INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

DENTINA ERODIDA E SUA REPARAÇÃO ATRAVÉS DE PASTAS DESSENSIBILIZANTES - ESTUDO IN VITRO

Trabalho submetido por
Solange Helena Azevedo Fernandes dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

DENTINA ERODIDA E SUA REPARAÇÃO ATRAVÉS DE PASTAS DESSENSIBILIZANTES – ESTUDO IN VITRO

Trabalho submetido por

Solange Helena Azevedo Fernandes dos Santos

para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Carla Ascenso

e coorientado por

Prof. Doutora Ana Cristina Manso

Prof. Doutora Patrícia Carvalho

setembro de 2017

Clique aqui para introduzir DEDICATÓRIA.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Carla Ascenso pelo rigor científico e constante apoio nas mais pequenas incertezas e maiores dúvidas.

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso pela constante disponibilidade, brio e principalmente pela boa disposição e todas as palavras de motivação ao longo da realização deste trabalho de investigação.

À Prof. Doutora Patrícia Carvalho e ao *Center of Physics and Engineering of Advanced Materials* do Instituto Superior Técnico pela disponibilização de materiais e partilha de conhecimento.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, pela disponibilização do laboratório de Biomateriais e constante vontade de conhecer, ajudar e ensinar.

Ao ISCSEM, palco de 5 anos de uma aprendizagem de excelência que enaltecerei e agradecerei sempre.

Aos meus pais, que sempre me motivaram a ir mais longe e que permitiram a realização deste sonho. Palavras não chegam para vos agradecer.

Às minhas irmãs, cuja admiração é a grande motivação de todas as minhas conquistas. Esta vitória é nossa e espero que vos inspire a conquistar o mundo.

Ao Ivo, o meu porto seguro e o melhor que a Egas Moniz me deu.

À Joana, parceira desde o primeiro dia da minha vida académica e com quem cresci muito nestes 5 anos de desafios, derrotas, vitórias e conquistas.

RESUMO

Objetivos: Medir e comparar a microdureza e microscopia de superfície de dentina erodida, quando exposta a distintas pastas dentífricas dessensibilizantes.

Materiais e métodos: 144 fragmentos de dentina humana, foram divididos em dentina superficial (n=72) e profunda (n=72) e aleatoriamente distribuídos em 6 grupos (n= 24): Grupo A – dentina sã; Grupo B – desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60s); Grupos C-F – desafio erosivo intrínseco seguido de escovagem bidiária, durante 7 dias com diferentes pastas dessensibilizantes: pasta de arginina (Grupo C); pasta de arginina seguida de aplicação tópica de pasta de arginina (Grupo D); pasta de fluoreto de estanho (Grupo E); pasta de cloreto de estrôncio (Grupo F). Usou-se microdureza Vickers e microscopia eletrónica de varrimento para avaliação da superfície. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* (intervalo de confiança: 95%) para análise estatística.

Resultados: Valores de microdureza na dentina superficial: Grupo A – 145,94±21,29 HV; Grupo B – 77,46±7,72 HV; Grupo C – 78,11±8,18 HV; Grupo D – 101,19±17,77 HV; Grupo E – 62,87±8,63 HV; Grupo F – 98,41±9,17 HV**.** Microscopicamente, observou-se oclusão parcial e heterogénea dos túbulos dentinários nos grupos C, D e F. Valores de microdureza na dentina profunda: Grupo A – 93,35±17,14 HV; Grupo B – 76,51±7,87 HV; Grupo C – 68,51±5,93 HV; Grupo D – 98,58±20,10 HV; Grupo E – 72,16±7,95 HV; Grupo F – 84,79±18,04 HV. Observou-se oclusão parcial dos túbulos nos grupos C, E e F e oclusão total no D.

Conclusão: Apenas a aplicação tópica de pasta à base de arginina e a escovagem com pasta de estrôncio permitiram um aumento da microdureza. Todas as pastas, exceto aquela à base de fluoreto de estanho, permitiram alguma oclusão dentinária. A aplicação tópica de pasta de arginina permitiu oclusão total dos túbulos na dentina profunda.

Palavras-chave: Erosão, Perimólise, Dentina, Remineralização

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the surface microhardness and microscopic aspect of eroded superficial and deep dentin when exposed to desensitizing toothpastes.

Materials and methods: 144 human dentin fragments were divided in superficial dentin (n=72) and deep dentin (n=72) and distributed into 6 groups (n=24): Group A – sound dentin; Group B – intrinsic erosive challenge (HCl, pH 2,6, 60s);Groups C-F – intrinsic erosive challenge followed by brushing twice a day during 2 minutes for 7 days using different desensitizing toothpastes: arginine toothpaste (Group C); arginine toothpaste followed by topical application of arginine paste (Group D); stannous fluoride toothpaste (Group E); strontium chloride toothpaste (Group F). Vickers microhardness and scanning electron microscopy were used for surface evaluation. *One-way* ANOVA (with a 95% confidence interval) was used for statistical analysis.

Results: Microhardness values for superficial dentin: Group A – 145.94±21.29 HV; Group B – 77.46±7.72 HV; Group C – 78.11±8.18 HV; Group D – 101.19±17.77 HV; Group E – 62.87±8.63 HV; Group F – 98.41±9.17 HV. Microscopically, partial and heterogeneous occlusion of the dentinal tubules was observed in groups C, D and F. Microhardness values for deep dentin: Group A – 93.35±17.14 HV; Group B – 76.51±7.87 HV; Group C – 68.51±5.93 HV; Group D – 98.58±20.10 HV; Group E – 72.16±7.95 HV; Group F – 84.79±18.04 HV. Partial occlusion of the tubules was observed in groups C, E and F and total occlusion was observed in group D.

Conclusion: Only the topical application of arginine-based toothpaste and brushing with strontium toothpaste allowed an increase in surface microhardness. All toothpastes except for the stannous fluoride one allowed some degree of dentin occlusion. The topical application of arginine toothpaste allowed complete occlusion of the dentin tubules in deep dentin.

Keywords: Erosion, Perimolysis, Dentin, Remineralization

ÍNDICE GERAL

RESUMO 1
ABSTRACT 2
ÍNDICE GERAL 3
ÍNDICE DE FIGURAS 5
ÍNDICE DE TABELAS 11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS 13
INTRODUÇÃO 15
DENTINA 15
EROSÃO DENTÁRIA 16
Agentes etiológicos intrínsecos 17
Características clínicas 19
Classificação 19
Características histológicas e químicas 21
PASTAS DESSENSIBILIZANTES NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES EROSIVAS 22
Arginina 23
Estanho 24
Estrôncio 25
PERTINÊNCIA DO ESTUDO 25
OBJETIVOS 26
HIPÓTESE NULA 26
MATERIAIS E MÉTODOS 27
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 27
LOCAL DO ESTUDO 27
DESENHO DO ESTUDO 27
SELEÇÃO DA AMOSTRA 28
PREPARAÇÃO E SECÇÃO DOS DENTES 30
INDUÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO COM ÁCIDO CLORÍDRICO 33
APLICAÇÃO DE PASTAS DESSENSIBILIZANTES 33
ANÁLISE DE SUPERFÍCIE 36
Microdureza Vickers 36
Microscopia Eletrónica de Varrimento 38
RESULTADOS 41

DENTINA SUPERFICIAL 41
Microdureza de Vickers 41
Microscopia Eletrónica de Varrimento 45
DENTINA PROFUNDA 55
Microdureza de Vickers 55
Microscopia Eletrónica de Varrimento 60
DISCUSSÃO 71
REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA SUPERFICIAL 72
Arginina 72
Estanho 73
Estrôncio 74
REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA PROFUNDA 75
Arginina 75
Estanho 76
Estrôncio 76
LIMITAÇÕES 77
PERSPETIVAS FUTURAS 78
CONCLUSÕES 79
BIBLIOGRAFIA 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do desenho do estudo 29
Figura 2. Micrótomo de tecidos duros Accutom50 30
Figura 3. Dente montado em suporte acrílico com cera colante 30
Figura 4. Dois cortes no sentido vestibulo-lingual, excluindo o esmalte mesial e distal 31
Figura 5. Dois cortes no sentido mesio-distal, excluindo o esmalte vestibular e lingual 31
Figura 6. Três cortes no sentido cervico-oclusal, excluindo raiz e esmalte oclusal e obtendo-se, assim, um fragmento de dentina superficial e outro de dentina profunda 32
Figura 7. Fragmento 3x4 mm 32
Figura 8. Polimento de espécimen após corte 32
Figura 9. Ácido clorídrico 33
Figura 10. (A) Escova elétrica utilizada na aplicação das pastas dentífricas dessensibilizantes (Oral-B™ Vitality, Braun) e (B) Imagem do processo de escovagem dos espécimenes com a escova elétrica 33
Figura 11. Pasta dentífrica à base de arginina (Colgate™ Sensitive Pro-Relief) 34
Figura 12. (A) Pasta de aplicação tópica à base de arginina (Colgate™ Sensitive Pro-Relief – Sensitivity Relief Pen) e (B) Pormenor da metodologia adotada para a sua aplicação sobre os espécimenes 35
Figura 13. Pasta dentífrica à base de fluoreto de estanho (Oral-B™ Pro-Expert – Professional Protection) 35
Figura 14. Pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio (Sensodyne ™ Classic) 35
Figura 15. Vickers Hardness Tester - HSV 30T 37
Figura 16. Exemplo de indentação no teste de microdureza de Vickers 37
Figura 17. Esquema ilustrativo da preparação das amostras para MEV 39
Figura 18. Espécimenes montados em suporte de alumínio com cola de carbono 40
Figura 19. Imagem do Microscópio Eletrónico de Varrimento utilizado neste trabalho (JEOL JSM-700001F Schottky Emission Scaning Electron Microscope) 40
Figura 20. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina superficial (output da análise descritiva recorrendo ao software SPSS) 42
Figura 21. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 1000x 45

Figura 22 Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 5000x, observando-se as fibras de colagénio no interior dos túbulos 45
Figura 23. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 10000x, observando-se as fibras de colagénio no interior dos túbulos 46
Figura 24. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 1000x 46
Figura 25. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 5000x. É evidente a desorganização e depressão das fibras no interior dos túbulos: e um halo de remineralização na dentina peritubular que sugere que se manteve parte desta dentina 47
Figura 26. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 10000x, sendo evidente a desorganização e depressão das fibras no interior dos túbulos e um halo de remineralização na dentina peritubular que sugere que se manteve parte desta dentina 47
Figura 27. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x 48
Figura 28. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 5000x. Observa-se uma oclusão parcial dos túbulos e, novamente, um halo de mineralização 48
Figura 29. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x. Destaque para um túbulo dentinário ocluído. 49
Figura 30. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 1000x 49
Figura 31. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 5000x. Observam-se vários túbulos com grande oclusão. 50
Figura 32. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulos com grande oclusão. 50

Figura 33. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Ao contrário dos anteriores grupos de estudo, observam-se os túbulos dentinários abertos. 51
Figura 34. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Observam-se túbulos dentinários abertos e partículas de sílica depositadas. 51
Figura 35. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Destaque para as partículas de sílica depositadas e desorganização das fibras no interior dos túbulos. 52
Figura 36. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos. 52
Figura 37. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos e fibras desorganizadas no interior dos túbulos. 53
Figura 38. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos e fibras desorganizadas no interior dos túbulos. 53
Figura 39. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina profunda (output da análise descritiva recorrendo ao software SPSS) 56
Figura 40. Gráfico de dispersão dos valores médios de microdureza de Vickers, obtidos com as amostras de dentina profunda. A azul encontram-se os valores médios das 5 indentações realizadas em cada espécimen e a laranja o valor médio estimado para o grupo/amostra. 59
Figura 41. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 1000x 60
Figura 42. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 5000x. Destaque para o elevado número de túbulos expostos 60
Figura 43. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 10000x. Destaque para o elevado número de túbulos expostos 61

Figura 44. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 1000x. Observa-se um halo de mineralização na região peritubular, sugerindo que se manteve parte desta dentina após o desafio erosivo 61
Figura 45. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 5000x. Destaque para a desorganização das fibras no interior dos túbulos e halos de mineralização. 62
Figura 46. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 10000x. Destaque para a desorganização das fibras no interior dos túbulos e halos de mineralização. 62
Figura 47. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x 63
Figura 48. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 5000x. Observam-se vários túbulos com oclusão parcial e, novamente, halos de mineralização. 63
Figura 49. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulo dentinário com obturação extensa..... 64
Figura 50. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 1000x. Apenas se observam as depressões dos túbulos dentinários, com grande homogeneidade na oclusão tubular..... 64
Figura 51. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 5000x. Destaque para túbulos dentinários totalmente ocluídos e partículas de titânio na superfície..... 65
Figura 52. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulos dentinários totalmente ocluídos e partículas de titânio na superfície..... 65
Figura 53. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. 66
Figura 54. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 5000x. Observam-se alguns túbulos dentinários

com oclusão parcial e partículas de sílica depositadas e, novamente, halos de mineralização. 66
Figura 55. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 10000x. Destaque para alguns túbulos dentinários com oclusão parcial e partículas de sílica depositadas. 67
Figura 56. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. 67
Figura 57. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 5000x. Observam-se as fibras no interior dos túbulos e partículas de titânio depositadas..... 68
Figura 58. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 10000x. Destaque para as fibras no interior dos túbulos..... 68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Eccles (Joshi et al., 2016) 19
Tabela 2 BEWE – Classificação por sextante (Carvalho et al., 2015) 20
Tabela 3 BEWE – Abordagem Clínica (Carvalho et al., 2015)..... 20
Tabela 4. Composição da saliva artificial (Urban et al., 2009)..... 34
Tabela 5. Composição das pastas dentífricas dessensibilizantes em estudo..... 36
Tabela 6. Estatística descritiva dos grupos de estudo A-F: dentina superficial (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS) 41
Tabela 7. Teste de normalidade - dentina superficial 42
Tabela 8. Teste da homogeneidade das variâncias dos grupos de dentina superficial (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)..... 43
Tabela 9. Teste ANOVA a um fator aplicado aos grupos de dentina superficial para análise da diferença entre grupos (output obtido pelo sofware de análise estatística SPSS..... 43
Tabela 10. Teste de contrastes aplicado a pares de grupos de dentina superficial (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS, adaptado para mostrar apenas os resultados relativos a amostras não homogéneas)..... 44
Tabela 11. Teste de Games-Howell de comparações múltiplas aplicado aos grupos de dentina superficial (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS) 44
Tabela 12. Imagens de microscopia eletrónica de varrimento da dentina superficial 54
Tabela 13. Estatística descritiva dos grupos de estudo A-F: dentina profunda (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS) 55
Tabela 14. Teste de normalidade - dentina profunda..... 56
Tabela 15. Teste da homogeneidade das variâncias dos grupos de dentina profunda (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)..... 57
Tabela 16. Teste ANOVA a um fator aplicado aos grupos de dentina profunda para análise da diferença entre grupos (output obtido pelo sofware de análise estatística SPSS 57
Tabela 17. Teste de Games-Howell de comparações múltiplas aplicado aos grupos de dentina profunda (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS, adaptado para mostrar na última coluna o resultado da análise de cada

comparação, para uma visualização mais simples da incongruência matemática dos resultados obtidos) 58
Tabela 18 Imagens de microscopia eletrónica de varrimento da dentina profunda..... 69
Tabela 19 Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento da dentina profunda..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

º graus

ºC graus Celsius

BEWE Índice para avaliação do desgaste erosivo (*Basic Erosive Wear Evaluation*)

$Ca(SnF_3)_2$ Fluoreto de cálcio estanoso

Ca^{2+} Ião cálcio

$CaCl_2$ cloreto de cálcio

CaF_2 Fluoreto de cálcio

CO_3^{2-} Ião carbonato

EFCD Federação Europeia de Medicina Dentária Conservadora (*European Federation of Conservative Dentistry*)

Fig. Figura

g Gramas

GPa Gigapascal

H^+ Ião hidrogénio

HAp Hidroxiapatite

HCl Ácido clorídrico

HMDS Hexametildisilazano

HV Número Vickers (*Hardness Vickers*)

KCl Cloreto de potássio

MEV Microscopia eletrónica de varrimento

Mg^{2+} Ião magnésio

min Minutos

ml Mililitros

mm Milímetros

mM Milimolar

N Newton

Na^+ Ião sódio

$Na_2S•9H_2O$ Sulfito de sódio nano-hidratado

NaCl Cloreto de sódio

$NaH_2PO_4·2H_2O$ di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado

OH^- Ião hidróxido

PO_4^{3-} Ião fosfato

ppm partes por milhão

RDA Abrasividade relativa da dentina (*Relative Dentin Abrasivity*)

s segundos

Sn_2OHPO_4 Hidróxido fosfato estanoso

$Sn_3F_3PO_4$ Fosfato de flúor estanoso

INTRODUÇÃO

A erosão dentária tem vindo a ganhar importância no âmbito da Medicina Dentária pela sua crescente prevalência (Carvalho, et al., 2015).

Com a diminuição do edentulismo e preservação das peças dentárias durante mais tempo, os tecidos dentários ficam mais suscetíveis a fenómenos de erosão. Estes têm origem na diminuição abrupta do pH oral relacionada com hábitos dietéticos ou distúrbios gastroesofágicos e comportamentais, situações que levam, por mecanismos próprios, a lesões erosivas dos tecidos dentários. Estas patologias, que provocam contacto do ácido gástrico com a cavidade oral, merecem especial atenção uma vez que as características deste composto podem desencadear lesões mais graves (Moazzez & Bartlett, 2014; Kanzow, Wegehaupt, Attin, & Wiegand, 2015; Frencken, et al., 2017).

Além disso, lesões mais severas e situações como recessão gengival traduzem-se numa maior exposição dentinária, tecido mais vulnerável a este tipo de lesões (Algarni, Lippert, & Hara, 2015; Carvalho, et al., 2015; Frencken, et al., 2017). A erosão dentinária, especificamente, tem particular interesse pois a sua taxa de desmineralização é mais rápida que a do esmalte e está associada a sintomatologia – hipersensibilidade dentinária (Poggio, Lombardini, Vigorelli, Colombo, & Chiesa, 2012; Kanzow et al., 2015). Assim, importa encontrar soluções eficazes de fácil utilização que previnam este tipo de lesão, protejam os tecidos dentários e, mais ainda, tenham a capacidade de reparar estas lesões erosivas.

DENTINA

A dentina, tecido duro do dente, é composta por aproximadamente 33% de matéria orgânica (maioritariamente colagénio), 21% de água, que lhe confere uma porosidade superior à do esmalte, e 47% de matéria inorgânica, composta por hidroxiapatite (HAp) biológica - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ - e intimamente relacionada com a sua componente orgânica. Dada a sua composição, a microdureza e módulo de elasticidade da dentina (57-60 HV e 11,7 GPa, respetivamente) são mais baixos que os do esmalte (294-400 HV e 33,6 GPa, respetivamente) (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013; Ganss, Lussi, & Schlueter, 2014).

A hidroxiapatite biológica, explicam Shellis, Featherstone e Lussi (2014), é designada não estequiométrica uma vez que iões da sua forma cristalina são substituídos, na sua formação, por outros – ocorre, por exemplo, a substituição de PO_4^{3-} ou OH^- por

CO_3^{2+} 2e Ca^{2+} por Na^{+} e Mg^{2+}, o que se traduz numa maior solubilidade. Assim, explicam ainda, os principais componentes da porção inorgânica são cálcio (26,9%), fósforo (13,2%), carbonato (4,6%), sódio (0,6%), magnésio (0,8%), cloro (0,06%) e potássio (0,02%).

A porção orgânica é, por sua vez, composta por 90% de colagénio. Durante a génese da dentina, explicam os mesmos autores, este funciona como matriz para deposição mineral tanto entre as fibras como no seu interior, o que resulta naquilo que se designa dentina peritubular e intratubular, respetivamente (Shellis et al., 2014).

Na região mais próxima da polpa, isto é, na dentina profunda existem 4 vezes mais túbulos do que nas zonas mais externas e o diâmetro dos mesmos ronda os 3-4mm, enquanto na dentina superficial se encontram túbulos de 1 mm. Além disso, o rácio de conteúdo orgânico e inorgânico varia à medida que se avança apicalmente, tendo a dentina profunda maior conteúdo orgânico e uma hidroxiapatite menos cristalina, mais suscetível a trocas iónicas (Garberoglio & Brannstrom, 1976; Pashley, 1986; Shellis, Featherstone, & Lussi, 2014; Seyedmahmoud, McGuire, Wang, Thiagarajan, & Walker, 2017).

EROSÃO DENTÁRIA

A erosão dentária é definida pela *European Federation of Conservative Dentistry* (EFCD) como "um processo químico-mecânico, não causado por bactérias, que resulta na perda cumulativa de tecido dentário duro" (Carvalho, et al., 2015, p. 1558). Este fenómeno resulta de vários episódios de breve exposição a ácido (Shellis et al., 2014).

Estudos epidemiológicos demonstram que a erosão dentária é uma condição comum de prevalência crescente, principalmente em grupos mais jovens. Sociedades desenvolvidas, nomeadamente na Europa, têm prevalência elevada deduzindo-se que este tipo de desgaste dentário está relacionado com alterações no estilo de vida e hábitos nutricionais, nomeadamente com o aumento do consumo de alimentos ácidos. Em relação à sua distribuição, não se observam diferenças no envolvimento de dentes decíduos e permanentes e as lesões apresentam-se mais frequentemente nas faces oclusais e vestibulares de todos os dentes, bem como nas superfícies palatinas dos dentes maxilares. O esmalte é o tecido mais frequentemente afetado pela erosão dentária, no entanto fatores como a diminuição do edentulismo e um maior número de situações de recessão gengival

resultam numa maior quantidade de casos de exposição da dentina e, com isso, de erosão dentinária (Jaeggi & Lussi, 2014; Algarni, et. al, 2015).

Os ácidos responsáveis pela erosão dentária podem ser de origem endógena ou exógena, o que resulta em aspetos clínicos distintos e permite classificar as lesões em intrínsecas ou extrínsecas. Na perimólise, isto é, quando a lesão ocorre por contacto do ácido gástrico (HCl) com a superfície dentária, observam-se normalmente lesões nas faces palatinas e oclusais dos dentes. Por outro lado, as lesões erosivas de origem extrínseca surgem, em primeira instância, nas faces vestibulares de dentes anteriores, tendo como fator etiológico fontes alimentares (bebidas gaseificadas, citrinos, vinagre, vinho, entre outros), medicamentosas (ácido acetilsalicílico, suplementos de ferro/vitamina C) ou exposição ocupacional, que afeta, por exemplo, enólogos, trabalhadores industriais e nadadores (Moazzez & Bartlett, 2014; Kanzow et al., 2015).

Agentes etiológicos intrínsecos

O principal agente etiológico intrínseco, foco do presente estudo, é o ácido gástrico, que atinge a cavidade oral em situações como refluxo gastroesofágico – movimento retrógrado do conteúdo gástrico pelo esfíncter esofágico inferior –, distúrbios alimentares, abuso de álcool ou outras situações, como é o caso, por exemplo, da gravidez. Assim, a erosão dentária intrínseca é geralmente caracterizada por uma exposição intermitente e por curtos períodos de tempo ao ácido gástrico, ao longo de semanas ou meses (Kandanuru, Madhusudhana, Ramachandruni, Vitta, & Babu, 2016).

