



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CATIÕES
NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS
POR AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE DO
ESMALTE**

Trabalho submetido por
Carolina de Matos Arsénio
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CATIÕES
NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS
POR AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE DO
ESMALTE**

Trabalho submetido por
Carolina de Matos Arsénio
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Carla Ascenso

e coorientado por
Prof.^a Doutora Ana Cristina Manso

Setembro de 2019

Em memória da minha Mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora de tese, Prof. Doutora Carla Ascenso, por todo o seu apoio, compreensão, ensinamentos, disponibilidade e acima de tudo por a confiança depositada em mim. Agradeço-lhe, também, toda a ajuda prestada durante o meu período de ERASMUS que fez com que lhe tivesse um carinho especial. Foi um privilégio tê-la como minha orientadora.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Ana Cristina Manso, por todo o apoio e ajuda demonstrados durante a realização da tese.

À minha coorientadora, Mestre Joana Carmo, por toda a disponibilidade mostrada em ajudar na realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Mário Polido por ter disponibilizado o Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz.

Ao meu pai, o meu ídolo. Obrigada por todo o amor e apoio incondicional, incentivo e paciência e por todo o esforço feito para que a minha formação fosse o melhor possível.

Aos meus tios, segundos pais, que estiveram comigo todos estes anos e acompanharam todo o meu percurso. Foram e são um pilar essencial na minha vida. Agradeço-vos por todos os conselhos e incentivo durante estes anos.

Ao meu irmão, o meu grande orgulho. Obrigada por todo o carinho e confiança depositada em mim.

Ao meu avô, por todas as palavras de motivação e afeto demonstrado.

Ao meu namorado, Diogo, por acreditar sempre em mim e me apoiar nesta jornada.

À minha colega e amiga, Mafalda Aquino, que me acompanhou em todo este percurso e que foi a minha companheira de tese. Sem ela, todo este trabalho não teria o mesmo sentido, um sincero obrigado.

À minha colega de box, Inês Póvoas, por todos os momentos que passámos juntas neste último ano e por todo o apoio e amizade demonstrada.

Aos meus amigos, agradeço-vos por o encorajamento nas fases mais difíceis deste percurso e por terem partilhado comigo momentos que nunca irei esquecer.

RESUMO

Objetivo: Incorporar diferentes catiões divalentes na fluorapatite avaliando a microdureza de superfície do esmalte.

Materiais e métodos: 60 fragmentos de esmalte obtidos a partir de 16 molares humanos, aleatoriamente divididos em 6 grupos (A, B, C, D, E e F). Todos os grupos sofreram desmineralização com uma solução tampão de ácido láctico durante 6 dias. Exceto no grupo A, em todos os restantes grupos aplicou-se verniz de fluoreto de sódio a 5%. Os grupos C-F foram seguidamente tratados com soluções de saliva artificial diferentes, durante 6 dias e com renovação diária: C, imersão em saliva artificial sem cálcio; D, imersão em saliva artificial com cálcio; E, imersão em saliva artificial com estrôncio; F, imersão em saliva artificial com magnésio. Todos os grupos foram submetidos a testes de microdureza de Vickers. Os dados recolhidos foram analisados estatisticamente por aplicação de um teste ANOVA *One-way* (intervalo de confiança de 95%), seguido de comparação múltipla pelo teste de Bonferroni (*software* SPSS, versão 24).

Resultados: A análise estatística pelo teste ANOVA a um fator, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou existirem diferenças significativas entre valores médios de microdureza dos vários grupos de estudo ($p=0,001$). A - $261,720 \pm 2,582$ HV; B - $364,044 \pm 1,699$ HV; C - $551,260 \pm 1,766$ HV; D - $597,860 \pm 2,623$ HV; E - $483,060 \pm 2,964$ HV; F - $444,420 \pm 2,562$ HV.

Conclusões: Tanto o magnésio como o estrôncio originaram valores de microdureza de superfície indicadores de ter ocorrido remineralização, mas estes valores foram sempre inferiores aos produzidos pelo cálcio.

Palavras-chave: esmalte, catiões divalentes, remineralização, hidroxiapatite, microdureza.

ABSTRACT

Objectives: Incorporate different divalent cations in fluorapatite, while evaluating microhardness of enamel surface.

