



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES IÕES
METÁLICOS EM ESMALTE HUMANO FLUORETADO POR
AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE**

Trabalho submetido por
Alice Maria Aldeagas Mira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES IÕES
METÁLICOS EM ESMALTE HUMANO FLUORETADO POR
AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE**

Trabalho submetido por
Alice Maria Aldeagas Mira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Ana Cristina Manso

e coorientado por
Prof.^a Doutora Carla Ascenso
Prof.^a Mestre Joana Carmo

outubro de 2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que são a força motriz que me faz avançar e querer sempre mais.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso, minha orientadora de tese, por ter aceite fazer parte deste projeto, pela confiança depositada em mim, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo do meu percurso académico.

À Prof. Doutora Carla Ascenso, minha coorientadora, pela dedicação, rigor, e disponibilidade constante durante este período de trabalho intenso. Agradeço-lhe a ajuda na parte protocolar e análise estatística.

À Mestre Joana Carmo, minha coorientadora, pelo incentivo, apoio e ajuda no decorrer da presente investigação.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, por facilitar e disponibilizar o acesso ao Laboratório de Biomateriais Dentários do IUEM onde decorreu toda a fase experimental.

Aos meus pais, os grandes propulsores da minha vida, pelo esforço que sempre fizeram para me proporcionar o melhor e a concretização dos meus sonhos, pelos valores que me passaram, pelo amor incondicional e por me apoiarem incessantemente.

À minha irmã, por me fazer crescer e aprender todos os dias, pela coragem e pelos momentos marcantes que temos vivido juntas.

À Carolina, a minha fiel parceirinha de box, que me acompanhou em tantos momentos e da primeira à última consulta na Clínica Egas Moniz. Uma amiga que levo no coração e para vida.

Ao Viriato, por ser um pilar, um companheiro de todas as horas e um amigo incrível. Um exemplo para mim pela sua dedicação e paixão pela medicina dentária que me fazem querer melhorar mais e mais. Obrigada pela partilha de conhecimentos e pela constante motivação.

Aos meus amigos fora da faculdade e da faculdade, sem vocês este meu percurso teria sido bem mais difícil.

Ao IUEM e à Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz pela formação de excelência concedida aos seus estudantes.

RESUMO

Objetivo: Medir e comparar a microdureza de superfície de esmalte após a incorporação de diferentes catiões e de flúor na hidroxiapatite.

Materiais e métodos: 18 molares humanos, íntegros, a partir dos quais foram obtidos 70 fragmentos de esmalte, aleatoriamente divididos em 7 grupos de estudo (A, B, C, D, E, F e G). Em todos os grupos, exceto no A, foi aplicado um verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha). O grupo B foi seguidamente imerso em água destilada e os grupos C a G em soluções de saliva artificial diferentes, por um período de 6 dias e com renovação diária: C, saliva artificial isenta de cloreto de cálcio; D, saliva artificial com cloreto de cálcio; E, saliva artificial com cloreto de estrôncio em substituição do cloreto de cálcio; F, saliva artificial com cloreto de magnésio em substituição do cloreto de cálcio e G, saliva artificial com cloreto de zinco em substituição do cloreto de cálcio. Todos os grupos foram avaliados quanto à microdureza de superfície através do teste de Vickers. Os resultados foram tratados estatisticamente pela aplicação do teste ANOVA a um fator com intervalo de confiança de 95% e pelo teste de Bonferroni (*software* SPSS Statistics versão 24.0 (IBM, Chicago, EUA)).

Resultados: O grupo B foi o único que não apresentou mineralização e exibiu um valor de microdureza de 472 ± 6 HV ($p < 0,05$), não diferindo estatisticamente do grupo A (controle) 466 ± 7 HV ($p < 0,05$). Os restantes grupos apresentaram como valores de microdureza, C: 485 ± 4 HV; D: 572 ± 7 HV; E: 517 ± 5 HV; F: 531 ± 6 HV; G: 504 ± 8 HV. Para os 7 grupos foram obtidos valores de $p > \alpha(0,05)$.

Conclusões: Tanto o estrôncio, como o magnésio ou o zinco originaram valores médios de microdureza de esmalte indicativos de ter acontecido mineralização, porém os resultados foram sempre menores aos causados pelo cálcio.

Palavras-chave: esmalte, iões divalentes, mineralização, microdureza.

ABSTRACT

Objectives: Measure and compare the microhardness of enamel surface after the incorporation of different cations and fluoride in hydroxyapatite.

Materials and methods: 18 human molars, intact, from which 70 enamel fragments were obtained, randomly divided into 7 study groups (A, B, C, D, E, F and G).

In all groups, except A, a 5% sodium fluoride varnish (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Germany) was applied. Group B was subsequently immersed in distilled water and groups C to G in different artificial saliva solutions, for a period of 6 days and with daily renewal: C, calcium chloride free artificial saliva; D, calcium chloride free artificial saliva; E, strontium chloride substituted artificial saliva; F, magnesium chloride substituted artificial saliva and G, zinc chloride substituted artificial saliva. All groups were evaluated for surface microhardness using the Vickers test. The results were treated statistically by applying the ANOVA test to a 95% confidence interval factor and the Bonferroni test (SPSS Statistics software version 24.0 (IBM, Chicago, EUA)).

Results: Group B was the only one that did not show mineralization and showed a microhardness value of 472 ± 6 HV ($p < 0.05$), not differing statistically from group A (control) 466 ± 7 HV ($p < 0.05$). The remaining groups showed as microhardness values, C: 485 ± 4 HV; D: 572 ± 7 HV; E: 517 ± 5 HV; F: 531 ± 6 HV; G: 504 ± 8 HV. For the 7 groups $p > \alpha(0.05)$ values were obtained.

Conclusions: Both strontium, magnesium and zinc originated average values of enamel microhardness indicative of mineralization, but the results were always lower than those caused by calcium.

Key words: enamel, divalent ions, mineralization, microhardness.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE SIGLAS	11
INTRODUÇÃO	13
ESMALTE HUMANO	14
MINERALIZAÇÃO	15
COMPOSTOS MINERALIZANTES	17
Flúor	17
Cálcio	18
Estrôncio	19
Magnésio	20
Zinco	20
SALIVA	21
VERNIZES DE FLÚOR.....	23
PERTINÊNCIA DO ESTUDO.....	23
OBJETIVO DO ESTUDO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	25
LOCAL DO ESTUDO	25
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
DESENHO DO ESTUDO	26
PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	27
AGENTES MINERALIZANTES	31

ALEATORIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA	33
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	51
BIBLIOGRAFIA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho do estudo.	26
Figura 2. I: Curetas Gracey. II: Dente humano com presença de cálculo e tecidos moles.	27
Figura 3. I: Máquina de polimento LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Ballerup, Dinamarca). II: Discos de lixa de polimento de granulometria, da esquerda para a direita, 320, 600 e 1200 grits (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). III: Polimento de dente na máquina de polimento. IV: Dente.....	28
Figura 4. I: Marcação de linhas horizontais ao nível da JAC e 4 mm acima da JAC. II: Marcação de linhas paralelas ao LED e com distância entre si de 3 mm. III: Dente com todas as linhas de orientação de corte marcadas.....	29
Figura 5. I: Cera colante (Sticky Wax, Kemdent®, Wiltshire, Inglaterra). II: Dente aderido com cera colante ao suporte de acrílico.....	29
Figura 6. I: Micrótomo de tecidos duros Accutom 50® (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). II: Chave e suporte metálico para fixar o bloco de acrílico com o dente ao micrótomo. III: Dente posicionado no micrótomo para o primeiro corte, corte único com direção mesio-distal. IV: Dente posicionado no micrótomo para corte múltiplo vestibulo-lingual.....	30
Figura 7. I: Espécimen de dimensões 4x3 mm. II: Fragmentos após colocação em água desionizada para eliminar eventuais partículas resultantes dos processos de polimento e corte.....	31
Figura 8. I: Verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote: 2003747) usado no estudo. II: Aplicação de verniz de flúor na face polida do esmalte de um fragmento dentário.	31
Figura 9. Cloreto de cálcio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, CAS-No:10043-52-4, lote: K49688478) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo D.	32
Figura 10. Cloreto de estrôncio hexa-hidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, CAS-No: 10025-70-4, lote: MKCB1948V) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo E.	32

Figura 11. Cloreto de magnésio hexa-hidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, CAS-No: 7791-18-6, lote: BCBV9958) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo F.	33
Figura 12. Cloreto de zinco anidro (Chem-Lab NV, Zedelgem, Bélgica, CAS-No: 7646-85-7, lote: 26.2741604) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo G.	33
Figura 13. Estufa de laboratório UFE 400 (Mettler® GmbH, Schwabach, Alemanha) a 37 °C de temperatura constante.....	34
Figura 14. I: Máquina de microdureza de Vickers HSV-30® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). II: Fragmento no momento da indentação com uma força de 4,903 N por 15 segundos.	36
Figura 15. I e II: Imagens de indentações realizadas em esmalte pela máquina de microdureza de Vickers HSV-30® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).	36
Figura 16. Gráfico da normalidade com testes aplicado aos 7 grupos de estudo A a G (n=10), mostrando as variâncias e os valores discrepantes (<i>outliers</i>), quando presentes. *, <i>outlier</i> extremo; ○, <i>outlier</i> moderado (não presente).....	38
Figura 17. Gráfico de comparação dos valores médios estatísticos da microdureza de superfície dos diferentes grupos.	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do teste Shapiro-Wilk recorrendo ao software SPSS, considerando os 7 grupos de A a G com n=10.	38
Tabela 2. Resultados pós aplicação do teste Shapiro-Wilk considerando 6 grupos com n=10 e o grupo C com n=9.....	39
Tabela 3. Resultados pós aplicação do teste de homogeneidade de variâncias (teste de Levene).....	39
Tabela 4. Resultados pós aplicação do teste ANOVA one-way através do software SPSS Statistics (IBM, Chicago, EUA).	40
Tabela 5. Resultados de comparação múltipla dos valores médios dos grupos pelo teste de Bonferroni.....	41
Tabela 6. Valores obtidos da análise descritiva para cada um dos grupos em estudo...42	

LISTA DE SIGLAS

FAP – Fluorapatite

h – Horas

HAP – Hidroxiapatite

HV – Dureza de Vickers

JAC – Junção amelocementária

Kps – Produto de solubilidade

LED – Longo eixo do dente

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

N – Newton

°C – Graus Celsius

Ops – Produto iónico

pH – $-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$

rpm – Rotações por minutos

s – Segundos

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

μM – Micromolar

INTRODUÇÃO

O dente é um órgão complexo, considerado uma das estruturas mais substanciais do corpo humano e é constituído por quatro estruturas base, esmalte, dentina, cemento e polpa (Angelova Volponi et al., 2018; Lacruz et al., 2017; Palmer et al., 2008).

O esmalte dentário é o tecido biológico mais duro do corpo humano, sendo a sua dureza fortemente estudada e usada como indicador para avaliar algumas das propriedades do dente, como a suscetibilidade à cárie, a resistência ao desgaste, a propagação de fissuras e a mineralização. Esta particularidade, permite não só ao esmalte perdurar no meio oral, como também desempenhar um papel chave nas funções do sistema estomatognático, como é o caso da mastigação (Gelli et al., 2019; Lacruz et al., 2017; Mansoor et al., 2019).

Embora a cárie dentária seja uma doença evitável e que observou um declínio na maioria dos países desenvolvidos nos últimos anos, continua a ser um grande problema de saúde pública (Ali et al., 2019; Kooshki et al., 2019; Simmer et al., 2020). Segundo a literatura, é uma doença crónica infecciosa, multifatorial e transmissível dos tecidos duros dentários que ocorre quando existe um desequilíbrio na interface dente/placa do hospedeiro. O processo cariogénico é influenciado pela suscetibilidade da superfície dentária, perfil bacteriano, quantidade e qualidade da saliva, presença de hidratos de carbono fermentáveis e flúor (Ayoub et al., 2020; Kooshki et al., 2019; Walsh et al., 2019).

A saliva humana também exerce um papel preponderante na mineralização dentária, desempenhando uma função tampão e atuando como transportador de iões como flúor (F^-), cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) que conduzem a uma mudança construtiva na estrutura do esmalte (Baumann et al., 2017; Farooq & Bugshan, 2020). No entanto, esta nem sempre consegue proporcionar um ambiente anticárie. O fator deve-se à sacarose dietética metabolizada em ácido láctico por *Streptococcus mutans* que pode exceder a capacidade de neutralização do bicarbonato salivar, reduzindo assim o pH da placa, que cai abaixo dos níveis necessários para sustentar a mineralização e a remineralização (Ayoub et al., 2020; Hua et al., 2019; Simmer et al., 2020).

O desenvolvimento e a mineralização do esmalte são processos complexos e altamente regulados pelas células do órgão de esmalte, os ameloblastos (Lacruz et al., 2017; Shao et al., 2019).