Uma vez que o ácido gástrico pode atingir valores de pH abaixo de 1, valor muito inferior ao pH crítico do esmalte e da dentina, o seu contacto com a cavidade oral resulta num quadro de erosão dentária. Além disso, trata-se de um ácido forte com elevada capacidade de dissociação. Tendo, então, em conta que o pH do ácido gástrico é menor e a sua acidez titulável total é maior que a dos ácidos da dieta, isto é, tem maior capacidade de cedência de iões H+, a severidade das lesões erosivas é maior no caso de causas endógenas (Moazzez & Bartlett, 2014; Shellis et al., 2014).

Refluxo gastroesofágico

O esófago, explicam Moazzez & Bartlett (2014), tem como função major a coordenação da passagem de sólidos e fluidos, isto é, do bolo alimentar desde a cavidade oral até ao estômago por meio de movimentos peristálticos, atravessando os esfíncteres

esofágicos superior, entre a faringe e o esófago, e inferior, entre o esófago e o estômago. Este último está relaxado aquando do fenómeno da digestão e a sua contração impede um movimento retrógrado do bolo alimentar. No entanto, sendo um esfíncter fisiológico e não anatómico, isto é, não sendo firme e estático, situações como relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior, incompetência do mesmo e distúrbios de motilidade podem resultar em refluxo gastroesofágico, ou seja, movimento retrógrado do conteúdo gástrico. Em condições de saúde, este refluxo é contrariado por movimentos peristálticos e neutralizado pelo tampão salivar, no entanto se existe um elevado número destes episódios e estes se traduzem num quadro clínico de azia e regurgitação, sintomas mais frequentes, fala-se em doença de refluxo gastroesofágico, definida por gastroenterologistas como "episódios em que o pH esofágico atinge valores abaixo de 4" (Moazzez & Bartlett, 2014, p. 184).

Distúrbios alimentares

Os distúrbios alimentares mais associados a sinais orais são a anorexia nervosa e a bulimia. A anorexia nervosa é definida como um distúrbio comportamental caracterizado por uma busca obsessiva pela magreza, resultando num emagrecimento extremo e patológico. Esta doença divide-se em dois grandes tipos, fluidos entre si – restritiva, caracterizada por uma limitação grave da alimentação, e purgativa, associada a uso de medicação e indução de vómito. Por outro lado, a bulimia é caracterizada por um descontrolo na alimentação associado, *a posteriori*, a uma indução de vómito com o objetivo de evitar ganho de peso. O paciente bulímico tem, regra geral, um peso normal mas esta patologia cruza-se, frequentemente, com a anorexia nervosa. Assim, tanto a anorexia nervosa purgativa como a bulimia podem resultar em lesões dentárias erosivas segundo o padrão de erosão intrínseca acima referido, o que coloca o médico dentista numa posição privilegiada no diagnóstico destas patologias (Antunes, Amaral, & Balbinot, 2007; Moazzez & Bartlett, 2014).

Abuso de álcool

Alguns pacientes que sofrem de alcoolismo crónico apresentam lesões dentárias erosivas cujo padrão indica que a sua causa major é intrínseca, isto é, resulta da regurgitação e/ou refluxo gastroesofágico causado pelo consumo de álcool. Por outro

lado, verifica-se também uma tendência destes pacientes para um maior consumo de alimentos ácidos (Moazzez & Bartlett, 2014).

Características clínicas

Na erosão intrínseca observa-se, clinicamente, uma perda inicial de brilho e um aspeto sedoso, envidraçado que evolui para concavidades nas superfícies lisas, primariamente nas faces palatinas dos incisivos superiores e, com a progressão da lesão, de pré-molares e molares. Em situações mais graves ocorre arrasamento das cúspides, sinal patognomónico de erosão dentária (Donovan & Swift, 2009), e são já afetadas as faces vestibulares dos dentes. Nos casos mais severos, toda a estrutura dentária pode ser perdida. A dentina mantém um aspeto duro, no entanto a perda de tecido inorgânico traduz-se numa diminuição da sua microdureza de superfície. Estas lesões podem traduzir-se em alterações estéticas, funcionais e/ou sintomas como hipersensibilidade dentinária (Moazzez & Bartlett, 2014; Shellis et al., 2014; Kanzow et al., 2015).

A hipersensibilidade dentinária é definida como uma resposta exagerada a um estímulo não prejudicial, ocorrendo uma dor localizada e muito aguda na sequência de estímulos químicos, térmicos, tácteis ou osmóticos. Esta dor é de curta duração e não tem consequências patológicas para o complexo pulpo-dentinário, isto é, não envolve alteração da pressão intrapulpar como ocorre na dor provocada por cárie ou inflamação pulpar. Pacientes que sofrem de hipersensibilidade dentinária relatam períodos de exacerbação e remissão (Berman, 1985; Borges, et al., 2012).

Classificação

Existem, para a classificação da erosão dentária, vários índices que relacionam critérios morfológicos e quantitativos. Eccles é responsável por um dos primeiros, que classifica a erosão de forma simples em uma de três classes, tendo em conta perda de estrutura e profundidade da lesão (Tabela 1) (Joshi, Joshi, Kathariya, Angadi, & Raikar, 2016).

Tabela 1. Classificação de Eccles (Joshi et al., 2016)

Classe I	Lesão superficial de esmalte
Classe II	Lesão localizada que afeta a dentina (<1/3 da superfície)
Classe III	Lesão generalizada que afeta a dentina (>1/3 da superfície)

Por outro lado, a *European Federation of Conservative Dentistry* (EFCD) refere, num *consensus report*, o *Basic Erosive Wear Examination* (BEWE) como um índice mais completo para classificação da erosão dentária, uma vez que cruza nível das lesões com abordagem clínica. Neste, a cavidade oral é dividida em sextantes, registando-se a lesão mais grave de cada um segundo critérios específicos (tabela 2). Uma vez classificado cada sextante, procede-se à soma de todos os valores, o que se traduzirá numa abordagem clínica (tabela 3) (Carvalho et al., 2015).

Tabela 2 BEWE – Classificação por sextante (Carvalho et al., 2015)

Classificação	Critérios
0	Sem desgaste erosivo
1	Início de perda da textura da superfície
2	Defeito visível; Perda de tecido duro <50%
3	Perda de tecido duro envolvendo ≥ 50% da área de superfície

Tabela 3 BEWE – Abordagem Clínica (Carvalho et al., 2015)

Nível de risco	Soma dos valores de todos os sextantes	Abordagem clínica
Ausente	≤ 2	Manutenção e observação de rotina Repetir a cada 3 anos
Baixo	3 – 8	Higiene oral, avaliação dietética e aconselhamento Manutenção e observação de rotina Repetir a cada 2 anos
Médio	9 – 13	Higiene oral, avaliação dietética e aconselhamento Identificar o(s) principal(is) fator(es) etiológico(s) para a perda de tecido e desenvolver estratégias para eliminar as respetivas consequências Considerar fluorterapia ou outras estratégias para aumentar a resistência das superfícies dentárias Modelos, fotografias ou impressões de silicone. Repetir a cada 6 a 12 meses
Elevado	≥ 14	Higiene oral, avaliação dietética e aconselhamento, Identificar o(s) principal(ais) fator(es) etiológico(s) para a perda de tecido e desenvolver estratégias para eliminar as respetivas consequências Considerar fluorterapia ou outras estratégias para aumentar a resistência das superfícies dentárias Idealmente, evitar restaurações e monitorizar o desgaste dos dentes com modelos de estudo, fotografias ou impressões de silicone. Em casos de progressão grave considerar cuidados especiais, que podem envolver restaurações Repetir a cada 6 a 12 meses

Características histológicas e químicas

Embora pouco se conheça sobre a histologia da erosão dentária, sabe-se que as características histológicas da dentina erodida são bastante diferentes das do esmalte. Em condições experimentais, após ataque ácido da dentina verifica-se uma dissolução acídica da sua porção mineral, enquanto a porção orgânica é desmineralizada sem, no entanto, haver perda de estrutura (Ganss et al., 2014). A dissolução da porção inorgânica, especificamente da dentina peritubular, traduz-se, microscopicamente, num aumento do diâmetro dos túbulos dentinários (Poggio et al., 2012).

Porção orgânica

Em estudos *in vitro* observou-se que, perante um ataque ácido, se obtém uma matriz orgânica desmineralizada, sem que haja perda de estrutura. Quanto maior o tamanho desta matriz desmineralizada, isto é, quanto maior a distância entre superfície dentinária e frente de desmineralização, menor vai ser a perda mineral. Isto traduz-se numa desmineralização cada vez menor, se mantido o estímulo erosivo (Ganss et al., 2014). No entanto, isto não corresponde na totalidade ao que acontece *in vivo* – em estados ativos, esta matriz é muito fina ou até ausente devido à presença de colagenases e enzimas proteolíticas que, uma vez que a desmineralização ocorre mais lentamente do que *in vitro*, conseguem destruí-la gradualmente. Além disso, a abrasão normal da escovagem dentária contribui para a destruição desta camada superficial de dentina desmineralizada (Shellis et al., 2014).

Porção inorgânica

Relativamente à porção inorgânica da dentina, Shellis et al. (2014) desconstroem, numa revisão bibliográfica, o seu processo de dissolução:

Quando um sólido é submerso numa solução, forma-se uma interface onde ocorre troca de iões em ambas as direções, no sentido do equilíbrio. Quando estamos a falar de erosão dentária intrínseca, observam-se trocas de iões Ca^{2+}, PO_4^{3-} e OH^- da hidroxiapatite com H^+ proveniente do HCl. Ocorre, portanto, uma reação de desmineralização na superfície dentinária:

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20HCl \rightarrow 10CaCl_2 + 6H_3PO_4 + 2H_2O$$

Os autores referem alguns fatores que promovem a dissolução da estrutura dentinária:

- taxa de fluxo da solução, que irá alterar o equilíbrio na interface e assim promover as trocas iónicas;
- subsaturação da solução relativamente à dentina, ou seja, concentração baixa de cálcio, fosfato ou ambos, sendo que quanto mais díspares as concentrações, maior será a taxa de dissolução;
- pH, que quando está à volta de 5 se traduz numa taxa de dissolução baixa e, em valores menores, a acelera manifestamente.

Por outro lado, a presença de flúor ou outros fatores inibidores da dissolução, como estaterina, pirofosfato e magnésio, podem reduzir este fenómeno mesmo em situações de subsaturação (Shellis et al., 2014).

É de realçar que a hidroxiapatite na dentina tem mais carbonatos do que a do esmalte, o que se traduz numa desmineralização mais rápida (Poggio et al., 2012).

PASTAS DESSENSIBILIZANTES NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES EROSIVAS

Vários autores tentaram já explicar o mecanismo da hipersensibilidade, existindo quatro grandes teorias. A teoria da modulação ou estimulação neural direta sugere que a dor ocorre por estimulação direta de terminações nervosas existentes na dentina. Por outro lado, a teoria da transdução odontoblástica defende a existência de sinapses entre os odontoblastos e as terminações nervosas. Por fim, a teoria da vibração sugere que, aquando de um estímulo, há uma vibração dos odontoblastos que leva a estimulação das fibras nervosas na polpa. A teoria hidrodinâmica de Brannstrom é, porém, a mais aceite hoje em dia. Esta sugere que um estímulo externo leva ao movimento do fluido dentinário no sentido da polpa, estimulando assim terminações nervosas na camada odontoblástica da dentina (Berman, 1985).

Assim, Yang et al. (2016) explicam que, para o tratamento da hipersensibilidade dentária, existem dois tipos de pastas dessensibilizantes, diferentes no seu mecanismo de ação:

- Dentífricos à base de sais de potássio, que atuam causando despolarização da condução nervosa, inibindo, assim, a estimulação e, com isso, a dor;

- Dentífricos que bloqueiam o mecanismo hidrodinâmico por oclusão dentinária; embora não tão utilizados, têm como vantagem a sua rápida atuação na redução da dor (Gillam & Orchardson, 2006).

Estes últimos têm, por vários motivos, interesse em quadros de erosão dentária.

Por um lado, criam precipitados resistentes a novos ataques ácidos, demonstrando potencial não só na redução da hipersensibilidade mas também no controlo da progressão da lesão erosiva que poderá estar na sua etiologia (Schlueter, Jaeggi, & Lussi, 2012; Yang, Wang, Lu, Li, & Zhou, 2016).

Além disso, teoriza-se que a remineralização da dentina implica deposição de cristais perdidos ou precipitação de outros no interior dos túbulos, por exposição a solução sobressaturada de cálcio e fosfato. Uma remineralização completa leva a recuperação da resistência mecânica e a posteriores desafios erosivos. Estudos *in vitro* já demonstraram a possibilidade da remineralização parcial, no entanto *in vivo* a remineralização é afetada por fatores como a baixa saturação da saliva e presença de inibidores – fosfoproteínas – da precipitação de fosfato de cálcio (Shellis et al., 2014). O presente estudo desafia-nos a olhar para o evento da oclusão dentinária induzida por agentes químicos existentes nas pastas dessensibilizantes e para a criação destas condições para remineralização.

Arginina

Os aminoácidos nas proteínas não colagénicas da matriz extracelular, como é o caso da arginina, têm a capacidade de, ao ligar-se a superfícies, veicular iões cálcio e fosfato. Por este motivo, pastas à base de arginina têm propriedades dessensibilizantes e potencial na remineralização dos tecidos dentários. (Singh, 2013; Tavafoghi & Cerruti, 2016)

Na hipersensibilidade dentinária, este aporte iónico permite redução da sintomatologia, ao formar-se uma camada protetora de fosfato de cálcio e glicoproteínas salivares sobre os túbulos dentinários, mecanismo que as pastas dessensibilizantes à base de arginina visam mimetizar e acelerar – obtém-se, através da associação de arginina com carbonato de cálcio, um depósito com elevados níveis de carbonato de cálcio, fosfato, glicoproteínas salivares e arginina, cuja carga positiva a pH fisiológico (6,5-7,5) permite a ligação deste complexo à superfície dentinária, à qual a hidroxiapatite confere carga negativa (Singh, 2013).

Este mecanismo demonstra, igualmente, potencial na remineralização de lesões de erosão dentária. Ao atrair iões de cálcio e fosfato, a arginina gera uma zona de

sobressaturação que potenciará a remineralização, com formação de cristais de hidroxiapatite (Tavafoghi & Cerruti, 2016).

Estanho

O fluoreto de estanho é um composto com vasta aplicação na saúde oral, inclusivamente no âmbito da hipersensibilidade dentinária e prevenção de erosão dentária.

Embora não exista consenso quanto à eficácia deste composto na oclusão dentinária, alguns estudos defendem que o fluoreto de estanho tem a capacidade de aliviar os sintomas de hipersensibilidade, ao formar depósitos à base de hidróxido fosfato estanoso (Sn_2OHPO_4), fosfato de flúor estanoso ($Sn_3F_3PO_4$, fluoreto estanoso de cálcio ($Ca(SnF_3)_2$) e fluoreto de cálcio (CaF_2) no interior dos túbulos, mesmo em concentrações baixas. Este precipitado demonstrou ser resistente a novos ataques ácidos – um estudo de Algarni et al. (2015) verificou persistência desta camada durante 2 min depois de exposição a ácido cítrico a 1% (pH 2.3) – motivo pelo qual o fluoreto de estanho tem também indicação na prevenção de lesões erosivas (Ganss, Schlueter, Hardt, Schattenberg, & Klimek, 2008; Algarni, et al, 2015; Arnold, Prange, & Naumova, 2015). Teoriza-se que esta capacidade de proteção para lesões erosivas está dependente da presença de uma matriz orgânica desmineralizada e região subjacente intacta, às quais o estanho se liga (Huysmans, Young, & Ganss, 2012). Além disso, o fluoreto de estanho interage com proteínas salivares, nomeadamente a albumina (proteína hidrofílica da saliva), potenciando o seu efeito protetor contra a erosão embora não se compreenda, ainda, este mecanismo em profundidade (Hara, Lippert, & Zero, 2013).

Além da sua capacidade preventiva da erosão dentária, pensa-se que o fluoreto de cálcio no precipitado tem a capacidade de incorporar a hidroxiapatite, formando fluorohidroxiapatite. (Hove, Stenhagen, Mulic, Holme, & Tveit, 2015).

Estrôncio

O estrôncio é um composto de elevado potencial na saúde oral uma vez que, tal como o cálcio, é um ião bivalente, substituindo-o facilmente na hidroxiapatite (Saeki, Marshall, Gansky, Parkinson, & Marshall, 2016).

Perante uma desmineralização dentinária e escovagem com pasta dentífrica à base de estrôncio o que se observa é uma precipitação do sal de estrôncio (cloreto de estrôncio ou acetato de estrôncio + flúor) nos túbulos dentinários, bloqueando o mecanismo de hipersensibilidade e ocorrendo a ligação do estrôncio aos locais onde faltam cristais de cálcio. Forma-se, assim, cálcio-estrôncio-apatite – $Ca_6Sr_4(PO_4)_6(OH)_2$ – e esta incorporação de estrôncio na hidroxiapatite retarda a sua taxa de dissolução, funcionando como matriz para formação de novos cristais. Este estudo *in vitro* sugere, ainda, que a formação deste cristal é mais simples do que a da hidroxiapatite biológica (Saeki et al., 2016).

PERTINÊNCIA DO ESTUDO

A erosão dentária, de prevalência crescente nas sociedades desenvolvidas do século XXI, é responsável por alterações estéticas, funcionais e sintomatologia como hipersensibilidade dentinária. Por este motivo, tem vindo a estabelecer-se como uma das grandes preocupações atuais a nível de saúde oral (Jaeggi & Lussi, 2014; Kanzow et al., 2015). Embora a frequência de atingimento erosivo da dentina seja menor, lesões erosivas mais severas bem como situações como a recessão gengival, frequente por trauma de escovagem, levam a exposição dentinária, deixando este tecido cada vez mais suscetível a fenómenos de erosão e suas consequências (Algarni et al., 2015; Carvalho et al., 2015). Posto isto, é necessária uma busca de estratégias preventivas e de remineralização da dentina erodida.

A remineralização da dentina implica deposição de cristais no interior dos túbulos dentinários por exposição a solução sobressaturada, capacidade que pode ser oferecida por determinados produtos dessensibilizantes cujo modo de atuação passa pela oclusão dos túbulos dentinários (Shellis et al., 2014; Yang et al., 2016). Assim, o presente estudo visa investigar a capacidade de várias pastas dessensibilizantes na reparação da dentina erodida.

OBJETIVOS

1) Medir e comparar a microdureza da dentina superficial após a indução de um desafio erosivo intrínseco e posterior utilização de diferentes estratégias de remineralização com pasta dentífrica dessensibilizante:

a) fluoretada à base de arginina;

b) fluoretada à base de arginina seguida de aplicação tópica de pasta dessensibilizante de arginina;

c) à base de fluoreto de estanho;

d) à base de estrôncio;

2) Medir e comparar a microdureza da dentina profunda após a indução de um desafio erosivo intrínseco e posterior utilização de diferentes estratégias de remineralização com pasta dentífrica dessensibilizante:

a) fluoretada à base de arginina;

b) fluoretada à base de arginina seguida de aplicação tópica de pasta dessensibilizante de arginina;

c) à base de fluoreto de estanho;

d) à base de estrôncio;

3) Caracterizar microscopicamente as amostras de dentina superficial e profunda dos vários grupos de estudo.

HIPÓTESE NULA

No presente estudo foram equacionadas as seguintes hipóteses nulas:

- Não existem diferenças quantitativas de microdureza na dentina erodida, superficial e profunda, quando se compara a aplicação de distintas pastas dentífricas dessensibilizantes;
- Não existem diferenças qualitativas na caracterização microscópica da dentina erodida, superficial e profunda, quando se compara a aplicação de distintas pastas dentífricas dessensibilizantes;

MATERIAIS E MÉTODOS

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz. Os dentes foram fornecidos pelo banco de dentes da Clínica Dentária Egas Moniz, após assinatura de consentimento informado por sujeitos dadores anónimos, e preservados em solução de cloramina T a 1 %, durante 1 semana, e água destilada a 4ºC, por não mais de 6 meses (ISO/TS 11405:2015).

LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no laboratório de Biomateriais do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, entre junho e julho de 2017. A análise por microscopia eletrónica de varrimento foi efetuada no Laboratório de Microscopia Eletrónica do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa em julho de 2017.

DESENHO DO ESTUDO

Foi efetuado um estudo observacional e analítico em 36 molares humanos intactos, livres de cáries e fraturas, obtidos de sujeitos anónimos. Destes, resultaram 144 fragmentos de dentina (72 de dentina superficial e 72 de dentina profunda) que foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, cada um deles dividido em 2 subgrupos – dentina superficial (n=12) e dentina profunda (n=12):

Grupo A (n=24) – controlo: não foi submetido a nenhum procedimento de desmineralização ou remineralização, correspondendo a amostras de dentina sã;

Grupo B (n=24) – controlo: foi apenas submetido a desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60 s);

Grupo C (n=24): após desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60 s) os especímenes foram escovados 2 vezes por dia durante 2 min ao longo de 7 dias com escova elétrica pasta dentífrica fluoretada à base de arginina;

Grupo D (n=24): após desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60 s) os especímenes foram escovados 2 vezes por dia durante 2 min ao longo de 7 dias com escova elétrica e pasta dentífrica fluoretada à base de arginina, seguida de aplicação tópica de pasta à base de arginina;

Grupo E (n=24): após desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60 s) os especímenes foram escovados 2 vezes por dia durante 2 min ao longo de 7 dias com escova elétrica e pasta dentífrica à base de fluoreto de estanho;

Grupo F (n=24): após desafio erosivo intrínseco (HCl, pH 2,6, 60 s) os especímenes foram escovados 2 vezes por dia durante 2 min ao longo de 7 dias com escova elétrica e pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio.

20 especímenes de cada grupo (10 de dentina superficial e 10 de dentina profunda) foram analisados quanto à Microdureza de Vickers (Vickers Hardness Tester – HSV-30T, Shimadzu Corporation, Japão). Procedeu-se, também, à análise qualitativa de 4 especímenes de cada grupo (2 de dentina superficial e 2 de dentina profunda) através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV) (JEOL JSM-700001F Schottky Emission Scaning Electron Microscope),

O desenho do estudo está esquematizado na Figura 1.

SELEÇÃO DA AMOSTRA

Obtiveram-se, a partir de 36 molares, 144 fragmentos de dentina (72 de dentina superficial e 72 de dentina profunda). Para tal foram aleatoriamente selecionados 36 molares hígidos, isto é, íntegros, não cariados, livres de fraturas e que não tivessem sido submetidos a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos comtemplados na higiene dentária dos indivíduos. Por outro lado, foram excluídos aqueles com malformações, não íntegros, que tenham sido submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio, ou outros), ou eletromagnéticos (radiação laser). Esta seleção foi feita com recurso a lupa estereomicroscópica Leica TM MZ6 (Leica, Germany).