Materials and methods: 60 enamel fragments obtained from 16 human molars randomly divided into 6 groups (A, B, C, D, E and F). All groups were demineralized with a lactic acid buffer solution for 6 days. Except for group A, 5% sodium fluoride varnish was applied. Groups C-F were then treated with different artificial saliva solutions for 6 days and with daily renewal: C, immersion in artificial saliva without calcium; D, immersion in artificial saliva with calcium; E, immersion in artificial saliva with strontium; F, immersion in artificial saliva with magnesium. All groups were submitted to Vickers microhardness tests. The collected data was statistically analyzed by applying a one-way ANOVA test (95% confidence interval), followed by multiple comparison by the Bonferroni test (SPSS software, version 24).

Results: Statistical analysis by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test revealed significant differences between mean microhardness values of the various study groups ($p = 0.001$). A - 261.720 ± 2.582 HV; B - 364.044 ± 1.699 HV; C 551.260 ± 1.766 HV; D - 597.860 ± 2.623 HV; E - 483.060 ± 2.964 HV; F- 444.420 ± 2.562 HV.

Conclusions: Both magnesium and strontium originated surface microhardness values indicating remineralization, but these values were always lower than those produced by calcium.

Key words: enamel, divalent cations, remineralization, hydroxyapatite, microhardness.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE SIGLAS	11
INTRODUÇÃO.....	13
ESMALTE	13
CÁRIE DENTÁRIA.....	16
DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO	16
AGENTES REMINERALIZANTES	17
Flúor	17
Cálcio	18
Estrôncio	19
Magnésio	19
SALIVA	20
OBJETIVO DO ESTUDO.....	23
HIPÓTESES DE ESTUDO	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	25
LOCAL DO ESTUDO.....	25
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	25
PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	25
SOLUÇÕES REMINERALIZANTES	29
Saliva artificial sem metais divalentes	29
Soluções de saliva artificial com metais divalentes	29
DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DA AMOSTRA	30
Indução de Lesões Artificiais de Cárie	30
Aleatorização da amostra	31
Remineralização com saliva artificial sem/com metais divalentes	31
ANÁLISE DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE	33
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES.....	47
BIBLIOGRAFIA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho do estudo	26
Figura 2. Polimento das amostras. A: Aparelho usado no polimento das amostras LaboPol – 4® B: Espécime após ser submetido ao polimento.	27
Figura 3. Micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup).	28
Figura 4. A: marcação da linha da junção amelo-cementária (JAC) B: marcação da linha 4mm acima da JAC C: marcação das linhas verticais com 3mm de distância D: dente com todas as linhas de corte E e F: fragmentos obtidos após processo de corte com as dimensões 4x3.	28
Figura 5. Cloreto de estrôncio hexa-hidratado utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo Sr^{2+} (Grupo E).	29
Figura 6. Cloreto de magnésio hexa-hidratado utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo Mg^{2+} (Grupo F).....	30
Figura 7. Solução de ácido láctico, utilizada como agente desmineralizante artificial para mimetizar as lesões de cárie no esmalte.....	30
Figura 8. A: Verniz de fluoreto de sódio 5% usado neste trabalho (Profluorid® Varnish, VOCO) B: Imagem do modo de aplicação do verniz de fluor na face lingual/vestibular.....	32
Figura 9. Testes de Microdureza de Vickers. A: Equipamento HSV-30®, Shimadzu Corporation B: Pormenor da indentação com pressão 4,903 N, durante 15 segundos C: Observação da Indentação.	33
Figura 10. Gráfico comparativo dos valores estatísticos médios de microdureza de superfície do esmalte dos diferentes grupos.	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Medidas estatísticas descritivas obtidas para cada grupo de estudo.....	35
Tabela 2. Resultados da aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk a cada grupo de estudo, após eliminação de um <i>outlier</i> ao grupo B.	37
Tabela 3. Teste de homogeneidade de variância de Levene aplicado aos seis grupos de estudo para avaliar a homogeneidade das suas variâncias ($df1=n^{\circ}$ de grupos-1; $df2=n^{\circ}$ de espécimenes – n° de grupos).....	37
Tabela 4. Resultado do teste ANOVA a um fator obtido utilizando o <i>software</i> IBM SPSS <i>Statistics</i> versão 24.....	38
Tabela 5. Resultados da comparação múltipla das médias dos grupos estudados pelo teste de Bonferroni.	39