Por sua vez, o flúor tem um papel importante na mineralização dentária, pois diminui a solubilidade mineral da estrutura do dente. A sua presença também aumenta a probabilidade de substituir a hidroxiapatite (HAP) por um mineral mais resistente ao ácido como a fluorapatite (FAP). O esmalte tratado com fluoretos aumenta a sua dureza de superfície (Ali et al., 2019; Doddamani & Girish Babu, 2017; Lale et al., 2020). Os vernizes fluoretados são agentes tópicos de fácil aplicação por profissionais e que, de uma forma segura, fornecem aos dentes uma elevada concentração flúor (Kooshki et al., 2019).

Segundo Kooshki et al. (2019), a conexão entre o conteúdo mineral e a microdureza de superfície do esmalte, pode ser usada como critério para avaliar o efeito de múltiplas substâncias mineralizantes na suspensão da desmineralização e na restituição de lesões.

ESMALTE HUMANO

O esmalte dentário é uma estrutura altamente mineralizada de origem epitelial que forma uma barreira isolante e protege o dente de forças físicas, químicas e térmicas que, de outra forma, seriam prejudiciais à polpa, tecido vital subjacente (Lacruz et al., 2017; Mansoor et al., 2019).

Sendo acelular, não pode ser substituído ou reparado automaticamente quando danificado. No entanto, não é um tecido estático e pode sofrer algumas alterações ao nível da sua mineralização (Farooq & Bugshan, 2020; Shao et al., 2019). O seu alto conteúdo mineral torna-o extremamente resistente à destruição, porém suscetível à desmineralização por ácidos formados na cavidade oral por bactérias da flora oral (Ali et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020).

Com uma espessura de 2 a 3 mm, tem na sua constituição 92 a 96% de substâncias inorgânicas, principalmente fosfato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] que está presente como cristais de hidroxiapatite (HAP) de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Apresenta ainda na sua composição 1 a 2% de materiais orgânicos, essencialmente proteínas como a amelogenina e a enamulina e 3 a 4% de água (Mansoor et al., 2019; Zhou & Zheng, 2008). Além disso, também podemos encontrar na sua estrutura, carbono (C), magnésio (Mg), sódio (Na), flúor (F), potássio (K), zinco (Zn), chumbo (Pb), nitrogênio (N), ferro (Fe) e oxigênio (O), bem como outros oligoelementos (Mansoor et al., 2019).

O processo de formação do esmalte é chamado de amelogenese e engloba uma série de atividades, incluindo a formação de uma matriz proteica conducente à mineralização, o transporte de íons, a regulação do pH e a apoptose. Qualquer falha que ocorra durante uma das fases da amelogenese pode resultar em patologias que afetam a saúde do esmalte (Lacruz et al., 2017).

O esmalte formado apresenta uma microestrutura característica composta por prismas ou hastes de HAP com orientações diferentes. Os cristais de HAP são finamente compactados com uma espécie de cola proteica composta por enamulina, originando as hastes de esmalte. Estas hastes, que apresentam orientações diferentes, são encapsuladas por uma fina bainha orgânica rica em proteínas, como a ameloblastina hidrofílica e estendem-se desde a junção dentino-esmalte até a superfície do dente (Lacruz et al., 2017; Zhou & Zheng, 2008).

O órgão do esmalte é formado por uma população mista de células. Entre eles estão os ameloblastos, que são os principais responsáveis pela formação e mineralização do esmalte, e formam uma monocamada que está em contato direto com a superfície do esmalte em formação (Lacruz et al., 2017).

Embora o conteúdo orgânico represente uma pequena percentagem na sua constituição, ele exerce um relevante papel na determinação do comportamento mecânico do esmalte. Esse conteúdo orgânico, ajuda a estabelecer planos tridimensionais de clivagem que impedem a fratura de progredir e possibilitam movimentos limitados entre as hastes durante o stress oclusal (Elfallah et al., 2015).

Por sua vez, elevada dureza do esmalte deve-se ao seu alto conteúdo mineral, enquanto que a sua fragilidade é atribuída ao módulo de elasticidade e à baixa resistência à tração (Zhou & Zheng, 2008).

MINERALIZAÇÃO

O esmalte dentário é o único tecido do corpo humano derivado do epitélio que mineraliza em situação não patológica. O osso e a dentina, outros dos principais tecidos mineralizados, são derivados de células mesenquimais (Lacruz et al., 2017).

Os sólidos iônicos, como HAP, mantêm-se unidos por interações eletrostáticas. As forças de atração são opostas e determinadas pela magnitude das cargas, pela distância entre elas e pela constante dielétrica do meio circundante. Portanto, quanto mais compactados estiverem os íons de um cristal, mais difícil será separá-los por dissolução.

De referir, que diferentes sólidos iónicos podem formar-se a partir de íons cálcio e fosfato, mas os menos solúveis são a HAP e a FAP devido à compactação dos íons nas suas estruturas (Johnsson & Nancollas, 1992; Simmer et al., 2020).

O meio que envolve um sólido iónico pode ter uma enorme influência nas forças de atração que o unem. Por sua vez, as moléculas polares de água formam interações eletrostáticas com os íons na superfície do esmalte, levando um certo número a sair da superfície do cristal e a dissolver-se. A menos que haja uma taxa igual ou maior de íons a serem depositados na superfície do esmalte, haverá uma desmineralização líquida. Felizmente, e regra geral, a saliva contém concentrações de vários íons que ajudam a compensar essas perdas (Hay, 1995; Rathje, 1954).

Na estrutura de HAP dominam os aniões fosfato (PO_4^{3-}) que são significativamente maiores que os íons Ca^{2+} e OH^- do cristal. Os íons cálcio e hidroxilo estão inseridos nos espaços entre os fosfatos, sendo os últimos maiores, expandem mais a estrutura cristalina de HAP. Por exemplo, quando há substituição do grupo OH^- da HAP por F^- , forma-se uma estrutura cristalina chamada de FAP, onde os fosfatos atingem uma organização mais condensada, aumentam as forças de atração entre íons de carga oposta e a estabilidade do cristal. Isto deve ao facto de os íons flúor apresentarem menores dimensões que os íons hidroxilo (Bhatnagar, 1968; Simmer et al., 2020).

Num sólido iónico, a constante do produto de solubilidade (Kps) é igual ao produto iónico (Qps) das concentrações dos íons que compõem o sólido. Ou seja, quando o sólido está em equilíbrio com o meio envolvente não há perdas ou ganhos de íons na estrutura cristalina. Um cristal com baixo Kps é menos solúvel do que um com alto Kps e quando o Qps de uma solução iónica em torno de um cristal é menor que o Kps, o mesmo desmineraliza. Numa situação contrária, em que o Qps é maior que o Kps, ocorre a mineralização (Johnsson & Nancollas, 1992; Simmer et al., 2020).

Uma vez constantes as concentrações totais de cálcio e fosfato, a acidez do meio reduz a estabilidade do esmalte, reduzindo o Qps do fluido à sua volta. A acidez refere-se ao ião hidrogénio (H^+) ou à concentração de protões do meio líquido. Os íons de hidrogénio associam-se a aniões em solução, o que leva a uma diminuição das concentrações das formas não protonadas (PO_4^{3-} e OH^-) que estão em equilíbrio com o mineral, reduzindo assim o Qps de HAP (Simmer et al., 2020).

Na cavidade oral, o pH cai devido à conversão dos hidratos de carbono em ácidos orgânicos, como o lactato. Um conceito comum é que existe um pH crítico a partir do qual o esmalte desmineraliza. Este conceito transmite a ideia de que se o pH cair suficientemente, o esmalte começa a desmineralizar, contudo este não desmineraliza quando o pH atinge um determinado ponto, mas sim quando o Qps cai abaixo do Kps do mineral. Todo este processo depende das excreções de cálcio, fosfato e bicarbonato das glândulas salivares, bem como dos níveis de flúor no esmalte (Ali et al., 2019; Buzalaf et al., 2011; Clapp et al., 2019). (M. A. R. Buzalaf et al., 2011).

O pH no qual o esmalte fluoretado começará a desmineralizar é inferior aquele em que o pH não fluoretado começará a desmineralizar. O pH no qual o mineral do dente se desmineraliza não tem um valor único e universal (Buzalaf et al., 2011; Clapp et al., 2019).

COMPOSTOS MINERALIZANTES

Flúor

O flúor é o elemento mais reativo e com menor peso atômico dentro do grupo dos halogénios. Além disso, a sua ligação química de elevada energia com os eletrões forma um fluoreto aniónico. Sendo o mais eletronegativo de todos os elementos químicos da tabela periódica, nunca é encontrado na Terra na sua forma elementar (Lacson et al., 2020; O'Mullane et al., 2016).

O flúor na saliva possui três funções principais, prevenção da desmineralização dentária, promoção de remineralização e intervenção no crescimento bacteriano (Farooq & Bugshan, 2020).

A incorporação de flúor no esmalte acontece durante o desenvolvimento e mineralização do mesmo e também depois da coroa do dente estar completamente formada e exposta na cavidade oral. Contudo, os fluoretos não são uniformemente distribuídos por toda a coroa dentária, sendo mais abundantes nas camadas externas de esmalte (Lacruz et al., 2017).

Assim, os iões de flúor são incorporados na molécula de HAP pela substituição de iões hidroxilo, criando uma estrutura de HAP enriquecida com flúor que é mais estável quimicamente que a HAP pura (Farooq & Bugshan, 2020; Lacruz et al., 2017).

Conforme aumentam os níveis de flúor e diminuem os de carbonato, o esmalte eleva as suas taxas de crescimento de cristalitos e torna-se menos solúvel a ácidos. Esta diminuição da solubilidade, que acontece devido à adição de flúor, é um dos principais mecanismos pelos quais o flúor contribui para minorar o risco de cárie dentária (Lacruz et al., 2017; Lale et al., 2020; Rizvi et al., 2016; Thakkar et al., 2017).

Assim, o flúor é capaz de ajudar a reparar os cristalitos danificados e auxiliar na reposição do conteúdo mineral perdido durante a desmineralização (Farooq & Bugshan, 2020).

Como referido anteriormente, o flúor é altamente reativo, o que permite que os seus íons se liguem aos cristalitos de esmalte parcialmente desmineralizados e reajam com os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . De notar que, para formar uma molécula de fluorapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, por cada dois íons de fluoreto são necessários dez de cálcio e seis de fosfato que estão presentes na saliva ou são fornecidos por meio de agentes terapêuticos. Portanto, na aplicação tópica de íons de flúor, a disponibilidade de íons de cálcio e fosfato pode ser um fator limitante para que ocorra remineralização do esmalte (Lacruz et al., 2017; Lacson et al., 2020; Thakkar et al., 2017).

Devido ao esmagador papel do flúor na sequência de remineralização, ele foi acrescentado à maioria dos produtos de libertação de fosfato de cálcio, em diferentes formas, mecanismos de atuação e concentrações. A eficácia da remineralização de materiais contendo flúor está relacionada com o conteúdo de flúor, com os mecanismos de fixação das matrizes de flúor e com os componentes dos materiais (Elkassas & Arafa, 2014).

Atualmente, existem três métodos básicos de administração de flúor: baseado na comunidade (água fluoretada, sal e leite), administrado por profissionais de saúde (géis de flúor e vernizes) e autoadministrado (dentífricos e elixires bucais) (O'Mullane et al., 2016).

Cálcio

O cálcio é considerado, quantitativamente, o principal constituinte mineral do sistema esquelético, desempenhando um papel fulcral nos processos fisiológicos do corpo humano. É um componente inorgânico da saliva e está presente em diferentes formas no fluido oral. Uma grande parte dos íons cálcio na saliva está ligada a elementos

inorgânicos, como o fosfato, o carbonato ou macromoléculas, como proteínas (Rabiei et al., 2019).

No esmalte maduro, o Ca^{2+} é o íon mais abundante e pode ser incorporado rapidamente a partir do sangue. Segundo a literatura, o Ca^{2+} representa aproximadamente 36% do peso do esmalte, sendo amplamente incorporado durante o estágio de maturação. Estágio este, onde é encontrado cerca de 86% do Ca^{2+} da estrutura de esmalte (Lacruz et al., 2017).

A alteração no nível de íons de cálcio presentes na saliva que envolve os cristais do esmalte, afeta a dissolução dos minerais, alterando o grau de saturação da HAP. Essas modificações podem, conseqüentemente, impactar a atividade do cálcio nos processos de desmineralização e remineralização que ocorrem na estrutura dentária. Em geral, a diminuta concentração de cálcio, traduz-se em baixa força motriz para deposição de HAP a pH oral normal (Dawes, 2003; Rabiei et al., 2019).

Estrôncio

O estrôncio pertence à família dos metais alcalinoterroso, tal como o cálcio, e encontra-se uma posição abaixo deste na tabela periódica. Está naturalmente presente no corpo humano de um adulto em aproximadamente 0,3 a 0,4 g, estando 99% no esqueleto em dentes ou osso. Os íons estrôncio não apresentam radioatividade naturalmente e encontra-se usualmente nas rochas, solo, poeira e carvão. Estudos relatam que o estrôncio é adquirido pelos humanos através da ingestão de água e alimentos, sendo a suplementação com estrôncio bem tolerada e geralmente segura em doses aprovadas (Fernandes et al., 2019; Wang et al., 2019).

