



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CATIONES  
NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS  
POR MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (MEV) E  
POR ESPETROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE  
ENERGIA (EDS)**

Trabalho submetido por  
**Mafalda Alexandra Aquino Oliveira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Carla Ascenso**

**setembro de 2019**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CATIONES  
NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS  
POR MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (MEV) E  
POR ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE  
ENERGIA (EDS)**

Trabalho submetido por  
**Mafalda Alexandra Aquino Oliveira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Carla Ascenso**

e coorientado por  
**Prof. Doutora Ana Cristina Manso**

**setembro de 2019**



## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, a estrela que me iluminará para sempre.  
À minha mãe, a minha guerreira e exemplo de mulher que eu mais admiro.

*“A vida não é sobre esperar que a tempestade passe, é sobre aprender a dançar  
na chuva.”*

- Vivian Greene



## AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Carla Ascenso, minha orientadora, pelo entusiasmo, dedicação, disponibilidade e apoio constantes na realização do estudo piloto do qual resultou a presente tese.

À Prof. Doutora Cristina Manso pela coorientação, pela prestabilidade e pelo rigor no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Doutor António Alves de Matos, pela ajuda na aquisição das imagens MEV/EDS.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, por permitir que o estudo se realizasse no Laboratório de Biomateriais do IUEM.

À técnica Sandra Ribeiro, responsável pelos laboratórios de Morfologia e de Biomateriais do Instituto Egas Moniz, pela simpatia demonstrada sempre que recorri à sua ajuda.

Aos meus alicerces, os meus pais, pelo amor incondicional que me deram desde sempre, pelo empenho na minha formação pessoal e profissional e pelo esforço que fizeram para proporcionar a concretização deste sonho.

Aos meus avós e restante família, pelo carinho que me deram permanentemente.

Ao meu namorado, João, por todo o amor, apoio e motivação demonstrados ao longo destes anos, bem como pelo seu esforço em compreender este meu mundo.

À Teresa, Carlos, Joana e Ricardo, com quem me sinto em casa, por terem acompanhado esta aventura e por estarem presentes nos momentos mais marcantes desta viagem que é a minha vida.

À Carolina Arsénio, minha amiga, colega e parceira nesta investigação. Não pedia melhor. Levo-te no meu coração.

À minha colega de box, Ana Rita Matos, pela amizade desde o primeiro dia, pelo companheirismo e por todos os momentos partilhados ao longo destes cinco anos.

Aos meus amigos de sempre e aos amigos que fiz durante o percurso académico, por todas as memórias que guardo convosco.

Aos funcionários e docentes da Clínica Universitária Egas Moniz com quem tanto aprendi nestes últimos dois anos.



## RESUMO

**Objetivo** - Estudar a incorporação de diferentes catiões na remineralização de lesões de cárie artificiais por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) e por espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS).

**Materiais e Métodos** - 12 espécimes de esmalte de molares humanos foram, aleatoriamente, distribuídos em 6 grupos de observação (A-F). Todos os grupos foram submetidos a uma solução tampão de ácido láctico a pH 5 durante 6 dias para indução de lesões artificiais de cárie, seguidos de imersão em água destilada durante 2 horas. Nos grupos B, C, D, E e F foi aplicado verniz de fluoreto de sódio a 5%. O GC (controle negativo) foi imerso em saliva artificial alterada, sem cloreto de cálcio, durante 6 dias. O GD (controle positivo) foi imerso em saliva artificial contendo de cloreto de cálcio, durante 6 dias. O GE foi imerso em saliva artificial alterada, por substituição do cloreto de cálcio por cloreto de estrôncio e o GF foi imerso em saliva artificial alterada, por substituição do cloreto de cálcio por cloreto de magnésio. Todas as soluções de saliva artificial foram renovadas diariamente ao longo dos 6 dias. Por grupo, foi realizada a análise MEV/EDS dos espécimes.

**Resultados** – As imagens MEV/EDS mostram que: Os grupos A, B e C corroboram a ocorrência de desmineralização, ainda que com alguma remineralização nos grupos B e C; as imagens MEV/EDS dos grupos D, E e F corroboram a ocorrência de remineralização com formação de fluorapatite, observando-se maior homogeneidade nas imagens do GD e GE, do que no GF.

**Conclusões** – As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e estrôncio e as amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e magnésio originaram imagens MEV/EDS que corroboram a ocorrência de remineralização com formação de fluorapatite com estrôncio e fluorapatite com magnésio, respectivamente, ainda que em menor quantidade que a remineralização que ocorre nas amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e cálcio.

**Palavras-chave:** Estrôncio, hidroxiapatite, magnésio, remineralização



## **ABSTRACT**

**Objective** – Study the incorporation of different cations in the remineralization of artificial caries lesions by scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS).

**Materials and methods** – 12 specimens of human molar enamel were randomly assigned to 6 observation groups (A-F). All groups were subjected to a lactic acid buffer solution at pH 5 for 6 days to induce artificial caries lesions, followed by immersion in distilled water for 2 hours. In groups B, C, D, E and F 5% sodium fluoride varnish was applied. The GC (negative control) was immersed in altered artificial saliva without calcium chloride for 6 days. GD (positive control) was immersed in artificial saliva containing calcium chloride for 6 days. EG was immersed in altered artificial saliva by substitution of calcium chloride by strontium chloride and GF was immersed in altered artificial saliva by replacement of calcium chloride by magnesium chloride. All artificial saliva solutions were renewed daily over the 6 days. By group, SEM / EDS analysis of specimens was performed.

**Results** – The SEM / EDS images show that: Groups A, B and C corroborate the occurrence of demineralization, although with some remineralization in groups B and C; MEV / EDS images from groups D, E and F corroborate the occurrence of remineralization with fluorapatite formation, with greater homogeneity in GD and GE images than in GF.

**Conclusions** – The demineralized and fluoride and strontium-treated samples and the demineralized and fluoride and magnesium-treated samples yielded SEM / EDS images that corroborate the occurrence of remineralization with formation of strontium fluorapatite and magnesium fluorapatite, respectively, although in a smaller amount than that. remineralization that occurs in demineralized samples treated with fluoride and calcium.

**Keywords:** Strontium, hydroxyapatite, magnesium, remineralization



# ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE GERAL .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
LISTA DE SIGLAS .....	11
I. INTRODUÇÃO .....	13
I.1. Metais alcalino-terrosos .....	14
I.2. Esmalte .....	15
I.3. Cárie .....	16
I.4. Desmineralização/Remineralização .....	16
I.5. Saliva .....	17
I.6. Flúor .....	18
I.7. Estrôncio .....	20
I.8. Magnésio .....	21
I.9. Pertinência do estudo.....	22
I.10. Objetivo do estudo.....	23
I.11. Hipóteses de estudo .....	23
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
II.1. Local do estudo .....	25
II.2. Considerações éticas.....	25
II.3. Tipo de estudo e seleção da amostra .....	25
II.4. Preparação da amostra.....	25
II.5. Distribuição das amostras .....	29
II.6. Observação ao Microscópio Eletrônico de Varrimento (MEV) .....	31
II.7. Espectroscopia de Raios X com Dispersão de Energia (EDS) .....	32
III. RESULTADOS.....	33
III.1. Microscopia eletrônica de varrimento (MEV).....	33
III.2. Espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS) .....	40
IV. DISCUSSÃO.....	43
IV.1. Limitações do estudo.....	46
IV.2. Perspetivas futuras .....	46
V. CONCLUSÃO .....	47
VI. BIBLIOGRAFIA .....	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos elementos essenciais para a vida na Tabela Periódica. Contorno circular - elementos essenciais; Contorno quadrado a cheio - oligoelementos que se pensa serem essenciais para bactérias, plantas e animais; Contorno quadrado a tracejado - oligoelementos que se pensa serem essenciais para algumas espécies (Fraústo da Silva & Williams, 2001).....	13
Figura 2 - Esquema da ação do flúor no controlo da cárie. ....	20
Figura 3 - Desenho do estudo. ....	26
Figura 4 – Molar humano fixo a suporte de metacrilato montado no Micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). ....	27
Figura 5 - Fragmentos de esmalte de 4x3 mm. ....	28
Figura 6 - Verniz de fluoreto de sódio 5% (Profluorid® Varnish, VOCO). ....	29
Figura 7 - Cloreto de Cálcio utilizado para a realização da solução de saliva artificial do grupo D. ....	30
Figura 8 - Cloreto de Estrôncio utilizado para a realização da solução de saliva artificial com estrôncio. ....	30
Figura 9 - Cloreto de Magnésio utilizado para a realização da solução de saliva artificial com magnésio. ....	31
Figura 10 - Amostras dos grupos A, B e C (à esquerda) e dos grupos D, E e F (à direita). ....	31
Figura 11 - Microscópio Eletrónico de Varrimento JEOL JSM 5400 Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia Egas Moniz ....	32
Figura 12 - Amostra do grupo A (controlo negativo - indução de lesões artificiais de cárie dentária por tratamento com solução tampão de ácido láctico 50 mM, pH 5 durante 6 dias, seguido de imersão em água destilada durante 2 horas). ....	33
Figura 13 - Amostra do grupo B (controlo negativo – procedimento idêntico ao grupo A, seguido de aplicação de Verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish), de acordo com as indicações do fabricante). ....	34
Figura 14 - Amostra do grupo C (controlo negativo - procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimes em saliva artificial alterada, sem cloreto de cálcio). ....	35

Figura 15 - Amostra 1 grupo D (controlo positivo - procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimenes em saliva artificial alterada, com cloreto de cálcio). .....	36
Figura 16 - Amostra 1 grupo E (procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimenes em saliva artificial alterada, com cloreto de estrôncio)...	37
Figura 17 - Amostra 1 grupo F (procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimenes em saliva artificial alterada, com cloreto de magnésio). ..	38

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características periódicas dos elementos alcalino-terrosos estudados - magnésio, cálcio e estrôncio (Adaptado de Discher, Medwick & Bailey, 1985).....	22
Tabela 2 - Resumo das imagens MEV a X 500 obtidas em cada um dos grupos de estudo .....	39
Tabela 3 - Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS em cada um dos grupos de estudo.....	40



## **LISTA DE SIGLAS**

**CPP-ACP** – *Casein Phosphopeptide – Amorphous Calcium Phosphate*

**EDS** – Espetroscopia de raios X com dispersão de energia

**EGF** – Fator de crescimento epidérmico

**g** – Gramas

**HA** – Hidroxiapatite [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]

**Ig** – Imunoglobulina

**JAC** – Junção amelo-cimentária

**MEV** – Microscopia eletrônica de varrimento

**mg** – Miligramas

**mL** – Mililitros

**mM** – Milimolar

**μM** – Micromolar

**NGF** – Fator de crescimento nervoso

**PRP's** – Proteínas ricas em prolina

**rpm** – Rotações por minuto

**TGF - α** – Fator de crescimento transformador alfa

**°C** – Graus Centígrados



## I. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença dos tecidos duros dos dentes causada por um desequilíbrio, ao longo do tempo, nas interações entre bactérias cariogênicas da placa dentária e os hidratos de carbono fermentáveis, principalmente açúcares (Shen *et al.*, 2018; Walsh, Worthington, Glenny, Marinho & Jeronic, 2019). O objetivo da prevenção da cárie dentária é preservar a estrutura dentária sólida, evitar a desmineralização do esmalte e promover, naturalmente, o processo de remineralização do mesmo (Ismail *et al.*, 2013; Pitts *et al.*, 2017). A escovagem regular com uma pasta dentífrica fluoretada é a principal intervenção não profissional para prevenir a cárie (Walsh, Worthington, Glenny, Marinho & Jeronic, 2019). Um dos principais mecanismos anticariogênicos do ião flúor é conduzir a remineralização do tecido duro do dente afetado por cárie na presença de iões biodisponíveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) para formar fluorapatite (Shen *et al.*, 2018).