LISTA DE SIGLAS

Ca - Cálcio

Ca²⁺ - Cátion de Cálcio

CO₃²⁻ - Ânion de carbonato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

F - Flúor

F⁻ - Ânion de flúor

FHA - Hidroxiapatite fluoretada

h - Horas

HA - Hidroxiapatite

IgA - Imunoglobulina A

MMPs - Metaloproteinases

mM - Milimolar

Mg - Magnésio

Mg²⁺ - Cátion de Magnésio

Mg-HA - Hidroxiapatite de Magnésio

mg - Miligrama

mL - Mililitro

μM - Micromolar

N - Newton

Na⁺ - Cátion de Sódio

ppm - Partes por milhão

pH - Potencial de Hidrogénio

PO₄³⁻ - Ânion de Fosfato

PRPs - Proteínas ricas em Prolina

RNA - Ácido Ribonucleico

rpm - Rotações por minutos

s - Segundos

SiO₃²⁻ - Ânion de Silicato

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

Sr - Estrôncio

Sr²⁺ - Cátion de Estrôncio

Sr-HA - Hidroxiapatite de Estrôncio

INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é considerado como uma “obra-prima” dos tecidos mineralizados biológicos e, por isso, tem despertado grande interesse na área da investigação (Shahmoradi, Bertassoni, Elfallah & Swain, 2014), sendo a sua estrutura afetada pela doença mais prevalente na cavidade oral – a cárie dentária (Robinson, Kirkham, Brookes & Shore, 2017; Frencken *et al.*, 2017).

A cárie dentária é uma doença multifatorial e dinâmica, mediada por um biofilme ácido, que resulta do desequilíbrio na relação desmineralização/remineralização dos tecidos duros dentais (Pitts *et al.*, 2017). A desmineralização progressiva do esmalte dentário ocorre quando as bactérias da placa metabolizam açúcares da dieta em ácidos que vão libertar íons de cálcio e fosfato da hidroxiapatite. Patologicamente, as lesões de cárie desenvolvem-se gradualmente, começando como uma mudança estrutural mínima que não é detetável clinicamente, progredindo para uma mancha clinicamente visível de desmineralização, e para graus de destruição do tecido no dente (Llena, Leyda & Forner, 2015).

Nos estágios iniciais do processo da doença, esta é completamente reversível. No entanto, os íons de flúor podem promover a remineralização do esmalte se o cálcio e o fosfato estiverem disponíveis em quantidades adequadas quando o flúor é aplicado (Reynolds *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, devido a uma melhor compreensão da estrutura e da natureza dinâmica da cárie do esmalte, houve uma mudança de paradigma no tratamento de lesões, passando de uma abordagem operatória/restauradora para um conceito de prevenção/remineralização. O objetivo do tratamento contemporâneo da cárie é deslocar o equilíbrio dinâmico das reações de desmineralização/remineralização para o ganho mineral dentro da lesão, através do fornecimento de íons mineralizantes biodisponíveis (Shahmoradi, Hunter & Swain, 2017).

A desmineralização e a remineralização ocorrem constante, simultânea ou alternadamente, sendo que uma lesão progredirá ou será reparada, dependente do processo predominante ao longo dos períodos de tempo (Jing, Lu, Hao & Han, 2009).

ESMALTE

O esmalte dentário é a substância mais dura do corpo humano e forma um escudo que protege o dente das forças físicas, térmicas e químicas que, de outro modo, seriam

prejudiciais ao tecido vital subjacente, a polpa dentária (Zaytsev, 2016; Nurbaeva, Eckstein, Feske & Lacruz, 2017). Os cristais de esmalte como os de dentina são muito pequenos, na ordem de 40 nm e 10 nm de diâmetro, respectivamente (Featherstone, 2008).