Com características físico-químicas idênticas às do cálcio, a ligação do estrôncio aos tecidos dentários tem sido cada vez mais alvo de estudos, principalmente pelos íons de estrôncio terem a capacidade de se introduzirem nos cristais de HAP. Segundo Wang et al., (2019), o uso de dentífricos com estrôncio, hidroxiapatite de estrôncio (Sr-HAP) e flúor pode intensificar a remineralização de lesões dentárias de white spot. Um estudo feito, no mesmo ano, e pelo mesmo autor, revelou ainda que amostras de esmalte em soluções ácidas com de íons estrôncio apresentaram menor redução da dureza de superfície do esmalte, menos íons de fósforo dissolvidos, menor rugosidade superficial e menos alterações de altura no esmalte em comparação com as soluções ácidas sem adição de íons de estrôncio (Wang et al., 2019).

No campo da Medicina Dentária, os dentífricos com adição de estrôncio têm sido utilizados para tratar a hipersensibilidade dentária há vários anos. Além disso, a literatura refere que a diminuição da solubilidade do esmalte, a menor prevalência do índice de cárie e níveis mais baixos de placa estão associados à presença de estrôncio. Este elemento químico tem-se mostrado um eficaz agente cariostático, anti placa e anti gengivite, uma vez que pode deslocar o cálcio na placa e prevenir a sua mineralização (Fernandes et al., 2019).

Magnésio

O magnésio é um elemento que está presente no esmalte, principalmente sob a forma de fosfato de magnésio. É crucial para o bom desenvolvimento da estrutura do dente, revelando impacto na qualidade e anatomia dos tecidos duros dentários (Klimuszko et al., 2018; Uwitonze et al., 2020).

Como o cálcio, o magnésio reage com os grupos fosfato, mas o seu conteúdo no esmalte é muito menor em comparação com o cálcio (Waszkiel et al., 2004).

Os íons de magnésio têm a capacidade de suprimir a precipitação e o crescimento dos cristais de HAP e de estabilizar a forma amorfa do fosfato de cálcio. Assim, desempenham um papel de destaque na regulação do crescimento do cristal de HAP, determinando a sua estabilidade física e química. Além disso, também afetam a atividade da fosfatase alcalina que pode inibir a transformação do fosfato de cálcio amorfo numa forma cristalina (Klimuszko et al., 2018; Waszkiel et al., 2004).

Zinco

O zinco é o elemento metálico encontrado em maior abundância no corpo humano, com uma percentagem de 85% nos músculos e ossos. Este elemento acumula-se nas estruturas superficiais dos dentes onde a sua concentração varia entre 430 e 2100 ppm. A maior deposição de Zn ocorre antes da erupção do dente, sendo a deposição pós-eruptiva irregular. No esmalte, os íons zinco são prontamente adquiridos pela HAP, competindo com os íons cálcio por posições na superfície do cristal (Bhardwaj et al., 2018; Creeth et al., 2018; Rahman et al., 2019).

Na literatura, consta que o pré-tratamento do esmalte com Zn origina uma resistência à dissolução ácida, idêntica em magnitude àquela que é produzida por concentrações molares equivalentes de flúor. Assim, o Zn não só é um componente importante da estrutura dentária, especialmente do esmalte, como também a sua distribuição e quantidade podem influenciar o desenvolvimento de lesões de cárie (Rahman et al., 2019).

Segundo um trabalho de investigação *in vitro* levado a cabo por Mohammed et al. (2014) em molares humanos, a capacidade do zinco para reduzir a desmineralização do esmalte num contexto pós lesões de cárie foi evidenciada. Nesse mesmo estudo, os fosfatos de zinco, ao exibirem um produto de baixa solubilidade constante, mostraram ser pouco provável que a camada formada por eles na superfície de esmalte, fosse muito solúvel em condições ácidas.

Outros ensaios, demonstraram ainda que o zinco reduz a carga bacteriana e a formação de cálculo dentário, sendo frequentemente adicionado a produtos de saúde oral devido às suas propriedades antibacterianas e de controlo de halitose (Bhardwaj et al., 2018; Creeth et al., 2018).

SALIVA

A substituição iónica é um fenómeno comum na cavidade oral e duas das principais partes envolvidas são o esmalte e a saliva (Featherstone & Lussi, 2006).

As glândulas salivares são um órgão que liberta secreções na cavidade oral, sendo classificadas em dois tipos, as glândulas major e as minor. As primeiras e principais, das quais fazem parte a parótida, a submandibular e a sublingual, estão distantes da mucosa oral, contudo estão a ela conectadas por meio de ductos glandulares extras. As segundas, residem na mucosa ou submucosa e podem segregar diretamente na cavidade oral (de Paula et al., 2017; Farooq & Bugshan, 2020; Samiei et al., 2019).

Segundo Zhou e Zheng (2008), o ambiente oral cumpre um papel extremamente importante na conduta tribológica das estruturas dentárias, sendo a saliva o componente com maior relevo químico na boca humana.

Os substratos sólidos, tal como as mucosas expostas na cavidade oral, são revestidos por película adquirida, uma camada de proteínas salivares, cuja formação se inicia em segundos e em qualquer superfície sólida evidente no meio oral (Farooq & Bugshan, 2020; Zhou & Zheng, 2008).

A formação da saliva inicia-se com a adsorção de proteínas e péptidos individuais que levam à homeostase mineral. Algumas dessas proteínas ricas em estaterina, prolina e histatinas, têm afinidade pelas superfícies de esmalte e auxiliam na remineralização, elevando a concentração de cálcio. Existem ainda outras proteínas presentes com função antimicrobiana e antibacteriana, como a catelicidina LL3 e as histatinas, respectivamente (Baumann et al., 2017; Farooq & Bugshan, 2020).

A saliva humana é um fator natural, essencial na cavidade oral, que tem como funções diluir, limpar, neutralizar e tamponar os ácidos produzidos na placa que afetam a superfície do esmalte, também reduz a desmineralização e potencia o processo de remineralização ao fornecer vários íons. Além destas ações, faz parte de um sistema de lubrificação entre tecidos duros (esmalte) e tecidos moles (mucosa), para ajudar a reduzir o desgaste dentário e minorar o atrito (Baumann et al., 2017; Rizvi et al., 2016; Zhou & Zheng, 2008).

Conforme descrito na literatura, a câmbio de íons é um fenómeno frequente na cavidade oral. Os íons de presença mais relevante na saliva humana são o cálcio, o fosfato e o flúor. Os íons carbonato podem substituir os íons hidroxilo ou fosfato na estrutura cristalina, o magnésio pode substituir o cálcio e o flúor pode substituir os íons hidroxilo. Estas trocas iônicas têm um efeito significativo no comportamento da HAP, incluindo na sua solubilidade e conversão em FAP (Farooq & Bugshan, 2020; Featherstone & Lussi, 2006; Lale et al., 2020).

No processo natural de remineralização do esmalte, os íons cálcio e fosfato são necessários ao flúor para o promover, uma vez que durante a desmineralização, o cálcio é libertado antes dos íons fosfato. Assim, a utilização de produtos à base de cálcio pode anular de forma eficaz o processo de desmineralização. Além do papel dos íons, a saliva também protege dos efeitos ácidos ao formar uma película salivar na superfície do dente (Buzalaf et al., 2012; Meyer et al., 2018).

O pH salivar varia, estando normalmente próximo dos $6,9 \pm 0,6$. A capacidade tampão da saliva apresenta um papel fundamental na manutenção do nível de pH da saliva e da placa, ajudando, na neutralização dos efeitos da exposição aos ácidos. Os três sistemas tampão presentes na saliva são o sistema bicarbonato, o sistema fosfato e o sistema proteico (Farooq & Bugshan, 2020; Simmer et al., 2020).

VERNIZES DE FLÚOR

Segundo Punathil et al., (2018), o recurso a vernizes de flúor é um método eficaz para prevenir a cárie dentária. Cerca de 40 a 56% das incidências de cárie podem ser reduzidas usando vernizes fluoretados. O esmalte tratado com flúor reduz a profundidade de lesões cariosas, apresenta maior resistência à solubilidade ácida, diminui a taxa de desmineralização e aumenta a taxa de remineralização. O objetivo principal do verniz é reter e prolongar o contato próximo do fluoreto com a superfície do dente (Punathil et al., 2018; Simmer et al., 2020).

Os vernizes fluoretados, após aplicados no esmalte, alteram para uma consistência mais dura. Eles atuam por libertação lenta de iões fluoreto com o intuito de formar um complexo mais estável que dificulte a dissolução cristalina, originando um reservatório para a apatite subjacente. Deste modo, elevam a dureza das superfícies de esmalte, reduzem a taxa de desmineralização e melhoram a deposição mineral ao formar reservatórios de fluoreto de cálcio (Doddamani & Girish Babu, 2017).

PERTINÊNCIA DO ESTUDO

Como consta na tabela periódica, os elementos químicos Mg, Ca e Sr pertencem todos ao mesmo grupo, o grupo 2 ou também denominado de metais alcalino-terrosos. É importante salientar que os elementos encontram-se dispostos de forma sistemática e que dentro da mesma coluna apresentam propriedades similares, o que facilmente sugere que se podem substituir uns aos outros.

Por sua vez, o Zn encontra-se num grupo distinto, o dos metais de transição. Porém, tem sido adicionado frequentemente a produtos de saúde oral devido às suas propriedades antibacterianas, controlo de halitose e afinidade com iões fosfato na superfície de esmalte.

Atualmente na medicina dentária e com tendência crescente, tem-se procurado atuar de forma conservadora e menos invasiva possível, focando mais a prevenção e novas técnicas que permitam reverter o quadro clínico.

OBJETIVO DO ESTUDO

Com a presente investigação, pretende-se medir e comparar a microdureza de superfície de esmalte após a incorporação de diferentes catiões divalentes e de flúor na hidroxiapatite.

HIPÓTESES DO ESTUDO

Neste trabalho de investigação formularam-se as hipóteses de estudo, seguintes:

- i.* As amostras tratadas apenas com flúor apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte relativamente a amostras de esmalte são;
- ii.* As amostras tratadas apenas com estrôncio, com magnésio ou com zinco como única fonte de metal divalente apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte relativamente a amostras de esmalte são;
- iii.* As amostras tratadas com flúor e com metais divalentes (estrôncio, magnésio ou zinco) apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte, quer relativamente a amostras de esmalte são, quer relativamente a amostras em que os elementos incorporados foram disponibilizados em separado.

MATERIAIS E MÉTODOS

TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foi realizado um estudo observacional, analítico, *ex vivo*, em 18 dentes molares humanos, intactos, a partir dos quais foram obtidos 70 fragmentos de esmalte são. Seguidamente, selecionaram-se 7 grupos de estudo cada um com n=10: Grupo A, Grupo B, Grupo C, Grupo D, Grupo E, Grupo F e Grupo G aos quais foi aplicado um verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha,) com exceção do grupo A. Posteriormente, e consoante o grupo, os fragmentos foram submergidos em diferentes soluções.

A seleção da amostra foi concebida tendo em conta os seguintes critérios de inclusão: dentes hígidos, livres de lesões de cárie ou fraturas, sem anomalias, sem alteração de superfícies expostas a procedimentos químicos ou mecânicos, excetuando os refletidos na higiene dentária dos indivíduos.

Como critérios de exclusão foram considerados: dentes não hígidos, com malformações, com submissão a tratamentos químicos (ex. branqueamento), mecânicos (ex. tratamento ortodôntico prévio), ou eletromagnéticos (ex. radiação laser).

LOCAL DO ESTUDO

O estudo experimental ocorreu nas instalações do Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz no período entre julho e agosto de 2020.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de investigação foi submetido à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz e aprovado pela mesma entidade. Os dentes utilizados no estudo foram cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária Egas Moniz, sendo obtidos de indivíduos anónimos que assinaram o respetivo consentimento informado.