Evolutivamente, os elementos introduzidos pela natureza nos sistemas biológicos parecem estar associados por um lado à sua utilidade nas funções a desempenhar, por outro à sua disponibilidade no ambiente e à facilidade da sua extração, ou seja, ter estado "biologicamente disponível" a partir do ambiente. Como é possível observar na Figura 1, os elementos essenciais para a vida são os elementos mais leves e, por sua vez, são também os mais abundantes no universo (Fraústo da Silva & Williams, 2001).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
(H)																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
(Na)	(Mg)											Al	(Si)	(P)	(S)	(Cl)	Ar
(K)	(Ca)	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	(Sr)	Y	Zr	Nb	(Mo)	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	(Cd)	In	(Sn)	Sb	Te	(I)	Xe
Cs	(Ba)	Ln	Hf	Ta	(W)	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U												

Figura 1 - Distribuição dos elementos essenciais para a vida na Tabela Periódica. Contorno circular - elementos essenciais; Contorno quadrado a cheio - oligoelementos que se pensa serem essenciais para bactérias, plantas e animais; Contorno quadrado a tracejado - oligoelementos que se pensa serem essenciais para algumas espécies (Fraústo da Silva & Williams, 2001)

A incorporação de alguns elementos nos sistemas biológicos, em detrimento de outros, parece estar associada não só às propriedades físico-químicas pertencentes a esses elementos e respectiva adequação à função a desempenhar em termos evolutivos, como à sua disponibilidade e à facilidade da sua extração do meio ambiente. Nesta linha, alguns elementos, como por exemplo o estrôncio, podem ter sido preteridos pela natureza em detrimento de outros elementos do grupo dos metais alcalino-terrosos simplesmente por estarem presentes em pequenas quantidades nos ambientes primitivos, nomeadamente na água e no universo.

Presumivelmente, uma das razões pelas quais os metais alcalino-terrosos essenciais, nomeadamente o sódio, o potássio, o magnésio e o cálcio, foram preferencialmente selecionados pela natureza em detrimento de outros como o estrôncio, poderá ter sido o facto de serem mais abundantes e de mais fácil extratibilidade do meio envolvente para incorporação nos sistemas biológicos (Fraústo da Silva & Williams, 2001). Tratando-se apenas de uma questão de abundância nos ambientes primitivos, o mesmo não significa que a sua incorporação artificial em substituição dos elementos biológicos não seja viável, e que as propriedades físico-químicas destes elementos se sobreponham ao fator biodisponibilidade. Por este mesmo motivo, não deixa de ser interessante estudar e procurar correlacionar as propriedades análogas de elementos do mesmo grupo, que teoricamente, podem desempenhar papéis biológicos semelhantes, nomeadamente em processos físico-químicos como é o caso da formação de fluorapatite, bem como compreender se elementos quimicamente semelhantes são capazes de se substituir e qual a relevância dessa mesma substituição.

## **I.1. METAIS ALCALINO-TERROSOS**

Ao longo dos anos, foi proposta e testada uma vasta gama de agentes não fluoretados - antimicrobianos (por exemplo, clorexidina, triclosan, iodo), polióis (por exemplo, xilitol) e derivados do cálcio (por exemplo, CPP-ACP) (Cochrane, Cai, Huq, Burrow, & Reynolds, 2010; Rethman *et al.*, 2011). Além disso, iões metálicos a substituir o cálcio atraíram algum interesse no passado, em particular o estrôncio devido à sua similaridade com o cálcio (Bowen, 2001; Lippert & Hara, 2013; Lippert, 2017).

O estrôncio (Sr) é um oligoelemento encontrado nas rochas calcárias e na água do mar (Li *et al.*, 2007). Alimentos e água potável são a maior fonte de estrôncio. A ingestão diária de estrôncio é cerca de 2,1 mg - 2,4 mg (Wang *et al.*, 2018). No passado, o papel

deste elemento na prevenção da cárie atraiu grande interesse na comunidade científica (Lippert, 2012). A maioria dos estudos desenvolvidos até à data sugere que o estrôncio exhibe algumas propriedades cariostáticas, predominantemente na presença de flúor (Lippert & Hara, 2013). O estrôncio tem propriedades químicas e físicas próximas ao cálcio, pelo que, teoricamente, é capaz de substituir o cálcio na hidroxiapatite. Experiências anteriores deram resultados promissores, embora alguns dos dados sejam controversos. Sendo, portanto, essencial ter mais informações sobre a eficácia real do estrôncio na remineralização.

O magnésio é um catião abundante e essencial no corpo humano, pois tem efeitos significativos no metabolismo humano (Gu e Zheng, 2010). Juntamente com outros seis elementos – sódio, potássio, cálcio, fósforo, enxofre e cloro, o magnésio representa cerca de 0,9% do número total de átomos no corpo humano (Fraústo da Silva & Williams, 2001). Este elemento pode substituir facilmente o cálcio dos minerais do corpo devido às suas semelhanças químicas. Não obstante, algumas diferenças entre os iões  $Mg^{2+}$  e os iões  $Ca^{2+}$ , como por exemplo os raios iónicos (0,66 e 0,99 Å, respetivamente), resultam em propriedades diferentes dos materiais que compõem. A presença de iões  $Mg^{2+}$  nos minerais ósseos e no fluido corporal pode influenciar os processos de metabolismo, formação e cristalização dos minerais ósseos (Nabiyouni, Ren & Bhaduri, 2015).

## **I.2. ESMALTE**

O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado do corpo dos mamíferos, formando uma camada muito dura, fina e translúcida de tecido calcificado que cobre toda a coroa anatómica do dente (Peng *et al.*, 2019; Higham *et al.*, 2018). Localizado na camada externa da coroa, o esmalte, protege as estruturas dentárias subjacentes e é composto por 95% - 96% de material inorgânico, 1% de material orgânico e 3% de água (Wang, Chang, Chiang Lin & Lin, 2019). O material inorgânico é composto principalmente por hidroxiapatite mineral (HA), uma estrutura cristalina constituída por cálcio e fosfato que incorpora facilmente oligoelementos. Estes iões podem ser carregados negativamente, como o flúor ou o carbono, ou carregados positivamente, como o sódio, zinco, estrôncio ou potássio e as concentrações dos mesmos alteram a solubilidade do esmalte. Estequiometricamente, a HA não corresponde completamente à fórmula química  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , pois contém muitas impurezas incluindo carbono, magnésio, sódio e cloro, bem como uma pequena quantidade de flúor (García-Godoy &

Hicks, 2008). O carbono, em particular, juntamente com o magnésio, causa grandes perturbações nos cristais de HA.

A presença de carbonatos e outras substituições iônicas perturba significativamente a rede cristalina da HA, enfraquecendo-a e aumentando sua suscetibilidade ao ataque ácido e solubilidade. Os íons de carbono podem substituir íons fosfato ou grupos hidroxilo e aumentar a solubilidade de apatite, enquanto que os íons de magnésio podem substituir íons de cálcio e inibir o crescimento de cristais. Por outro lado, os íons de flúor podem substituir os grupos hidroxilo e diminuir a solubilidade da apatite (Alkattan, Lippert, Tang, Eckert & Ando, 2018; Neel *et al.*, 2016).

### **I.3. CÁRIE**

Os mecanismos e a fisiopatologia subjacentes ao desenvolvimento da cárie dentária são cada vez melhor compreendidos, tendo aumentado a consideração pelos aspectos relacionados com o esmalte e o biofilme cariogénico. Os tecidos duros dos dentes expostos ao ambiente da cavidade oral são os alvos do processo da doença da cárie, e todas as superfícies dos dentes são suscetíveis ao longo da vida de um indivíduo (Pitts *et al.*, 2017).

A cárie dentária ocorre através da quebra do equilíbrio dinâmico entre desmineralização e remineralização do tecido de esmalte altamente mineralizado. Se o processo não for interrompido no estágio inicial, uma perda substancial de minerais do esmalte acontece, levando à lesão da superfície (Takahashi & Nyvad, 2011). Portanto, melhorar a resistência ácida da superfície do esmalte é importante para inibir a desmineralização, particularmente em superfícies dentárias de alto risco (Nakata *et al.*, 2018).

### **I.4. DESMINERALIZAÇÃO/REMINERALIZAÇÃO**

A cárie dentária é um processo dinâmico de perda mineral que envolve ciclos alternados de desmineralização e remineralização (Pitts *et al.*, 2017). Estes não se podem considerar processos distintos e, qual aquele que “vence” depende de vários fatores do ambiente oral, nomeadamente da frequência do consumo de sacarose e da saliva. Diversos estudos relatam que as características físico-químicas do esmalte influenciam significativamente o seu comportamento nos desafios de desmineralização e subsequente remineralização (Alkattan, Lippert, Tang, Eckert & Ando, 2018; Higham *et al.*, 2018). A

remineralização pode ser definida como qualquer ganho pela superfície dentária que ocorra através da deposição de minerais na zona desmineralizada. Esta não só interrompe o processo de desmineralização, como repara as lesões cáries incipientes. Por conseguinte, observa-se uma maior resistência ao processo de desmineralização em áreas de esmalte remineralizado (Carvalho, Godoy & Bastos, 2002). A fronteira entre dissolução e precipitação, isto é, desmineralização e remineralização, respetivamente, é frequentemente caracterizada pelo pH crítico. Se presumirmos que os níveis fisiológicos de cálcio e fosfato estão nos fluidos orais, então o esmalte desmineralizará numa condição abaixo de pH 5,5 e a remineralizará acima desse valor (Cate & Buzalaf, 2019).

A dissolução do esmalte dentário como consequência do metabolismo bacteriano é um processo seletivo, pois o esmalte possui regiões de solubilidade variável. Este pode dissolver (desmineralizar) até ou além da junção amelo-dentinária, enquanto que a estrutura geral permanece intacta e funcional. A desmineralização é um processo reversível, isto é, os cristais de HA parcialmente desmineralizados podem crescer até o tamanho original, se expostos a ambientes orais que favoreçam a remineralização. Posto isto, claramente que o objetivo na prática da Medicina Dentária, é ajudar o paciente a manter um ambiente oral que evite a desmineralização e aprimore a remineralização para impedir a formação de cárie dentária (Higham *et al.*, 2018). Felizmente, a saliva contém cálcio e fosfato em concentrações superiores à solubilidade do fosfato de cálcio no esmalte, pelo que em condições de repouso, este fosfato de cálcio precipitará, indesejavelmente, como cálculo dentário ou reabastecerá as porosidades formadas pelo ataque ácido – remineralização. Este último processo ocorre enquanto a estrutura geral do esmalte e da dentina está intacta, pois são necessários núcleos de cristalitos para o crescimento de fosfato de cálcio.

## **I.5. SALIVA**

A saliva é um fluido extraordinariamente complexo que desempenha muitos papéis na proteção dos dentes, nomeadamente contra a abrasão, atrição, erosão e cárie dentária (Dawes *et al.*, 2015). O principal componente da saliva é a água até 99,5%, o nível de compostos inorgânicos varia de 0,2 a 0,9% e uma a fração orgânica varia de 0,4 a 0,6%. A saliva contém uma ampla gama de eletrólitos, como por exemplo: potássio, cationes de sódio, cálcio, magnésio e amónio. O grupo aniónico é composto de fosfatos, carbonatos, cloretos, ródio e vários micronutrientes. A componente orgânica da saliva é

constituída principalmente por substâncias peptídicas que ocorrem de várias formas e contém: histatinas, cistatinas, estaterina, sialina, catelicidina, defensina e fatores de crescimento - fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento nervoso (NGF), crescimento transformador fator alfa (TGF- $\alpha$ ). As proteínas não enzimáticas incluem mucinas, lactoferrinas, proteínas ricas em prolina (PRPs), calprotectina, interferão, albuminas e globulinas: globulinas IgG e IgM e IgA produzidas apenas nas glândulas parótidas. As enzimas contidas na saliva são peroxidase salivar, lisozima e enzimas digestivas - amilase, maltase, lipases, esterases, glucosidases e proteases. A saliva contém ainda hidratos de carbono (principalmente na forma de glicoproteínas salivares), lípidos-fosfolípidos e colesterol, bem como metabolitos de compostos de azoto – ureia, ácido úrico, creatinina – e aminoácidos. Todos os componentes trabalham em conjunto para formar um sistema multitarefa complexo. A neutralização dos ácidos e manutenção do pH adequado é regulada por hidratos de carbono, fosfatos e ureia.

O tampão mais importante é o ácido carbónico/bicarbonato, ativo principalmente na saliva estimulada. A saliva atua como uma defesa passiva barreira através de compostos como péptidos, enzimas e imunoglobulinas anti-infecciosas. A saliva é apoiada por mucinas responsáveis pela lubrificação, proteção da mucosa membranar de substâncias irritantes e limpeza da cavidade oral. Os iões fosfato e cálcio e também os seus sais com estaterina são responsáveis pela integridade dos tecidos duros dos dentes, apoiando os processos de remineralização e supressão da desmineralização.