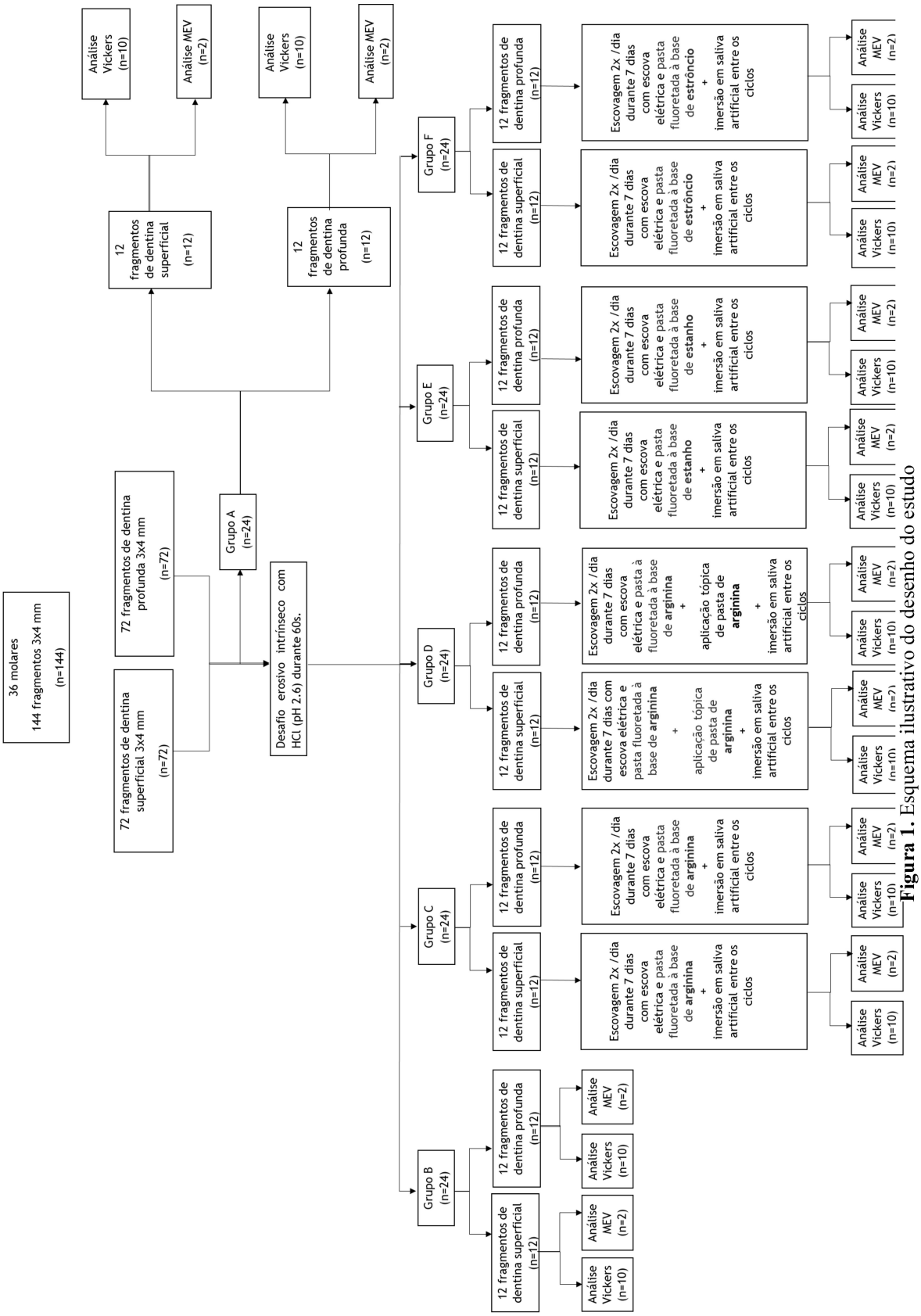


Figura 1. Esquema ilustrativo do desenho do estudo

PREPARAÇÃO E SECÇÃO DOS DENTES

Uma vez selecionados os dentes, procedeu-se, em primeira instância, à limpeza das superfícies dentárias utilizando-se curetas Gracey 3/4 e 5/6 para remoção de cálculo e restos de ligamento periodontal (Caneppele, Jeronymo, Di Nicoló, de Araújo, & Soares, 2012).

Utilizou-se, para a secção dos dentes, um micrótomo de tecidos duros – Accutom50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig. 2) –, obtendo-se um total de 144 fragmentos de 4x3mm – 72 especímenes de dentina superficial e 72 de dentina profunda. Para tal, os dentes foram montados sobre um suporte acrílico com cera colante, como exemplificado na figura 3.



Figura 2. Micrótomo de tecidos duros Accutom50



Figura 3. Dente montado em suporte acrílico com cera colante

Para obter estes fragmentos de dentina superficial e profunda fizeram-se, então, dois cortes no sentido vestíbulo-lingual (Fig. 4), seguidos de dois cortes no sentido mesio-distal (Fig. 5), de modo a excluir o esmalte axial. De seguida, fizeram-se 3 cortes no sentido cervico-oclusal, excluindo raiz e esmalte oclusal e obtendo-se, assim, dois fragmentos de 1,25 mm de espessura - dentina profunda e dentina superficial (Fig. 6). Os fragmentos foram marcados com verniz, deixando-se livres as faces a analisar – aquela orientada para oclusal no caso da dentina superficial e para cervical no caso da dentina profunda. Cada um destes foi, finalmente, dividido em 4 fragmentos de aproximadamente 3x4mm, obtendo-se 144 fragmentos semelhantes à Figura 7. Finalmente, os fragmentos foram polidos com discos de polimento de grão 500 e 800 conforme ilustrado na figura 8 (Struers TM, FEPA paper) (Fuentes, Toledano, Osorio, & Carvalho, 2003), de modo a remover irregularidades de superfície que se tenham mantido após o corte.

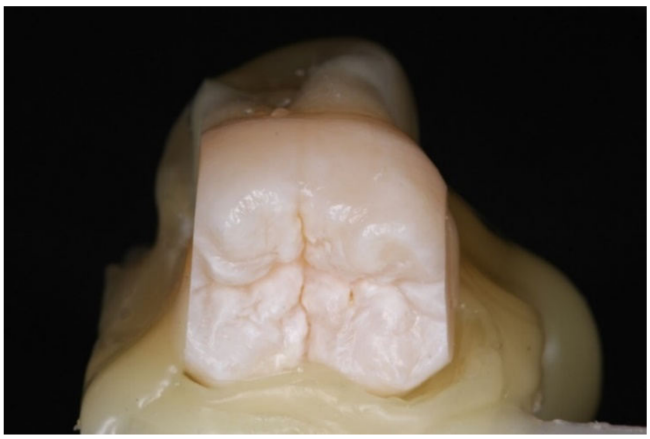


Figura 4. Dois cortes no sentido vestibulo-lingual, excluindo o esmalte mesial e distal

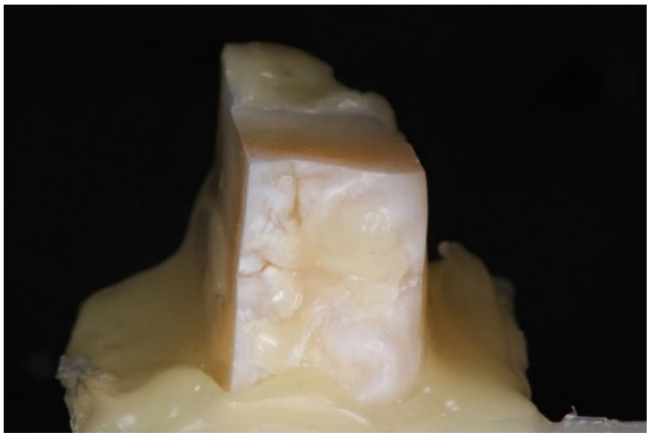


Figura 5. Dois cortes no sentido mesio-distal, excluindo o esmalte vestibular e lingual



Figura 6. Três cortes no sentido cervico-oclusal, excluindo raiz e esmalte oclusal e obtendo-se, assim, um fragmento de dentina superficial e outro de dentina profunda



Figura 7. Fragmento 3x4 mm



Figura 8. Polimento de espécimen após corte

INDUÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO COM ÁCIDO CLORÍDRICO

Os especímenes dos grupos B, C, D, E e F foram submetidos a desmineralização através de desafio erosivo em 1 ml de HCl, pH 2,6 (Fig. 9) durante 60 s, agitando-se ligeiramente o microtubo (180º, 60 rotações por minuto) seguido de lavagem com água destilada durante 15 s (Batista, Torres, Sener, Attin, & Wiegand, 2016). A imersão em HCl simula agente erosivo intrínseco (Aykut-Yetkiner, Attin, & Wiegand, 2014).

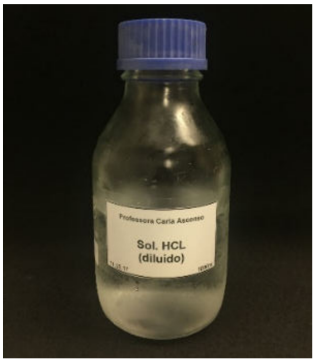


Figura 9. Ácido clorídrico

APLICAÇÃO DE PASTAS DESSENSIBILIZANTES

Nos grupos de estudo (C, D, E, F), os 24 especímenes foram, após o desafio erosivo, escovados duas vezes por dia durante 2 minutos, ao longo de 7 dias, com uma escova elétrica (Oral-B, Vitality, Braun) (Fig. 10A) conforme indicado na figura 10B, variando a pasta dentífrica dessensibilizante utilizada. Durante os ciclos de remineralização, os especímenes foram colocados numa solução de saliva artificial em estufa a 37ºC (Memmert INE 400, Memmert, Germany). A solução de saliva artificial possui um pH de 6,9-7 e a sua composição está indicada na tabela 4.

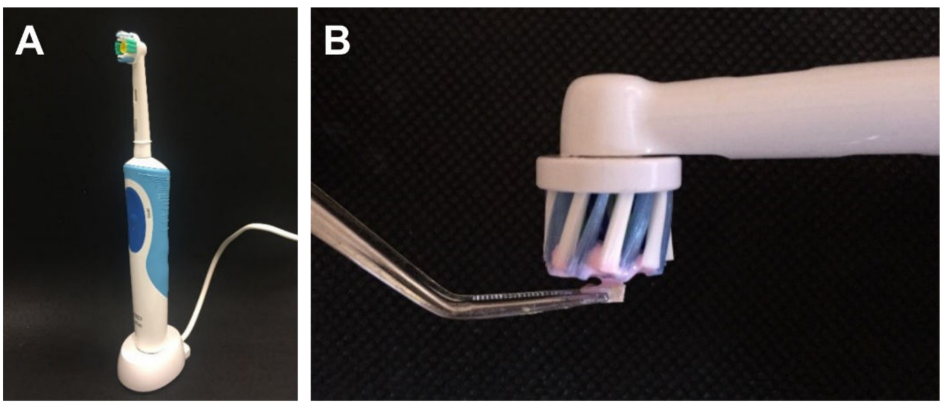


Figura 10. (A) Escova elétrica utilizada na aplicação das pastas dentífricas dessensibilizantes (Oral-B™ Vitality, Braun) e (B) Imagem do processo de escovagem dos espécimenes com a escova elétrica

Tabela 4. Composição da saliva artificial (Urban et al., 2009)

Composição	Concentração em solução aquosa (mM)
Sulfito de sódio nano-hidratado ($Na_2S•9H_2O$)	0,02
Cloreto de sódio (NaCl)	6,84
Cloreto de potássio (KCl)	5,36
Di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado ($NaH_2PO_4·2H_2O$)	4,42
Ureia	16,65
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	1,80
Água desionizada	-

Grupo C (n=24): Pasta dessensibilizante à base de arginina

A escovagem foi efetuada com pasta dentífrica fluoretada dessensibilizante à base de arginina (*Colgate*^{TM} *Sensitive Pro-Relief*) (Fig. 11), cujos componentes estão indicados na tabela 5.



Figura 11. Pasta dentífrica à base de arginina (*Colgate*^{TM} *Sensitive Pro-Relief*)

Grupo D (n=24): Pasta dessensibilizante à base de arginina + aplicação tópica de arginina

A escovagem foi, igualmente, efetuada com pasta dentífrica fluoretada dessensibilizante à base de arginina (*Colgate*^{TM} *Sensitive Pro-Relief*) (Fig. 11). Após cada escovagem, procedeu-se a aplicação tópica durante 1 minuto de pasta de arginina (*Colgate*^{TM} *Sensitive Pro-Relief – Sensitivity Relief Pen*) (Fig. 12A) conforme demonstrado na figura 12B. Os componentes desta pasta estão, também, indicados na tabela 5.

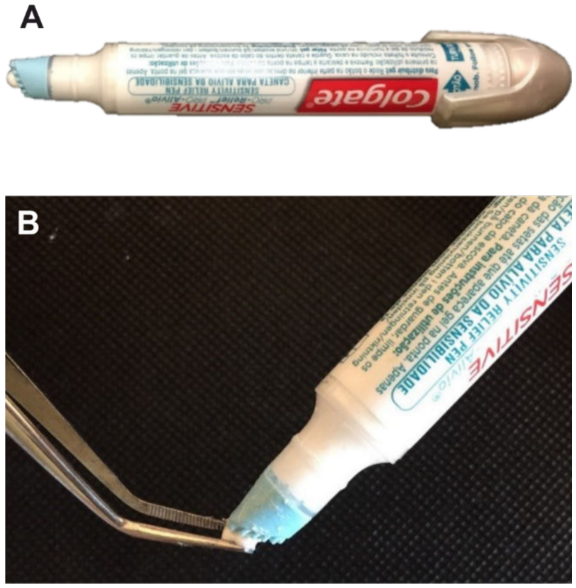


Figura 12. (A) Pasta de aplicação tópica à base de arginina (*Colgate*^{TM} *Sensitive Pro-Relief – Sensitivity Relief Pen*) e (B) Pormenor da metodologia adotada para a sua aplicação sobre os espécimenes

Grupo E (n=24): Pasta dessensibilizante à base de estanho

A escovagem foi efetuada com pasta dentífrica dessensibilizante à base de fluoreto de estanho (*Oral-B*^{TM} *Pro-Expert – Professional Protection*) (Fig. 13), cujos componentes estão indicados na tabela 5.



Figura 13. Pasta dentífrica à base de fluoreto de estanho (*Oral-B*^{TM} *Pro-Expert – Professional Protection*)

Grupo F (n=24): Pasta dessensibilizante à base de estrôncio

A escovagem foi efetuada com pasta dentífrica dessensibilizante à base de cloreto de estrôncio (*Sensodyne*^{TM} *Classic*) (Fig. 14), cujos componentes estão indicados na tabela 5.



Figura 14. Pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio (*Sensodyne* ^{TM} *Classic*)

Tabela 5. Composição das pastas dentífricas dessensibilizantes em estudo

Pasta	Colgate™ Sensitive Pro-Relief	Colgate™ Sensitivity Relief Pen	Oral B™ Pro-Expert – Professional Protection	Sensodyne™ Classic
Componentes	Arginina 8% Carbonato de cálcio Monofluorofosfato de sódio 1,10% (1450 ppm F^-) Água Sorbitol Bicarbonato Lauriléter Sulfato de Sódio Aroma Carboximetilcelulose Bicarbonato de sódio Pirofosfato de sódio Dióxido de titânio Álcool benzílico Sacarina sódica Goma xantana Limoneno	Arginina 8% Carbonato de cálcio Glicerina Água Propilenoglicol Carboximetilcelulose Aroma Bicarbonato de sódio Sacarina Sódica Álcool benzílico Silicato de sódio Limoneno	Fluoreto de estanho 0,454% Fluoreto de sódio 0,077% Glicerina Sílica hidratada Propilenoglicol 6 Água Lactato de zinco Lauriléter sulfato de sódio Aroma Gluconato de sódio Pó de Chondrus crispus Fosfato trisódico Sacarina sódica Goma xantana Cera de Copernicia cerifera Hexilcinamaldeído Sílica Dióxido de titânio Eugenol Azul de ftalocianina	Cloreto de estrôncio hexa-hidratado 10% Carbonato de cálcio Água Glicerina Sorbitol Sílica Hidroxietilcelulose Metilcocoiltaurato de sódio Aroma PEG-40 Ácido esteárico Sacarina Sódica Limoneno Dióxido de titânio Eritrosina

ANÁLISE DE SUPERFÍCIE

Terminado o protocolo de desmineralização-remineralização, 20 especímenes de cada grupo (10 de dentina superficial e 10 de dentina profunda) foram submetidos ao teste de microdureza de Vickers e 4 (2 de dentina superficial e 2 de dentina profunda) a MEV.

Microdureza Vickers

10 especímenes de cada subgrupo foram submetidos ao teste de microdureza Vickers para avaliação da sua microdureza de superfície (Vickers Hardness Tester – HSV-30T, Shimadzu Corporation, Japão) (Fig. 15). Para tal, foi utilizada uma carga de 500 g, equivalente a 4,9N, durante 10 segundos (Kandanuru et al., 2016). Foram

realizadas 5 indentações em cada espécimen, de forma aleatória e distantes entre si, evitando stress residual. Assim, por subgrupo obtiveram-se 50 indentações semelhantes à figura 16, com resultados registados em HV – unidade de microdureza de Vickers.



Figura 15. Vickers Hardness Tester - HSV 30T

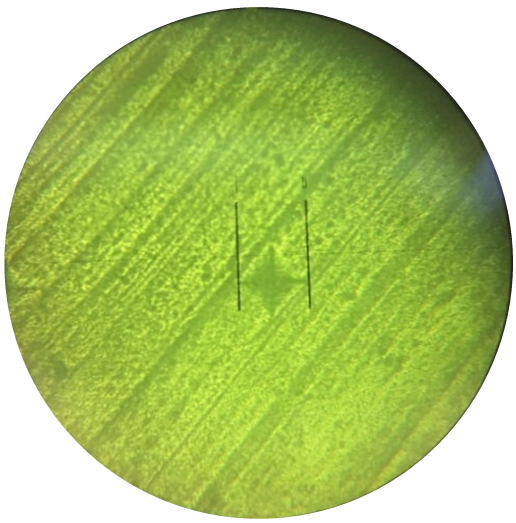


Figura 16. Exemplo de indentação no teste de microdureza de Vickers

Microscopia Eletrónica de Varrimento

2 especímenes de cada subgrupo foram submetidos a microscopia eletrónica de Varrimento (JEOL JSM-700001F). Para tal, as amostras foram, no final do tratamento, preparadas criando-se primeiramente um *smear layer* com disco de polimento de grão 600 durante 60s. De seguida, fez-se condicionamento ácido com solução de ácido fosfórico a 10% durante 15 s, seguido de jato de água durante 10s e jato de ar durante 1-2 s. Para a fixação, procedeu-se à imersão das amostras em tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) com glutaraldeído a 2,5% durante 12h, a 4ºC. Terminado este tempo, as amostras foram lavadas com 20mL de tampão cacodilato de sódio 0,2M (pH 7,4) durante 1h, com 3 trocas, seguida de imersão em água destilada durante 1 min. Seguiu-se o processo de desidratação, com imersão em etanol a concentrações crescentes: 25% durante 20 min, 50% durante 20 min, 75% durante 20 min, 95% durante 30 min e 100% durante 60 min. De seguida, para a desidratação a ponto crítico, as amostras foram mergulhadas em hexametildisilazano (HMDS) – em frasco de vidro tapado com exaustor devido às propriedades irritantes do HMDS – durante 10 min. As amostras secaram, posteriormente, ao ar à temperatura ambiente em papel de filtro, dentro de frasco de vidro tapado (Perdigão, Lambrechts, Van Meerbeek, Vanherle, & Lopes, 1995; Perdigão, et al., 1996; Manso, et al., 2011). O processo de preparação das amostras encontra-se esquematizado na figura 17.

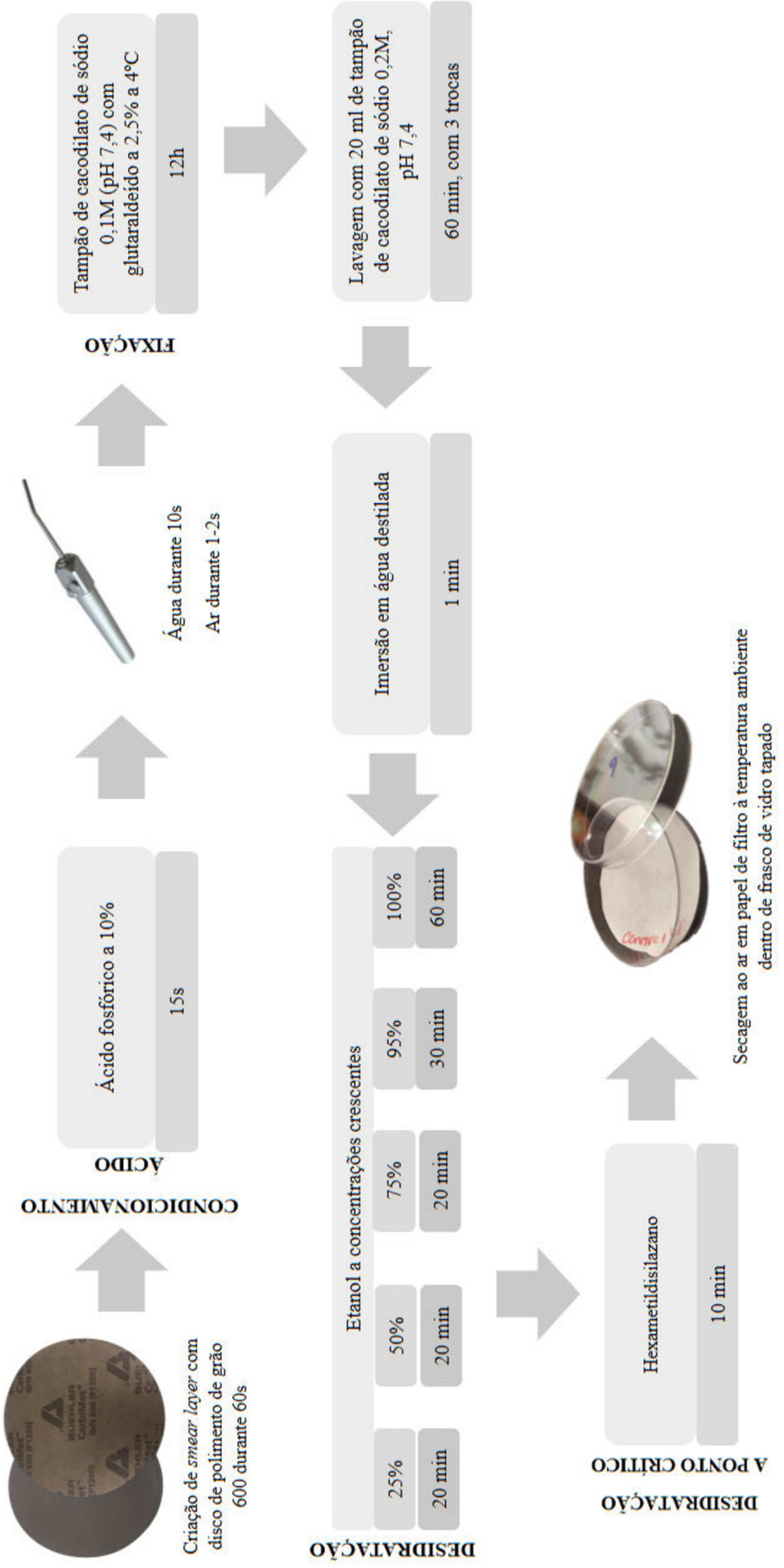


Figura 17. Esquema ilustrativo da preparação das amostras para MEV

Os especímenes foram posteriormente colocados em suporte de alumínio e fixados com cola de carbono (Fig. 18), material condutor que, além de fixar a amostra, melhora a condutividade do material, potenciando a interação do feixe eletrónico com a amostra. Os especímenes foram, finalmente, cobertos com filme de ouro-paládio de aproximadamente 20 nm, por *sputtering* através de revestidor de bombardeamento iónico, a 20 mA e 1,4 kV durante 3 min.