DESENHO DO ESTUDO

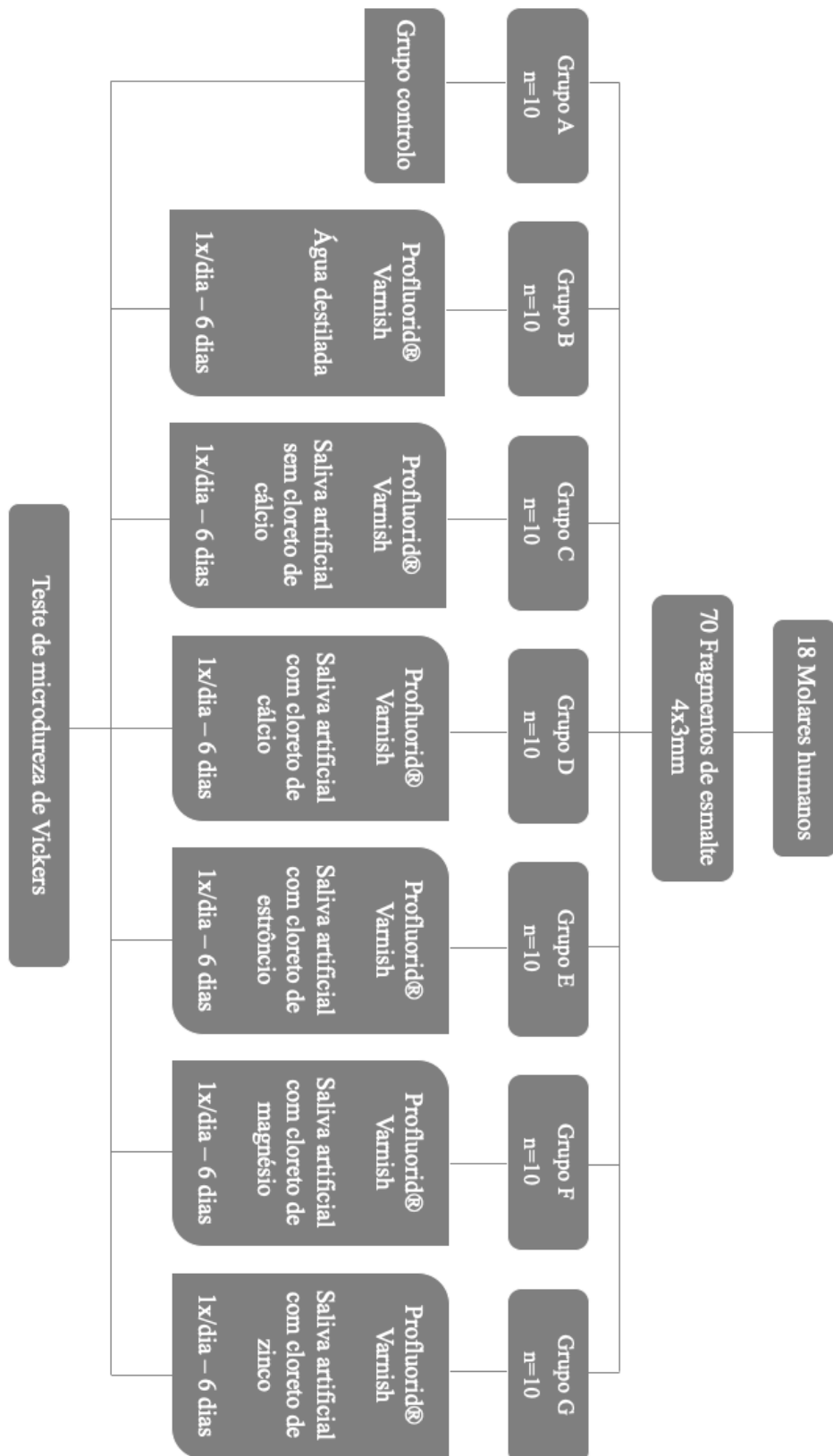


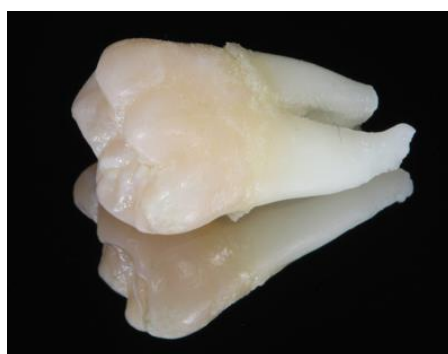
Figura 1. Desenho do estudo.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Concluída a recolha de dentes, utilizou-se curetas de Gracey para remover restos de tecidos moles, bem como, todo o cálculo presente nas superfícies dentárias (Cardoso et al., 2016) (Figura 2).



I



II

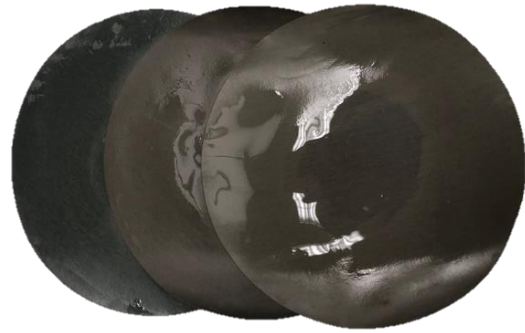
Figura 2. I: Curetas Gracey. II: Dente humano com presença de cálculo e tecidos moles.

Em seguida, colocou-se a amostra num recipiente plástico esterilizado e com Cloramina T a 0,5%, por um período de 7 dias a 4°C, no Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária Egas Moniz (Favaro et al., 2020). Passado esse tempo, a amostra foi conservada em água destilada até ao momento da sua utilização no estudo (Favaro et al., 2020), o que não ultrapassou os 6 meses. Com o objetivo de minorar a sua degradação, o meio de conservação foi trocado a cada período de dois meses.

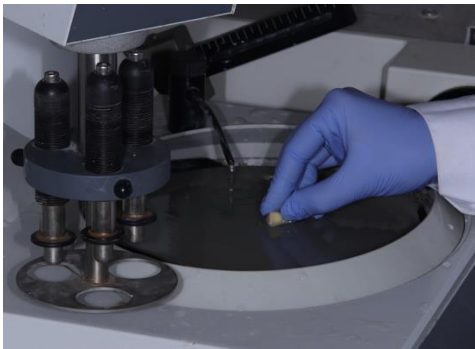
Os 18 molares foram polidos na máquina de polimento LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Ballerup, Dinamarca) para obtenção de uma superfície lisa com discos de lixa de polimento de granulometria 320, 600 e 1200 grits (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) a 40 rotações por minuto (rpm) e sempre com uso de refrigeração (Cassiano et al., 2017) (Figura 3).



I



II



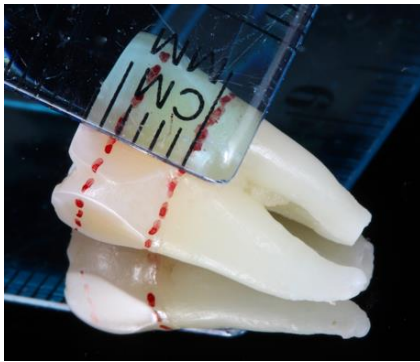
III



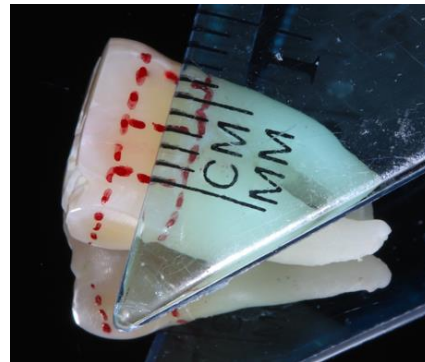
IV

Figura 3. I: Máquina de polimento LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Ballerup, Dinamarca). II: Discos de lixa de polimento de granulometria, da esquerda para a direita, 320, 600 e 1200 grits (Buchler, Lake Bluff, IL, USA). III: Polimento de dente na máquina de polimento. IV: Dente

No esmalte de cada dente, mais precisamente na face vestibular, foi efetuada a marcação de linhas de orientação com caneta de acetato para guiar o processo de corte. Uma primeira linha horizontal ao nível da junção amelocementária (JAC), seguida de uma também horizontal, mas 4 mm acima da JAC e três paralelas ao longo eixo do dente (LED) e com uma distância entre si de 3 mm (Figura 4).



I



II



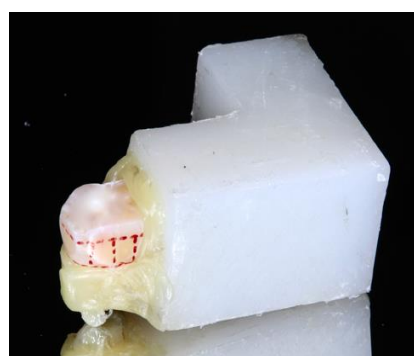
III

Figura 4. I: Marcação de linhas horizontais ao nível da JAC e 4 mm acima da JAC. II: Marcação de linhas paralelas ao LED e com distância entre si de 3 mm. III: Dente com todas as linhas de orientação de corte marcadas.

Cada dente foi aderido e estabilizado individualmente a um suporte de acrílico com recurso a cera colante (Sticky Wax, Kemdent®, Wiltshire, Inglaterra, lote: 21751, validade: 2021/03) e lamparina (Favaro et al., 2020) (Figura 5).



I

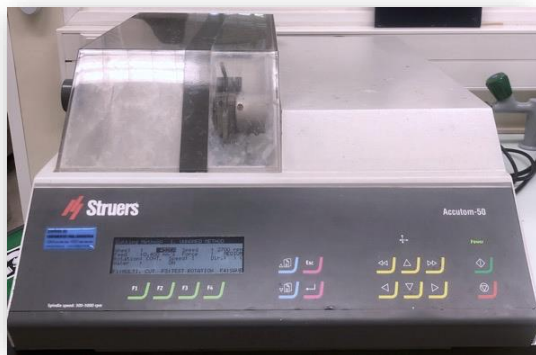


II

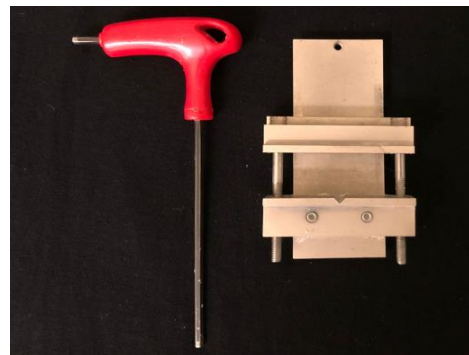
Figura 5. I: Cera colante (Sticky Wax, Kemdent®, Wiltshire, Inglaterra). II: Dente aderido com cera colante ao suporte de acrílico.

Relativamente ao corte das peças dentárias, este efetuou-se num micrótopo de tecidos duros Accutom 50® (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca), sempre com irrigação e utilizando um disco diamantado de 0,30 mm de espessura a uma velocidade de rotação de 4 rpm x 100 (Elkassas & Arafa, 2014; Rizvi et al., 2016) (Figura 6). Primeiramente, cada molar foi fracionado longitudinalmente na direção mesio-distal, acompanhando o sulco central da face oclusal (Elkassas & Arafa, 2014; Thakkar et al., 2017). Deste processo resultaram dois fragmentos, um vestibular e um palatino/lingual, que foram novamente fracionados, desta vez, na direção vestibulo-lingual (Thakkar et al., 2017), obtendo-se assim, fragmentos com proximamente 3 mm de largura.

Para terminar o corte, seccionaram-se as frações dentárias originadas anteriormente pela linha acima da JAC e pela linha da JAC (Mansoor et al., 2019). Desta forma, os fragmentos foram separados da raiz do dente, resultando de cada molar um total de quatro espécimes com dimensões de 4x3 mm.



I



II



III



IV

Figura 6. I: Micrótopo de tecidos duros Accutom 50® (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). II: Chave e suporte metálico para fixar o bloco de acrílico com o dente ao micrótopo. III: Dente posicionado no micrótopo para o primeiro corte, corte único com direção mesio-distal. IV: Dente posicionado no micrótopo para corte múltiplo vestibulo-lingual.

Todos os fragmentos foram colocados em água desionizada de forma a eliminar eventuais partículas resultantes dos processos de polimento e corte (Figura 7).



I



II

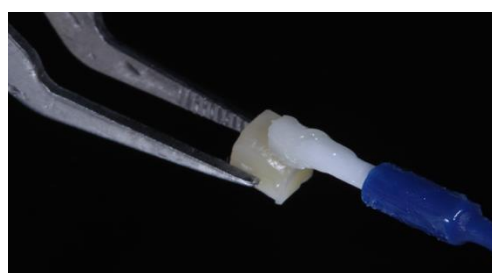
Figura 7. I: Espécimen de dimensões 4x3 mm. II: Fragmentos após colocação em água desionizada para eliminar eventuais partículas resultantes dos processos de polimento e corte.

AGENTES MINERALIZANTES

Os espécimenes dos grupos B a G foram primeiramente tratados com verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote: 2003747, validade: 2022/01) de acordo com as indicações do fabricante e como mostra a figura 8. II.



I



II

Figura 8. I: Verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote: 2003747) usado no estudo. II: Aplicação de verniz de flúor na face polida do esmalte de um fragmento dentário.

No caso das amostras dos grupos C a G, os fragmentos de esmalte foram ainda submetidas a um tratamento com saliva artificial a pH 7 constituída por 64,07 μM de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfito de sódio nano-hidratado), 16,65 mM de Ureia, 6,84 mM de NaCl (cloreto de sódio), 5,36 mM de KCl (cloreto de potássio), 2,88 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(hidrogénofosfato de sódio di-hidratado) e 2,11 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado) (Urban et al., 2009) e contendo 5,4 mM do metal divalente a analisar (grupos D-G) ou não contendo qualquer metal divalente (grupo C).