Devido à complexidade e variabilidade da composição e ao número de fatores variáveis individuais que influenciam a saliva, bem como às interações entre os seus componentes, não é possível criar uma fórmula sintética idêntica à saliva natural. É difícil criar um modelo químico e físico perfeito de um fluido fisiológico natural, que por si só não possui uma composição individual homogênea. Assim, a preparação do protocolo de saliva artificial é baseado na composição típica ou média das amostras de saliva natural testadas (Ptyko-Polonczyk, Jacubik, Przeklasa-Bierowiec & Musynska, 2017).

## **I.6. FLÚOR**

O processo de desmineralização do esmalte pode ser revertido para tornar a lesão inativa. Uma das medidas mais conhecidas e importantes para o controlo e tratamento da cárie dentária é o controlo mecânico do biofilme, que deve estar associado a um nível adequado de exposição ao flúor (Godoi *et al.*, 2019). O flúor (F) tem sido considerado o

principal fator responsável pela redução da cárie em crianças e adultos jovens países mais industrializados nas últimas décadas (Magalhães *et al.*, 2008).

As soluções de flúor existem sob a forma de baixa concentração para o uso diário, como as pastas de dentes e os colutórios, e em maiores concentrações para aplicação profissional, como vernizes fluoretados e géis de flúor. As vantagens dos vernizes são a sua aplicação simples e contato prolongado com a superfície de esmalte desmineralizada, bem como o facto de serem um importante auxiliar no controlo e tratamento de *white spots* (Godoi *et al.*, 2019). Num estudo de Gao *et al.* (2016) foi possível concluir que a aplicação profissional de verniz de fluoreto de sódio a 5% pode remineralizar lesões de cárie incipientes.

O ião flúor encaixa bem na estrutura de um cristal de hidroxiapatite, na realidade melhor do que o grupo hidroxilo, o que resulta numa menor solubilidade da apatite fluoretada quando comparado com a apatite livre de flúor. Como resultado, o pH crítico para a apatite contendo flúor é ligeiramente inferior ao mineral original. No entanto, como um ataque ácido pode atingir valores de pH bem abaixo de 5,0, essa solubilidade mais baixa não é suficiente para evitar que a dissolução mineral. Posto isto, este elemento permanece eficaz na prevenção da cárie, uma vez que diminui a desmineralização co-precipitando iões de cálcio e fosfato que se dissolvem e aumentando a precipitação de apatite fluoretada acima do pH crítico. Estes efeitos relativamente pequenos acumulam-se durante os muitos ciclos de pH que ocorrem ao longo do dia, pelo que, como resultado o flúor pode inibir a cárie dentária em 40% a 60% (Cate & Buzalaf, 2019). A figura 2 ilustra a ação do flúor no controlo da cárie.

O flúor é considerado a pedra angular no processo de remineralização, mas esta capacidade é limitada pela disponibilidade de iões de cálcio e fosfato (Elkassas & Arafa, 2014).

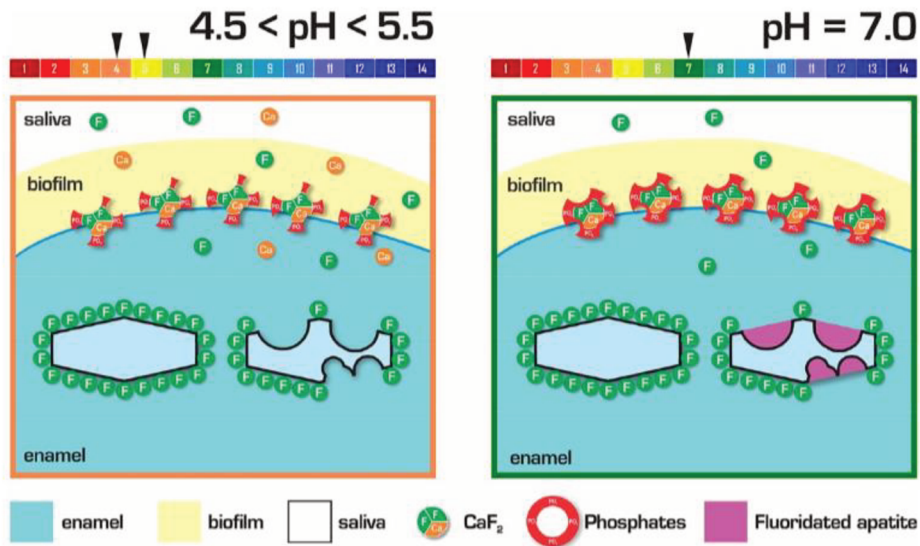


Figura 2 - Esquema da ação do flúor no controle da cárie. À esquerda - sob um desafio cariogênico, a camada de fosfato que cobre os depósitos de fluoreto de cálcio dissolve-se, permitindo a liberação de cálcio e flúor. O flúor libertado do fluoreto de cálcio aumenta o pool de flúor presente no fluido do esmalte, que é adsorvido aos cristais de hidroxiapatite. Quando estes cristais são completamente cobertos por fluoreto adsorvido, as suas superfícies tornam-se semelhantes à fluorapatite e não são dissolvidas por ácidos derivados de bactérias; isto é, a desmineralização é inibida. No entanto, quando os cristais de hidroxiapatite são apenas parcialmente cobertos por fluoreto adsorvido, as superfícies não revestidas são dissolvidas. À direita - após o desafio ácido, os tampões salivares aumentam gradualmente o pH. A  $\text{pH} > 5,5$ , a remineralização ocorrerá naturalmente, uma vez que a saliva é supersaturada em relação ao mineral dentário. Na presença de baixos níveis de flúor, os fluidos tornam-se supersaturados em relação à hidroxiapatite fluoretada, o que permite a precipitação da apatite fluoretada sobre os cristais parcialmente dissolvidos. Este mineral recém-formado é mais resistente a futuros desafios ácidos (adaptado de Cate & Buzalaf, 2019).

## I.7. ESTRÔNCIO

Um estudo epidemiológico de Curzon (1978) sugeriu que, elevadas concentrações de estrôncio na água potável estavam diretamente correlacionadas com a diminuição da incidência de cárie. No entanto, esta relação (estrôncio-cárie) não ocorre de forma direta, pelo que mais tarde, Curzon *et al.* (1985) sugeriram uma “concentração ótima de estrôncio”, pois a incidência de cárie tendeu a aumentar com o aumento da concentração de estrôncio. Os mesmos autores também relataram diferenças na resposta ao estrôncio entre residentes habituais e imigrantes, o que sugere efeitos tópicos e sistêmicos deste elemento.

Estudos analíticos demonstraram maiores concentrações de estrôncio no esmalte de áreas com baixo índice de cárie, o que sugere que o processo de remineralização do esmalte pode ser facilitado pela presença de elemento.

É interessante que o estrôncio, tal como o flúor, tenha sido considerado como um ião vestigial na água, o que corrobora uma possível responsabilidade na menor prevalência de cárie.

O flúor e o estrôncio têm um efeito positivo no progresso da remineralização *per se*, embora o efeito do flúor não seja dependente da presença de estrôncio, e nem o efeito do estrôncio parece depender da presença de flúor. No entanto, a combinação de estrôncio e flúor pode ter vantagens sobre qualquer um sozinho tendo sido relatado que, quando incorporados em conjunto, o fluoreto e o estrôncio melhoraram a cristalinidade da apatite (Thuy *et al.*, 2008).

Em suma, e de acordo com uma longa pesquisa de Lippert & Hara (2013), o estrôncio exibiu algumas propriedades cariostáticas na maioria das cáries de animais e estudos epidemiológicos (relatados até à data da pesquisa). Os resultados de vários estudos epidemiológicos levaram os investigadores a sugerir (e quase acreditar) numa "concentração ótima" de estrôncio na água. No entanto, nenhuma prova definitiva do papel do estrôncio na prevenção da cárie ou a existência duma "concentração ótima" de estrôncio pode ser fornecida com base nos dados recolhidos nesta meta-análise, principalmente devido à falta de ensaios clínicos randomizados e informações insuficientes fornecidas nos estudos epidemiológicos. Para tal, é necessária uma compreensão completa do papel do estrôncio na prevenção da cárie, nomeadamente a sua associação com os tecidos dentários e a placa bacteriana.

## **I.8. MAGNÉSIO**

Embora constitua apenas até 0,6%, em peso, do esmalte dentário o magnésio é mencionado em relação à suscetibilidade de cárie dentária, sendo conhecidas na literatura várias tentativas de incorporar este elemento na rede de apatites sintéticas (Terpstra & Driessens, 1986). Thewlis (1939), preparou hidroxiapatite de cálcio-magnésio por precipitação, no entanto não encontrou quaisquer alterações nos parâmetros da rede de HA. Carlström (1955), aqueceu  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a 1000°C com uma quantidade apropriada de  $\text{MgF}_2$ , mas a HA que obteve continha algum magnésio em vez de cálcio, não se tratando, contudo, de uma hidroxiapatite de cálcio-magnésio. Kreidler (1970), tentou preparar fluorapatite contendo magnésio, por reação em estado sólido e descobriu que os eixos a e c da sua apatite diminuíram quando a concentração de magnésio aumentou. Neuman & Mulray (1971), sintetizaram cristais de apatite sob condições aproximadamente fisiológicas e na presença de iões  $\text{Mg}^{2+}$  e concluíram que os iões  $\text{Mg}^{2+}$  foram fortemente rejeitados pela rede de apatite. Já Simpson (1972), afirmou que a substituição por magnésio nas apatites é limitada, o que ilustra, segundo o autor, o princípio geral de que

os iões significativamente maiores que o cálcio podem substituí-lo, mas que iões menores que este tendem a não ser capazes de o fazer.

Sumariamente, apesar do magnésio se tratar de um elemento bastante disponível e quimicamente semelhante ao cálcio, os estudos realizados, essencialmente, na segunda metade do século XX, geram alguma controvérsia em relação à incorporação deste elemento na rede de apatite, não havendo relatos promissores da substituição dos iões mencionados.

## **I.9. PERTINÊNCIA DO ESTUDO**

Como é possível verificar na tabela 1, os elementos magnésio, cálcio e estrôncio, tratam-se de metais alcalino-terrosos pertencentes ao mesmo grupo da tabela periódica (grupo 2), cujas características físico-químicas se assemelham, o que sugere que estes se podem, facilmente, substituir entre si.

Tabela 1 - Características periódicas dos elementos alcalino-terrosos estudados - magnésio, cálcio e estrôncio (Adaptado de Discher, Medwick & Bailey, 1985)

<b>Elemento</b>	<b>Magnésio</b>	<b>Cálcio</b>	<b>Estrôncio</b>
<b>Símbolo</b>	Mg	Ca	Sr
<b>Peso atómico</b>	24.32	20	87.63
<b>Número atómico</b>	12	20	38
<b>Configuração eletrónica</b>	2s <sup>2</sup> 2p <sup>6</sup> 3s <sup>2</sup>	3s <sup>2</sup> 3p <sup>6</sup> 4s <sup>2</sup>	4s <sup>2</sup> 4p <sup>6</sup> 5s <sup>2</sup>
<b>Raio atómico (Å)</b>	1.36	1.74	1.91
<b>Raio iónico (Å), +2</b>	0.65	0.99	1.13
<b>Potenciais de ionização</b>	I – 7.6 II – 15.0	I – 6.1 II – 11.9	I – 5.7 II – 11.0
<b>Potencial do eléctrodo</b>	+2.34	+2.87	+2.89
<b>Eletronegatividade</b>	1.2	1.0	1.0

Apesar das características dos três elementos serem idênticas, a fazer uma análise mais detalhada é possível constatar que o estrôncio apesar de significativamente mais pesado que o cálcio, possui os valores dos raios atómico e iónico mais próximos aos do cálcio, quando comparados com os do magnésio. Assim, e tendo em conta o que foi mencionado anteriormente, é possível inferir que, é mais provável o cálcio e o estrôncio se correlacionarem, contrastando com o cálcio e o magnésio.

#### **I.10. OBJETIVO DO ESTUDO**

Estudar a incorporação de diferentes catiões na remineralização de lesões de cárie artificiais por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) e por espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS).