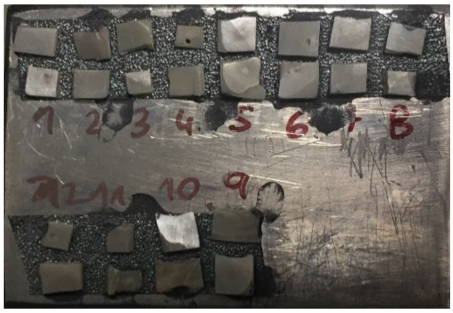


Figura 18. Espécimenes montados em suporte de alumínio com cola de carbono

Os especímenes foram observados num MEV da Hitachi, modelo S2400 (Fig. 19) nas ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, utilizando uma tensão de aceleração de 20 kV.



Figura 19. Imagem do Microscópio Eletrónico de Varrimento utilizado neste trabalho (JEOL JSM-700001F Schottky Emission Scaning Electron Microscope)

RESULTADOS

DENTINA SUPERFICIAL

Microdureza de Vickers

Os resultados de avaliação da microdureza de Vickers permitiram a análise quantitativa dos vários grupos de estudo e das diferenças existentes entre si e, com isso, o estudo da capacidade remineralização dos vários agentes aplicados, em comparação com os grupos de controlo. A tabela 6 mostra a análise descritiva dos 6 grupos de estudo.

Tabela 6. Estatística descritiva dos grupos de estudo A-F: dentina superficial (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS)

GRUPOS	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Curtose
A	10	145,9440	21,29056	112,82	171,20	-1,100
B	10	77,4580	7,71640	66,92	88,98	-,976
C	10	78,1120	8,18051	67,50	94,36	,472
D	10	101,1940	17,77399	79,88	133,40	-,415
E	10	62,8720	8,63140	52,82	77,78	-1,153
F	10	98,4170	9,17271	83,86	117,05	1,558
Total	60	93,9995	29,72569	52,82	171,20	,571

O grupo A, correspondente a dentina sã, apresentou os valores de microdureza de Vickers numérico mais elevados, com uma média de 145,94 ± 21,29 HV.

O grupo B, correspondente a dentina desmineralizada, apresentou uma média de 77,46 ± 7,72 HV.

O grupo C, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica fluoretada à base de arginina, apresentou uma média de 78,11 ± 8,18 HV.

O grupo D, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica fluoretada à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, apresentou uma média de 101,19±17,77 HV.

O grupo E, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de fluoreto de estanho, apresentou um valor de microdureza de Vickers numericamente mais baixo, tendo-se obtido uma média de 62,87 ± 8,63 HV.

Por fim, o grupo F, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio, apresentou uma média de 98,42 ± 9,17 HV.

O gráfico seguinte (Fig. 20) permite uma comparação dos valores médios dos vários grupos.

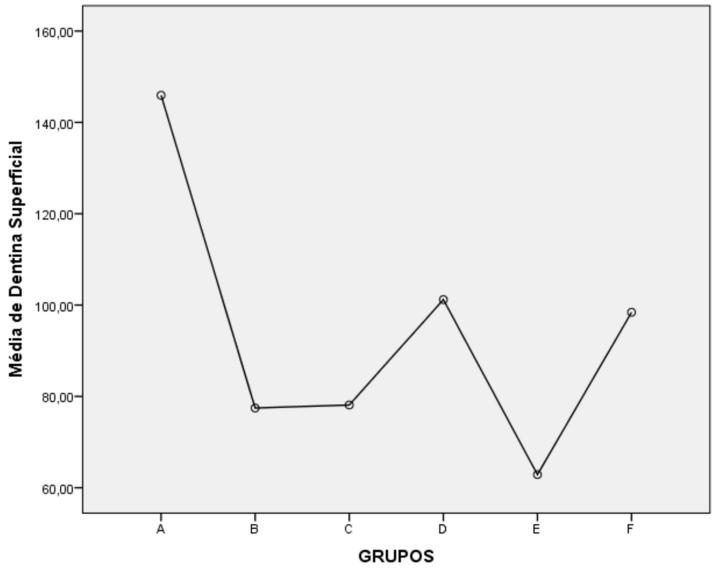


Figura 20. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina superficial (*output* da análise descritiva recorrendo ao software SPSS)

De modo a determinar a existência de diferença entre os vários grupos de estudo, Realizou-se um teste ANOVA a um fator (*one-way* ANOVA). Para tal, foi necessário confirmar a os requisitos para aplicação deste teste paramétrico:

- Independência das amostras
- Normalidade das amostras, verificada, devido à pequena dimensão das mesmas (N=10), através de teste de normalidade de Shapiro-Wilk (tabela 7). Todos os grupos apresentaram valores de significância superiores a 0,05 (p>0,05), o que permitiu concluir, com um nível de confiança de 95%, que as amostras são normais.

Tabela 7. Teste de normalidade - dentina superficial

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	GRUPOS	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Dentina Superficial	A	,205	10	,200*	,914	10	,309
	B	,117	10	,200*	,945	10	,604
	C	,167	10	,200*	,948	10	,645
	D	,165	10	,200*	,927	10	,422
	E	,198	10	,200*	,923	10	,384
	F	,216	10	,200*	,896	10	,197

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.
a. Correlação de Significância de Lilliefors

- Homogeneidade das variâncias, averiguada pelo teste de Levene (tabela 8). Este teste revelou existirem diferenças entre as variâncias dos vários grupos de estudo, uma vez que a significância resultante foi inferior a 0,05 (p=0,001).

Tabela 8. Teste da homogeneidade das variâncias dos grupos de dentina superficial (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

Dentina Superficial

Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
5,040	5	54	,001

Os valores de microdureza de Vickers, obtidos para os vários grupos de estudo, permitiram a aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator, não obstante o facto das variâncias das amostras não serem homogéneas. Tal é possível quando a dimensão dos grupos é a mesma (N=10 em todos os grupos) e quando a ferramenta de análise estatística (neste caso o programa SPSS) o permite, ao incluir testes específicos para estes casos. Procedeu-se, então, à aplicação do teste ANOVA a um fator, definindo-se como hipótese nula (H_0) a igualdade estatística das médias dos vários grupos e hipótese alternativa (H_1) a existência de diferenças entre as médias dos grupos. A tabela 9 mostra os resultados obtidos.

Tabela 9. Teste ANOVA a um fator aplicado aos grupos de dentina superficial para análise da diferença entre grupos (*output* obtido pelo sofware de análise estatística SPSS

Dentina Superficial

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	42644,614	5	8528,923	48,538	,000
Nos grupos	9488,753	54	175,718		
Total	52133,366	59			

Os resultados obtidos ($F(5,54)=48,538$, $p<0.001$) revelaram a existência de diferenças entre os valores médios de microdureza obtidos para os vários grupos de estudo – validação da hipótese alternativa. De modo a identificar a existências de eventuais igualdades estatísticas entre pares de grupos, realizaram-se dois testes independentes: um teste de contrastes, que permite comparar pares de grupos específicos, selecionados pelo operador (tabela 10) e um teste de comparações múltiplas, testes *post-hoc*, neste caso adequado a amostras não homogéneas e de dimensão reduzida (teste de Games-Howell, tabela 11).

Tabela 10. Teste de contrastes aplicado a pares de grupos de dentina superficial (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS, adaptado para mostrar apenas os resultados relativos a amostras não homogéneas)

		Contraste	Valor de Contraste	Erro Padrão	t	gl	Sig. (bilateral)
Dentina Superficial	Não considera variâncias iguais	B vs C	-,6540	3,55617	-,184	17,939	,856
		D vs F	2,7770	6,32498	,439	13,476	,668
		C vs F	-20,3050	3,88664	-5,224	17,769	,000
		C vs E	15,2400	3,76061	4,053	17,948	,001
		A vs D	44,7500	8,77042	5,102	17,444	,000

Tabela 11. Teste de Games-Howell de comparações múltiplas aplicado aos grupos de dentina superficial (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

Variável dependente: Dentina Superficial
Games-Howell

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95% Limite inferior	Limite superior
A	B	68,48600*	7,16122	,000	44,1910	92,7810
	C	67,83200*	7,21255	,000	43,4660	92,1980
	D	44,75000*	8,77042	,001	16,7792	72,7208
	E	83,07200*	7,26491	,000	58,6288	107,5152
	F	47,52700*	7,33094	,000	22,9801	72,0739
B	A	-68,48600*	7,16122	,000	-92,7810	-44,1910
	C	-,65400	3,55617	1,000	-11,9599	10,6519
	D	-23,73600*	6,12746	,020	-44,2405	-3,2315
	E	14,58600*	3,66120	,010	2,9346	26,2374
	F	-20,95900*	3,79053	,000	-33,0444	-8,8736
C	A	-67,83200*	7,21255	,000	-92,1980	-43,4660
	B	,65400	3,55617	1,000	-10,6519	11,9599
	D	-23,08200*	6,18737	,025	-43,6877	-2,4763
	E	15,24000*	3,76061	,008	3,2849	27,1951
	F	-20,30500*	3,88664	,001	-32,6746	-7,9354
D	A	-44,75000*	8,77042	,001	-72,7208	-16,7792
	B	23,73600*	6,12746	,020	3,2315	44,2405
	C	23,08200*	6,18737	,025	2,4763	43,6877
	E	38,32200*	6,24833	,000	17,6070	59,0370
	F	2,77700	6,32498	,997	-18,0837	23,6377
E	A	-83,07200*	7,26491	,000	-107,5152	-58,6288
	B	-14,58600*	3,66120	,010	-26,2374	-2,9346
	C	-15,24000*	3,76061	,008	-27,1951	-3,2849
	D	-38,32200*	6,24833	,000	-59,0370	-17,6070
	F	-35,54500*	3,98296	,000	-48,2081	-22,8819
F	A	-47,52700*	7,33094	,000	-72,0739	-22,9801
	B	20,95900*	3,79053	,000	8,8736	33,0444
	C	20,30500*	3,88664	,001	7,9354	32,6746
	D	-2,77700	6,32498	,997	-23,6377	18,0837
	E	35,54500*	3,98296	,000	22,8819	48,2081

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Ambos os testes identificam igualdades estatísticas entre as médias dos grupos B e C e D e F, pelo que se pode concluir, com um intervalo de confiança de 95% que:

$$\bar{u}_E < \bar{u}_B = \bar{u}_C < \bar{u}_D = \bar{u}_F < \bar{u}_A$$

Microscopia Eletrónica de Varrimento

Com o intuito de realizar uma análise qualitativa das amostras com observação dos túbulos dentinários em cada um dos especímenes, estes foram, como esclarecido na secção *Materiais e Métodos*, observados em Microscópio Eletrónico nas ampliações de 1000x, 5000x, 10000x. Apresentam-se, de seguida, as imagens selecionadas.

Grupo A

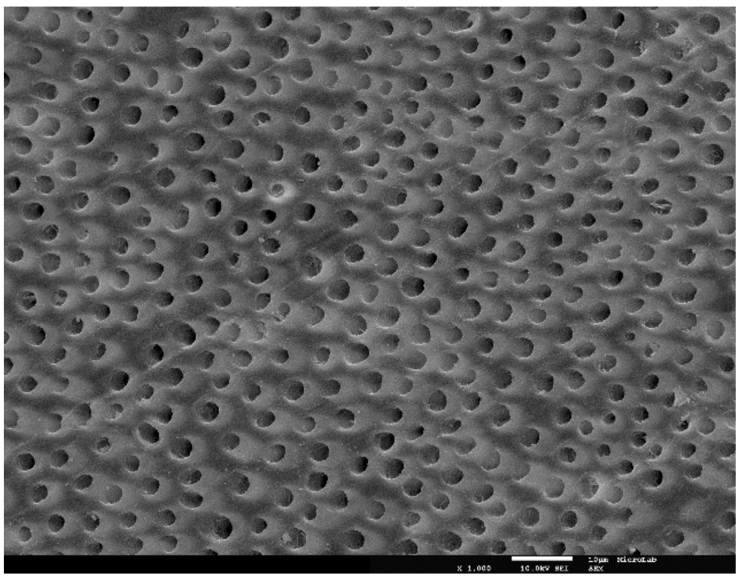


Figura 21. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 1000x

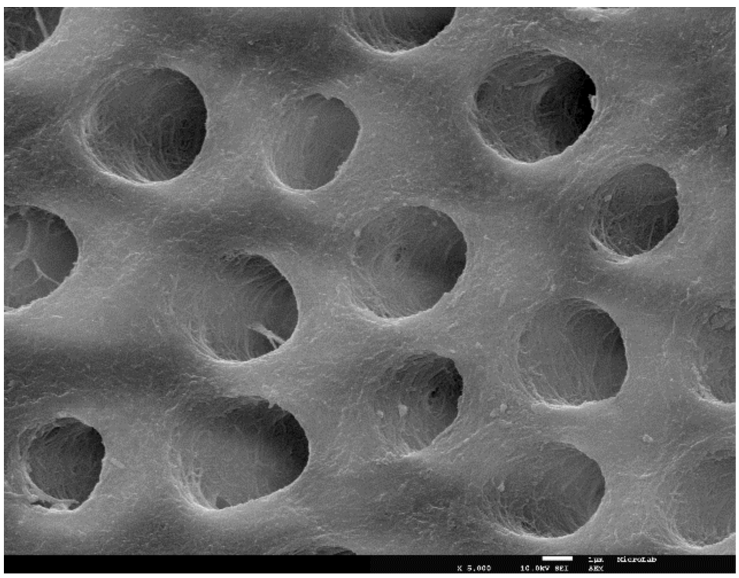


Figura 22 Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 5000x, observando-se as fibras de colagénio no interior dos túbulos

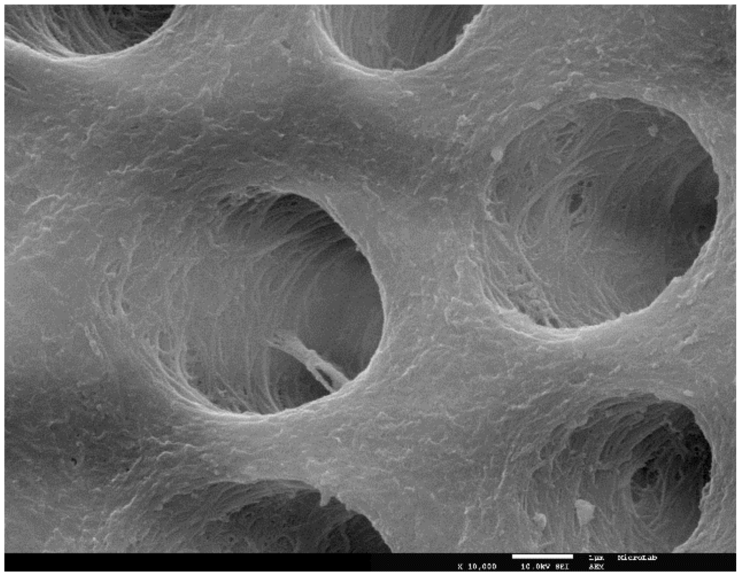


Figura 23. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 10000x, observando-se as fibras de colagénio no interior dos túbulos

Grupo B

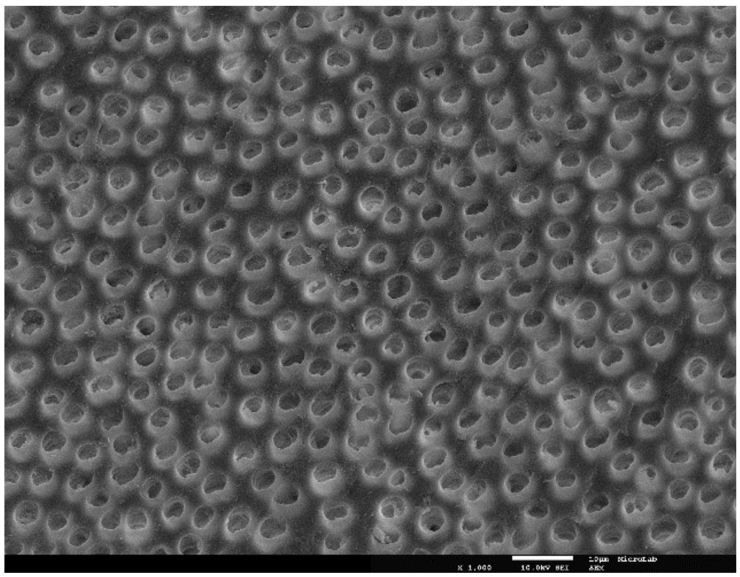


Figura 24. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 1000x

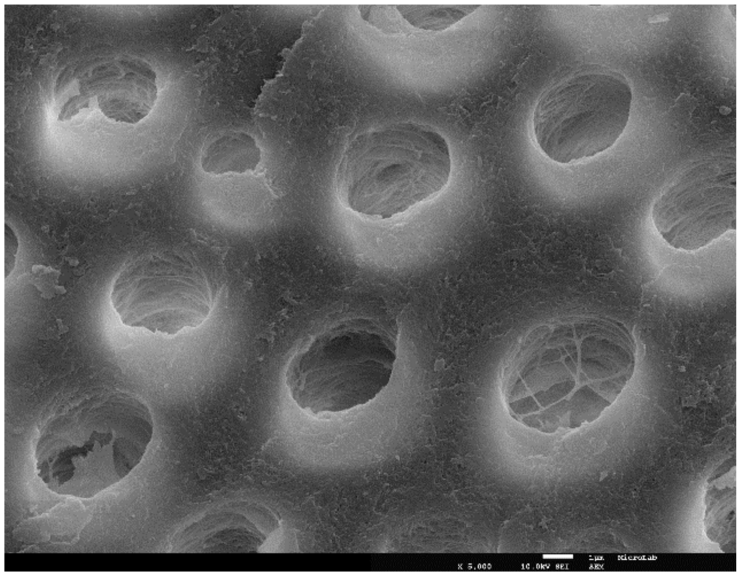


Figura 25. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 5000x. É evidente a desorganização e depressão das fibras no interior dos túbulos: e um halo de remineralização na dentina peritubular que sugere que se manteve parte desta dentina

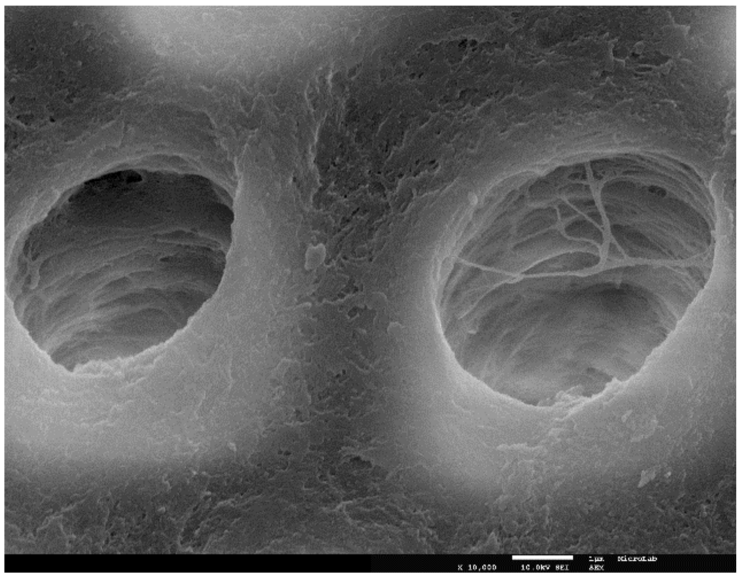


Figura 26. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após indução de desafio erosivo a 10000x, sendo evidente a desorganização e depressão das fibras no interior dos túbulos e um halo de remineralização na dentina peritubular que sugere que se manteve parte desta dentina

Grupo C

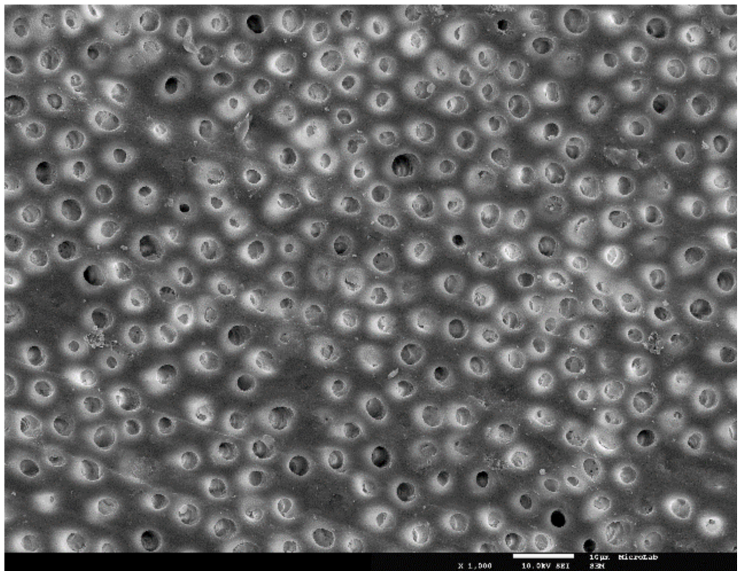


Figura 27. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x

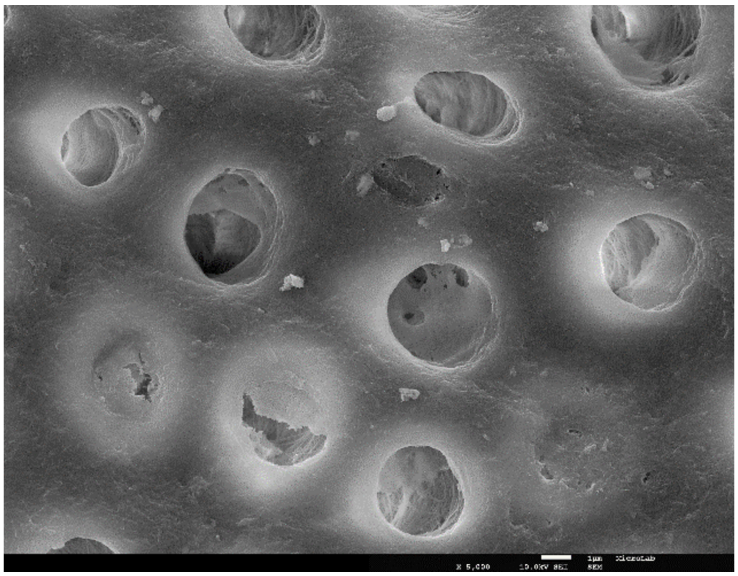


Figura 28. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 5000x. Observa-se uma oclusão parcial dos túbulos e, novamente, um halo de mineralização

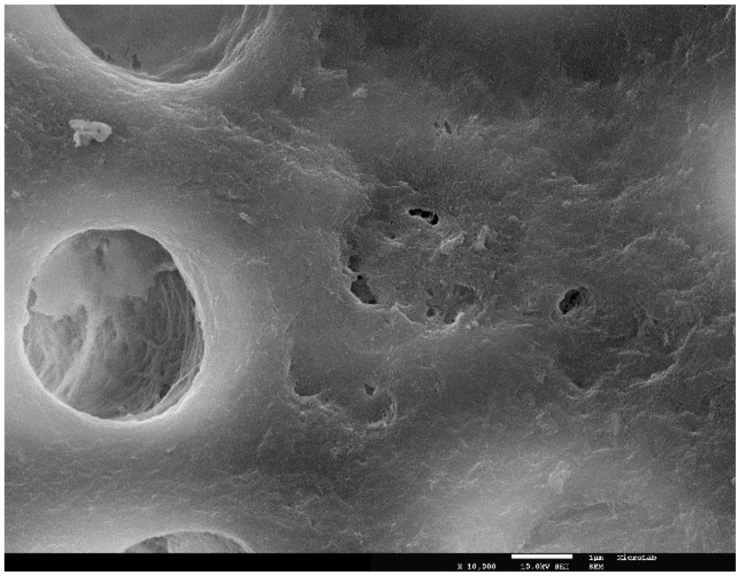


Figura 29. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x. Destaque para um túbulo dentinário ocluído.