Com o objetivo de minimizar erros associados à utilização de soluções de mineralização, optou-se por preparar uma única solução de saliva artificial pH 7 sem íons metálicos 1,25x concentrada e diferentes soluções de metais com concentração 27 mM adicionadas à primeira até perfazer o volume final correto, sendo que no caso do grupo C apenas se adicionou água desionizada.

No grupo D, como fonte de íons de cálcio usou-se $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) – Figura 9, no grupo E usou-se $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) – Figura 10, no grupo F usou-se $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) – Figura 11 e no grupo G usou-se ZnCl_2 anidro (Chem-Lab NV, Zedelgem, Bélgica) – Figura 12.

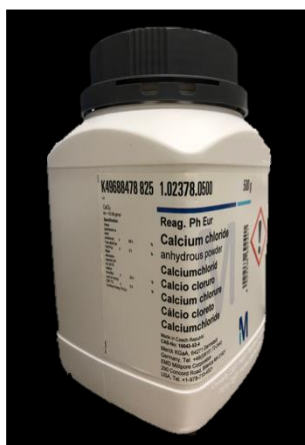


Figura 9. Cloreto de cálcio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, CAS-No:10043-52-4, lote: K49688478) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo D.

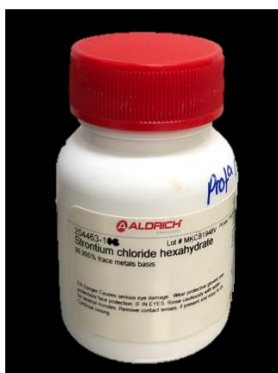


Figura 10. Cloreto de estrôncio hexa-hidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, CAS-No: 10025-70-4, lote: MKCB1948V) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo E.



Figura 11. Cloreto de magnésio hexa-hidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, CAS-No: 7791-18-6, lote: BCBV9958) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo F.

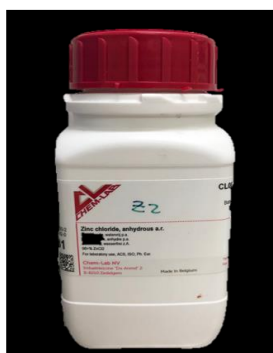


Figura 12. Cloreto de zinco anidro (Chem-Lab NV, Zedelgem, Bélgica, CAS-No: 7646-85-7, lote: 26.2741604) usado na preparação da solução de saliva artificial do grupo G.

ALEATORIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

Os 70 fragmento de esmalte são, obtidos como descrito na secção preparação da amostra, foram aleatoriamente distribuídos pelos 7 grupos de estudo, nomeados de A a G.

Grupo A (controlo, n=10): fragmentos de esmalte são.

Grupo B (n=10): fragmentos onde se procedeu à aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante, seguida de imersão em água destilada à temperatura ambiente por 2h (Figura 8). Terminado esse período, nova imersão em água destilada e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação do meio a cada dia (Figura 13).



Figura 13. Estufa de laboratório UFE 400 (Mettmert® GmbH, Schwabach, Alemanha) a 37 °C de temperatura constante.

Grupo C (n=10): fragmentos expostos ao procedimento descrito anteriormente para o grupo B. Após termino do tempo de imersão de 2h em água destilada à temperatura ambiente, todos os espécimes seguiram para imersão em saliva artificial, isenta de cloreto de cálcio, e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação diária do meio (Urban et al., 2009).

Grupo D (n=10): fragmentos expostos ao procedimento descrito anteriormente para o grupo B. Após termino do tempo de imersão de 2h em água destilada à temperatura ambiente, todos os espécimes seguiram para imersão em saliva artificial com cloreto de cálcio e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação diária do meio (Urban et al., 2009).

Grupo E (n=10): fragmentos expostos ao procedimento descrito anteriormente para o grupo B. Após termino do tempo de imersão de 2h em água destilada à temperatura ambiente, todos os espécimes seguiram para imersão em saliva artificial com cloreto de estrôncio, em substituição do cloreto de cálcio, e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação diária do meio (Urban et al., 2009).

Grupo F (n=10): fragmentos expostos ao procedimento descrito anteriormente para o grupo B. Após termino do tempo de imersão de 2h em água destilada à temperatura ambiente, todos os espécimes seguiram para imersão em saliva artificial com cloreto de magnésio, em substituição do cloreto de cálcio, e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação diária do meio (Urban et al., 2009).

Grupo G (n=10): fragmentos expostos ao procedimento descrito anteriormente para o grupo B. Após termino do tempo de imersão de 2h em água destilada à temperatura ambiente, todos os espécimes seguiram para imersão em saliva artificial com cloreto de zinco, em substituição do cloreto de cálcio, e colocação em estufa de laboratório a 37 °C de temperatura, durante 6 dias, com renovação diária do meio (Urban et al., 2009).

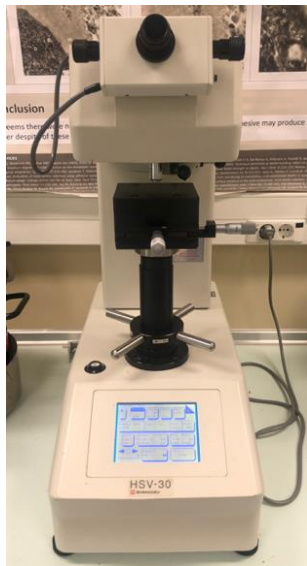
ANÁLISE DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

A superfície de esmalte dos 70 fragmentos em estudo, foi analisada em conformidade com a microdureza de superfície. Esta medição foi executada com recurso ao teste de Vickers HSV-30® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (Figura 14. I). Neste teste, o indentador de diamante Vickers exerce uma força de 4,903 N durante 15 segundos (Baumann et al., 2017) (Figura 14. II).

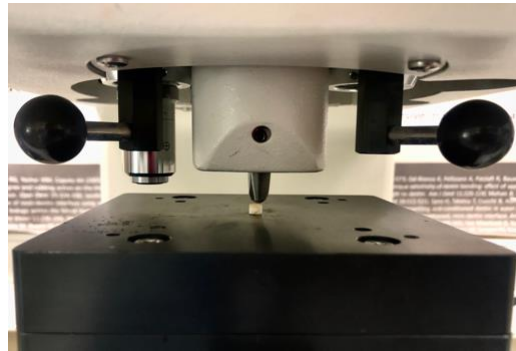
Em cada espécimen de esmalte realizaram-se 5 indentações distribuídas de forma aleatória e espaçadas entre si (Doddamani & Girish Babu, 2017) (Figura 15). Com o resultado das mesmas, calculou-se a média e o desvio padrão da microdureza de Vickers para cada fragmento de esmalte com um intervalo de confiança de 95%. Os valores alcançados foram expressos em HV, a unidade de dureza de Vickers (Doddamani & Girish Babu, 2017).

No presente estudo efetuaram-se 50 indentações para cada um dos grupos, num total de 350 indentações.

Com o propósito de diminuir ao máximo o número de possíveis erros experimentais, todo o procedimento acima descrito foi realizado sempre na mesma máquina, devidamente calibrada, e executado pelo mesmo examinador (Elkassas & Arafa, 2014).

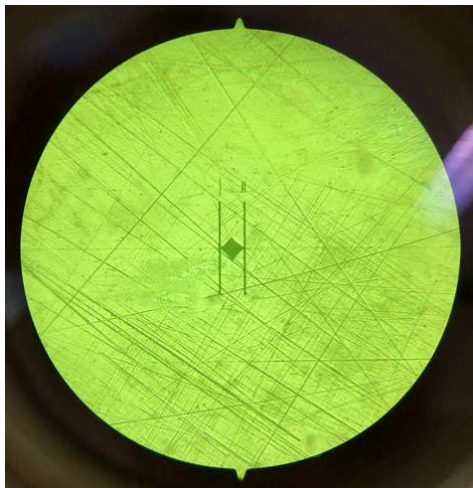


I

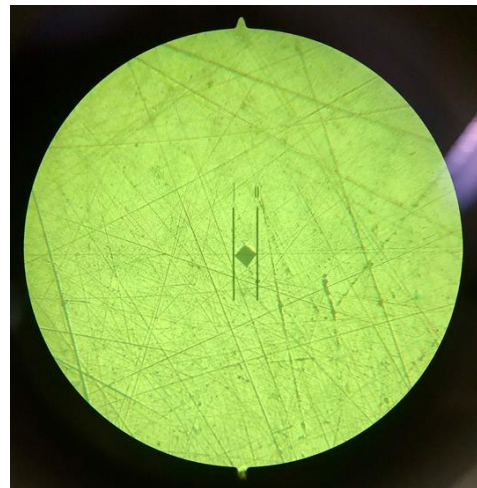


II

Figura 14. I: Máquina de microdureza de Vickers HSV-30® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). II: Fragmento no momento da indentação com uma força de 4,903 N por 15 segundos.



I



II

Figura 15. I e II: Imagens de indentações realizadas em esmalte pela máquina de microdureza de Vickers HSV-30® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Finda a recolha, todos os dados foram analisados estatisticamente recorrendo ao *software* SPSS Statistics versão 24.0 (IBM, Chicago, EUA). As diferenças estatísticas foram avaliadas aplicando o teste ANOVA a um fator (*one way*).

RESULTADOS

Com a intuito de analisar as modificações ocorridas na superfície do esmalte humano, após tratamento dos fragmentos dentários como mencionado na secção anterior, cada espécimen foi estudado relativamente à sua microdureza de superfície através do teste de Vickers. Para cada amostra foi efetuado um total de 5 indentações em esmalte (pentaplicados), a partir das quais se calculou a média da microdureza. Este passo, teve como propósito atenuar possíveis erros de medição devido a potenciais defeitos existentes na superfície do esmalte dos fragmentos.

Os valores médios da microdureza do esmalte dos 10 espécimenes que constituem cada um dos 7 grupos independentes em estudo, foram investigados estatisticamente quanto às suas semelhanças, com recurso a um teste paramétrico. Neste caso, e depois de confirmados todos os pressupostos para a sua correta utilização, o teste aplicado foi o teste de análise de variância a um fator (*one-way* ANOVA) com um intervalo de confiança de 95%, para uma variável escalar. Este método é usado para avaliar a hipótese da igualdade dos valores médios de mais de dois grupos de estudo (hipótese nula) e, no caso de resultar na rejeição desta, pode ser complementado com outro teste adequado à comparação múltipla de pares de grupos para determinar as diferenças entre as médias e saber quais as que diferem entre si.

Para garantir o cumprimento da independência, isto é, que o resultado de cada grupo em nada afeta o resultado dos restantes pela inexistência de fatores que possam influenciar o valor médio da microdureza, foi realizada uma distribuição aleatória de fragmentos pelos grupos, sendo cada grupo composto por 10 espécimenes escolhidos ao acaso. Assegurando-se assim, que os resultados obtidos das indentações em cada grupo não são influenciados pelos fragmentos que o constituem.

Por sua vez, e para garantir o cumprimento da normalidade, foi aplicado o teste Shapiro-Wilk, teste não paramétrico unilateral esquerdo, a fim de estudar o ajustamento de uma variável aleatória à distribuição normal. Este teste é adequado a amostras de dimensão pequena, o que se verifica neste ensaio experimental, uma vez que temos uma amostragem de $n=10$ para cada grupo em estudo.

Após a aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e considerando, para cada amostra, as seguintes hipóteses de estudo:

H0: A variável aleatória, valor médio de microdureza, do grupo X segue uma distribuição normal de parâmetros conhecidos;

H1: A variável aleatória, valor de microdureza, do grupo X não segue uma distribuição normal de parâmetros conhecidos.

verificou-se existir normalidade em todos os grupos, exceto no grupo C que apresentou um valor de $p(0,009) \leq \alpha(0,05)$. Os restantes grupos, A, B, D, E, F e G, revelaram apresentar uma distribuição normal, com valores de $p > \alpha(0,05)$ (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste Shapiro-Wilk recorrendo ao *software* SPSS, considerando os 7 grupos de A a G com $n=10$.

	<i>Grupos</i>	<i>Estatística</i>	<i>Dimensão</i>	<i>Significância</i>
Microdureza	A	0,968	10	0,873
	B	0,884	10	0,145
	C	0,783	10	0,009
	D	0,943	10	0,588
	E	0,916	10	0,328
	F	0,883	10	0,142
	G	0,905	10	0,246

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

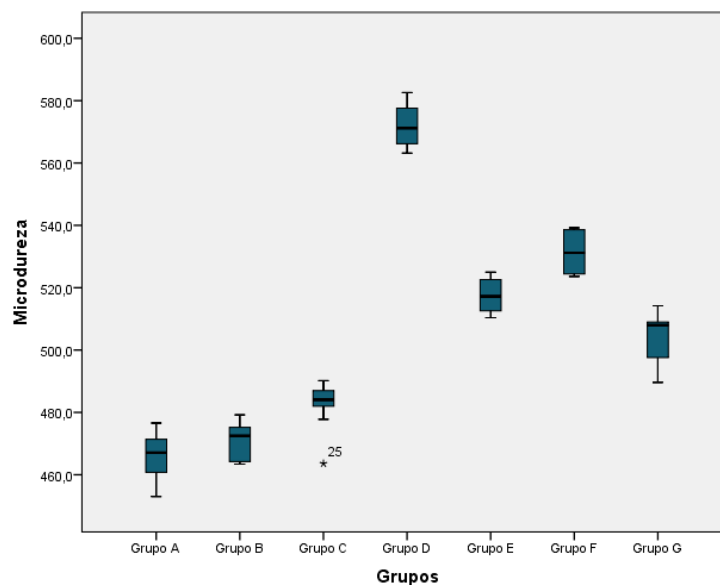


Figura 16. Gráfico da normalidade com testes aplicado aos 7 grupos de estudo A a G ($n=10$), mostrando as variâncias e os valores discrepantes (*outliers*), quando presentes. *, *outlier* extremo; ○, *outlier* moderado (não presente).