#### **I.11. HIPÓTESES DE ESTUDO**

No presente trabalho formularam-se as seguintes hipóteses de estudo:

- i.* As amostras desmineralizadas, as amostras desmineralizadas e tratadas apenas com íons fluoreto e as amostras desmineralizadas e tratadas com íons fluoreto e catiões monovalentes não apresentam diferenças significativas nas imagens MEV/EDS da superfície do esmalte.
- ii.* As amostras desmineralizadas e tratadas apenas com íons fluoreto e com apenas um tipo de íon alcalino-terroso (cálcio, estrôncio ou magnésio) como único catião divalente presente originam imagens MEV/EDS da superfície do esmalte que corroboram a ocorrência de remineralização com formação de fluorapatite.

*Estudo do efeito da adição de diferentes cátions na remineralização de lesões de cárie artificiais por microscopia eletrônica de varrimento e por espectroscopia de raios X com dispersão de energia*

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **II.1. LOCAL DO ESTUDO**

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Biomateriais da Egas Moniz. A análise da Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) e Espectroscopia de Raio X com Dispersão de Energia (EDS) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia da Egas Moniz.

### **II.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz. Os dentes foram fornecidos pelo banco de dentes da Clínica Universitária Egas Moniz.

### **II.3. TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Foi realizado um estudo observacional, analítico em 3 molares humanos obtidos de sujeitos anónimos, os quais originaram 12 fragmentos de esmalte que foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos de estudo, tal como mostra a figura 3. Como critérios de inclusão consideraram-se: dentes íntegros, não cariados, livres de fraturas e sem terem alterações de superfícies expostas a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos. Foram excluídos do estudo: dentes com malformações, não íntegros, que tivessem sido submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio, ou outros), ou eletromagnéticos (radiação laser).

### **II.4. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Uma vez selecionada a amostra, foram removidos, através de curetagem manual, os tecidos moles das superfícies coronais e radiculares dos dentes com o auxílio de curetas periodontais de Gracey (Caneppele, Jeronymo, Di Nicoló, de Araújo, & Soares, 2012; Jo *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2016). De seguida, estes foram armazenados em cloramina T solução tri-hidratada a 1% num frasco de plástico esterilizado (Lussi, Lussi, Carvalho & Cvikl, 2014), durante 7 dias à temperatura de 4°C. Posteriormente, a solução foi trocada por água desionizada, na qual as amostras permaneceram até ao momento da sua utilização para o estudo.

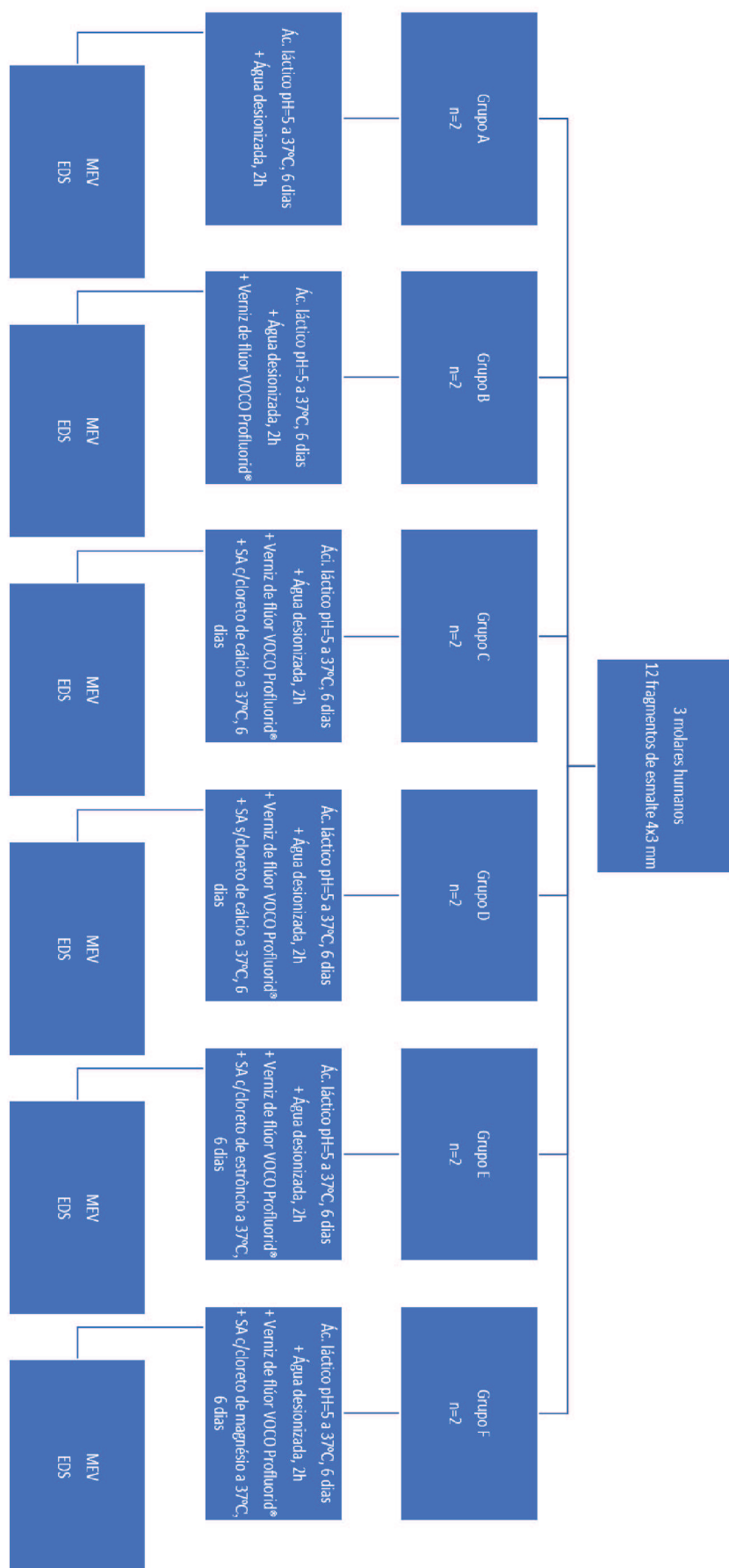


Figura 3 - Desenho do estudo.

Cada um dos dentes foi fixo e estabilizado com cera colante num suporte de metacrilato para a realização dos cortes necessários (Paris, Lausch, Selje, Dörfer, & Meyer-Lueckel, 2014). Estes foram então seccionados em fragmentos de esmalte 4x3 mm, num micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca), tal como representado na figura 4 (Rizvi *et al.*, 2016).

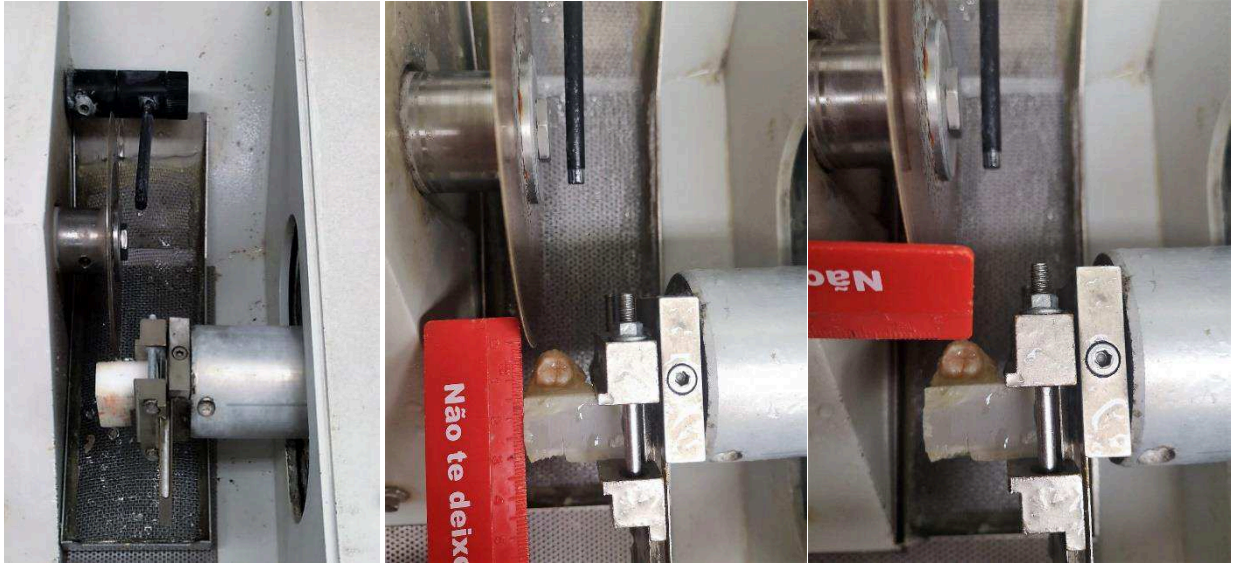


Figura 4 – Molar humano fixo a suporte de metacrilato montado no Micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca).

Cada um dos molares, foi primeiro seccionado longitudinalmente no sentido mesio-distal (Elkassas & Arafa, 2014), obtendo-se assim dois fragmentos, um vestibular e outro lingual/palatino. De seguida, cada um destes fragmentos foi novamente seccionado, desta vez no sentido vestibulo-lingual, obtendo-se dois fragmentos com cerca de 3 mm de largura. Por fim, os fragmentos foram descoronados pela junção amelo-cimentária (Caneppele *et al.*, 2012; Cassiano *et al.*, 2017), resultando de cada molar quatro fragmentos de 4x3 mm (figura 5): fragmento mesio-vestibular, disto-vestibular, mesiopalatino/lingual e disto-palatino/lingual.

Em seguida, os fragmentos foram polidos com discos de lixa de granulação 320, 600 e/ou 1200 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com refrigeração na máquina polidora LaboPol-4® (WS Struers 18-B, Dinamarca) a 40 rpm, obtendo-se, assim, uma superfície homogénea (Cassiano *et al.*, 2017; Comar *et al.*, 2012; Magalhães, Comar, Rios, Delbem,

& Buzalaf, 2008; Moron *et al.*, 2013). Depois disto, os espécimes foram colocados em água desionizada, por forma a eliminar eventuais partículas resultantes do polimento.



Figura 5 - Fragmentos de esmalte de 4x3 mm.

#### **II.4.1. Preparação da solução de saliva artificial**

Foi preparada uma solução de saliva artificial “mãe” 1,25x concentrada com as seguintes matérias primas e respetivas quantidades: 0,0063g de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 0,5000g de  $\text{NaCl}$ , 0,5000g de  $\text{KCl}$ , 0,3648g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,2500g de ureia, 0,6420g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1000 mL água destilada; pH 7,0 (Urban *et al.*, 2009). A necessidade de criar uma solução artificial deve-se ao facto do uso de saliva humana em estudos *in vitro* ser extremamente difícil de executar devido à sua composição variável e à falta de estabilidade desta fora da cavidade oral. Um problema adicional é a colonização da saliva humana por bactérias que podem levar a alterações na sua composição química, e a esterilização do líquido pode resultar na degradação dos componentes salivares orgânicos (Ptyko-Polonczyk, Jacubik, Przeklasa-Bierowiec & Musynska, 2017).

#### **II.4.2. Indução de lesões artificiais de cárie dentária**

Uma vez preparados os espécimes, procedeu-se ao estudo propriamente dito. O primeiro passo consistiu na indução de lesões de cárie artificiais em todos espécimes preparados, através imersão dos mesmos em 30 mL de solução tampão de ácido láctico 50 mM (3 mM de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 $\mu\text{M}$  tetraetil metil difosfonato e tendo-se ajustado o pH a 5,0 com  $\text{KOH}$ ), previamente preparada, imersão essa que ocorreu

durante 6 dias (Cardoso *et al.*, 2014) e à temperatura de 37°C (Featherstone & Rodgers, 1981; Jo *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014). A utilização de ácido láctico para este efeito, prende-se com o facto de este se tratar de um subproduto resultante do metabolismo dos hidratos de carbono fermentáveis realizado por bactérias cariogénicas como o *Streptococcus mutans* (Willems, Kos, Jabra-Rizk & Krom, 2016). O pH foi ajustado para 5,0, pois o pH crítico do esmalte é estimado encontrar-se no intervalo de valores de 4,5 a 5,5 (West & Joiner, 2014).

## II.5. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Os 12 fragmentos de esmalte desmineralizado, obtidos como descrito na secção II.4.2, foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos de estudo:

**Grupo A** (controlo negativo, n=2): imersão em água destilada durante 2 horas.

**Grupo B** (controlo negativo, n=2): aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish) de acordo com as indicações do fabricante (figura 6). Posteriormente foram imersos em água desionizada durante 2h à temperatura ambiente (Magalhães *et al.*, 2008).