Grupo D

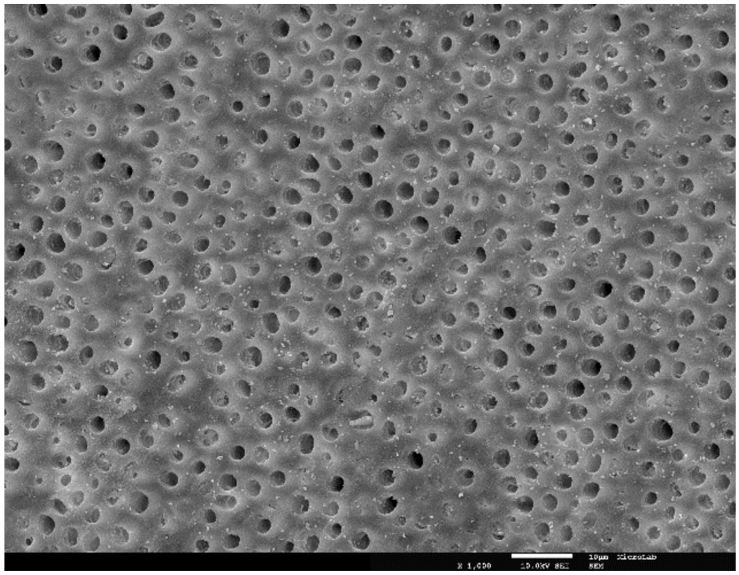


Figura 30. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 1000x

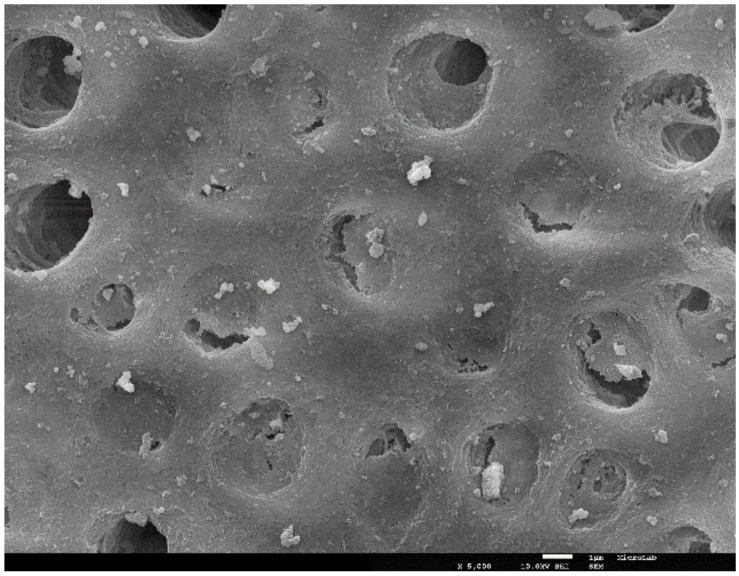


Figura 31. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 5000x. Observam-se vários túbulos com grande oclusão.

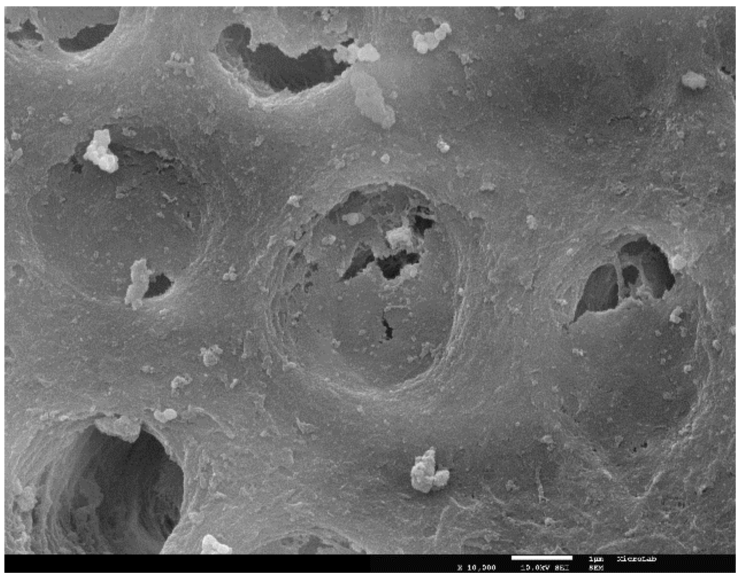


Figura 32. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulos com grande oclusão.

Grupo E

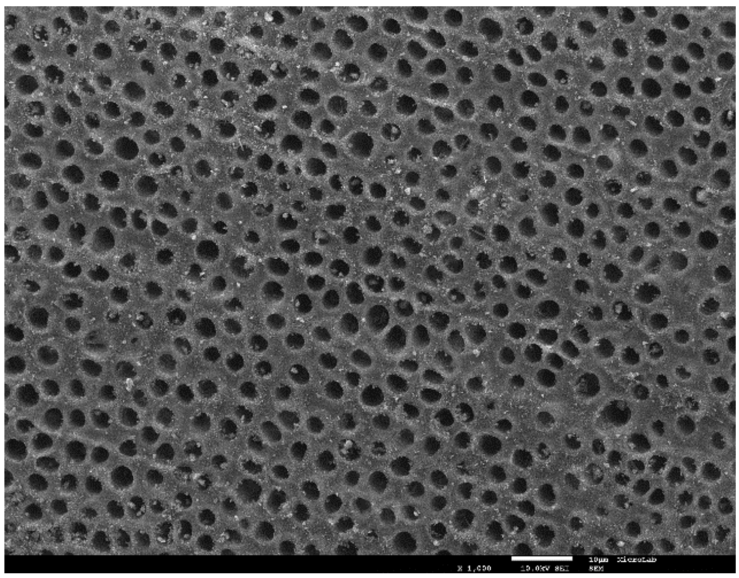


Figura 33. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Ao contrário dos anteriores grupos de estudo, observam-se os túbulos dentinários abertos.

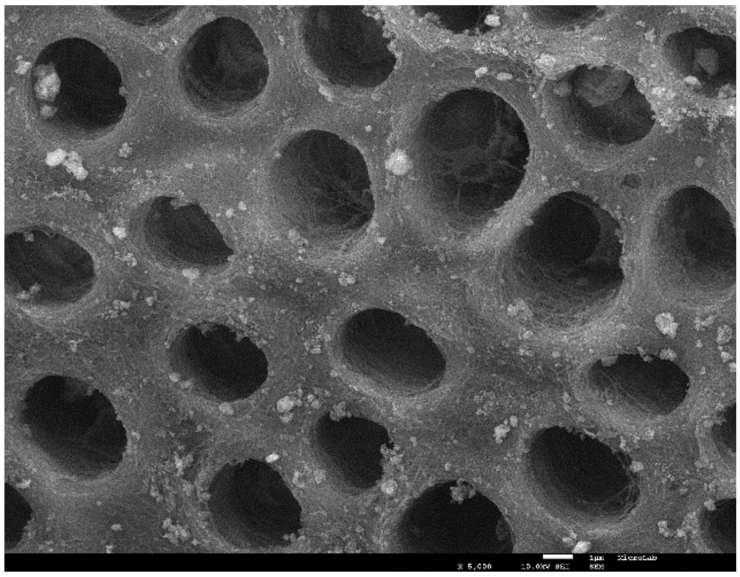


Figura 34. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Observam-se túbulos dentinários abertos e partículas de sílica depositadas.

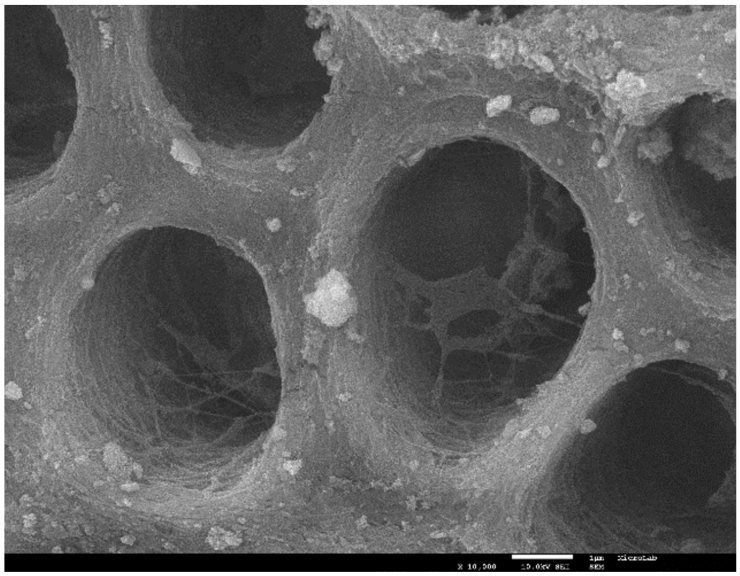


Figura 35. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x. Destaque para as partículas de sílica depositadas e desorganização das fibras no interior dos túbulos.

Grupo F

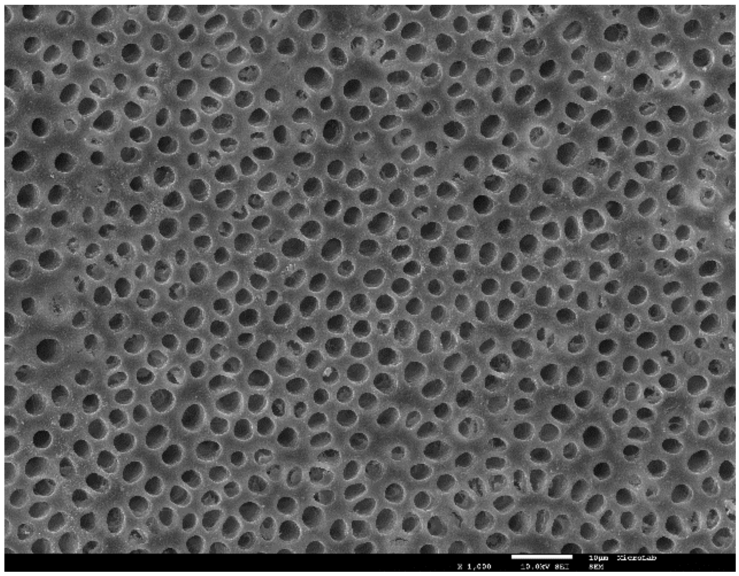


Figura 36. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos.

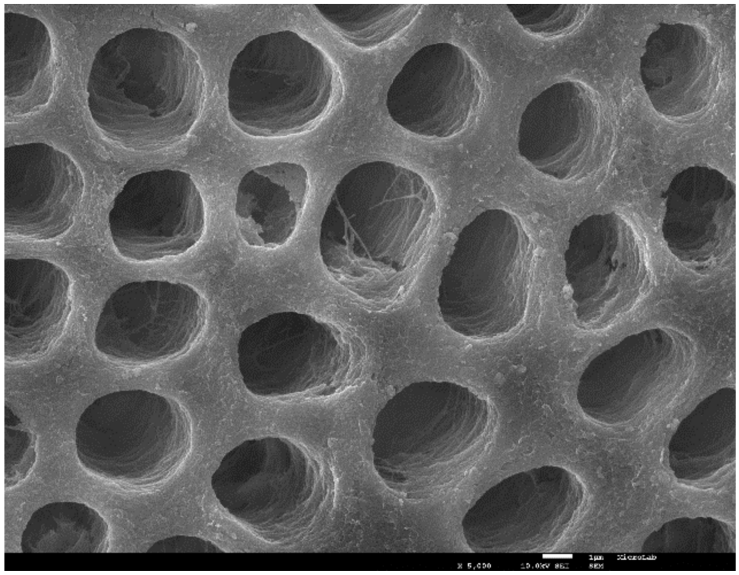


Figura 37. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos e fibras desorganizadas no interior dos túbulos.

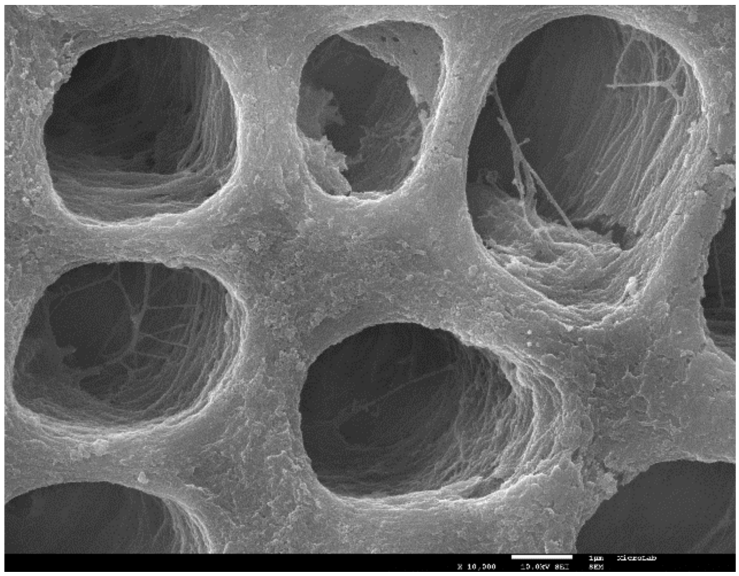
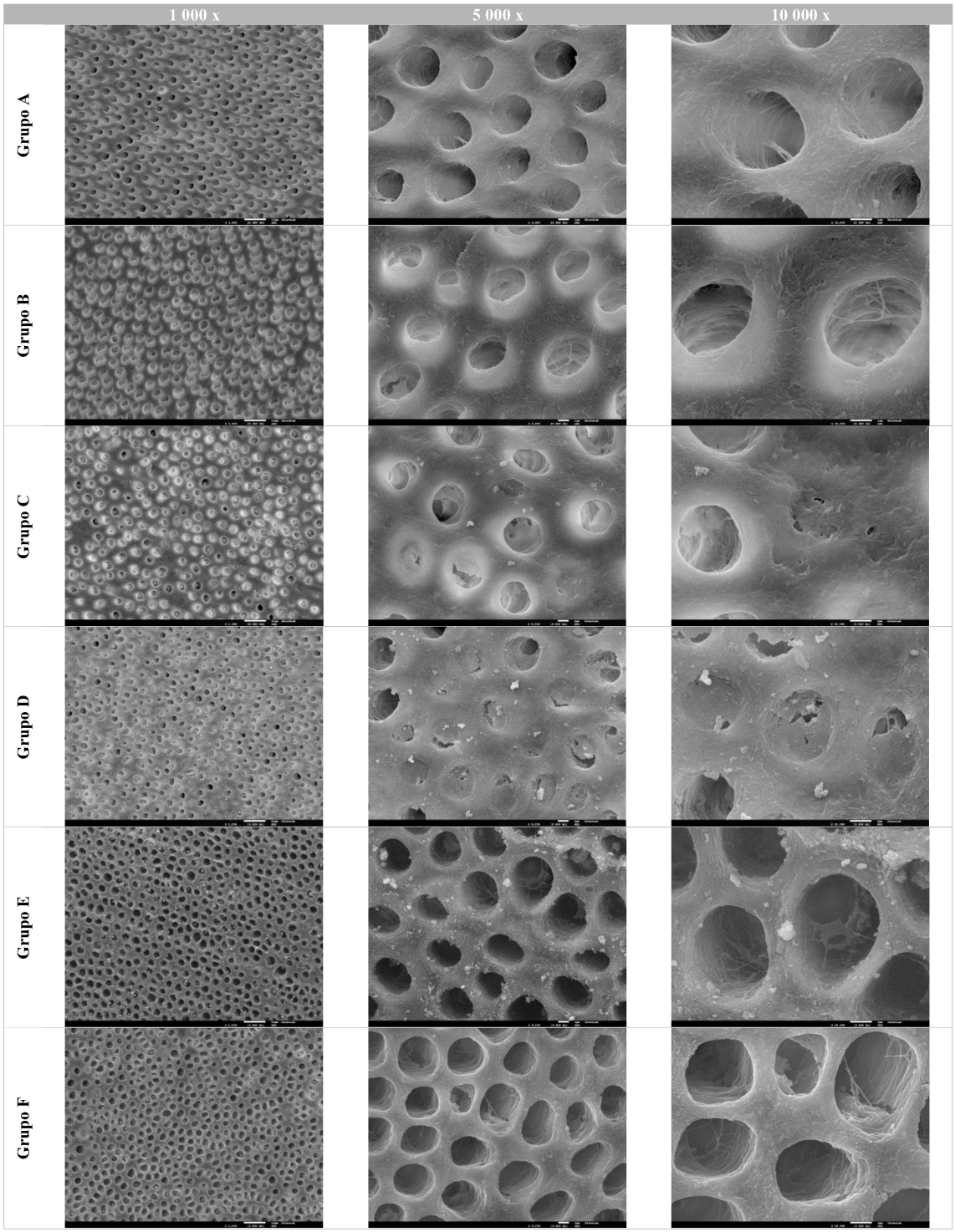


Figura 38. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x. Observam-se os túbulos dentinários abertos e fibras desorganizadas no interior dos túbulos.

A tabela 12 resume as imagens obtidas com as amostras de dentina superficial.

Tabela 12. Imagens de microscopia eletrónica de varrimento da dentina superficial



DENTINA PROFUNDA

Microdureza de Vickers

Procedeu-se, tal como para as amostras de dentina superficial, à análise estatística dos valores de microdureza de Vickers obtidos para os especímenes de dentina profunda. As medidas descritivas dos 6 grupos encontram-se na tabela 13.

Tabela 13. Estatística descritiva dos grupos de estudo A-F: dentina profunda (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS)

GRUPOS	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Curtose
A	10	93,3540	17,14893	66,78	118,14	-1,138
B	10	76,5160	7,87805	60,60	85,50	,261
C	10	68,5120	5,93444	61,54	80,90	,841
D	10	98,5780	20,09764	71,14	127,16	-1,387
E	10	72,1640	7,94608	59,16	86,60	,213
F	10	84,7940	18,04029	56,38	113,40	-,234
Total	60	82,3197	17,39458	56,38	127,16	,006

O grupo A, correspondente a dentina sã, apresentou uma média de 93,35 ± 17,15 HV.

O grupo B, correspondente a dentina desmineralizada, apresentou uma média de 76,52 ± 7,88 HV.

O grupo C, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, apresentou a média numericamente mais baixa – 68,51 ± 5,93 HV.

O grupo D, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, apresentou a média numericamente mais elevada – 98,57 ± 20,10 HV.

O grupo E, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, apresentou uma média de 72,16 ± 7,94 HV.

Por fim, o grupo F, submetido a desmineralização e tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, apresentou uma média de 84,79 ± 18,04 HV.

A diferença entre as médias dos vários grupos está ilustrada na figura 39.

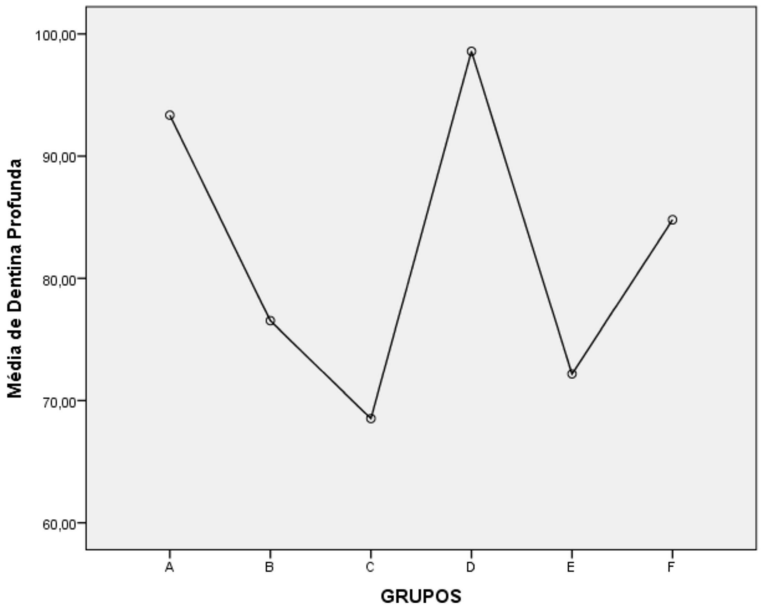


Figura 39. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina profunda (*output* da análise descritiva recorrendo ao software SPSS)

De modo a determinar a existência de diferenças entre os vários grupos de estudo, procedeu-se a teste ANOVA a um fator (*one-way* ANOVA). Para tal, foi necessário verificar os requisitos para aplicação deste teste paramétrico:

- Independência das amostras
- Normalidade das amostras, analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, mais adequado para amostras de reduzidas dimensões como as do presente estudo (N=10). Como mostra a tabela 14, todos os grupos apresentaram valores de significância superiores a 0,05 (p>0,05), o que permitiu concluir, com um nível de confiança de 95%, que as amostras são normais.

Tabela 14. Teste de normalidade - dentina profunda

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	GRUPOS	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Dentina Profunda	A	,221	10	,181	,939	10	,544
	B	,195	10	,200*	,915	10	,320
	C	,139	10	,200*	,934	10	,491
	D	,159	10	,200*	,938	10	,535
	E	,206	10	,200*	,969	10	,883
	F	,193	10	,200*	,945	10	,611

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.
a. Correlação de Significância de Lilliefors

- Homogeneidade das variâncias, averiguada pelo teste de Levene (tabela 15). Este teste revelou existirem diferenças entre as variâncias dos vários grupos de estudo, uma vez que a significância resultante foi inferior a 0,05 (p=0,002).

Tabela 15. Teste da homogeneidade das variâncias dos grupos de dentina profunda (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

Dentina Profunda

Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,543	5	54	,002

Tal como aquando da análise dos valores relativos à dentina superficial, prosseguiu-se com a análise estatística da diferença entre as amostras recorrendo a testes paramétricos, nomeadamente ao teste ANOVA a um fator, tendo-se considerado como hipótese nula (H_0) a igualdade estatística das médias dos vários grupos, e como hipótese alternativa (H_1) a existência de diferenças entre as médias dos grupos. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Teste ANOVA a um fator aplicado aos grupos de dentina profunda para análise da diferença entre grupos (*output* obtido pelo sofware de análise estatística SPSS

Dentina Profunda

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	7196,840	5	1439,368	7,295	,000
Nos grupos	10654,867	54	197,312		
Total	17851,707	59			

Os dados na tabela anterior, com $F(5,54)=7,295$, $p<0.001$, permitiram validar a hipótese alternativa, da existência de diferenças entre as médias dos grupos. À semelhança do realizado para os grupos de dentina superficial, aplicaram-se testes de contraste e de comparações múltiplas (teste de Games-Howell, para amostras não homogéneas e de reduzida dimensão) para a comparação direta entre pares de grupos/amostras. Ambos os testes originaram resultados matematicamente incongruentes, tendo-se optado por apresentar apenas os obtidos pelo teste de comparações múltiplas (tabela 17), pela simples razão deste permitir uma comparação entre todos os pares de amostras, ao contrário do teste de contrastes que requer a definição, pelo operador, dos pares de grupos/amostra a comparar.