A análise do gráfico da distribuição dos valores de cada grupo (gráfico da normalidade com testes, figura 16) revelou a existência de um *outlier* extremo inferior (25; 463,6 HV) identificado com o símbolo *, um valor médio de microdureza pertencente precisamente ao grupo C. A aplicação do teste de Shapiro-Wilk a este grupo, mas desprezando o *outlier*, isto é, considerando $n=9$, resultou num valor $p(0,810) > \alpha(0,05)$ indicador da existência de normalidade (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados pós aplicação do teste Shapiro-Wilk considerando 6 grupos com $n=10$ e o grupo C com $n=9$.

	<i>Grupos</i>	<i>Estatística</i>	<i>Dimensão</i>	<i>Significância</i>
<i>Microdureza</i>	A	0,968	10	0,873
	B	0,884	10	0,145
	C	0,783	9	0,810
	D	0,943	10	0,588
	E	0,916	10	0,328
	F	0,883	10	0,142
	G	0,905	10	0,246

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

A homogeneidade das variâncias foi avaliada por aplicação do teste de Levene, no intervalo de confiança de 95%, aos 7 grupos da investigação. Para este teste consideramos duas hipóteses:

H0: Os grupos de A a G revelam variâncias homogéneas;

H1: Os grupos de A a G não revelam variâncias homogéneas.

Neste caso, tivemos um valor de $p(0,255) > \alpha(0,05)$, confirmando que estamos perante amostras homogéneas (Tabela 3). Logo, podemos aceitar a hipótese nula (H0).

Tabela 3. Resultados pós aplicação do teste de homogeneidade de variâncias (teste de Levene).

<i>Estatística de Levene</i>	<i>gl1</i>	<i>gl2</i>	<i>Significância</i>
1,336	6	62	0,255

gl1=nº de grupos -1

gl2=nº de amostras

Asseguradas a independência, a normalidade e a homogeneidade das variâncias entre os grupos experimentais, o passo seguinte consistiu na aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator para avaliar a igualdade das médias de microdureza. Foram consideradas as seguintes hipóteses:

H0: As médias dos grupos não diferem significativamente (ou as médias dos valores médios dos diferentes grupos não diferem significativamente):

H1: As médias dos grupos diferem significativamente (ou as médias dos valores médios dos diferentes grupos diferem significativamente).

Tabela 4. Resultados pós aplicação do teste ANOVA one-way através do software SPSS Statistics (IBM, Chicago, EUA).

	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>F</i>	<i>Significância</i>
Entre grupos	82905,526	6	13817,588	353,570	0,000
Nos grupos	2422,976	62	39,080		
Total	85328,502	68			

Conforme a tabela 4, na qual podemos observar os resultados do teste ANOVA, aceitamos a hipótese alternativa (H1) devido à existência de variações entre as médias dos grupos.

O teste ANOVA a um fator, apresentou um $F(6,62)=13817,588$ com uma significância de 0,001, ou seja, um valor de $p(0,001) \leq \alpha(0,05)$ indicador de que a hipótese nula de igualdade de médias para qualquer nível de significância deve ser rejeitada e a hipótese alternativa considerada. Assim sendo, pelo teste ANOVA concluiu-se que, para um nível de significância de 5%, as médias dos valores de microdureza dos vários grupos diferem significativamente. A fim de identificar a origem destas diferenças, aplicou-se um teste adicional de comparação múltipla dos grupos estudados, de forma a avaliar a igualdade de valores médios de microdureza entre pares de grupos de estudo. O teste eleito foi o teste de Bonferroni, adequado a análises envolvendo mais de dois grupos de pequenas dimensões e que não apresentam diferenças significativas na variância. Para um nível de significância de 5%, este teste permite inferir a igualdade (se valor $p > 5\%$, validação da hipótese nula) ou a existência de diferenças (se valor $p < 5\%$, validação da hipótese alternativa) para cada par de grupo de estudo.

Os resultados do teste de Bonferroni, aplicados aos grupos de estudo (Tabela 5), revelam não existirem diferenças significativas entre os grupos A e B ($p=1,000$), sendo que estes dois grupos diferem significativamente dos restantes ($p=0,001$ para todas as comparações entre o grupo A ou B com os restantes grupos) e que os grupos C-G diferem significativamente entre eles ($p=0,001$ para todas as comparações entre os grupos C-G).

Tabela 5. Resultados de comparação múltipla dos valores médios dos grupos pelo teste de Bonferroni.

<i>Grupos</i>		<i>Erro padrão</i>	<i>Significância</i>
Grupo A	Grupo B	2,7957	1,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo D	2,7957	0,000
	Grupo E	2,7957	0,000
	Grupo F	2,7957	0,000
	Grupo G	2,7957	0,000
Grupo B	Grupo A	2,7957	1,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo D	2,7957	0,000
	Grupo E	2,7957	0,000
	Grupo F	2,7957	0,000
	Grupo G	2,7957	0,000
Grupo C	Grupo A	2,8723	0,000
	Grupo B	2,8723	0,000
	Grupo D	2,8723	0,000
	Grupo E	2,8723	0,000
	Grupo F	2,8723	0,000
	Grupo G	2,8723	0,000
Grupo D	Grupo A	2,7957	0,000
	Grupo B	2,7957	0,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo E	2,7957	0,000
	Grupo F	2,7957	0,000
	Grupo G	2,7957	0,000
Grupo E	Grupo A	2,7957	0,000
	Grupo B	2,7957	0,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo D	2,7957	0,000
	Grupo F	2,7957	0,000
	Grupo G	2,7957	0,000
Grupo F	Grupo A	2,7957	0,000
	Grupo B	2,7957	0,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo D	2,7957	0,000
	Grupo E	2,7957	0,000

Grupo G	Grupo G	2,7957	0,000
	Grupo A	2,7957	0,000
	Grupo B	2,7957	0,000
	Grupo C	2,8723	0,000
	Grupo D	2,7957	0,000
	Grupo E	2,7957	0,000
	Grupo F	2,7957	0,000

*. A diferença média é significativa no nível 0.05

Assim, com base nestes resultados e com um nível de confiança de 95%, podemos dizer que a microdureza de Vickers média obtida pelo grupo A é igual à microdureza média de Vickers obtida pelo grupo B, sendo precedidas em ordem crescente pelos grupos C (485 ± 4 HV) G (504 ± 8 HV), E (517 ± 5 HV), F (531 ± 6 HV) e pelo grupo D. Este último, o grupo cujos espécimes foram tratados com verniz de flúor e mineralizado com saliva artificial com iões cálcio é aquele que apresenta o valor de microdureza mais elevado do estudo, 571 ± 7 HV, tal como observado na figura 17.

Tabela 6. Valores obtidos da análise descritiva para cada um dos grupos em estudo.

Grupos	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
A	466,100	6,8936	461,169	471,031
B	471,600	5,8833	467,391	475,809
C	484,778	3,6379	481,981	487,574
D	571,880	6,7232	567,070	576,690
E	517,140	5,3625	513,304	520,976
F	531,480	6,3141	526,963	535,997
G	504,060	7,8418	498,450	509,670

No grupo A ou grupo controlo, encontram-se os fragmentos de esmalte são que não foram submetidos a qualquer procedimento depois do corte no micrótomo de tecidos duros. Segundo os resultados médios de microdureza de superfície apresentados na tabela 6, é o grupo que mostrou menor valor de microdureza, 466 ± 7 HV.

No grupo B, estão presentes os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em água destilada e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 472 ± 6 HV (Tabela 6).

No grupo C, estão presentes os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em saliva artificial isenta de cloreto de cálcio e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 485 ± 4 HV (Tabela 6).

No grupo D, encontram-se os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em saliva artificial com de cloreto de cálcio e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 572 ± 7 HV, aparentemente o mais elevado dos grupos em estudo (Tabela 6).

No grupo E, encontram-se os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em saliva artificial com cloreto de estrôncio, em substituição do cloreto de cálcio e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 517 ± 5 HV, aparentemente um valor médio menor que o registrado para o grupo D, no qual se promoveu a mineralização na presença de íons cálcio (Tabela 6).

No grupo F, encontram-se os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em saliva artificial com cloreto de magnésio, em substituição do cloreto de cálcio e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 531 ± 6 HV, aparentemente um valor médio menor que o registrado para o grupo D e maior que o registrado para o grupo E, nos quais se promoveu a mineralização na presença de íons cálcio ou íons estrôncio, respectivamente (Tabela 6).

Finalmente, no grupo G, encontram-se os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, seguida de imersão em saliva artificial com cloreto de zinco, em substituição do cloreto de cálcio e colocação em estufa. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 504 ± 8 HV, aparentemente um valor médio menor que o registrado para os grupos D, E e F, nos quais se promoveu a mineralização na presença de íons cálcio, íons estrôncio ou íons zinco, respectivamente (Tabela 6).

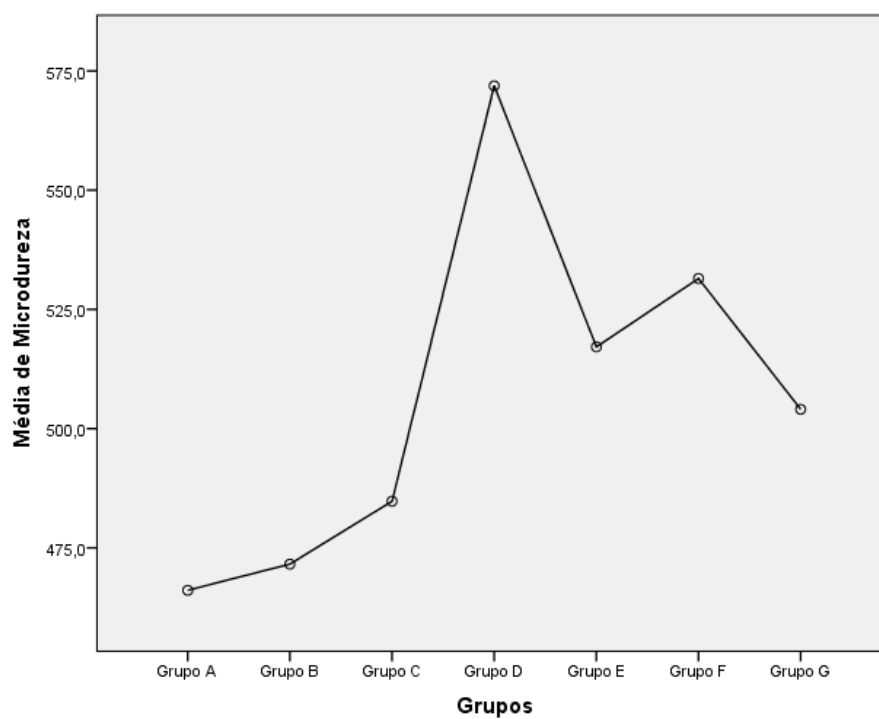


Figura 17. Gráfico de comparação dos valores médios estatísticos da microdureza de superfície dos diferentes grupos.

DISCUSSÃO

Os movimentos mastigatórios, a escovagem e a cárie dentária provocaram alterações na superfície da peça dentária, resultando na perda da estrutura mineralizada do esmalte (Lale et al., 2020; Thakkar et al., 2017).

Após a erupção do dente, o controlo sobre o meio ao redor do esmalte muda para a saliva, que normalmente contém iões e proteínas que favorecem a manutenção da superfície de esmalte saudável. No entanto, e apesar do papel significativo na remineralização, a saliva nem sempre consegue manter um equilíbrio homeostático favorável à manutenção de todas as propriedades do esmalte (Farooq & Bugshan, 2020; Simmer et al., 2020).

Em algumas circunstâncias e em estadios primários, a desmineralização pode ser cessada e revertida através de agentes adequados à remineralização (Dissanayake et al., 2020; Hua et al., 2019; Katakam et al., 2017). No processo de remineralização, iões cálcio, hidroxilo e fosfato são recolocados em espaços desocupados na HAP desmineralizada com o intuito de tornar a estrutura do mineral mais coesa, forte e esteticamente melhor (Simmer et al., 2020). As alterações químicas decorrentes dos processos de desmineralização e remineralização podem ser quantificadas pelas alterações na microdureza da superfície do esmalte (Katakam et al., 2017; Punathil et al., 2018).