Figura 6 - Verniz de fluoreto de sódio 5% (Profluorid® Varnish, VOCO).

**Grupo C** (controlo negativo, n=2): procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos espécimes em saliva artificial sem metais divalentes, durante 6 dias, renovando a solução cada dia. Ao 7º dia foram imersos em água desionizada durante 2 horas à temperatura ambiente.

**Grupo D** (controlo positivo, n=2): procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos espécimes em saliva artificial contendo cloreto de cálcio (figura 7), durante 6 dias e renovando a solução cada dia. Ao 7º dia foram imersos em água desionizada durante 2 horas à temperatura ambiente.

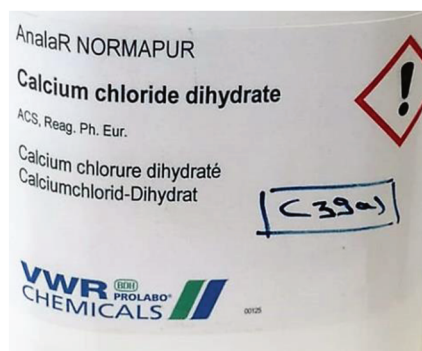


Figura 7 - Cloreto de Cálcio utilizado para a realização da solução de saliva artificial do grupo D.

**Grupo E** (n=2): procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos espécimes em saliva artificial contendo cloreto de estrôncio (figura 8), durante 6 dias e renovando a solução cada dia. Ao 7º dia foram imersos em água desionizada durante 2 horas à temperatura ambiente.

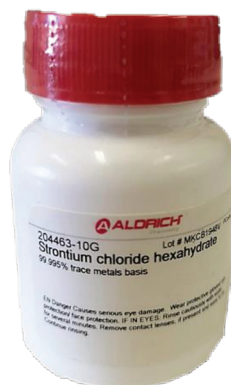


Figura 8 - Cloreto de Estrôncio utilizado para a realização da solução de saliva artificial com estrôncio.

**Grupo F** (n=2): procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos espécimes em saliva artificial com cloreto de magnésio (figura 9), durante 6 dias e renovando a solução cada dia. Ao 7º dia foram imersos em água desionizada durante 2 horas à temperatura ambiente.



Figura 9 - Cloreto de Magnésio utilizado para a realização da solução de saliva artificial com magnésio.

## II.6. OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO (MEV)

Até serem analisadas, as amostras foram armazenadas sob vácuo num exsiccador, garantido a sua preservação numa atmosfera seca mantida por sílica.

Para se proceder à observação por MEV, os pares de amostras de cada grupo A-F foram dispostas num suporte metálica redonda, sobre uma fita autocolante de carbono (condutora), de forma a mantê-las na mesma posição, durante todo o procedimento (figura 10). De seguida, a base metálica foi colocada no equipamento JEOL LSM 5400.

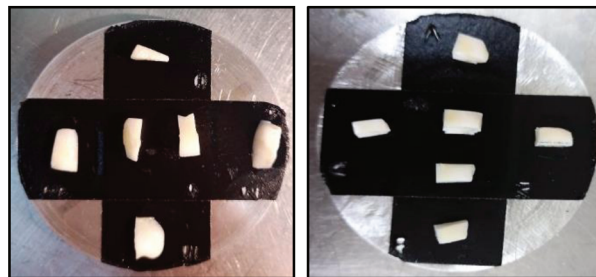


Figura 10 - Amostras dos grupos A, B e C (à esquerda) e dos grupos D, E e F (à direita).

A MEV (figura 11) é uma técnica complementar que ajuda a elucidar as alterações ultra-morfológicas da superfície do esmalte, induzidas por diferentes agentes remineralizantes (Elkassas & Arafa, 2014).

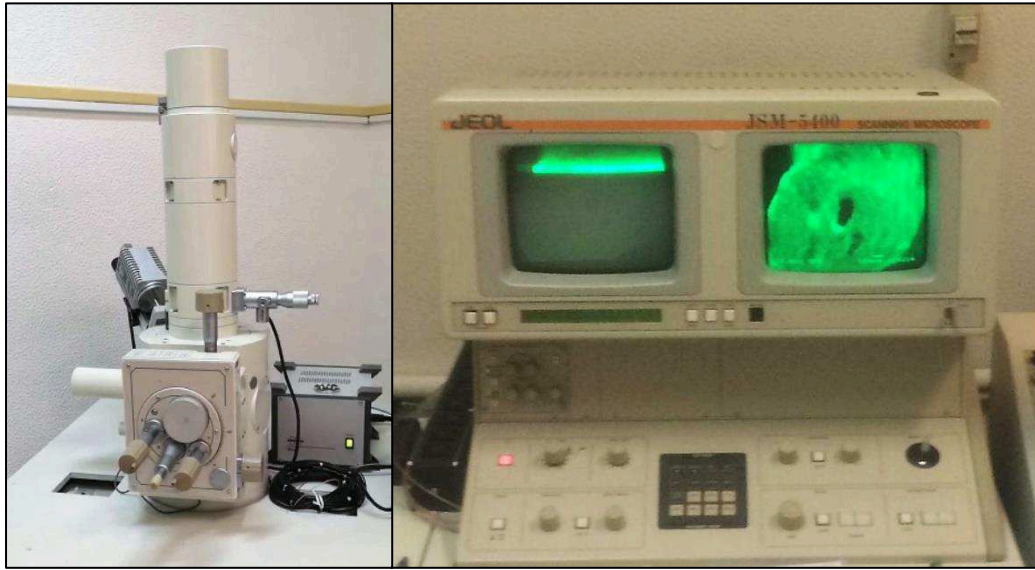


Figura 11 - Microscópio Eletrônico de Varrimento JEOL JSM 5400 Centro de Microscopia Eletrônica e Histopatologia Egas Moniz

Após uma observação preliminar (antes do início do estudo propriamente dito), optou-se por fazer esta análise sem a deposição de uma liga metálica (ouro/paládio) sobre as amostras, para que, posteriormente, esta não tivesse influência na análise de EDS, colocando em causa a fidedignidade dos resultados.

## **II.7. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)**

A espectrometria de fluorescência de raios X com dispersão de energia é uma técnica analítica não destrutiva aplicada para analisar o conteúdo mineral dos dentes. A radiação fluorescente emitida pelos elementos devido à radiação de raios X é proporcional ao seu conteúdo num tecido (de Carvalho *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009).

### III. RESULTADOS

#### III.1. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (MEV)

Com o propósito de observar as alterações na topografia da superfície do esmalte nos diferentes grupos, foram observadas as duas amostras de cada grupo por microscopia eletrónica de varrimento.

#### Grupo A

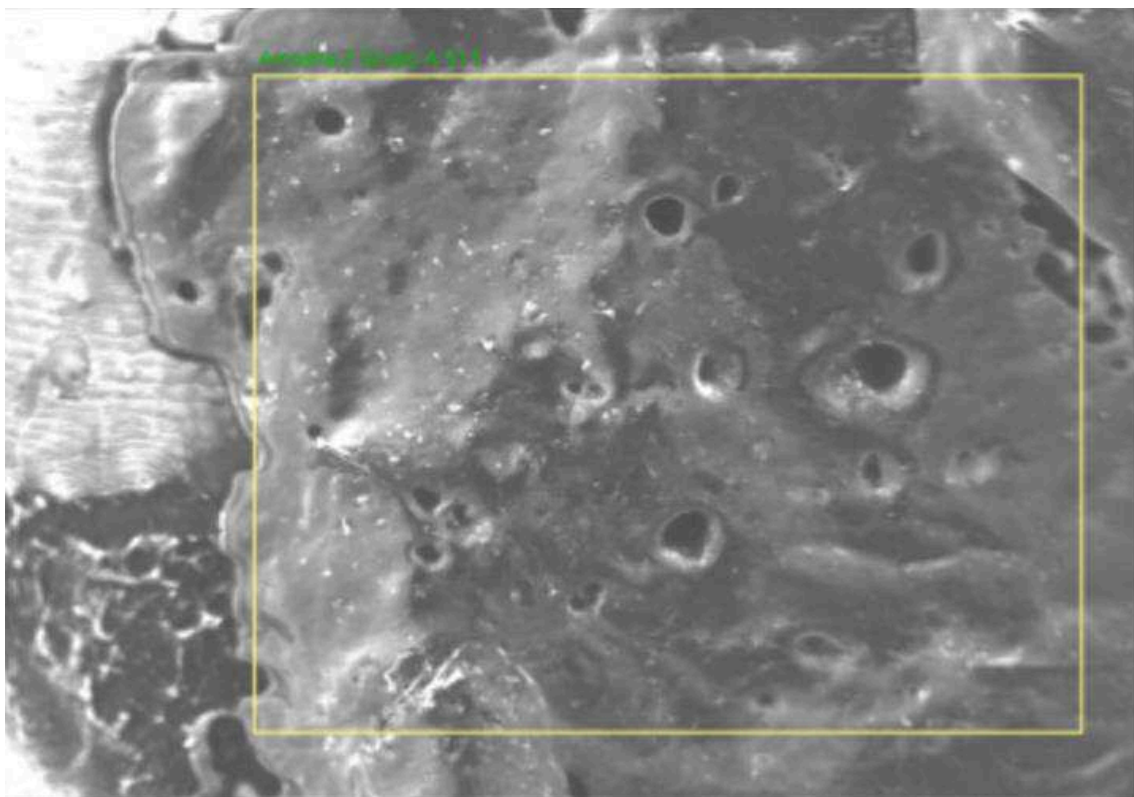


Figura 12 - Amostra do grupo A (controlo negativo - indução de lesões artificiais de cárie dentária por tratamento com solução tampão de ácido láctico 50 mM, pH 5 durante 6 dias, seguido de imersão em água destilada durante 2 horas).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observa-se uma sobre-camada não expectável, cuja origem pode estar relacionada com o processo de colagem da amostra sobre a fita autocolante de carbono, antes de se iniciar a observação ao Microscópio Eletrónico de Varrimento.

## **Grupo B**

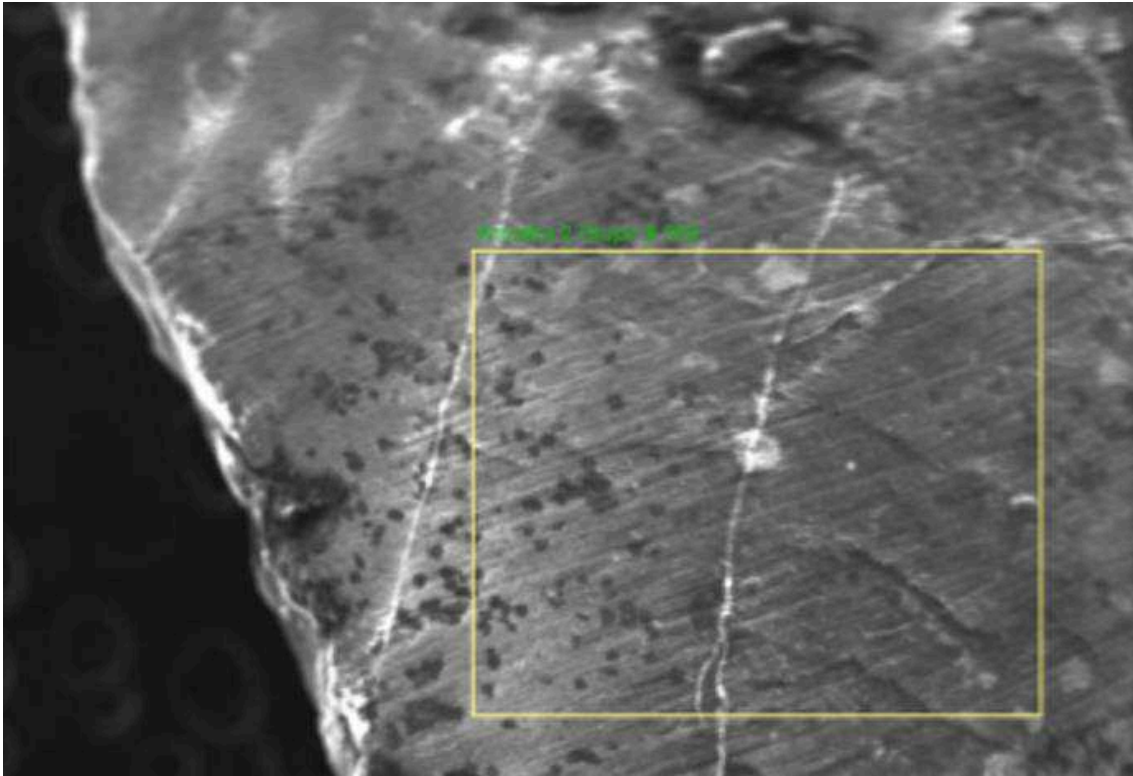


Figura 13 - Amostra do grupo B (controlo negativo – procedimento idêntico ao grupo A, seguido de aplicação de Verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish), de acordo com as indicações do fabricante).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observa-se uma camada contínua recobrindo a superfície de esmalte desmineralizado, correspondente à película de verniz de fluoreto de sódio, aplicado na amostra.