O esmalte apresenta na sua constituição hidroxiapatite (HA) (95%), água (4%) e material orgânico (1%) e, ao contrário do osso, o tecido do esmalte é acelular, portanto, não remodela quando afetado por patologias dentárias específicas, como cárie, escoriações ou fraturas (Abou Neel *et al.*, 2016; Colombo *et al.*, 2017; Lacruz, Habelitz, Wright & Paine, 2017). Quando se fala em esmalte totalmente mineralizado é importante ter presente que a principal espécie iônica representada na estrutura cristalina é o cálcio, na forma Ca^{2+} (Nurbaeva *et al.*, 2017).

O material orgânico encontra-se mais especificamente na periferia dos prismas de esmalte (Robinson *et al.*, 2017). Esta fase não contém colagénio, sendo composta por 90% de amelogenina (hidrofóbica), e os restantes 10% de ameloblastina (anfipática e ácida) e de enamelinina (hidrofilica e ácida). Todas estas proteínas encontram-se envolvidas na mineralização dos cristais de esmalte (Gelli, Ridi & Baglioni, 2019).

O principal componente inorgânico do esmalte é o cristal de hidroxiapatite, de unidade estrutural $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A hidroxiapatite é um cristal longo, fino e plano que forma uma superfície densa, dura e plana, responsável principalmente pela dureza dos ossos e dentes. Durante a formação do esmalte, os cristais de apatite unem-se formando fitas finas que se tornam hastes de esmalte (Levine, 2011). Para além disto, de acordo com a literatura (Wang, Chang, Chiang, C.H. Lin & C.P. Lin, 2019), durante o processo de formação do esmalte, os iões Ca^{2+} podem ser substituídos por iões de magnésio (Mg^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}). Por sua vez, o fosfato (PO_4^{3-}) pode ser substituído parcialmente por silicato (SiO_3^{2-}), carbonato (CO_3^{2-}) ou cloreto (ClO_3^-). Porém, análises cristalográficas revelaram que no esmalte, o fosfato é predominantemente substituído por cloreto (Levine, 2011).

O esmalte mineral difere da HA pura, uma vez que apresenta na sua composição várias substituições iônicas na rede de apatite, como CO_3^{2-} , F^- , Mg^{2+} , entre outros (Simmer & Fincham, 1995; Laurencin *et al.*, 2011). Estes iões não alteram apenas a configuração espacial do cristal, como também a morfologia, a estabilidade e as propriedades mecânicas da estrutura de HA. Para além disso, desempenham um papel importante nas respostas biológicas das células ósseas. Por exemplo, o CO_3^{2-} tem uma forte influência no crescimento dos cristais de apatite, sendo que também torna o cristal mais solúvel, enquanto o F^- , previne o desenvolvimento da cárie dentária. Os iões são

distribuídos homogeneamente por todo o tecido, e sua concentração muda de acordo com a idade e a maturidade do mineral (Laurencin *et al.*, 2011; Levine, 2011).

Como referido anteriormente, o esmalte é o tecido mais duro do corpo humano. (Wang *et al.*, 2019). Sabe-se que a dureza é uma medida que representa a capacidade de um material sólido resistir à deformação elástica, deformação plástica e destruição. As medidas da dureza dos dentes naturais mudaram de macroscópicas para microscópicas com o avanço de novos métodos, permitindo a medição precisa da dureza em diferentes locais de uma haste de esmalte (Zhang, Du, Zhou & Yu, 2014).

A dureza do esmalte é conseguida graças à sua matriz mineral, descrita anteriormente. Trata-se de uma matriz densa de cristais de apatite carbonatados em forma de agulha (diâmetro ~50 nm e comprimento de dezenas de μm), cujos eixos *c* cristalinos estão alinhados e formam hastes micrométricas. Essas hastes minerais peculiares, uma vez que a forma difere dos cristais apatíticos do osso e da dentina em forma de placa, formam uma rede complexa em 3 dimensões que constitui a maior parte do esmalte. Todo este arranjo espacial permite que a propagação das forças da mastigação sejam amortizadas, aumentando assim a força mecânica e a resistência à fadiga (Gelli, Ridi & Baglioni, 2019). A dureza pode ser medida através de índices, como a dureza de *Vickers*, dureza *Knoop* e nano-dureza. Todos estes métodos são realizados a partir de uma indentação estática. A dureza *Vickers* pode ser obtida calculando a área da unidade de força no recuo do indentador. O indentador é uma pirâmide quadrada de diamante formada por ângulos opostos de 136°. O valor medido é o quociente da carga para a área da superfície do recorte. No teste de *Knoop*, o indentador usado também consiste numa pirâmide quadrada de diamante mas, neste caso, é formada por dois ângulos opostos desiguais. A dureza *Knoop* é igual à razão entre a carga e a área de contato projetada (Zhang *et al.*, 2014).