Tabela 17. Teste de Games-Howell de comparações múltiplas aplicado aos grupos de dentina profunda (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS, adaptado para mostrar na última coluna o resultado da análise de cada comparação, para uma visualização mais simples da incongruência matemática dos resultados obtidos)

Variável dependente: Dentina Profunda
Games-Howell

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		Resultado
					Limite inferior	Limite superior	
A	B	16,83800	5,96782	,118	-3,0397	36,7157	$\bar{U}_A = \bar{U}_B$
	C	24,84200*	5,73849	,011	5,3118	44,3722	$\bar{U}_A \neq \bar{U}_C$
	D	-5,22400	8,35464	,988	-31,8479	21,3999	$\bar{U}_A = \bar{U}_D$
	E	21,19000*	5,97684	,034	1,2966	41,0834	$\bar{U}_A \neq \bar{U}_E$
	F	8,56000	7,87107	,880	-16,4616	33,5816	$\bar{U}_A = \bar{U}_F$
B	A	-16,83800	5,96782	,118	-36,7157	3,0397	$\bar{U}_B = \bar{U}_A$
	C	8,00400	3,11899	,160	-1,9918	17,9998	$\bar{U}_B = \bar{U}_C$
	D	-22,06200	6,82626	,063	-45,0886	,9646	$\bar{U}_B = \bar{U}_A$
	E	4,35200	3,53842	,817	-6,8933	15,5973	$\bar{U}_B = \bar{U}_A$
	F	-8,27800	6,22508	,765	-29,0993	12,5433	$\bar{U}_B = \bar{U}_A$
C	A	-24,84200*	5,73849	,011	-44,3722	-5,3118	$\bar{U}_C \neq \bar{U}_A$
	B	-8,00400	3,11899	,160	-17,9998	1,9918	$\bar{U}_C = \bar{U}_B$
	D	-30,06600*	6,62671	,009	-52,8392	-7,2928	$\bar{U}_C \neq \bar{U}_D$
	E	-3,65200	3,13620	,847	-13,7079	6,4039	$\bar{U}_C = \bar{U}_E$
	F	-16,28200	6,00558	,150	-36,7888	4,2248	$\bar{U}_C = \bar{U}_F$
D	A	5,22400	8,35464	,988	-21,3999	31,8479	$\bar{U}_D = \bar{U}_A$
	B	22,06200	6,82626	,063	-,9646	45,0886	$\bar{U}_D = \bar{U}_B$
	C	30,06600*	6,62671	,009	7,2928	52,8392	$\bar{U}_D \neq \bar{U}_C$
	E	26,41400*	6,83414	,022	3,3758	49,4522	$\bar{U}_D \neq \bar{U}_E$
	F	13,78400	8,54030	,600	-13,3920	40,9600	$\bar{U}_D = \bar{U}_F$
E	A	-21,19000*	5,97684	,034	-41,0834	-1,2966	$\bar{U}_E \neq \bar{U}_A$
	B	-4,35200	3,53842	,817	-15,5973	6,8933	$\bar{U}_E = \bar{U}_B$
	C	3,65200	3,13620	,847	-6,4039	13,7079	$\bar{U}_E = \bar{U}_C$
	D	-26,41400*	6,83414	,022	-49,4522	-3,3758	$\bar{U}_E \neq \bar{U}_D$
	F	-12,63000	6,23372	,381	-33,4656	8,2056	$\bar{U}_E = \bar{U}_F$
F	A	-8,56000	7,87107	,880	-33,5816	16,4616	$\bar{U}_F = \bar{U}_A$
	B	8,27800	6,22508	,765	-12,5433	29,0993	$\bar{U}_F = \bar{U}_B$
	C	16,28200	6,00558	,150	-4,2248	36,7888	$\bar{U}_F = \bar{U}_C$
	D	-13,78400	8,54030	,600	-40,9600	13,3920	$\bar{U}_F = \bar{U}_D$
	E	12,63000	6,23372	,381	-8,2056	33,4656	$\bar{U}_F = \bar{U}_E$

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Atendendo à tabela 17 podemos verificar que, de facto, não existe coerência nos resultados obtidos. Por exemplo, a comparação da média do grupo A com a média do grupo B indicou a igualdade estatística entre estes grupos (com p=0,118), a comparação das médias dos grupos B e C indicou que estes grupos não diferem estatisticamente (com p=0,160) e, no entanto, a comparação entre os grupos A e C é reveladora da existência de

diferenças (com p=0,011). Tais resultados podem ser explicados pela elevada dispersão de valores registada em alguns grupos, situação ilustrada no gráfico da figura 40. É de notar que, ainda que dispersos, os valores se encontram uniformemente distribuídos, não havendo, em nenhum caso, um valor que se destaque por ser excessivamente superior ou inferior (inexistência de *outliers*). Esta dispersão de valores pode ser uma consequência da existência de maior conteúdo orgânico da dentina profunda, originando superfícies mais heterogéneas e, por isso, mais difíceis de analisar quanto à sua microdureza de Vickers. O aumento do número de indentações de cada espécimen poderá, nestes casos e para trabalhos futuros nesta linha, resolver o problema da dispersão dos valores. Outra possibilidade será o aumento da dimensão das amostras.

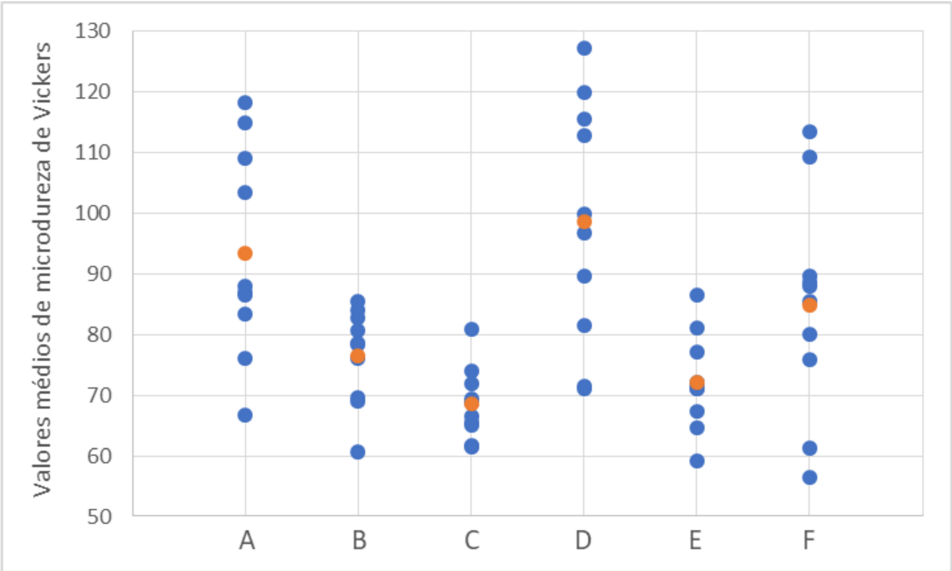


Figura 40. Gráfico de dispersão dos valores médios de microdureza de Vickers, obtidos com as amostras de dentina profunda. A azul encontram-se os valores médios das 5 indentações realizadas em cada espécimen e a laranja o valor médio estimado para o grupo/amostra.

A aplicação de outros testes (testes de Welch e de Brown-Forsythe), bem como a alteração do intervalo de confiança da análise, não permitiu ultrapassar o problema. Adicionalmente, foram aplicados testes não paramétricos (nomeadamente o teste de Kruskall-Wallis), os quais não comparam médias mas valores centrais da amostra e atendem a ordenações e não a valores absolutos, sendo que também com estes testes os resultados foram incoerentes. Pela natureza dos testes não paramétricos, a não obtenção de resultados coerentes corrobora a hipótese levantada da existência de problemas relacionados com a dispersão dos valores de microdureza de superfície registados.

Microscopia Eletrónica de Varrimento

As amostras de dentina profunda foram, igualmente, observadas por microscopia eletrónica de varrimento, nas ampliações de 1000x, 5000x, 10000x.

Grupo A

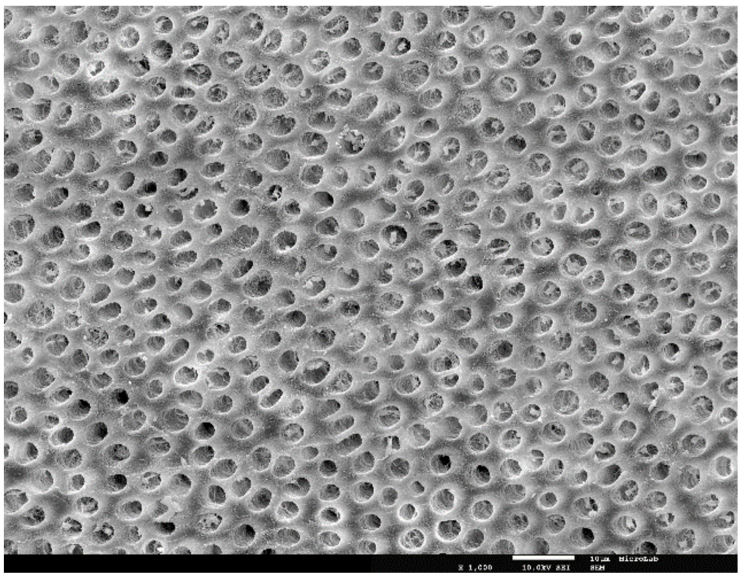


Figura 41. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 1000x

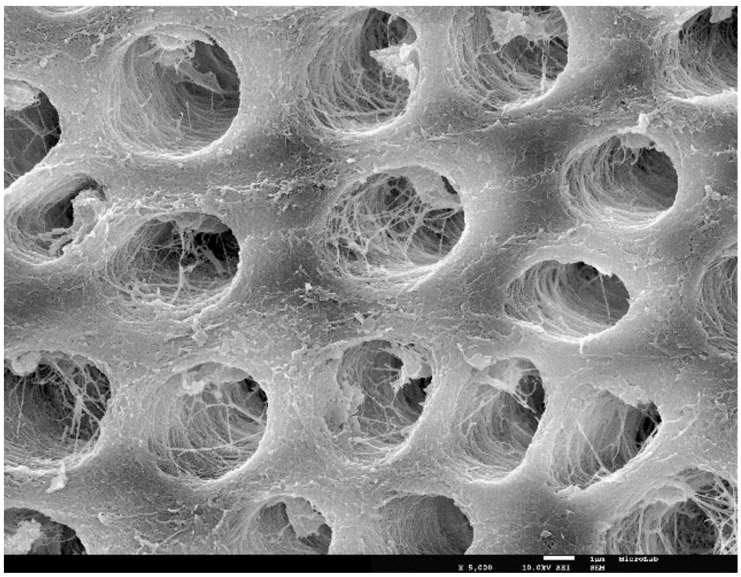


Figura 42. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 5000x. Destaque para o elevado número de túbulos expostos.

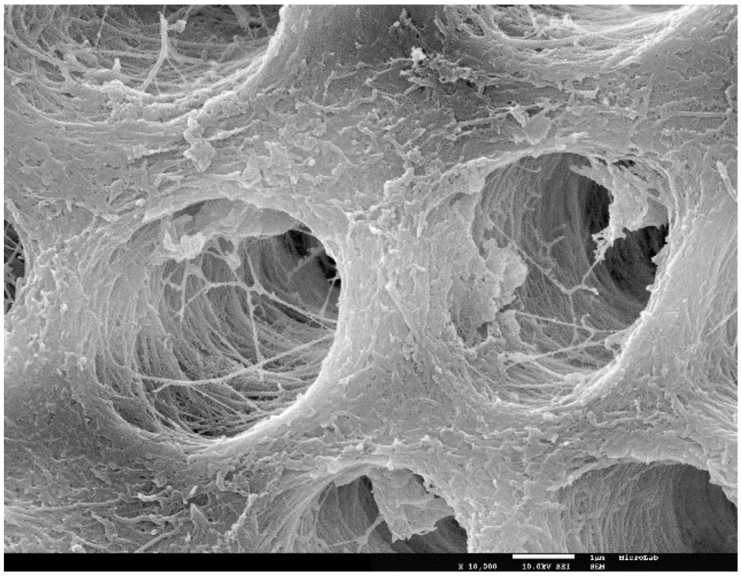


Figura 43. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda sã (sem indução de desafio erosivo ou remineralização) a 10000x. Destaque para o elevado número de túbulos expostos.

Grupo B

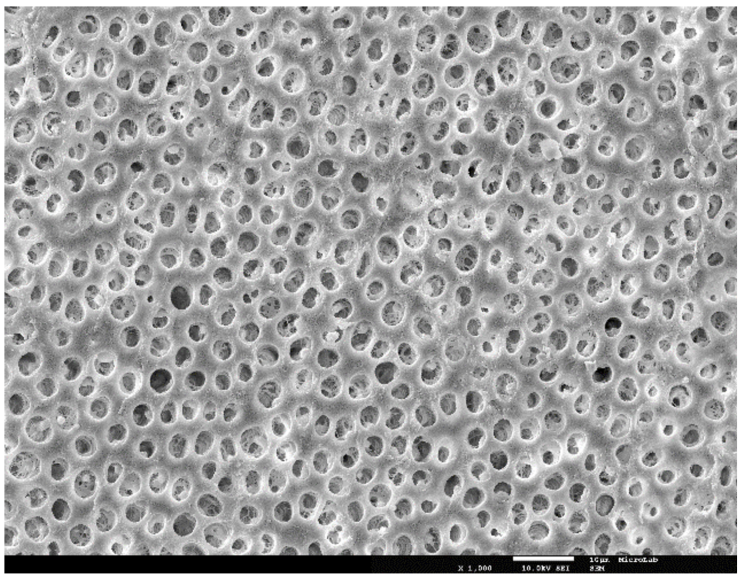


Figura 44. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 1000x. Observa-se um halo de mineralização na região peritubular, sugerindo que se manteve parte desta dentina após o desafio erosivo

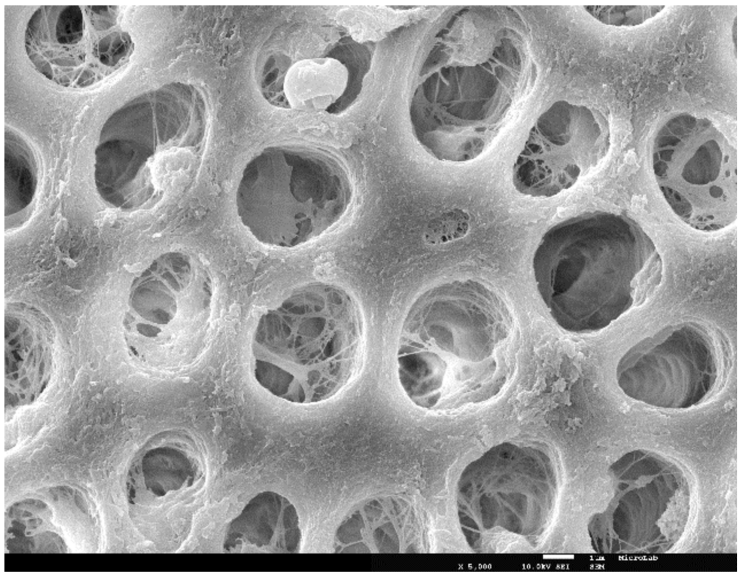


Figura 45. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 5000x. Destaque para a desorganização das fibras no interior dos túbulos e halos de mineralização.

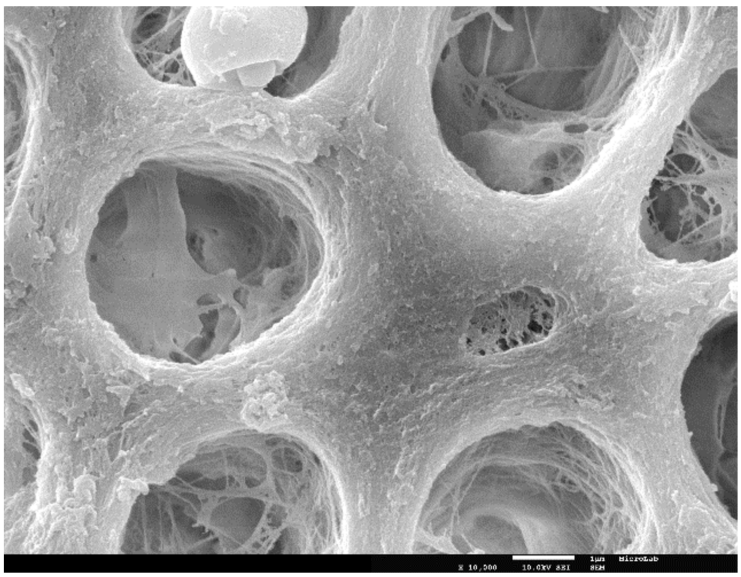


Figura 46. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após indução de desafio erosivo a 10000x. Destaque para a desorganização das fibras no interior dos túbulos e halos de mineralização.

Grupo C

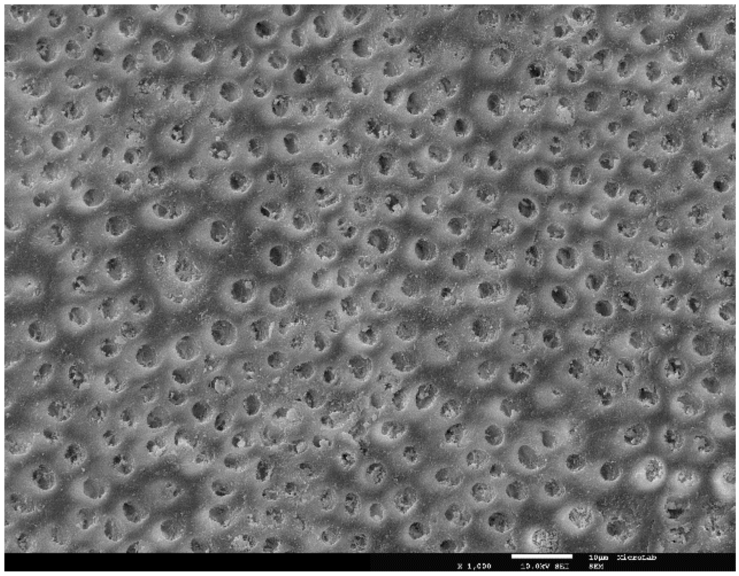


Figura 47. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 1000x

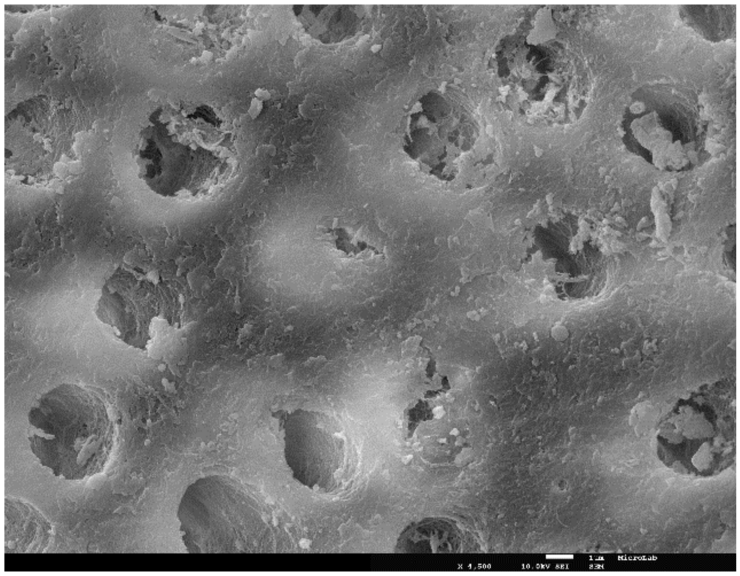


Figura 48. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 5000x. Observam-se vários túbulos com oclusão parcial e, novamente, halos de mineralização.

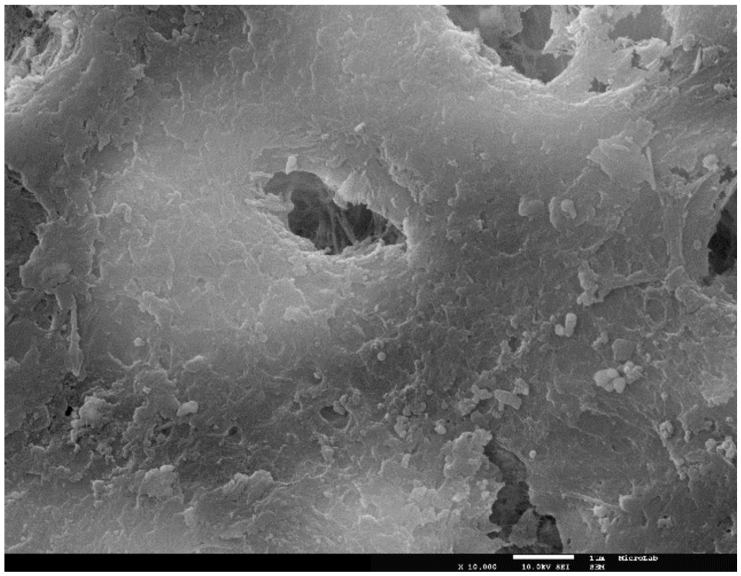


Figura 49. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulo dentinário com obturação extensa.

Grupo D

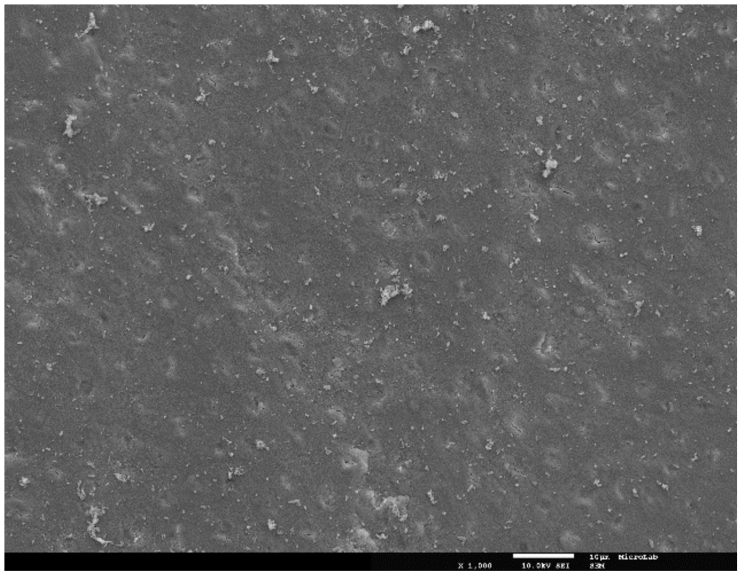


Figura 50. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 1000x. Apenas se observam as depressões dos túbulos dentinários, com grande homogeneidade na oclusão tubular.