## Grupo C

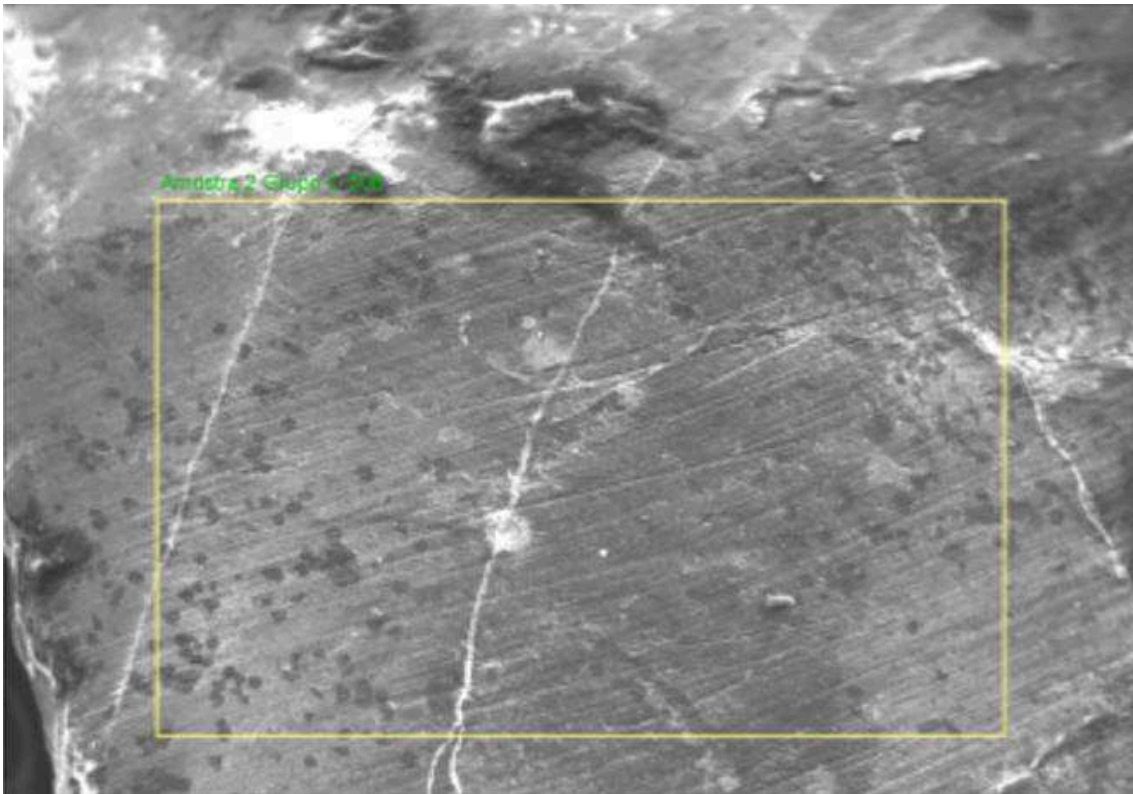


Figura 14 - Amostra do grupo C (controlo negativo - procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimes em saliva artificial alterada, sem cloreto de cálcio).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observam-se diversas linhas de fratura, bem como zonas irregulares alternadas com zonas mais organizadas e homogêneas pela sobre camada de verniz de fluoreto de sódio.

## **Grupo D**



Figura 15 - Amostra 1 grupo D (controle positivo - procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimes em saliva artificial alterada, com cloreto de cálcio).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observam-se padrões de fratura normais, bem como diferentes zonas homogêneas de recobrimento/exposição do mesmo.

## Grupo E



Figura 16 - Amostra 1 grupo E (procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimes em saliva artificial alterada, com cloreto de estrôncio).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observa-se uma estrutura mais homogênea e organizada com espaços lacunares, bem como uma camada impregnada.

## **Grupo F**

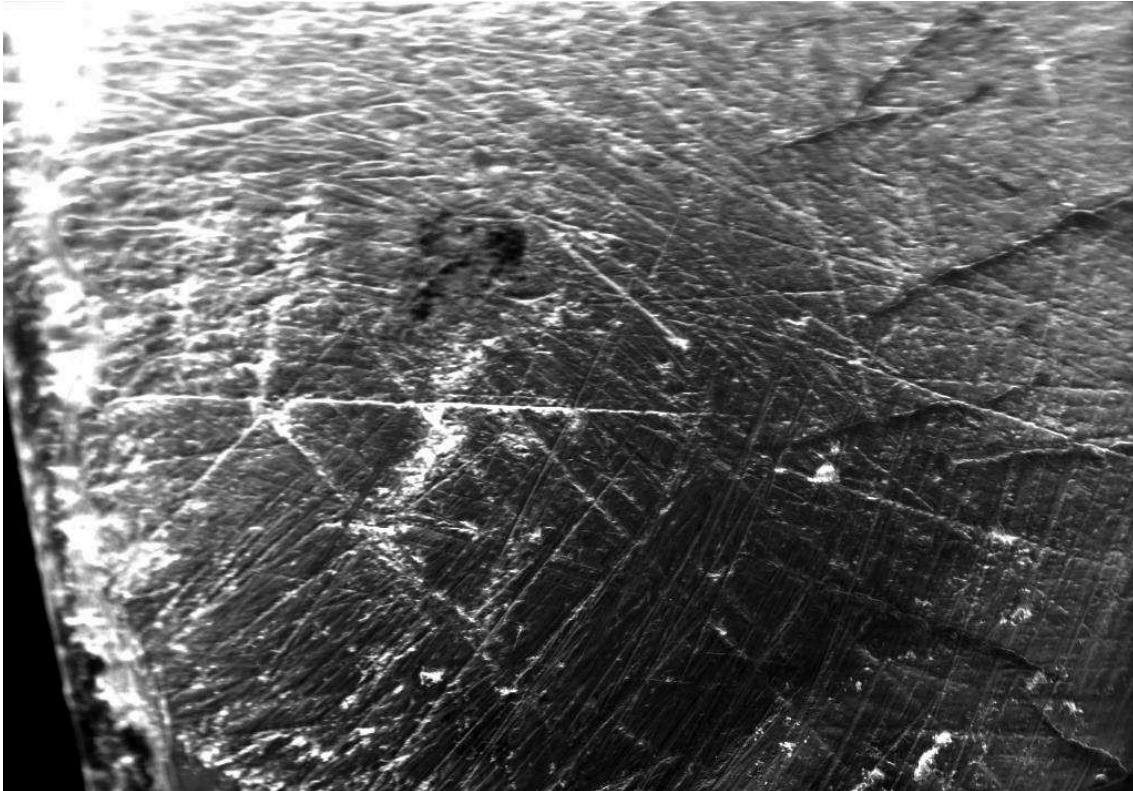
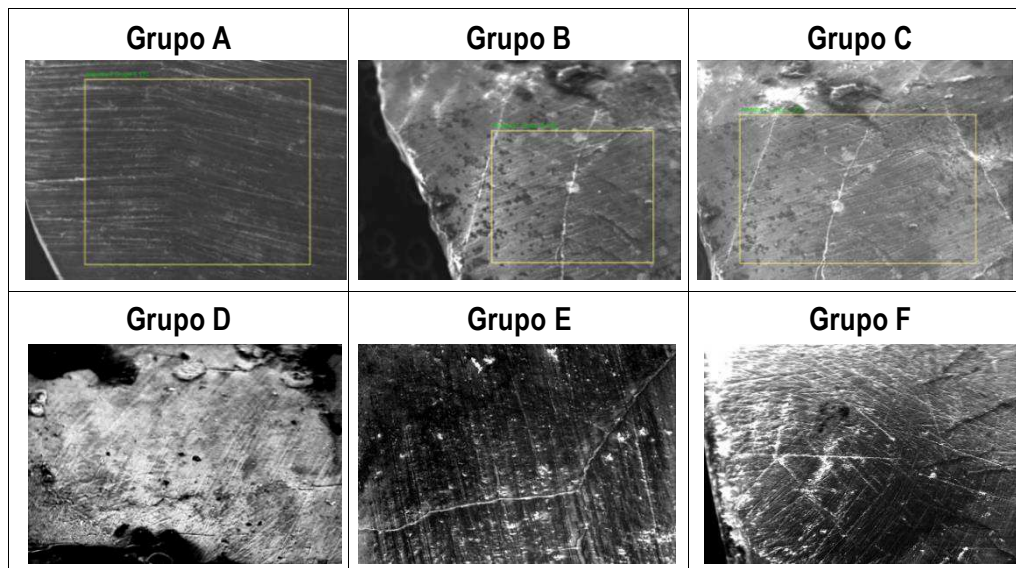


Figura 17 - Amostra 1 grupo F (procedimento idêntico ao grupo B, seguido da imersão dos espécimes em saliva artificial alterada, com cloreto de magnésio).

Visão panorâmica da superfície de esmalte desmineralizado a x500. Observa-se uma imagem similar à obtida no grupo E mas, mais desorganizada, e na qual é possível identificar várias camadas e linhas de fratura.

Tabela 2 - Resumo das imagens MEV a X 500 obtidas em cada um dos grupos de estudo



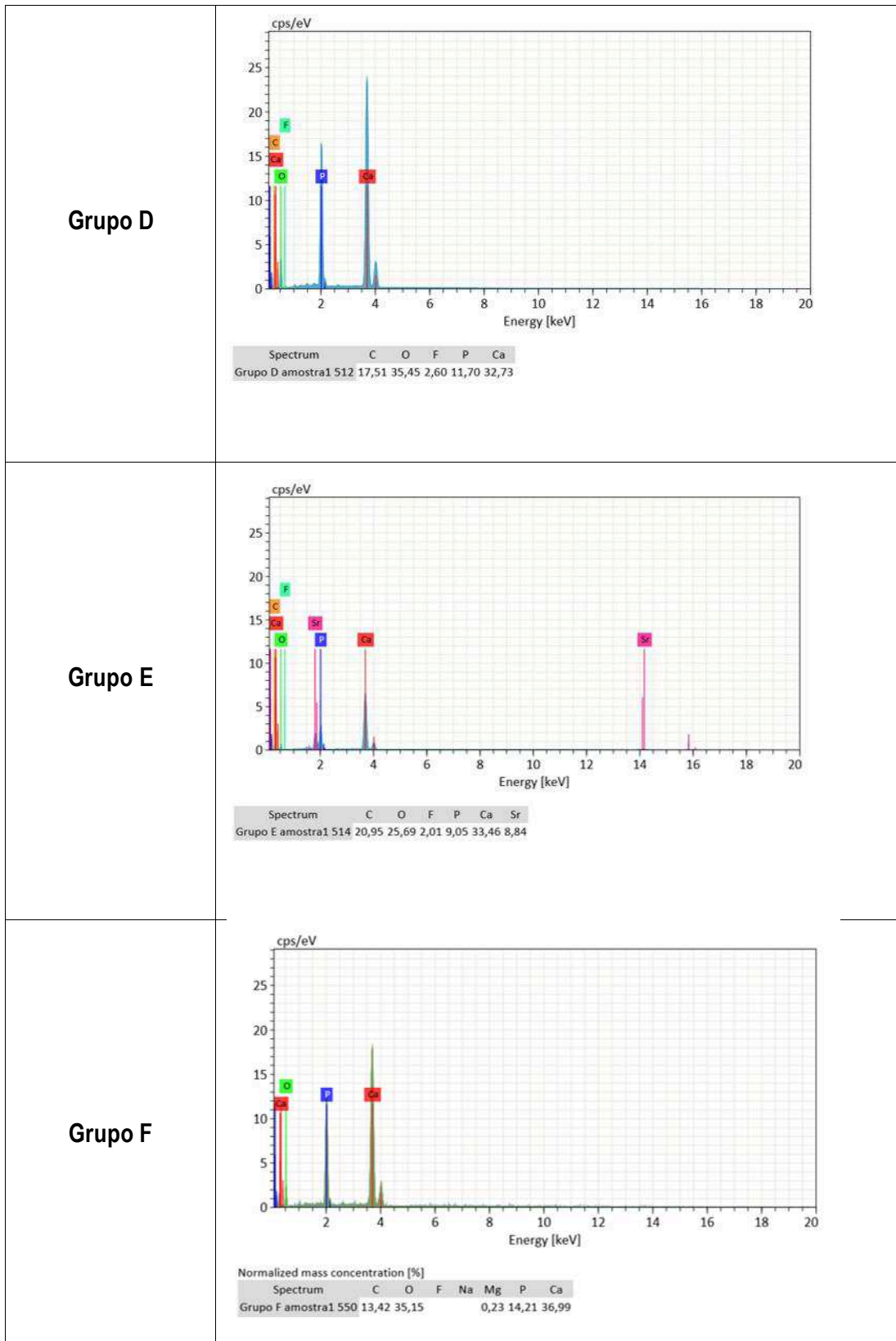
Apesar de não existir um grupo controle com esmalte sadio para se poder comparar a aparência deste sem sofrer desmineralização e após este processo, no grupo A é possível observar um padrão poroso característico desta ação.