Pelo teste de dureza *Knoop* ou *Vickers*, a dureza do esmalte é maior na ponta da cúspide do que na superfície lateral. A dureza do esmalte diminui gradualmente da superfície para a junção dentina-esmalte. Os resultados do teste de nanoindentação mostram que a dureza é maior na superfície vestibular do que na superfície lingual e é maior na cúspide funcional do que na cúspide não funcional. Quando a HA é mais alta na composição do esmalte, o módulo de *Young* aumenta. O módulo de *Young* é maior quando a força é aplicada diretamente no eixo *c* do cristal de HA hexagonal. Existem duas situações comuns de desmineralização química e biocorrosiva, respetivamente erosão e cárie (Wang *et al.*, 2019).

CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é uma doença multifatorial, dinâmica e mediada por um biofilme, que resulta na desmineralização e remineralização dos tecidos duros dentários. A cárie pode ocorrer ao longo da vida, tanto nas dentições primária como permanente e pode danificar a coroa dentária e, mais tarde, superfícies expostas da raiz. O equilíbrio entre fatores patológicos e protetores influencia o início e a progressão da cárie. A cárie dentária é uma doença evitável distribuída de forma desigual, com encargos económicos e de qualidade de vida consideráveis (Pitts *et al.*, 2017).

Para além destes fatores existem certos comportamentos e indicadores sociodemográficos que aumentam o risco de cárie. Isto inclui má higiene oral, idade, hábitos de escovagem incorretos, placa bacteriana e consumo exagerado de açúcar (Tahir & Nazir 2018).

Durante décadas, a bactéria acidogénica *Streptococcus mutans* foi considerada o principal agente causal das cáries dentárias e, por esse motivo, a maioria das estratégias de diagnóstico e terapêuticas eram direcionadas para esse microrganismo. No entanto, estudos recentes sobre lesões cariosas baseadas em DNA e RNA bacteriano revelaram que existe um ecossistema composto por outras bactérias e que o *S. mutans* é apenas uma pequena fração de toda a comunidade bacteriana (microflora). Assim, sabe-se que a cárie dentária resulta de uma ação coletiva de uma microflora existente na cavidade oral (Veiga *et al.*, 2016).

DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO

O processo de desmineralização por cárie pode ser descrito por um evento em duas fases: acidificação do meio e desmineralização. Inicialmente, as bactérias metabolizam os hidratos de carbono fermentáveis, produzindo e libertando metabolitos ácidos que se difundem no dente através da água entre os cristais. Posteriormente, quando o ácido atinge um sítio sensível numa superfície de cristal, o cálcio e o fosfato são dissolvidos na fase aquosa circundante entre os cristais. O primeiro sinal clínico de cárie no esmalte é a chamada *white spot*, em que uma superfície aparentemente sólida se sobrepõe a uma área de descalcificação, o que confere uma aparência esbranquiçada devido à difração da luz pela camada sub-superficial. A presença desta camada sub-superficial foi por muito tempo considerada um critério de diagnóstico da lesão, distinguindo-a dos casos de erosão

do esmalte. Uma vez que a lesão *white spot* foi o primeiro estágio clinicamente detetável da cárie no esmalte, esta foi considerada como “cárie inicial” (Ingram & Edgar, 1994). Segundo, Featherstone (2008) são regiões de deficiência de cálcio que são mais suscetíveis ao ataque ácido devido à substituição de iões fosfato por iões carbonato.

Este primeiro estágio da desmineralização ocorre em nível molecular, muito antes de poder ser visto visualmente como desmineralização bruta. É o primeiro passo no processo contínuo de cárie dentária, que pode eventualmente levar à cavitação (Featherstone, 2008).