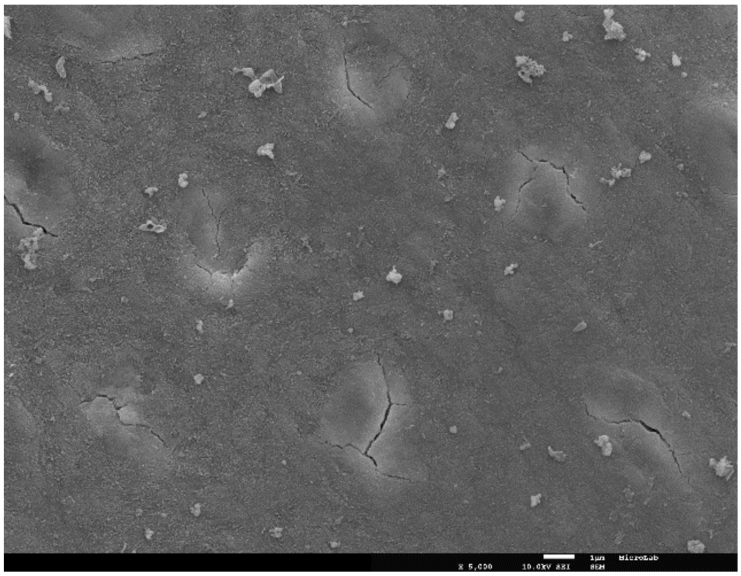


Figura 51. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 5000x. Destaque para túbulos dentinários totalmente ocluídos e partículas de titânio na superfície.

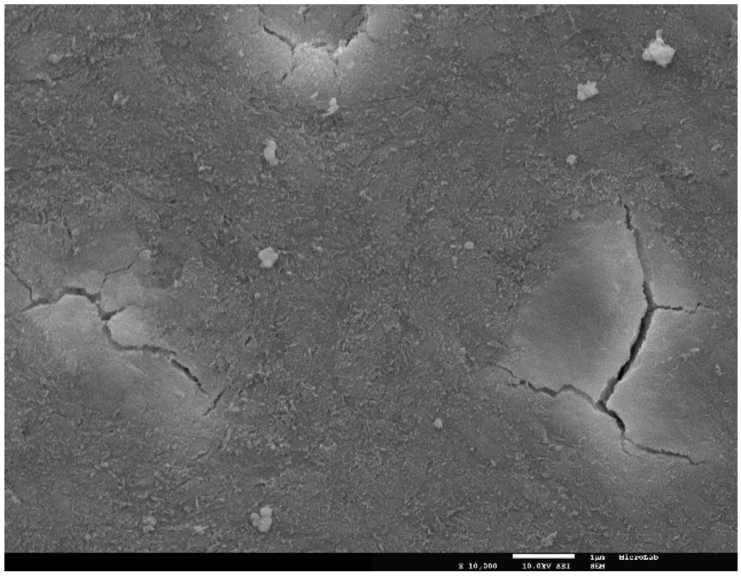


Figura 52. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após escovagem com pasta dentífrica à base de arginina e aplicação tópica de pasta à base de arginina, a 10000x. Destaque para túbulos dentinários totalmente ocluídos e partículas de titânio na superfície.

Grupo E

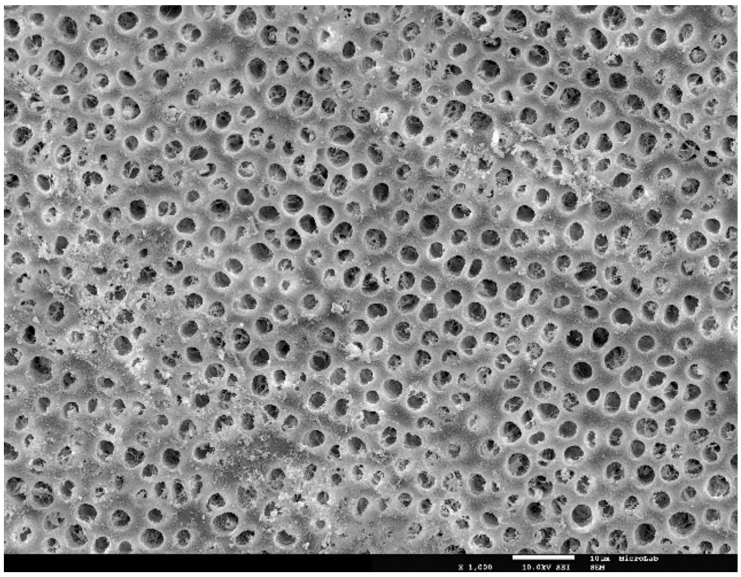


Figura 53. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 1000x.

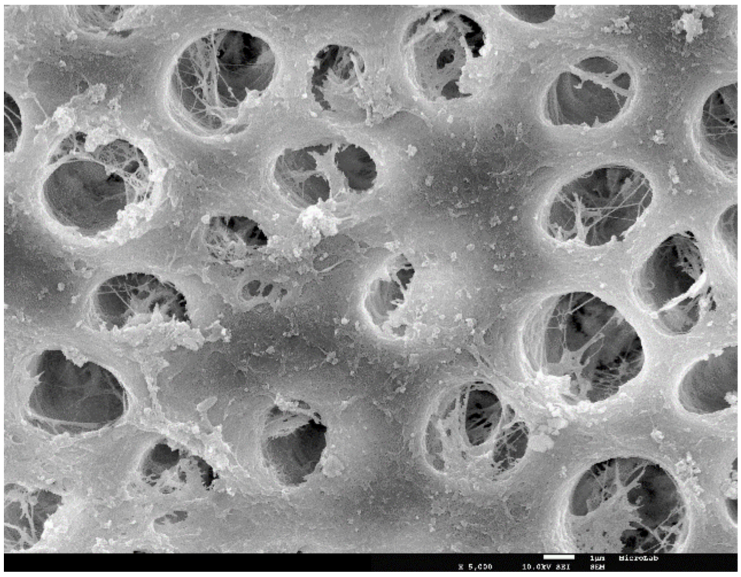


Figura 54. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 5000x. Observam-se alguns túbulos dentinários com oclusão parcial e partículas de sílica depositadas e, novamente, halos de mineralização.

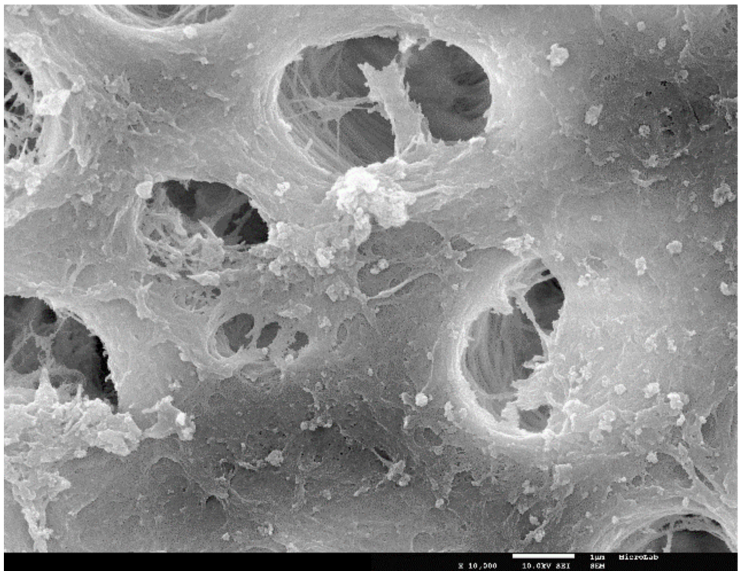


Figura 55. Fotomicrografia da superfície da dentina superficial após tratamento com pasta dentífrica à base de estanho, a 10000x. Destaque para alguns túbulos dentinários com oclusão parcial e partículas de sílica depositadas.

Grupo F

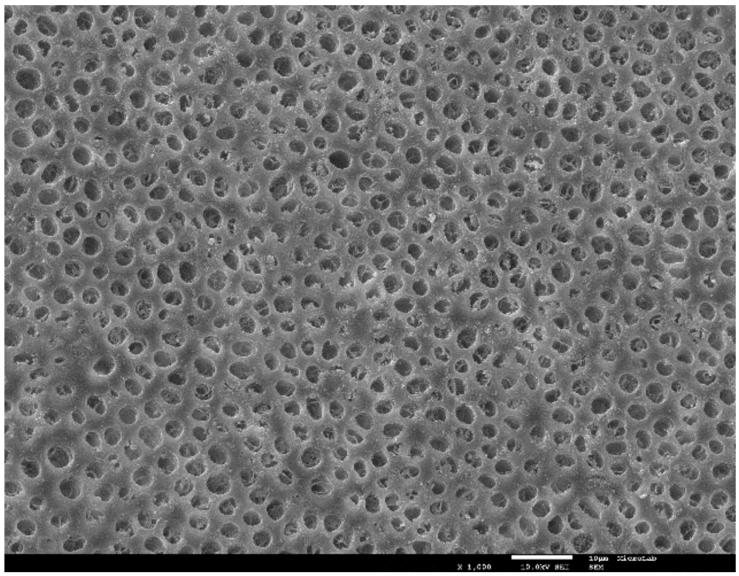


Figura 56. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 1000x.

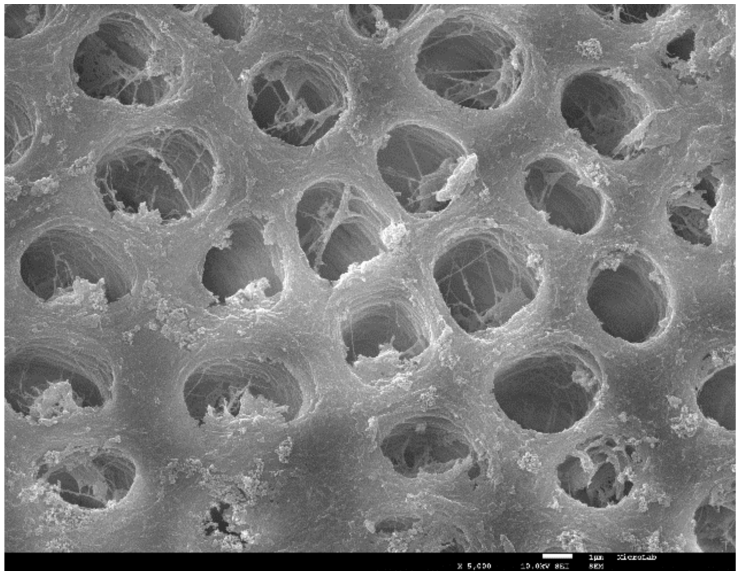


Figura 57. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 5000x. Observam-se as fibras no interior dos túbulos e partículas de titânio depositadas.

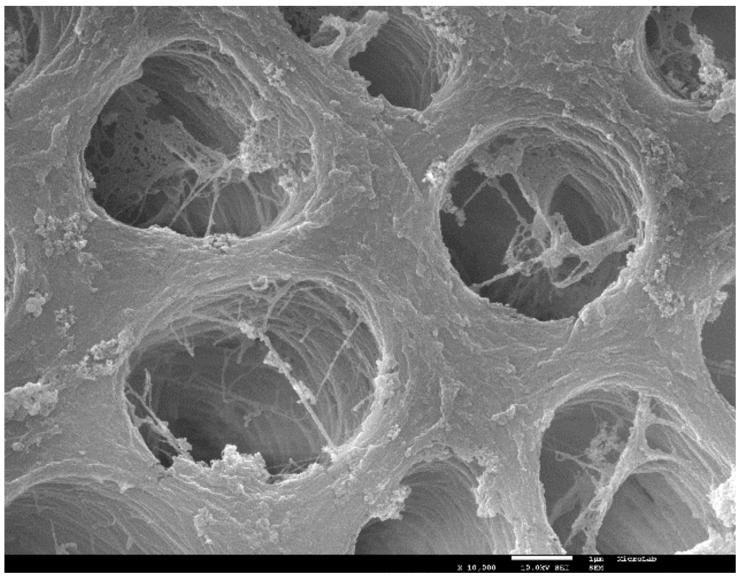
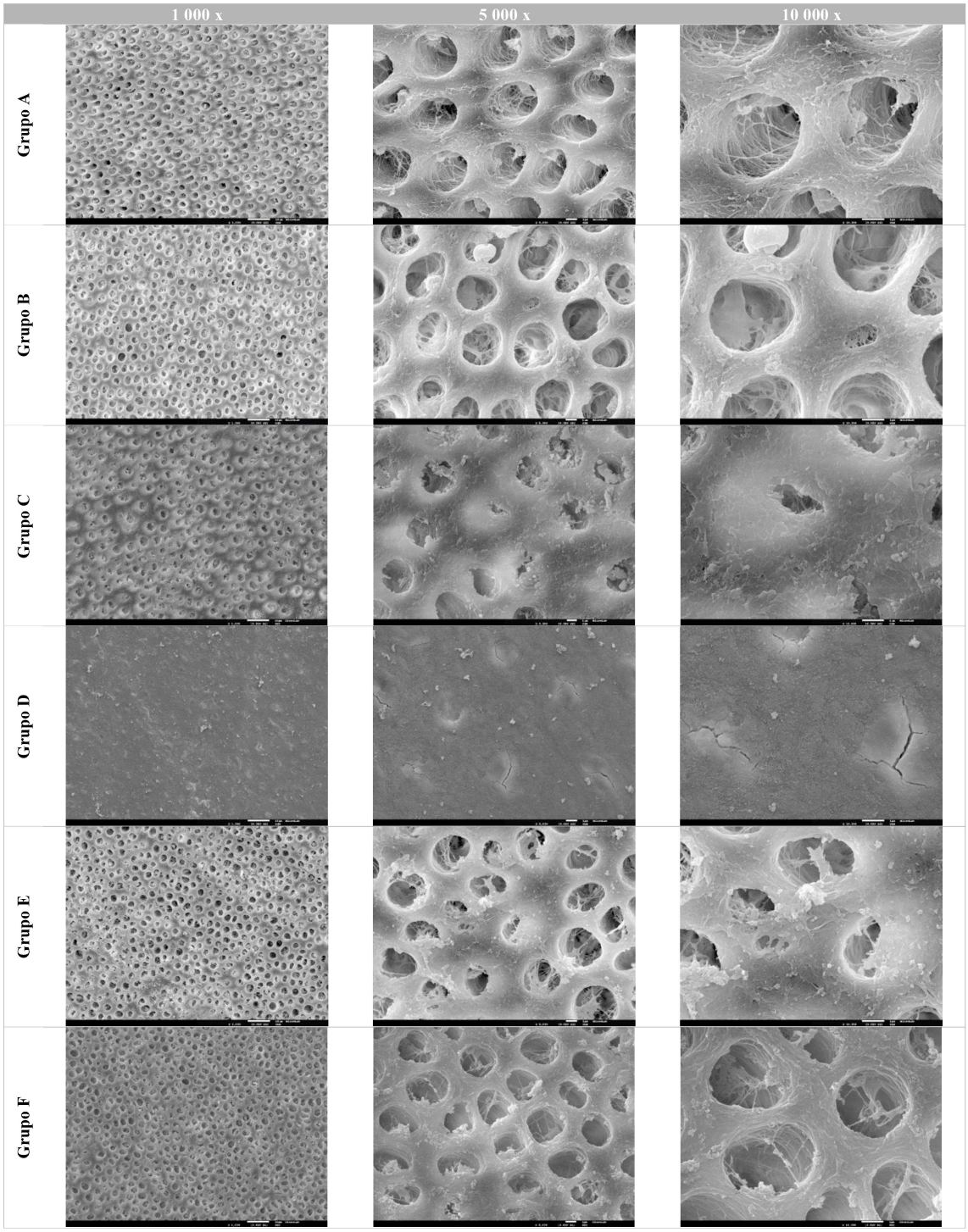


Figura 58. Fotomicrografia da superfície da dentina profunda após tratamento com pasta dentífrica à base de estrôncio, a 10000x. Destaque para as fibras no interior dos túbulos.

Todas as imagens obtidas nas amostras de dentina superficial encontram-se reunidas na tabela 18.

Tabela 18 Imagens de microscopia eletrónica de varrimento da dentina profunda



DISCUSSÃO

A avaliação das amostras em estudo foi feita com recurso a dois métodos diferentes com o objetivo de obter uma avaliação quantitativa e qualitativa das mesmas e, com isso, comparar os resultados obtidos.

O teste de microdureza de Vickers, o qual relaciona a área de uma indentação com a força aplicada e traduz a resistência do material à deformação, tem indicação para materiais resilientes como é o caso da dentina e relaciona-se com a percentagem mineral do tecido, tendo sido aqui escolhido para avaliar quantitativamente as amostras (Kandanuru et al., 2016). Para uma avaliação qualitativa dos especímenes recorreu-se a microscopia eletrónica de varrimento, ferramenta de vasta utilização em morfologia dentária e estrutural, pela observação detalhada que permite. Para tal, os especímenes foram submetidos a um protocolo de preparação para microscopia eletrónica de varrimento que permite uma preservação das fibras de colagénio e microporosidades da dentina e, com isso, a observação detalhada dos fenómenos de desmineralização e remineralização (Perdigão et al., 1995).

No presente estudo foram analisadas amostras de dentina superficial e profunda com o objetivo de se obter uma comparação entre os vários grupos de cada uma das regiões. Não obstante, na avaliação quantitativa das amostras de dentina profunda obteve-se uma grande dispersão de resultados em alguns grupos. Esta pode ser justificada pela heterogeneidade do tecido em estudo a um nível mais profundo. Assim, só podemos falar com relevância estatística na comparação entre os grupos de dentina superficial. As comparações entre os distintos grupos de dentina profunda foram feitas através de uma análise descritiva dos resultados considerando apenas as tendências observadas em cada grupo.

Na dentina superficial obteve-se uma maior microdureza na dentina sã (grupo A) do que na dentina desmineralizada (grupo B), isto é, após o desafio erosivo ocorreu uma diminuição da microdureza de superfície. Kandanuru et al. (2016) demonstraram que o valor de microdureza deste tecido dentário é diretamente proporcional ao seu conteúdo mineral, o que sugere que ocorreu dissolução da hidroxiapatite após o desafio erosivo intrínseco. As imagens de MEV demonstram uma dentina sã organizada, com fibras de colagénio no interior dos túbulos. Já na dentina desmineralizada, é possível observar alguma desorganização e depressão das fibras de colagénio, no entanto elas não foram removidas pelo ataque ácido. Isto sugere que se manteve, como seria de esperar, uma

matriz orgânica desmineralizada (Shellis et al., 2014; Kandanuru et al., 2016). Esta matriz de colagénio impede a difusão da solução acídica levando a uma menor perda mineral (Shellis et al., 2014). Assim, nas imagens de MEV do grupo B observa-se um halo de mineralização na região peritibular que sugere que esta dentina não foi completamente desmineralizada.

Na dentina profunda parece existir, de igual modo, uma microdureza maior na dentina sã (grupo A) do que na dentina desmineralizada (grupo B). Nas imagens de MEV observa-se novamente uma dentina sã organizada com elevada densidade de colagénio. Já no grupo B (dentina desmineralizada) observa-se uma grande desorganização das fibras de colagénio na região intratubular e, mais uma vez, halos de mineralização.

As pastas dentífricas em estudo atuam criando, com os depósitos, uma zona de sobressaturação que promove a remineralização. Deste modo, deduz-se que um *bom* resultado, isto é, uma remineralização efetiva implica deposição de compostos nos túbulos e um aumento da microdureza de superfície.

REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA SUPERFICIAL

Comparando o papel dos agentes remineralizantes na dentina superficial, obteve-se melhores resultados com aplicação tópica de arginina (grupo D) e escovagem com pasta de cloreto de estrôncio (grupo F). Os grupos submetidos a escovagem com pasta de arginina (grupo C) e de fluoreto de estanho (grupo D) conseguiram resultados menos favoráveis, obtendo-se valores de microdureza semelhantes e até inferiores, respetivamente, àqueles observados após desmineralização.

Arginina

No estudo da pasta dentífrica à base de arginina foram utilizadas duas formulações diferentes, de modo a comparar os resultados obtidos com escovagem e sua associação a aplicação tópica. Em relação à microdureza de Vickers, a escovagem com pasta dentífrica à base de arginina (grupo C), resultou em valores estatisticamente semelhantes aos do grupo B (dentina desmineralizada), sugerindo não ter ocorrido uma remineralização da dentina superficial erodida. Por outro lado, quando foi associada a aplicação tópica (grupo D) verificou-se um aumento da microdureza de Vickers, embora não se possa falar numa

remineralização total já que estes valores foram inferiores aos obtidos nas amostras de dentina sã (grupo A).

O potencial da arginina na remineralização de lesões erosivas está relacionado com a disponibilização de iões cálcio e fosfato para a hidroxiapatite, através de um depósito à base de carbonato de cálcio, fosfato, gliocoproteínas salivares e arginina nos túbulos dentinários (Singh, 2013; Tavafoghi & Cerruti, 2016). No grupo D observa-se, de facto, uma grande oclusão tubular, o que se traduziu num aumento da microdureza de superfície, isto é, na remineralização das lesões erosivas. No entanto, o mesmo não aconteceu em C, onde há uma menor oclusão tubular e, por isso, não ocorreu um aumento da microdureza de superfície.

As duas pastas à base de arginina têm, essencialmente, duas características que as distinguem e que poderão ter tido influência nos resultados obtidos: a presença de flúor na pasta dentífrica utilizada na escovagem e as diferentes formas de aplicação. A pasta dentífrica à base de arginina tem flúor na sua composição, no entanto um estudo de Diamanti et al. (2016) mostrou que uma concentração de 1450 ppm de flúor sob a forma de fluoreto de sódio é pouco eficaz na remineralização de lesões de erosão na dentina, enquanto outro, de Wiegand et al.(2014), comprovou que a abrasão da escovagem compromete esta capacidade. Estes estudos sugerem, então, que a presença de flúor terá tido pouca influência nos resultados obtidos. Deduz-se, portanto, que a diferença entre os resultados dos grupos C e D estará relacionado com a abrasão da escovagem, afirmação em consonância com a literatura que já demonstrou que, apesar do seu RDA (*Relative Dentin Abrasivity*) médio (81), a escovagem com esta pasta de arginina envolve perda de tecido (Lopes, Turbino, Zezell, Scaramucci, & Aranha, 2015). A utilização de uma formulação para aplicação tópica após a escovagem permitiu, então, contornar este problema – o agente foi aplicado e não foi removido pela abrasão da escovagem, o que resultou numa maior oclusão dentinária e aumento da microdureza de superfície.

Estanho

Nas amostras de dentina superficial tratadas com pasta à base de fluoreto de estanho (grupo E) observou-se uma diminuição da microdureza de superfície. Este resultado é contrário ao pretendido, uma vez que as pastas dessensibilizantes foram aplicadas no sentido de atingir uma remineralização destas lesões erosivas. Nas imagens de microscopia eletrónica de varrimento observam-se alguns túbulos dentinários parcialmente ocluídos mas a vasta maioria estão abertos. Estes resultados sustentam a

hipótese de que não ocorreu remineralização. No entanto, as imagens de MEV revelam, também, partículas de sílica à superfície, achado que poderá explicar os resultados obtidos.