As imagens dos grupos B, C, D, E e F revelam um revestimento correspondente à deposição da camada de verniz de flúor aplicado em cada uma das amostras destes grupos e ambas sugerem a existência de remineralização com fluorapatite.

### III.2. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X COM DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)

Tabela 3 - Gráficos e constituição elemental obtidos por EDS em cada um dos grupos de estudo

<p><b>Grupo A</b></p>	<p>Spectrum C F Na Si P Ca In          Amostra 2 Grupo A 511 90,40 1,67 1,50 5,50 0,13 0,29 0,52</p>
<p><b>Grupo B</b></p>	<p>Spectrum C O F Na Si P K Ca          Amostra 1 Grupo B 508 60,96 9,31 1,20 3,41 19,77 0,96 0,84 3,55</p>
<p><b>Grupo C</b></p>	<p>Spectrum C O F Si P Cl Ca          Amostra 1 Grupo C 503 75,03 7,11 0,15 14,45 0,35 0,02 2,88</p>



Através da análise dos gráficos presentes da Tabela 3, é possível fazer algumas inferências, nomeadamente:

Na análise elementar do grupo A observaram-se valores reduzidos de cálcio e fosfato, que corroboram o efeito do tratamento das amostras com ácido láctico.

O mesmo para o grupo B, ainda que em maior quantidade do que no grupo A, bem como um aumento do valor de sódio na amostra, elemento constituinte do verniz de flúor aplicado.

Na análise elementar do grupo C, verificaram-se também valores reduzidos de cálcio e fosfato, corroborantes do processo de desmineralização, ainda que mais elevados que no grupo A e B, respetivamente.

No grupo D, foi possível verificar a introdução de cloreto de cálcio, pois a amostras revelaram quantidades superiores do elemento cálcio. Observou-se a maior proporção Ca/P dos 6 grupos.

Na análise elementar do grupo E, a proporção Ca/P foi a mais elevada a seguir ao grupo D, e a presença do elemento estrôncio foi notória.

Quanto ao grupo F, a presença de magnésio foi difícil de achar, o que sugere alguma dificuldade de incorporação do mesmo na estrutura cristalina da HA.

#### IV. DISCUSSÃO

O esmalte dentário compreende aproximadamente 90% de hidroxiapatite substituída  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , que é submetida a ciclos consecutivos de dissolução (desmineralização) e recristalização (remineralização) (Güçlü, Alaçam, & Coleman, 2016). Sabe-se que o processo de desmineralização do esmalte pode ser revertido através da deposição mineral quando exposto a um ambiente favorável para a sua ocorrência, pelo que no presente trabalho pretendeu-se estudar a incorporação de diferentes catiões divalentes alcalino-terrosos na fluorapatite e realizar um estudo observacional comparativo das superfícies de esmalte resultantes, através da análise MEV/EDS das mesmas.

O grupo A, o qual corresponde a esmalte desmineralizado com solução de ácido láctico serviu de controlo para comparação das imagens e análise elementar face aos restantes grupos de estudo (B-F). Na imagem MEV deste grupo é possível verificar que existiu desmineralização e a análise elementar da mesma foi concordante com esta observação, tendo-se verificado valores diminuídos de cálcio e fosfato.

Posteriormente à indução de desmineralização nas amostras foi aplicado, em cada uma delas, com exceção do controlo A, um verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish) cuja intenção foi a de prover flúor de modo a que o processo de remineralização pudesse ocorrer, com a formação de fluorapatite, uma vez que é sabido que o flúor atua de forma dinâmica na difusão dos iões de cálcio e fosfato. Optou-se por trabalhar com a fluorapatite e não com a hidroxiapatite, pelo facto de esta não depender da disponibilidade de iões hidroxilo livres, excluindo assim a necessidade de manipular o pH. A formação de fluorapatite através desta metodologia já foi testada em trabalhos anteriormente realizados e discutidos, com resultados que sustentam o êxito da mesma.

A substituição de iões hidroxilo por iões fluoreto livres diminui o volume do cristal, aumenta a estabilidade e, conseqüentemente reduz a solubilidade dos cristais da HA (Güçlü, Alaçam, & Coleman, 2016).

A imagem MEV do grupo B, revela, portanto, camadas alternadas de recobrimento da superfície de esmalte desmineralizado. Estas camadas correspondem à deposição da película de verniz de flúor que foi aplicado. Em relação à análise elementar, os valores de cálcio e fosfato corroboram a existência de desmineralização, no entanto estes foram superiores aos do grupo A, o que sugere ter havido alguma remineralização. Contudo, o mesmo não seria expectável, uma vez que as amostras deste grupo não foram submetidas

a nenhum aporte de cálcio. Tal observação poderia ser justificada com a formação de um precipitado de sódio, uma vez que este metal está presente no verniz utilizado na forma NaF. Porém, por um lado o íon  $\text{Na}^+$  é um metal muito estável em solução (não apresenta significativa tendência em formar complexos e normalmente os seus sais têm solubilidade elevada), por outro as análises elementares das superfícies das amostras do grupo B revelaram que o teor de cálcio aumentou do grupo A para o grupo B, enquanto o teor de sódio não variou expressivamente. De qualquer forma, apenas considerando uma amostra de maior dimensão e recorrendo a métodos quantitativos mais exatos seria possível identificar a origem da mineralização.

No grupo C, onde as amostras desmineralizadas artificialmente foram tratadas com flúor e posteriormente imersas em saliva artificial sem qualquer metal divalente na sua constituição, as imagens de MEV sugerem a existência de desmineralização na superfície de esmalte, assim como uma camada de recobrimento correspondente à aplicação do verniz de flúor, idêntica à observada no grupo B. A análise elementar das amostras sugere a existência de desmineralização (valores de cálcio e fosfato diminuídos), todavia estes valores permanecem mais expressivos comparativamente com os dos grupos anteriores, sugerindo ter havido remineralização. Tal como no caso anterior, não era esperado que este grupo originasse imagens de MEV e resultados de EDS que sugerem a presença de maior teor de cálcio associado com uma mineralização da superfície, em comparação com o grupo A.

Posto isto, em virtude das diferenças nas imagens MEV/EDS da superfície do esmalte das amostras dos grupos A, B e C não se verificou a hipótese de estudo *i* (página 20).

Para que haja formação de fluorapatite é imperativo a presença de cálcio ou de um outro metal capaz de o substituir na apatite formada, motivo pelo qual se resolveu testar o estrôncio e o magnésio pois, como já referido anteriormente, tratam-se de elementos cujas propriedades periódicas se assemelham.

No grupo D, cujas amostras foram imersas em saliva artificial contendo cloreto de cálcio, as imagens MEV e a análise EDS corroboram a existência de remineralização, sendo possível identificar zonas alternadas de exposição/recobrimento na superfície de esmalte, assim como valores elevados de cálcio e fosfato. No processo de remineralização a disponibilidade de íões de cálcio e fosfato é uma limitação para a sua ocorrência (Cochrane *et al.*, 2010; Elkassas & Arafa, 2014), pelo que a disponibilidade de cálcio na

solução de saliva em que as amostras foram imersas e o fosfato libertado aquando a desmineralização do esmalte promoveram a formação de fluorapatite.

No grupo E, a imersão das amostras em saliva artificial contendo cloreto de estrôncio originou imagens MEV da superfície de esmalte mais homogêneas (quando comparadas com as dos grupos A, B, C) com uma estrutura mais organizada em que é possível identificar mais espaços lacunares. É possível observar uma camada impregnada na superfície, sugestiva da substituição do cálcio por estrôncio na remineralização com formação de Sr-fluorapatite. Deste modo, é possível corroborar a hipótese de estudo *ii* (página 20). Na análise elementar verificou-se de forma expressiva a presença do elemento estrôncio.

Assim, os resultados obtidos assemelham-se aos obtidos em estudos anteriormente desenvolvidos, tais como um estudo *in vitro* de Thuy et. al (2008), cujo objetivo foi esclarecer a interação entre o estrôncio e o flúor na remineralização de lesões de cárie, o qual mostrou claramente que a presença simultânea destes dois elementos, em concentrações específicas, aumenta a remineralização do esmalte *in vitro*, isto é, enquanto o processo de remineralização foi afetado pela concentração de flúor, a interação entre o estrôncio e o flúor induziram um aprimoramento sinérgico da remineralização. Num outro estudo mais antigo, Wefel (1995) mostrou os benefícios anticárie de uma pasta fluoretada suplementada com estrôncio quando comparado a um controlo de pasta fluoretada (com idêntica concentração de flúor).

No entanto, o efeito do estrôncio na transformação de fase do fosfato de cálcio ainda não está esclarecido. Para tal, é necessário investigar de que forma o estrôncio afeta a estabilidade térmica e a estrutura cristalina do fosfato de cálcio. Com esse intuito, num estudo recente de He, Dong & Deng (2016) foram sintetizadas, por precipitação química, amostras de fosfato de cálcio substituídas por estrôncio, com conteúdo variável. Os resultados deste estudo mostraram que o estrôncio é incorporado na rede de hidroxiapatite e esta incorporação, por sua vez, leva a um aumento na energia de ligação ao cálcio. Por outro lado, nos precursores da apatite, o estrôncio parece combinar-se com átomos de oxigénio ou grupos carbonato em geometrias semelhantes às adaptadas pelo cálcio na estrutura da apatite, o que uma vez mais vai de encontro aos resultados obtidos no presente estudo.

Por último, o grupo F cujas amostras foram imersas em saliva artificial contendo cloreto de magnésio, deu origem a imagens MEV/EDS que corroboram a existência de remineralização (e consequentemente, a hipótese de estudo *ii*), com formação de

fluorapatite, tal como se verificou nos grupos D e F, mas em menor quantidade e de forma mais heterogénea. Este resultado sustenta a ideia anteriormente mencionada de que os iões de magnésio podem substituir iões de cálcio, mas, contrariamente ao estrôncio, inibir o crescimento de cristais (Alkattan, Lippert, Tang, Eckert & Ando, 2018; Neel et al., 2016).

Sumariamente, os resultados obtidos revelam que a abundância/disponibilidade de um elemento, neste caso de um metal, no meio ambiente não é a chave suficiente para a incorporação do mesmo na hidroxiapatite, mas sim as propriedades físico-químicas deste.

#### **IV.1. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Apesar do presente trabalho ter sido desenvolvido com base em protocolos experimentais devidamente descritos na literatura, subsistem limitações. Tratando-se de um estudo *ex vivo*, as soluções preparadas de ácido láctico e saliva artificial, correspondem a soluções artificiais cujo objetivo é criar um ambiente suficiente e convenientemente estável para o desenvolvimento do projeto.