Com a presente investigação, pretendeu-se analisar a incorporação de diferentes catiões divalentes e de flúor na hidroxiapatite com o intuito de avaliar as propriedades superficiais dos cristais decorrentes. Especialmente a microdureza de superfície do esmalte humano através do teste de microdureza de Vickers. Durante o ensaio e com objetivo de minorar ao máximo o erro experimental associado, o mesmo foi realizado por um único operador que efetuou todos os testes de microdureza e o tratamento de todas as amostras.

O grupo A, no qual constam fragmentos de esmalte são que não foram submetidos a qualquer procedimento para além do corte no micrótomo de tecidos duros, funcionou como grupo de controlo para a investigação. O seu valor de microdureza, 466 ± 7 HV, foi o mais baixo entre os demais, tal como seria esperado pela ausência de tratamento com agentes remineralizantes (Thakkar et al., 2017). No entanto, um valor médio estatisticamente igual ao do grupo B (472 ± 6 HV).

Após a distribuição dos espécimes pelos grupos, todos eles foram submetidos a aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%, com exceção do grupo A (controle). O facto da utilização tópica de flúor se ter tornado um método amplamente reconhecido para prevenir a desmineralização do esmalte, levou a que se optasse por este tratamento (Lale et al., 2020). O verniz fornece um reservatório temporário de íões de flúor altamente concentrados e em contacto direto com a superfície do esmalte, que podem difundir-se para os cristais de HAP. A terapêutica com verniz fluoretado, tem como objetivo a substituição de íões hidroxilo por íões de flúor livres, mais pequenos e esféricos na estrutura da HAP $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, o que reforça as ligações dentro da malha e reduz o kps. A formação de FAP $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ mais insolúvel e fluoreto de cálcio aumentam a resistência do esmalte face à desmineralização (Farooq & Bugshan, 2020; Lale et al., 2020).

O grupo B, para além da aplicação de verniz de flúor, foi colocado em água desionizada e apresentou uma dureza de 472 ± 6 HV. Por ser um valor médio muito semelhante ao do grupo A (466 ± 7 HV), estatisticamente, e tendo em conta o desvio padrão, considera-se que estes dois grupos (A e B) apresentam valores de microdureza idênticos. Assim, e como esperado pela inexistência de uma fonte de íões metálicos, os resultados do teste de Vickers, sugerem que não houve remineralização no grupo B, não se verificando a hipótese de estudo *i* (página 24). De notar que, na aplicação tópica de íões de flúor, a disponibilidade de íões cálcio e fosfato pode ser um fator limitante para que ocorra remineralização do esmalte. A formação de cristais de FAP requer a presença de Ca ou de outro íão metálico com a capacidade de o substituir na estrutura recém-formada, o que não acontece na água desionizada (Lacson et al., 2020; Thakkar et al., 2017).

No grupo C, estão presentes as amostras submetidas a aplicação de verniz de flúor e imersão em saliva artificial isenta de cloreto de cálcio ou outro íão metálico divalente. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza de esmalte 485 ± 4 HV, que, ao ser superior ao do grupo com esmalte são (grupo A), sugere ter ocorrido mineralização (hipótese de estudo *i* – página 24).

A saliva artificial onde foram colocados os espécimes do grupo C após tratamento com verniz fluoretado, continha, entre outros constituintes, íões fosfato, sódio e potássio, que fazem parte da composição do esmalte e ajudam na sua mineralização. O aumento do valor de dureza de esmalte poderia aqui ser justificado pela existência de

flúor, sódio, potássio e fosfato no meio (saliva artificial) (Farooq & Bugshan, 2020; Mansoor et al., 2019; Punathil et al., 2018). Segundo a literatura, sabe-se que o Na, não sendo um dos constituintes principais, está presente na estrutura da HAP e tem aptidão para substituir o Ca na formação cristalina (Wang et al., 2019). Outra justificação, poderia ser o facto de que durante a parte experimental do projeto se tenha usado um verniz fluoretado comercial, no qual não se conhece a totalidade dos constituintes. O mesmo pode conter catiões metálicos divalentes que promovem a formação de HAP.

Já o meio do grupo B, incluía apenas água desionizada, ou seja, era isento de iões, o que impossibilita o processo de mineralização. Posto isto, era expectável que o valor médio de microdureza de superfície fosse mais elevado no grupo C do que no grupo B, como comprovado pelos resultados do teste de Vickers. Agora, comparando com os valores dos grupos D, E, F e G, seria de esperar que o grau de mineralização do grupo C fosse menor, uma vez que o meio onde foi imersa a amostra não continha uma fonte de catiões metálicos (Wang et al., 2019).

No grupo D e com um valor médio de microdureza de superfície de esmalte de 572 ± 7 HV, encontram-se as amostras submetidas a aplicação de verniz de fluoreto e imersão em saliva artificial com de cloreto de cálcio. Este resultado mostra que o grupo supramencionado, apresentou o maior grau dureza do estudo, ficando assim demonstrado que houve mineralização do esmalte dentário. Processo este, justificável pela presença de flúor, de fosfato e de cálcio, três elementos essenciais para a mineralização (Buzalaf et al., 2012; Lale et al., 2020). A hipótese de estudo *i* (página 24) é aqui novamente comprovada.

As ligações de cálcio são identificadas como um parâmetro chave responsável pela formação de cristais de HAP. O fosfato e os iões cálcio são conhecidos por ajudar na remineralização do esmalte (Dissanayake et al., 2020). Já a saliva artificial, não só tem a capacidade tampão para restabelecer o pH natural da cavidade (pH 7,0), neutralizando o baixo pH gerado após momentos ácidos em boca, como também atua como portador e transportador de iões essenciais, como os três referidos acima, que têm um papel positivo na remineralização da superfície do esmalte (Baumann et al., 2017; Farooq & Bugshan, 2020; Rizvi et al., 2016; Simmer et al., 2020). É pertinente ressaltar que falta à saliva artificial a capacidade para devolver a normal morfologia e a dureza inicial do esmalte. Porém possibilita a criação de um depósito de fosfato de cálcio sobre a extensão desmineralizada do dente que sugere uma atitude remineralizante (Xavier et al., 2010).

No grupo E, onde os espécimes além de tratados com verniz de fluoreto foram colocados em saliva artificial com cloreto de estrôncio, em substituição do cloreto de cálcio, apresentaram uma microdureza média de 472 ± 6 HV. Logo, existiu um aumento da dureza do esmalte face ao grupo de esmalte são (grupo A), onde o valor médio de dureza foi de 466 ± 7 HV. Posto isto, aceita-se a hipótese de estudo *ii* (página 24) uma vez que, houve mineralização. Com propriedades semelhantes às do cálcio, a ligação do estrôncio à superfície de esmalte tem sido cada vez mais abordada na literatura, maioritariamente pela capacidade que os iões de estrôncio possuem para se introduzirem nos espaços livres da estrutura de HAP, estabilizando-a.

O uso de dentífricos com flúor mais o acréscimo de estrôncio na sua composição, pode intensificar a remineralização nas peças dentárias. Estes dois elementos, flúor e estrôncio, quando juntos, são mais eficazes do que aplicados cada um em separado (Wang et al., 2019). Segundo Fernandes et al. (2019), menores índices de solubilidade do esmalte, de prevalência de cárie e de placa bacteriana estão associados à presença de estrôncio. Uma investigação levada a cabo por Wang et al., (2019), mostrou que o esmalte de terceiros molares humanos em soluções ácidas com iões de estrôncio apresentou menor desmineralização de superfície, menor rugosidade superficial e menos alterações de altura na estrutura de esmalte em comparação com as soluções ácidas sem adição de iões de estrôncio.

No grupo F, encontram-se os fragmentos submetidos a aplicação de verniz e submersos em saliva artificial com cloreto de magnésio, em substituição do cloreto de cálcio. Este grupo apresentou como valor médio de microdureza 531 ± 6 HV, o que revela ter existido mineralização. Como ocorreu um aumento da dureza face ao grupo de controlo, onde estava esmalte são sem qualquer tratamento, confirma-se a hipótese *ii* (página 24).

De acordo com esta última hipótese, autores como Kis et al., (2020) e Klimuszko et al., (2018) verificaram que a distribuição de magnésio no esmalte dentário apresenta uma concentração crescente da superfície externa para o interior. Esta distribuição revela que o esmalte humano é capaz de incorporar magnésio e induzir um aumento de cerca de 20% de microdureza, valor superior, mas similar ao encontrado neste estudo. O aumento da microdureza explica-se pela diminuição do tamanho cristalino na fina camada superficial e também pela difusão e incorporação do Mg em maiores profundidades.

Estruturas amorfas baseadas em fosfato de cálcio em combinação com magnésio, são frequentemente utilizadas na construção de componentes do nosso corpo como o osso ou o esmalte (Gelli et al., 2019). O magnésio é decisivo para o correto desenvolvimento da estrutura do dente, manifestando impacto na qualidade e anatomia dos tecidos duros dentários (Klimuszko et al., 2018; Uwitonze et al., 2020). Por sua vez, na HAP, os câmbios iónicos de Ca por Mg são muito importantes (Gelli et al., 2019; Kheradmandfard et al., 2012). Assim, os iões magnésio regulam o crescimento do cristal de HAP, determinam sua estabilidade física e química e ainda afetam a atividade da fosfatase alcalina (Klimuszko et al., 2018; Waszkiel et al., 2004). De acordo com o autor, Waszkiel et al. (2004), tal como o cálcio, o magnésio reage com os grupos fosfato, mas o seu conteúdo no esmalte é muito menor em comparação com o cálcio.

No grupo G, constam os espécimes submetidos a aplicação de verniz de fluoreto e submersos em saliva artificial com cloreto de zinco, em substituição do cloreto de cálcio. O referido grupo apresentou um valor de dureza de 504 ± 8 HV, o que comprova a hipótese de estudo *ii* (página 24) pelo aumento da microdureza relativamente ao grupo de controlo.

Na superfície de esmalte, os iões zinco apresentam afinidade com os iões fosfato e são rapidamente adquiridos pela HAP, competindo com os iões cálcio por posições livres na superfície do cristal (Bhardwaj et al., 2018; Creeth et al., 2018; Rahman et al., 2019). Um estudo realizado por Mohammed et al. (2014) em molares humanos extraídos por necessidade ortodôntica, evidenciou a capacidade do zinco para reduzir a desmineralização do esmalte num contexto pós simulação de lesões de cárie dentária *in vitro*. Nas condições testadas, o zinco atuou sobre as superfícies de esmalte para formar uma camada semelhante à HAP. Já os fosfatos de zinco, ao exibirem um produto de baixa solubilidade constante, exprimem ser pouco provável que a camada formada em esmalte seja muito solúvel em condições ácidas.

Uma vez apresentados todos os valores médios relativos à microdureza de esmalte para os grupos E, F e G, onde foi aplicado verniz fluoretado e imersão em saliva artificial com metais divalentes (estrôncio, magnésio ou zinco), pode aceitar-se a hipótese *iii* (página 24), dado que houve diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte, quer relativamente a amostras de esmalte são, quer relativamente a amostras em que os elementos incorporados foram disponibilizados em separado.

À luz dos resultados atuais, parece haver margem para explorar e otimizar o potencial terapêutico destes íons metálicos divalentes, não só como agentes antibacterianos, mas também como num possível uso em tratamentos preventivos de lesões cariosas devido às suas capacidades remineralizantes.

CONCLUSÕES

No presente ensaio experimental, os grupos estudados demonstraram resultados positivos relativamente ao fator em estudo, a microdureza de superfície de esmalte. Facto este que corrobora a existência de remineralização em todos os grupos, salvo exceção do grupo B, face às amostras do grupo controlo onde o esmalte dentário não foi sujeito a qualquer tipo de tratamento.

A hipótese de estudo *i* não foi confirmada para o grupo B, uma vez que o aumento de microdureza relativamente ao grupo A foi estatisticamente insignificante. Este acontecimento atribuiu-se ao facto do meio onde os fragmentos foram colocados, água desionizada, não conter iões necessários à remineralização. Já o mesmo não se verificou para o grupo C, onde houve aumento da microdureza de superfície relativamente ao controlo. Confirmando-se aqui a hipótese *i*. Neste caso, a remineralização atribui-se à formação de um precipitado com outros iões metálicos oriundos de fonte não controlada.

Perante o aumento de dureza que surgiu nas amostras de E, F e G (grupos tratados com flúor e soluções com iões metálicos na composição), verifica-se a hipótese de estudo *ii*. A hipótese *iii* também é confirmada por o valor médio de dureza entre os três grupos acima referidos ser diferente entre si.

Na medida em que as soluções de saliva artificial continham elementos químicos metálicos díspares, sabe-se que iões metálicos distintos apresentam dureza e tendência para originar minerais diferentes.

Com a investigação pretendia-se analisar a microdureza de superfície dos cristais de esmalte resultantes da incorporação de diferentes catiões divalentes (cálcio, magnésio, estrôncio e zinco) e de flúor na hidroxiapatite.