A sílica é um composto frequentemente incorporado em pastas dentífricas, tendo função espessante e também abrasiva, característica que permite a limpeza e polimento das superfícies dentárias (Ganss, Marten, Hara, & Schlueter, 2016). No entanto, a presença de agentes abrasivos (geralmente sílica) na formulação de dentífricos afeta comprovadamente a eficácia dos mesmos, ao levar a abrasão significativa da superfície dentinária, especialmente quando se trata de um dentífrico com RDA mais elevado (Arnold, Gröger, Bizhang, & Naumova, 2016). Perante uma superfície erodida a suscetibilidade é ainda maior, uma vez que temos uma matriz orgânica desmineralizada mais suscetível a remoção por fenómenos abrasivos (Shellis et al., 2014; Arnold et al., 2016). Por outro lado, o estanho adsorve à sílica, reduzindo o número de iões Sn^{+} livres para formação do precipitado à base de estanho (Ganss, Möllers , & Schlueter, 2017). Este conjunto de fatores poderá estar na origem dos baixos valores de microdureza de superfície observados no grupo E.

Estrôncio

A escovagem com pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio (Grupo F) causou, no presente estudo, um aumento da microdureza de superfície das amostras de dentina superficial. É sabido que, perante uma desmineralização dentinária, o estrôncio atua precipitando sobre os túbulos e integrando a hidroxiapatite, onde substitui os sais de cálcio perdidos e forma uma cálcio-estrôncio-apatite. Esta promove a remineralização ao atuar com matriz para deposição mineral (Saeki et al., 2016). Assim, os resultados obtidos sugerem que ocorreu uma remineralização parcial. No entanto, este aumento da microdureza de superfície foi ligeiro.

Por outro lado, nas imagens de MEV das amostras de dentina superficial tratadas com pasta dentífrica à base cloreto de estrôncio observam-se túbulos dentinários abertos, com pouca ou nenhuma evidência de depósitos. Este resultado pode ser atribuído às forças abrasivas da escovagem combinadas com o RDA do próprio dentífrico, que um estudo de Kodaka et. al (2001) sugere levarem a remoção da dentina bem como dos depósitos no interior dos túbulos. Este fenómeno pode explicar o porquê de não existir um maior aumento da microdureza de superfície, uma vez que há perda da superfície de contacto entre os compostos da pasta e a hidroxiapatite.

Ainda assim, o aumento da microdureza de superfície independentemente da fraca oclusão dentinária vem comprovar a elevada afinidade do estrôncio à hidroxiapatite e, eventualmente, apoiar a teoria de que a formação deste cristal é mais simples do que a da hidroxiapatite biológica (Saeki et al., 2016).

REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA PROFUNDA

Como referido anteriormente, a maior heterogeneidade da dentina profunda parece ter levado, na análise da microdureza de Vickers, a uma elevada dispersão de resultados em alguns grupos, especificamente A, D e F. No entanto, os valores médios obtidos e concentração de resultados permitem detetar algumas tendências nos resultados, observação que possibilita uma análise descritiva dos mesmos. Além disso, a comparação dos intervalos de resultados nos grupos de estudo versus grupos de controlo adianta, também, algumas informações. Esta análise, embora deficiente na sua relevância estatística, permite, em associação às imagens de microscopia eletrónica de varrimento, um estudo comparativo dos vários grupos.

Arginina

No caso da dentina profunda, os resultados obtidos para as duas formulações de pasta de arginina foram em tudo diferentes.

Nas imagens de MEV do grupo C, submetido a ciclos de escovagem com pasta à base de arginina, observa-se uma imagem heterogénea com oclusão parcial de alguns túbulos, resultado semelhante a estudos *in vitro* prévios que relatam uma diminuição do diâmetro dos mesmos (Lopes et al., 2015). O teste de microdureza de Vickers demonstra não haver diferença estatística entre os grupos B (dentina desmineralizada) e C, sugerindo que esta oclusão parcial não foi suficiente para ocorrer remineralização.

Por outro lado, as imagens do grupo D, submetido ao mesmo tratamento seguido aplicação tópica de pasta de arginina, demonstraram os melhores resultados de todo o estudo, tendo-se verificado oclusão total dos túbulos. A análise estatística dos valores de microdureza de Vickers obtidos permite apenas afirmar que estes resultados são diferentes daqueles em A (dentina sã) e B (dentina desmineralizada), no entanto a observação do gráfico da figura 40 sugere que tenha ocorrido remineralização, atingindo-se valores substancialmente superiores a B e até aparentemente melhores do que A. A elevada eficácia desta formulação na redução da hipersensibilidade já foi comprovada,

demonstrando uma ótima oclusão dos túbulos dentinários com resistência a posteriores desafios abrasivos e erosivos, após uma única aplicação (Samuel, Khatri, Acharya, & Patil, 2015). Uma vez que a remineralização implica deposição mineral no interior dos túbulos e tendo em conta os resultados observados neste grupo, deduz-se que tenha acontecido, com a oclusão completa e homogénea dos túbulos, uma remineralização total que, inclusivamente, conferiu resistência à abrasão da escovagem (Shellis et al., 2014).

Estes resultados realçam, também, a superioridade de uma formulação de aplicação tópica, uma vez que a abrasão da escovagem parece interferir com as potencialidades da pasta de arginina.

Estanho

A avaliação quantitativa dos especímenes escovados com pasta dentífrica à base de fluoreto de estanho (grupo E) revelou não existir diferença estatística entre estes e aqueles submetidos apenas a desmineralização (grupo B). Deduz-se que não ocorreu, então, remineralização destas amostras de dentina profunda.

Nas imagens de MEV observam-se, mais uma vez, depósitos de sílica mas, ao contrário das amostras de dentina superficial deste grupo, houve aqui uma oclusão parcial de alguns deles. No entanto, cruzando esta análise com a microdureza de Vickers pode afirmar-se que, mesmo assim, não ocorreu remineralização.

Tal como ocorreu na dentina superficial, a elevada abrasividade da pasta, evidenciada pelos depósitos de sílica à superfície, parece ter removido, pelo mecanismo explicado na dentina superficial, a dentina e os depósitos resultando numa baixa microdureza de superfície.

Estrôncio

Nas amostras de dentina profunda tratadas com pasta à base de cloreto de estrôncio (grupo F) observaram-se, em microscópio eletrónico de varrimento, depósitos no interior de alguns túbulos. Na fotomicrografia de menor ampliação (Fig. 56) observa-se uma imagem muito heterogénea, com túbulos com vários níveis de oclusão.

Por outro lado, a observação da figura 40 parece sugerir que ocorreu um aumento da microdureza de superfície. Mais ainda, a análise estatística e distribuição de resultados sugerem não existir diferença entre o grupo A (dentina sã) e F, isto é, a remineralização com cloreto de estrôncio parece ter permitido resultados semelhantes àqueles da dentina

sã. Tal como ocorreu na dentina superficial, o aumento considerável da microdureza de superfície apesar de não existir uma oclusão dentinária total remete para a elevada afinidade do estrôncio para a hidroxiapatite, substituindo eficazmente o cálcio na sua composição (Saeki et al., 2016).

Em geral, a pasta dentífrica à base de cloreto de estrôncio parece exibir superioridade em relação às demais pastas em estudo – enquanto nos outros grupos a remineralização parece estar dependente de uma boa oclusão dentinária, o estrôncio, apesar de não gerar uma oclusão dentinária total, conseguiu um aumento da microdureza de superfície tanto na dentina superficial como na profunda. A superioridade da pasta de estrôncio em relação ao grupo D (escovagem com pasta de arginina seguido de aplicação tópica de pasta de arginina), único que também conseguiu remineralização, poderá estar sustentada no facto de, como explicam Saeki et. al (2016), a nucleação da cálcio-estrôncio-apatite ser mais simples do que aquela da hidroxiapatite.

LIMITAÇÕES

O presente estudo apresenta algumas características que limitam a generalização das suas conclusões.

Antes de mais, a utilização de dentes humanos implica uma variabilidade nas suas características, o que pode afetar os resultados em vários sentidos. Por um lado, a uniformização dos cortes pode implicar a análise de diferentes zonas, isto é, num dente com 3 mm de dentina os dois cortes de 1,25 mm resultarão numa amostra menos superficial do que um dente mais pequeno, em que este corte nos colocará no nível mais superficial de dentina. Além disso, a distribuição espacial das porções orgânica e inorgânica varia, sendo a própria microdureza de Vickers afetada pela zona em que é medida, devido à grande heterogeneidade do tecido dentinário. Esta heterogeneidade da dentina, embora não seja contornável, pode afetar negativamente os resultados, uma vez que, sendo as indentações maiores do que a microestrutura da dentina, estas podem envolver zonas diferentes.

A provavelmente maior limitação do presente estudo foi o número de amostras (N). Tendo em conta a heterogeneidade da dentina enquanto tecido, o número reduzido de amostras avaliadas quanto à microdureza de Vickers (N=10) resultou numa dispersão de resultados muito grande em certos grupos.

A utilização de saliva artificial constitui, também, uma limitação do estudo. A utilização de saliva natural seria, evidentemente, dificultada pelo seu processo de recolha e preservação e implicaria, do mesmo modo, as suas próprias limitações, no entanto a saliva artificial não tem a capacidade de reproduzir todas as características biológicas da saliva, nomeadamente as proteínas salivares, que poderiam afetar os resultados deste estudo.

Outra importante limitação do presente estudo é o protocolo de indução de lesões erosivas intrínsecas. Lesões erosivas de origem endógena implicam, *in vivo*, períodos curtos de exposição ao ácido, com repetição ao longo de semanas ou meses. Assim, a exposição ao ácido durante 1 min no início do protocolo de remineralização sem mais episódios de desmineralização não traduz o que ocorre na cavidade oral, limitando a extrapolação dos resultados. A matriz orgânica desmineralizada que se manteve após desafio erosivo e teve papel nos resultados obtidos constitui, também, uma limitação do estudo, uma vez que, *in vivo*, proteínas proteolíticas removem esta matriz.

PERSPETIVAS FUTURAS

Estudos futuros beneficiariam de um maior número de amostras (N) de modo a obter resultados mais fidedignos e uma comparação de resultados mais fundamentada. A utilização de dentes semelhantes (por exemplo, primeiros molares), pela similaridade de dimensões e, com isso, das zonas avaliadas permitiria também resultados mais fiáveis.

No sentido de poder extrapolar as conclusões deste estudo, poderia ser interessante, futuramente, elaborar um protocolo de desmineralização mais semelhante àquele que acontece *in vivo*, através, por exemplo, de ciclos de pH conforme acontece em situações de erosão intrínseca.

Quanto ao protocolo de remineralização, seria pertinente, tendo em conta a superioridade da formulação de aplicação tópica e o aparente papel da abrasão da escovagem nos resultados, avaliar o potencial das formulações utilizadas em aplicação tópica, podendo, assim, comparar-se as características das diferentes apatites. Além disso, o estudo do comportamento dos compostos em estudo ao longo do tempo poderia, também, ser conclusivo.

CONCLUSÕES

Nunca esquecendo as limitações estatísticas desta comparação, uma observação geral dos resultados obtidos permite inferir algumas conclusões:

1) Na dentina superficial, após desafio erosivo e diferentes estratégias de remineralização, concluiu-se que:

a) a escovagem com pasta fluoretada à base de arginina não permite um aumento da microdureza de superfície;

b) a escovagem com pasta fluoretada à base de arginina seguida de aplicação tópica de pasta dessensibilizante de arginina permitiu um aumento da microdureza de superfície;

c) a escovagem com pasta à base de fluoreto de estanho resulta numa diminuição da microdureza de superfície;

d) a escovagem com pasta fluoretada à base de estrôncio permite um aumento da microdureza de superfície.

2) Na dentina profunda, após desafio erosivo e diferentes estratégias de remineralização, conclu-iu-se que:

a) a escovagem com pasta fluoretada à base de arginina não permite um aumento da microdureza de superfície;

b) a escovagem com pasta fluoretada à base de arginina seguida de aplicação tópica de pasta dessensibilizante de arginina permite um aumento da microdureza de superfície, atingindo-se valores até superiores aos encontrados na dentina sã;

c) a escovagem com pasta à base de fluoreto de estanho não permite um aumento da microdureza de superfície;

d) a escovagem com pasta fluoretada à base de estrôncio permite um aumento da microdureza de superfície.

3) Na dentina profunda todas as pastas, à exceção daquela à base de fluoreto de estanho, permitem uma oclusão dentinária parcial. Na dentina profunda, todas as pastas permitem uma oclusão dentinária parcial e a escovagem com pasta de arginina seguida de aplicação tópica de pasta de arginina permite uma oclusão dentinária total.

BIBLIOGRAFIA

Algarni, A., Lippert, F., & Hara, A. (2015). Efficacy of stannous, fluoride and their combination in dentin erosion prevention in vitro. *Brazilian Oral Research, 29 (1)*, 1-5. doi:10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0081.

Antunes, K., Amaral, C., & Balbinot, C. (2007). Anorexia e bulimia nervosa: complicações bucais e o papel do cirurgião-dentista frente a transtornos alimentares. *Disciplinarum Scientia, 8 (1)*, 159-167.

Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillip'S Science of Dental Materials* (12ª edição). St. Louis, MO: Elsevier/Saunders. ISBN: 9781437724189

Arnold, W. H., Gröger, C., Bizhang, M., & Naumova, E. A. (2016). Dentin abrasivity of various desensitizing toothpastes. *Head & Face Medicine*, *12(1)*, 16. doi: 10.1186/s13005-016-0113-1

Arnold, W. H., Prange, M., & Naumova, E. A. (2015). Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *Journal of Dentistry*, *43*(4), 440–449. doi: 10.1016/j.jdent.2015.01.014

Aykut-Yetkiner, A., Attin, T., & Wiegand, A. (2014). Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. *Journal of Dentistry, 42 (7)*, 856-861. doi:10.1016/j.jdent.2014.03.011

Batista, G., Rocha Gomes Torres, C., Sener, B., Attin, T., & Wiegand, A. (2016). Artificial Saliva Formulations versus Human Saliva Pretreatment in Dental Erosion Experiments. *Caries Research, 50 (1)*, 78-86. doi:10.1159/000443188

Berman, L. (1985). Dentinal sensation and hypersensitivty: Review of mechanisms and treatment alternatives. *Journal of Periodontology, 56 (4)*, 216-222. doi:10.1902/jop.1985.56.4.216

Borges, A., Barcellos, D., Torres, C., Borges, A., Marsilio, A., & Carvalho, A. (2012). Dentin Hypersensitivity: etiology, treatment possibilities and other related factors: A Literature Review. *World Journal of Dentistry, 3 (1)*, 60-67. doi:10.5005/jp-journals-10015-1129

Caneppele, T., Jeronymo, R., Di Nicoló, R., de Araújo, M., & Soares, L. (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. doi:10.1590/S0103-64402012000400011

Carvalho, T., Colon, P., Ganss, C., Huysmans, M.-C., Lussi, A., Schlueter, N., . . . Wiegand, A. (2015). Consensus Report of the European Federation of Conservative Dentistry: Erosive tooth wear – diagnosis and management. *Clinical Oral Investigations, 19 (7)*, 1557-1561. doi: 10.1007/s00784-015-1511-7

Diamanti, I., Koletsi-Kounari, H., & Mamai-Homata, E. (2016). Effect of toothpastes containing different NaF concentrations or a SnF_2/NaF combination on root dentine erosive lesions, in vitro. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *8*(5), e577–e583. doi: 10.4317/jced.53047

Donovan, T., & Swift, E. J. (2009). Dental Erosion. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *21*(6), 359–364. doi: 10.1111/j.1708-8240.2009.00291.x

Frencken, J., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Laverty, D., & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology, 44 (18)* , 94-105. doi:10.1111/jcpe.12677.

Fuentes, V., Toledano, M., Osorio, R., & Carvalho, R. M. (2003). Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *66*(4), 850–853. doi: 10.1002/jbm.a.10064

Ganss , C., Lussi , A., & Schlueter, N. (2014). The Histological Features and Physical Properties of Eroded Dental Hard Tissue. *Monographs in Oral Science, 25*, 99-107. doi:10.1159/000359939

Ganss, C., Möllers , M., & Schlueter, N. (2017). Do Abrasives Play a Role in Toothpaste Efficacy against Erosion/Abrasion? *Caries Research, 51*, 52-57. doi:10.1159/000452867

Ganss, C., Marten, J., Hara, A., & Schlueter, N. (2016). Toothpastes and enamel erosion/abrasion- impact of active ingredients and the particulate fraction. *Journal of Dentistry*, *54,* 62-67. doi:10.1016/j.jdent.2016.09.005

Ganss, C., Schlueter, N., Hardt, M., Schattenberg, P., & Klimek, J. (2008). Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Research, 42 (1)*, 2-7. doi:10.1159/000111743

Garberoglio, R., & Brannstrom, M. (1976). A scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology, 21 (6)*, 335-362. doi:10.1016/S0003-9969(76)80003-9

Gillam, D., & Orchardson, R. (2006). Advances in the treatment of root dentine sensitivity: mechanisms and treatment principles. *Endodontic Topics, 13*, 13-33. doi:10.1111/j.1601-1546.2006.00209.x

Hara, A., Lippert, F., & Zero, D. (2013). Interplay between Experimental Dental Pellicles and Stannous-Containing Toothpaste on Dental Erosion-Abrasion. *Caries Research, 47*, 325–329 . doi:10.1159/000347051

Helm, J. F. (1986). Esophageal acid clearance. *Journal of Clinical Gastroenterology, 8 (1)*, 5-11.

Huysmans, M. C., Young, A., & Ganss, C. (2014). Erosive tooth wear - The role of fluoride in erosion therapy. *Monographs in Oral Science*, *25*, 230–243. doi: 10.1159/000360555

Hystad Hove, L., Refsholt Stenhagen, K., Mulic, A., Holme, B., & Tveit, A. B. (2015). May caries-preventive fluoride regimes have an effect on dental erosive wear? An *in situ* study. *Acta Odontologica Scandinavica*, *73*(2), 114–120. doi: 10.3109/00016357.2014.956146

Jaeggi, T., & Lussi, A. (2014). Prevalence, Incidence and Distribution of Erosion. *Monographs in Oral Science, 25*, 55-73. doi: 10.1159/000360973

Joshi, M., Joshi, N., Kathariya, R., Angadi, P., & Raikar, S. (2016). Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature. *Journal of Clinical and Diagnostic Research, 10*(10), ZE01-ZE07. doi:10.7860/JCDR/2016/17996.8634

Kandanuru, V., Madhusudhana, K., Ramachandruni, V., Vitta, H., & Babu, L. (2016). Comparative evaluation of microhardness of dentin treated with 4% titanium tetrafluoride and 1.23% acidic phosphate fluoride gel before and after exposure to acidic pH: An ex vivo study. *Journal of Conservative Dentistry, 19* (6), 560-563. doi:10.4103/0972-0707.194032

Kanzow, P., Wegehaupt, F., Attin, T., & Wiegand, A. (2015). Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence International, 47*, 275-278. doi:10.3290/j.qi.a35625

Kodaka, T., Kuroiwa, M., Kuroiwa, M., Okumura, J., Mori, R., Hirasawa, S., & Kobori, M. (2001). Effects of brushing with a dentifrice for sensitive teeth on tubule occlusion and abrasion of dentin. *Journal of Electron Microscopy, 50(1)*, 57-64.

Lopes, R., Turbino, M., Zezell, D., Scaramucci, T., & Aranha, A. (2015). The effect of desensitizing dentifrices on dentin wear and tubule occlusion. *American Journal of Dentistry, 28 (5)*, 297-302.

Manso, A., González-Lopez, S., Bolaños-Carmona, V., Maurício, P., Félix, S., & Carvalho, P. (2011). Regional Bond Strength to Lateral Walls In Class I and II Ceramic

Inlays Luted with Four Resin Cements and Glass-Ionomer Luting Agent. *The Journal of Adhesive Dentistry, 13 (5)*, 455-465. doi:10.3290/j.jad.a19816

Moazzez, R., & Bartlett, D. (2014). Intrinsic Causes of Erosion. *singh, 25*, 180-196. doi:10.1159/000360369

Pashley, D. (1986). Dentine permeability, dentine sensitivity and treament through tubule occlusion. *Journal of Endodontics, 12*, 465-474. doi:10.1016/S0099-2399(86)80201-1

Perdigão, J., Lambrechts, P., Meerbeerk, B., Tomé, A., Vanherle, G., & Lopes, A. (1996). Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dental Materials, 12*, 262-271.

Perdigão, J., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B., Vanherle, G., & Lopes, A. (1995). Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res., 29(9)*, 1111-1120. doi:10.1002/jbm.820290911

Poggio, C., Lombardini, M., Vigorelli, P., Colombo, M., & Chiesa, M. (2012). The Role of Different Toothpastes on Preventing Dentin Erosion. *Wiley Periodicals, 36(3)*, 301-310. doi:10.1002/sca.21105

Saeki, K., Marshall, G., Gansky, S., Parkinson, C., & Marshall, S. (2016). Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties. *Dental Materials, 32(2)*, 240-251. doi:10.1016/j.dental.2015.11.020

Samuel, S. R., Khatri, S. G., Acharya, S., & Patil, S. T. (2015). Evaluation of instant desensitization after a single topical application over 30 days : a randomized trial. *Australian Dental Journal 60(3)*, 336–342. doi: 10.1111/adj.12341

Schlueter, N., Jaeggi, T., & Lussi, A. (2012). Is dental erosion really a problem? *Advances in Dental Research, 24(2)*, 68-71. doi:10.1177/0022034512449836

Seyedmahmoud, R., McGuire, J., Wang, Y., Thiagarajan, G., & Walker, M. (2017). The interrelationship of microstructure and hardness of human coronal dentin using reference point indentation technique and micro-Raman spectroscopy. *Dental Materials*. Advance online publication. doi: 10.1016/j.dental.2017.07.005

Shellis, R., Featherstone, J., & Lussi, A. (2014). Understanding the Chemistry of Dental Erosion. *Monographs in Oral Science, 25*, 163-179. doi:10.1159/000359943

Singh, S. (2013). Pro-Argin: A Breakthrough Technology for Dentin Hypersensitivity Treatment. *International Journal of Scientific Study, 1 (3)*, 133-137.

Tavafoghi, M., & Cerruti, M. (2016). The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. Journal of the Royal Society Interface. *13 (123).* 1-12. doi: 10.1098/rsif.2016.0462

Thuy, T., Nakagaki, H., Kato, K., Hung, P., Inukai, J., & Tsuboi, S. (2008). Effect of strontium in combination with fluoride on enamel remineralization in vitro. *Archives of Oral Biology, 53(11)*, 1017-1022. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.06.005

Urban, V., Machado, A., Vergani, C., Giampaolo, E., Pavarina, A., de Almeida, F., & Cass, Q. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Materials, 25(5)*, 662–671. doi:10.1016/j.dental.2008.10.017

Wiegand, A., Schneider, S., Sener, B., Roos, M., & Attin, T. (2014). Stability against brushing abrasion and the erosion-protective effect of different fluoride compounds. *Caries Research*, *48*(2), 154–162. doi: 10.1159/000353143

Wichgers, T., & Emert, R. (1996). Dentine hypersensitivity. *General Dentistry, 44*, 225-230. doi:8957816

Yang, Z.-y., Wang, F., Lu, K., Li, Y.-h., & Zhou, Z. (2016). Arginine-containing desensitizing toothpaste for the treatment of dentin hypersensitivity: a meta-analysis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, 8*, 1-14. doi:10.2147/CCIDE.S95660.