O facto da observação das amostras ter sido feita sem a deposição de liga metálica resultou em imagens de baixa qualidade, o que dificultou a análise das mesmas. A deposição da liga metálica tem como objetivo facilitar a condução da amostra e o esmalte é considerado um mau condutor (Prajapati *et al.*, 2017). Optou-se pela não deposição da liga metálica na microscopia eletrónica de varrimento, de modo a que fosse possível fazer a análise elementar com EDS e assim ter uma noção, ainda que não muito exata, do conteúdo metálico do mineral formado.

A obtenção de imagens foi efetuada apenas numa ampliação (x500), não permitindo comparar as características topográficas das amostras/ orientação dos prismas de esmalte a diferentes ampliações.

#### **IV.2. PERSPETIVAS FUTURAS**

Futuramente, seria importante aumentar a amostra estudada, de modo a obter um maior número de resultados, realizar ciclos de pH para avaliar a resistência da fluorapatite formada, face a um novo ataque ácido. Ou por outro lado, comparar a diferença entre a escovagem com dentífricos comercializados que contenham cloreto de estrôncio, face a outros de diferente composição.

## **V. CONCLUSÃO**

Perante os resultados obtidos no presente estudo e, tendo em consideração as limitações do mesmo, é possível concluir que os resultados MEV/EDS obtidos corroboram a ocorrência desmineralização pelo tratamento das amostras com ácido láctico no grupo A, e suportam a existência de remineralização com formação de fluorapatite com cálcio no grupo tratado com saliva artificial contendo cloreto de cálcio, bem como a ocorrência de remineralização com formação de fluorapatite com estrôncio no grupo tratado com saliva artificial contendo cloreto de estrôncio e de fluorapatite com magnésio no grupo enriquecido com este elemento. No entanto, de entre os grupos com adição de cátions divalentes, o grupo que continha magnésio foi aquele que apresentou remineralização em menor quantidade, validando o “insucesso” dos diversos estudos que procuraram integrar este elemento na rede de HA e o facto de nos últimos anos, a pesquisa com este elemento e a sua relação com o esmalte dentário não ser expressiva.

Contrariamente a este facto, o estrôncio continua a mostrar resultados satisfatórios, revelando o seu potencial nesta área, pelo que é indispensável continuar a estudá-lo; uma vez que há formação de fluorapatite com estrôncio, será proveitoso procurar saber as suas características, nomeadamente a sua resistência ao processo de desmineralização-remineralização.

*Estudo do efeito da adição de diferentes cátions na remineralização de lesões de cárie artificiais por microscopia eletrônica de varrimento e por espectroscopia de raios X com dispersão de energia*

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Alkattan, R., Lippert, F., Tang, Q., Eckert, G. J., & Ando, M. (2018). The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *Journal of dentistry*, 75, 34-40.
- Bowen, W. H. (2001). Exposure to metal ions and susceptibility to dental caries. *Journal of Dental Education*, 65, 1046-1053.
- Caneppele, T. M. F., Jeronymo, R. D. I., Di Nicoló, R., de Araújo, M. A. M., & Soares, L. E. S. (2012). In vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: Surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Brazilian Dental Journal*, 23(4), 373–378.
- Cardoso, C. A. B., de Castilho, A. R. F., Salomão, P. M. A., Costa, E. N., Magalhães, A. C., & Buzalaf, M. A. R. (2014). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(11), 1495–1501.
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., ... & Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of dentistry*, 50, 74-78.
- Carlstrom, D. (1955). X-ray crystallographic studies on apatites and calcified structures. *Acta radiologica. Supplementum*, 121, 1-59.
- Carvalho, J. G., Godoy, L. F., Bastos, M. T. A. A. (2002). Comparação de duas técnicas para remineralização do esmalte. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 16(1), 89-92.
- Cassiano, L., Biology, O., Pessan, J., Cardoso, C., Dionisio, A., Manarelli, M., ...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.
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of dental research*, 89(11), 1187-1197.

- Curzon, M. E. J. (1985). The relation between caries prevalence and strontium concentrations in drinking water, plaque, and surface enamel. *Journal of dental research*, 64(12), 1386-1388.
- Curzon, M. E. J., Spector, P. C., & Iker, H. P. (1978). An association between strontium in drinking water supplies and low caries prevalence in man. *Archives of oral biology*, 23(4), 317-321.
- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., ... Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874.
- de Carvalho, F. G., Puppim-Rontani, R. M., Soares, L. E., Santo, A. M. E., Martin, A. A., & Nociti-Junior, F. H. (2009). Mineral distribution and CLSM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. *Journal of dentistry*, 37(4), 307-314.
- De Carvalho Filho, A. C. B., Sanches, R. P., Martin, A. A., do Espírito Santo, A. M., & Soares, L. E. S. (2011). Energy dispersive X-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion. *Microscopy research and technique*, 74(9), 839-844.
- Discher CA, Medwick T, Bailey LC (1985) *Moder Inorganic Pharmaceutical Chemistry*. 2nd Ed. Waveland Press, Inc. EUA: Illinois. ISBN 0-88133-121-X
- 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.
- Featherstone, J. D. B., & Rodgers, B. E. (1981). Effect of Acetic, Lactic and other Organic Acids on the Formation of Artificial Carious Lesions. *Caries Research*, 15(5), 377– 385.
- Featherstone, J. D. B., Shields, C. P., Khademazad, B., & Oldershaw, M. D. (1983). Acid reactivity of carbonated apatites with strontium and fluoride substitutions. *Journal of Dental Research*, 62(10), 1049-1053.
- Fraústo da Silva, J. J. R., & Williams, R. J. P. (2001). *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Oxford University Press.

- Gao, S. S., Zhang, S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2016). Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment—a systematic review. *BMC Oral Health*, *16*(1), 12
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface. *The Journal of the American Dental Association*, *139*, 25S–34S.
- Godoi, F. A. D., Carlos, N. R., Bridi, E. C., Amaral, F. L. B. D., França, F. M. G., Turssi, C. P., ... & Basting, R. T. (2019). Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions. *Brazilian oral research*, *33*.
- Gu, X. N., & Zheng, Y. F. (2010). A review on magnesium alloys as biodegradable materials. *Frontiers of Materials Science in China*, *4*(2), 111-115.
- Güçlü, Z. A., Alaçam, A., & Coleman, N. J. (2016). A 12-Week Assessment of the Treatment of White Spot Lesions with CPP-ACP Paste and/or Fluoride Varnish. *BioMed Research International*, 2016, 1–9.
- He, L., Dong, G., & Deng, C. (2016). Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation. *Ceramics International*, *42*(10), 11918-11923.
- Higham S [webpage Internet]. Caries Process and Prevention Strategies: Demineralization/Remineralization. Disponível em: <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce372>. Consultado em: 20 de Junho de 2019.
- Ismail, A. I., Tellez, M., Pitts, N. B., Ekstrand, K. R., Ricketts, D., Longbottom, C., ... & Featherstone, J. D. (2013). Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community dentistry and oral epidemiology*, *41*(1), e12-e40
- Jo, S. Y., Chong, H. J., Lee, E. H., Chang, N. Y., Chae, J. M., Cho, J. H., ... & Kang, K. H. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *The Korean Journal of Orthodontics*, *44*(3), 113-118.
- Kreidler, E. R., & Hummel, F. A. (1970). The crystal chemistry of apatite: structure fields of fluor- and chlorapatite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*, *55*(1-2), 170-184.

- Li, Z. Y., Lam, W. M., Yang, C., Xu, B., Ni, G. X., Abbah, S. A., ... & Lu, W. W. (2007). Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*, 28(7), 1452-1460.
- Lippert, F. (2012). The effects of lesion baseline characteristics and different Sr:Ca ratios in plaque fluid-like solutions on caries lesion de- and remineralization. *Archives of oral biology*, 57(10), 1299-1306.
- Lippert, F. (2017). The effects of fluoride, strontium, theobromine and their combinations on caries lesion rehardening and fluoridation. *Archives of Oral Biology*, 80, 217–221.
- Lippert, F., & Hara, A. T. (2013). Strontium and caries: a long and complicated relationship. *Caries research*, 47(1), 34-49.
- 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.
- Magalhães, A. C., Comar, L. P., Rios, D., Delbem, A. C. B., & Buzalaf, M. A. R. (2008). Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*, 36(2), 158–162.
- Nabiyouni, M., Ren, Y., & Bhaduri, S. B. (2015). Magnesium substitution in the structure of orthopedic nanoparticles: A comparison between amorphous magnesium phosphates, calcium magnesium phosphates, and hydroxyapatites. *Materials Science and Engineering: C*, 52, 11-17.
- Nakata, T., Kitasako, Y., Sadr, A., Nakashima, S., & Tagami, J. (2018). Effect of a calcium phosphate and fluoride paste on prevention of enamel demineralization. *Dental Materials Journal*, 37(1), 65–70.
- Neel, E. A. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., ... & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International journal of nanomedicine*, 11, 4743.
- Neuman, W. F., & Mulryan, B. J. (1971). Synthetic hydroxyapatite crystals. *Calcified tissue research*, 7(1), 133-138.

- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1592–1602.
- Paris, S., Lausch, J., Selje, T., Dörfer, C. E., & Meyer-Lueckel, H. (2014). Comparison of sealant and infiltrant penetration into pit and fissure caries lesions in vitro. *Journal of dentistry*, 42(4), 432-438.
- Peng, C., de Sousa, F. B., Gan, H. Y., Kwon, H. J., Park, S., Kilpatrick-Liverman, L., ... & Han, J. (2019). Enhanced Delivery of F<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup> Ions into Enamel by Electrokinetic Flows. *Journal of dental research*, 98(4), 430-436.
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., ... & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature reviews Disease primers*, 3, 17030.
- Prajapati, D., Nayak, R., Pai, D., Upadhyaya, N., Bhaskar, V. K., & Kamath, P. (2017). Effect of resin infiltration on artificial caries: an in vitro evaluation of resin penetration and microhardness. *International journal of clinical pediatric dentistry*, 10(3), 250.
- Pytko-Polonczyk, J., Jakubik, A., Przeklasa-Bierowiec, A., & Muszynska, B. (2017). Artificial saliva and its use in biological experiments. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(6), 807-813.
- Rethman, M. P., Beltrán-Aguilar, E. D., Billings, R. J., Hujoel, P. P., Katz, B. P., Milgrom, P., *et al.* (2011). Nonfluoride caries-preventive agents: executive summary of evidence-based clinical recommendations. *Journal of the American Dental Association*, 142, 1065-1071.
- Rizvi, A., Zafar, M. S., Wasifi, Y. Al, Fareed, W., Khurshid, Z., & Zafar, C. M. S. (2016). Role of enamel demineralization and remineralization on microtensile bond strength of resin composite. *European Journal of Dentistry*, 10(3), 376–380
- Shen, P., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., Stanton, D. P., Fernando, J. R., & Reynolds, E. C. (2018). Importance of bioavailable calcium in fluoride dentifrices for enamel remineralization. *Journal of dentistry*, 78, 59-64.

- Simpson, D. R. (1972). Problems of the Composition and Structure of the Bone Minerals. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 86, 260-286.
- Soares, L. E. S., Santo, A. M. D. E., Brugnera, A., Zanin, F. A. A., & Martin, A. A. (2009). Effects of Er: YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 2: energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Journal of biomedical optics*, 14(2), 024002.
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of dental research*, 90(3), 294-303.
- Ten Cate, J. M., & Buzalaf, M. A. R. (2019). Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist... *Journal of Dental Research*, 98(7), 725-730.
- Terpstra, R. A., & Driessens, F. C. M. (1986). Magnesium in tooth enamel and synthetic apatites. *Calcified Tissue International*, 39(5), 348–354.
- Thewlis, J., Glock, G. E., & Murray, M. M. (1939). Chemical and X-ray analysis of dental, mineral and synthetic apatites. *Transactions of the Faraday Society*, 35, 358-363.
- Thuy, T. T., Nakagaki, H., Kato, K., Hung, P. A., Inukai, J., Tsuboi, S., ... & Robinson, C. (2008). Effect of strontium in combination with fluoride on enamel remineralisation in vitro. *Archives of Oral Biology*, 53(11), 1017-1022.
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662-671.
- Walsh, T., Worthington, H. V., Glenny, A. M., Marinho, V. C., & Jeronic, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3).
- 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(1), 39-49.

- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of dentistry*, 42, S2-S11.
- Willems, H. M., Kos, K., Jabra-Rizk, M. A., & Krom, B. P. (2016). Candida albicans in oral biofilms could prevent caries. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(5), ftw039.