O cálcio, sendo o elemento do estudo sobre o qual existe um maior destaque na literatura, era previsível que demonstrasse um papel chave no processo de mineralização, o que foi mais uma vez comprovado. Todavia, o magnésio também revelou robusta evidência de que consegue elevar a microdureza da estrutura do esmalte humano.

Ante a complexa química dos sistemas de desmineralização e remineralização da superfície do esmalte e os mecanismos próprios pelos quais as estirpes iónicas que neles atuam se regem, ainda não serem completamente compreendidas, são necessários mais estudos para desmistificar as lacunas em falta. Assim, seria proveitoso que outros estudos e com uma amostragem maior, fossem realizados sobre o tema.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, S., Farooq, I., Al-Thobity, A. M., Al-Khalifa, K. S., Alhooshani, K., & Sauro, S. (2019). An in-vitro evaluation of fluoride content and enamel remineralization potential of two toothpastes containing different bioactive glasses. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 30(5–6), 487–496. <https://doi.org/10.3233/BME-191069>
- Angelova Volponi, A., Zaugg, L. K., Neves, V., Liu, Y., & Sharpe, P. T. (2018). Tooth Repair and Regeneration. *Current Oral Health Reports*, 5(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s40496-018-0196-9>
- Ayoub, H. M., Gregory, R. L., Tang, Q., & Lippert, F. (2020). Influence of salivary conditioning and sucrose concentration on biofilm-mediated enamel demineralization. *Journal of Applied Oral Science*, 28(317), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0501>
- Baumann, T., Bereiter, R., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2017). The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13367-3>
- Bhardwaj, V. A., Deepika, P. C., & Basavarajaiah, S. (2018). Zinc Incorporated Nano Hydroxyapatite: A Novel Bone Graft Used for Regeneration of Intrabony Defects Abstract. *Contemporary Clinical Dentistry*, 9(3), 427–433. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_192_18. PMID: 30166839
- Bhatnagar, V. M. (1968). Unit cell dimensions of synthetic apatites. *Experientia*, 24(8), 765–765. <https://doi.org/10.1007/BF02144852>
- Buzalaf, M. A., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5), 493–502. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500001>
- Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M., & Ten Cate, J. M. (2011). Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. Em *Monogr Oral Sci.* (Vol. 22, pp. 97–114). <https://doi.org/10.1159/000325151>
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., Caldana, M. L., Bastos, J. R. M., & Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, 50, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>

- Cassiano, L., Pessan, J., Comar, L., Levy, F., Cardoso, C., Dionisio, A., Manarelli, M., Grizzo, L., Magalhães, A. C., & Buzalaf, M. (2017). Frequency of intake and amount of fluoride in milk for remineralisation of artificial caries on enamel and dentine: Ex vivo/in situ study. *Archives of Oral Biology*, 73, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.005>
- Clapp, O., Morgan, M. Z., & Fairchild, R. M. (2019). The top five selling UK energy drinks: implications for dental and general health. *British Dental Journal*, 226(7), 493–497. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0114-0>
- Creeth, J. E., Karwal, R., Hara, A. T., & Zero, D. T. (2018). A Randomized in situ Clinical Study of Fluoride Dentifrices on Enamel Remineralization and Resistance to Demineralization: Effects of Zinc. *Caries Research*, 52(1–2), 129–138. <https://doi.org/10.1159/000479823>
- Dawes, C. (2003). What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal Canadian Dental Association*, 69(11), 722–724. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14653937/>
- de Paula, F., Teshima, T. H. N., Hsieh, R., Souza, M. M., Nico, M. M. S., & Lourenco, S. V. (2017). Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. *Anatomical Record*, 300(7), 1180–1188. <https://doi.org/10.1002/ar.23569>
- Dissanayake, S. S. M., Ekambaram, M., Li, K. C., Harris, P. W. R., & Brimble, M. A. (2020). Identification of Key Functional Motifs of Native Amelogenin Protein for Dental Enamel Remineralisation. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184214>
- Doddamani, G. M., & Girish Babu, K. L. (2017). Effect of Fluoridated Varnishes on surface micro-hardness of Enamel Geeta. *International Journal of Oral Health and Medical Research*, 4(2), 1–3. <http://www.ijohmr.com/upload/Fluoridated%20Varnishes.pdf>
- Elfallah, H. M., Bertassoni, L. E., Charadram, N., Rathsam, C., & Swain, M. V. (2015). Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. *Acta Biomaterialia*, 20(April), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.035>
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal*

- of Dentistry*, 42(4), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>
- Farooq, I., & Bugshan, A. (2020). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a review. *F1000Research*, 9, 171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.1>
- Favaro, J. C., Ribeiro, E., Guiraldo, R. D., Lopes, M. B., Aranha, A. M. F., & Berger, S. B. (2020). Effect of mouth rinses on tooth enamel surface. *Journal of Oral Science*, 62(1), 103–106. <https://doi.org/10.2334/josnurd.18-0370>
- Featherstone, J., & Lussi, A. (2006). Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. *Monogr Oral Sci.*, 20, 66–76. <https://doi.org/10.1159/000093351>
- Fernandes, G., Vanyo, S. T., Alsharif, S. B. A., Andreana, S., Visser, M. B., & Dziak, R. (2019). Strontium Effects on Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Oral Implantology*, 45(4), 274–280. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-18-00253>
- Gelli, R., Ridi, F., & Baglioni, P. (2019). The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body. *Advances in Colloid and Interface Science*, 269, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.011>
- Hay, D. I. (1995). Salivary factors in caries models. *Advances in dental research*, 9(3), 239–243. <https://doi.org/10.1177/08959374950090030801>
- Hua, F., Yan, J., Zhao, S., Yang, H., & He, H. (2019). In vitro remineralization of enamel white spot lesions with a carrier-based amorphous calcium phosphate delivery system. *Clinical Oral Investigations*, 24(6), 2079–2089. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03073-x>
- Johnsson, M. S. A., & Nancollas, G. H. (1992). The role of Brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3(1–2), 61–82. <https://doi.org/10.1177/10454411920030010601>
- Katakam, D., Sh, P., Raghu, R., Shetty, A., Premlatadevi, T., & Cherukuri, S. (2017). an in Vitro Comparative Evaluation of Enamel Microhardness in Soft Drinks, Cpp-Acp, Amine Fluoride and Sodium Fluoride With Functionalised Tricalcium Phosphate. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 6(04), 273–277. <https://doi.org/10.14260/jemds/2017/62>
- Kheradmandfard, M., Fathi, M. H., Ahangarian, M., & Zahrani, E. M. (2012). In vitro bioactivity evaluation of magnesium-substituted fluorapatite nanopowders. *Ceramics International*, 38(1), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.157>
- Kis, V. K., Sulyok, A., Hegedűs, M., Kovács, I., Rózsa, N., & Kovács, Z. (2020).

- Magnesium incorporation into primary dental enamel and its effect on mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 4, 6906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.035>
- Klimuszek, E., Orywal, K., Sierpiska, T., Sidun, J., & Golebiewska, M. (2018). Evaluation of calcium and magnesium contents in tooth enamel without any pathological changes: in vitro preliminary study. *Odontology*, 106(4), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0353-6>
- Kooshki, F., Pajooan, S., & Kamareh, S. (2019). Effects of treatment with three types of varnish remineralizing agents on the microhardness of demineralized enamel surface. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 11(7), e630–e635. <https://doi.org/10.4317/jced.55611>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
- Lacson, C. F. Z., Lu, M. C., & Huang, Y. H. (2020). Fluoride network and circular economy as potential model for sustainable development-A review. *Chemosphere*, 239, 124662. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124662>
- Lale, S., Solak, H., Hınçal, E., & Vahdettin, L. (2020). In Vitro Comparison of Fluoride, Magnesium, and Calcium Phosphate Materials on Prevention of White Spot Lesions around Orthodontic Brackets. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1989817>
- Lussi, A., Lussi, J., Carvalho, T. S., & Cvikl, B. (2014). Toothbrushing after an erosive attack: Will waiting avoid tooth wear? *European Journal of Oral Sciences*, 122(5), 353–359. <https://doi.org/10.1111/eos.12144>
- Mansoor, A., Moeen, F., Mehmood, M., Hassan, S. M., Ullah, M., & Khan, T. (2019). Correlation between micro-hardness and mineral content in the healthy tooth enamel of humans belonging to different age groups. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 69(6), 1204–1209. <https://www.pafmj.org/index.php/PAFMJ/article/view/3636>
- Meyer, F., Amaechi, B. T., Fabritius, H.-O., & Enax, J. (2018). Overview of Calcium Phosphates used in Biomimetic Oral Care. *The Open Dentistry Journal*, 12(1), 406–423. <https://doi.org/10.2174/1874210601812010406>
- Mohammed, N. R., Mneimne, M., Hill, R. G., Al-Jawad, M., Lynch, R. J. M., &

- Anderson, P. (2014). Physical chemical effects of zinc on in vitro enamel demineralization. *Journal of Dentistry*, 42(9), 1096–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.014>
- O'Mullane, D. M., Baez, R. J., Jones, S., Lennon, M. A., Petersen, P. E., Rugg-Gunn, A. J., Whitford, H., & Whelton, G. M. (2016). Fluoride and Oral Health. *Community Dental Health*, 33(2), 69–99. https://doi.org/10.1922/CDH_3707O'Mullane31
- Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., & Stupp, S. I. (2008). Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. *Chemical Reviews*, 108(11), 4754–4783. <https://doi.org/10.1021/cr8004422>
- Punathil, S., Pulayath, C. V., Ismail, S. P., Bavabeedu, S. S., Moyin, S., & Uthappa, R. (2018). Assessment of enamel surface microhardness with different fluoride varnishes-An in vitro study. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 19(11), 1317–1321. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2425>
- Rabiei, M., Asli, H. N., & Mohamadi, M. H. (2019). Comparison of Salivary Calcium Level in Dentulous and Edentulous Patients. *European Journal of Dentistry*, 13(1), 36–41. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688685>
- Rahman, M. T., Hossain, A., Pin, C. H., & Yahya, N. A. (2019). Zinc and Metallothionein in the Development and Progression of Dental Caries. *Biological Trace Element Research*, 187(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1369-z>
- Rathje, W. (1954). Oversaturation of Saliva with Hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*, 35(2):245-248. <https://doi.org/10.1177/00220345560350021301>
- Rizvi, A., Zafar, M. S., Al-Wasifi, Y., Fareed, W., & Khurshid, Z. (2016). Role of enamel demineralization and remineralization on microtensile bond strength of resin composite. *European Journal of Dentistry*, 10(3), 376–380. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.184167>
- Samiei, M., Ahmadian, E., Eftekhari, A., Eghbal, M. A., Rezaie, F., & Vinken, M. (2019). Cell junctions and oral health. *EXCLI Journal*, 18, 317–330. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1370>
- Shao, C., Jin, B., Mu, Z., Lu, H., Zhao, Y., Wu, Z., Yan, L., Zhang, Z., Zhou, Y., Pan, H., Liu, Z., & Tang, R. (2019). Repair of tooth enamel by a biomimetic mineralization frontier ensuring epitaxial growth. *Science Advances*, 5(8), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw9569>
- Simmer, J., Hardy, N., Chinoy, A., Bartlett, J., & Hu, J. (2020). How Fluoride Protects

- Dental Enamel from Demineralization. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 10(10), 134–141. <https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD>
- Thakkar, P. J., Badakar, C. M., Hugar, S. M., Hallikerimath, S., Patel, P. M., & Shah, P. (2017). An in vitro comparison of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste with fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate varnish on the inhibition of demineralization an. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 35(4), 312–318. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_308_16
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside relines resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>
- Uwitonze, A. M., Rahman, S., Ojeh, N., Grant, W. B., Kaur, H., Haq, A., & Razzaque, M. S. (2020). Oral manifestations of magnesium and vitamin D inadequacy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 200(February), 105636. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105636>
- Walsh, T., Worthington, H. V., Glenny, A. M., Marinho, V. C. C., & Jeroncio, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007868.pub3>
- Wang, Y. L., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Lin, C. H., & Lin, C. P. (2019). Strontium ion can significantly decrease enamel demineralization and prevent the enamel surface hardness loss in acidic environment. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(1P1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.01.001>
- Waszkiel, D., Opalko, K., Łagocka, R., & Chlubek, D. (2004). Fluoride and magnesium content in superficial enamel layers of teeth with erosions. *Fluoride*, 37(4), 271–277. https://www.researchgate.net/publication/228872353_Fluoride_and_magnesium_content_in_superficial_enamel_layers_of_teeth_with_erosions
- Xavier, A. F. C., Cavalcanti, A. L., Montenegro, R. V., & de Melo, J. B. da C. A. (2010). Avaliação in vitro da Microdureza do Esmalte Dentário após Exposição a Bebidas

- Isotônicas. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 10(2), 145–150. <https://doi.org/10.4034/1519.0501.2010.0102.0003>
- Zhou, Z. R., & Zheng, J. (2008). Tribology of dental materials: A review. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(11). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/41/11/113001>