A remineralização é o processo de reparo natural do corpo para lesões de cárie não cavitadas na superfície do esmalte. O cálcio e fosfato, provenientes principalmente da saliva, mas possivelmente de outras fontes tópicas, difundem-se no dente e, com a ajuda do flúor, estes iões vão-se fundamentar nos cristais remanescentes existentes, ao invés da formação de novos cristais. Os iões de flúor adsorvem à superfície do cristal apatítico do mineral dental atraindo iões de cálcio, que, por sua vez, atraem iões de fosfato, começando a construir uma rede remineralizada semelhante à fluorapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ na superfície do cristal. A superfície do cristal é agora muito menos solúvel do que o mineral de hidroxiapatite original e é mais difícil que o ácido se dissolva da próxima vez que houver um desafio ácido da placa (Featherstone, 2008). Assim, demonstrou-se que o flúor desempenha um papel fundamental nesse processo e, portanto, tem sido amplamente empregado em vários meios, como fluoretação das águas residuais, pastas dentífricas e colutórios orais (Shahmoradi, Hunter & Swain, 2017).

A mineralização ocorre quando o pH se encontra acima de 7 e é muitas vezes referida como a precipitação de iões cálcio e fosfato. Os precipitados iniciais são macios e não cristalinos (amorfos). Caso estes precipitados fiquem assim, irá formar-se de uma forma espontânea, embora lenta, a hidroxiapatite, cujos cristais contêm, cada um, dez iões de cálcio (Ca^{2+}), seis de fosfato (PO_4^{3-}) e dois de hidróxido (OH^-) (Levine, 2011).

AGENTES REMINERALIZANTES

FLÚOR

O flúor é o elemento da tabela periódica mais eletronegativo e apresenta um pequeno diâmetro iónico. Devido à sua alta densidade de carga, apresenta a capacidade de formar fortes ligações iónicas e de hidrogénio, para além de ser um excelente ligando de metais duros como o cálcio. Portanto o ião fluoreto tem um potencial para interagir

tanto com fases minerais como com macromoléculas orgânicas. Devido a estas propriedades, e particularmente à sua pequena dimensão, também pode atuar como um "estruturador anterior" na água. Isto pode diminuir a mobilidade de moléculas de água em solução e em camadas de hidratação de proteínas e superfícies de apatite com efeitos concomitantes na ligação e troca de ligantes (Robinson, Connell, Kirkham, Brookes, Shore, & Smith, 2004).

O uso de produtos fluoretados, especialmente o consumo de água fluoretada e o uso de dentífricos fluoretados, proporciona uma redução significativa no risco de cárie de uma maneira custo-efetiva. O flúor também tem sido usado como agente preventivo da cárie em vernizes e géis (Manton & Reynolds, 2016).

No que toca aos vernizes fluoretados, no presente, estes incluem principalmente 5% de fluoreto de sódio (22.600 ppm) e podem ser aplicados em todas as superfícies dentárias duas vezes/ano ou como uma aplicação pontual quando necessário. Além da fácil aplicação e alta aceitação pelo paciente, os vernizes fluoretados têm demonstrado eficácia clínica significativa na redução da cárie dentária. Logo, pode-se concluir que o flúor altamente concentrado no verniz se liga às superfícies dos cristais de hidroxiapatite do esmalte e forma fluoreto de cálcio. Os precipitados de fluoreto de cálcio agem como um depósito e gradualmente libertam fluoreto durante os futuros ataques ácidos. O flúor libertado evita a desmineralização do esmalte e reduz a suscetibilidade à cárie (Shahmoradi, Hunter & Swain, 2017).

Como referido anteriormente, o flúor por si só não é suficiente para a prevenção da desmineralização e possível reposição de minerais nos cristais de hidroxiapatite. A presença de cálcio e fosfato biodisponíveis no fluido da placa também são indispensáveis para manter a integridade estrutural dos cristais de hidroxiapatite. Embora a saliva normal geralmente não contenha um nível ótimo de flúor, foi demonstrado que a saliva é supersaturada em relação ao cálcio e ao fosfato (Shahmoradi, Hunter & Swain, 2017).

CÁLCIO

O cálcio é um mineral essencial para o organismo humano. É um constituinte dos ossos e dentes e é necessário para a síntese e função das células do sangue, e função do músculo, coração e sistema digestivo (Oliver & Gregory, 2014).

O cálcio encontra-se, normalmente, associado ao fosfato. O fosfato de cálcio $[Ca_3(PO_4)_2]$ representa o principal componente inorgânico presente nos organismos

humanos, visto que constituem a maioria da matriz inorgânica dos ossos (65% em relação ao peso total do osso) e dentes (~97% em peso de esmalte, ~70% em peso dentina) (Gelli, Ridi & Baglioni, 2019).

ESTRÔNCIO

O estrôncio é um elemento químico com o número atômico 38. Encontra-se abaixo do cálcio na tabela periódica, não é radioativo naturalmente e apresenta-se principalmente em rochas, no solo, em poeira, no carvão, etc.. Alguns compostos de estrôncio podem ser dissolvidos em água. A maior fonte de estrôncio para os humanos é através da alimentação e da água potável. A ingestão diária de estrôncio varia entre 2,1-2,4 mg. Este elemento químico ajuda na formação óssea, ou seja, controla a reabsorção de osso. Como as propriedades físico-químicas do estrôncio são semelhantes às do cálcio, a correlação do estrôncio com os dentes tem sido estudada nos últimos anos. O estrôncio pode penetrar nos cristais da HA. Quando a concentração de estrôncio é maior na água potável, o conteúdo de estrôncio torna-se maior no esmalte. Contudo, esta tendência é limitada quando a concentração de estrôncio excede 10 µg/mL em água potável, o conteúdo de estrôncio permanece aproximadamente 300 µg/mL no esmalte. Um estudo anterior mostrou que as pastas dentífricas contendo estrôncio nas suas constituições, podem aumentar o conteúdo de estrôncio no esmalte e reduzir a solubilidade do mesmo. O uso de pastas dentífricas contendo estrôncio, flúor e hidroxiapatite de estrôncio (Sr-HA) durante seis meses, pode remineralizar a lesão de *white spot* no dente (Wang *et al.*, 2018).

MAGNÉSIO

O Magnésio é um elemento químico com número atômico 12. Segundo Laurencin (2011) é conhecido por ser um importante oligoelemento nos ossos e dentes. De fato, apesar da sua baixa concentração (geralmente entre 0,50 e 1,5%) desempenha um papel básico no metabolismo ósseo, particularmente durante os estágios iniciais da osteogênese, onde estimula a proliferação de osteoblastos, sendo que a sua depleção causa fragilidade óssea e perda óssea. Além disso, foram sugeridas relações entre o teor de magnésio no esmalte e o desenvolvimento de cárie dentária. É de salientar que, em apatites biológicas, as substituições catiónicas do cálcio por magnésio são das mais importantes. O magnésio encontra-se na dentina (1,23%), esmalte (0,44%) e osso (0,72%). A presença de magnésio

torna os revestimentos de hidroxiapatite fluoretada (FHA) mais bioativos na promoção da formação óssea (Kheradmandfard, Fathi, Ahangarian & Zahrani, 2012; Gelli, Ridi & Baglioni, 2019).

SALIVA

A saliva é um fluido que consiste em água (99,5%), proteínas (0,3%), inorgânicos (0,2%) e substâncias vestigiais (Zheng *et al.*, 2019). É uma mistura complexa de componentes orgânicos, principalmente proteínas e peptídeos salivares, e componentes inorgânicos, como íons de cálcio e de fosfato que se encontram relacionados com o processo de remineralização do esmalte dentário, prevenindo a cárie dentária e/ou a erosão dentária (Valente *et al.*, 2018).

Este fluido desempenha muitos papéis na proteção dos dentes contra a abrasão, o atrito, a erosão e a cárie dentária. Trata-se do fator natural mais importante capaz de prevenir a desmineralização e auxiliar a remineralização da superfície dentária de diferentes formas. Por um lado, pode diretamente diluir, neutralizar e tamponizar, impedindo a acidez de atingir a superfície dentária. Por outro lado, pode remineralizar o esmalte devido aos seus componentes inorgânicos e ainda consegue proteger os dentes contra a erosão através da formação de uma película salivar na superfície do dente, denominada por película adquirida.

A capacidade da saliva para tamponizar ácidos (capacidade tampão) é essencial para manter valores de pH no ambiente oral. Este mecanismo inicia-se quando o pH salivar baixa, devido à presença excessiva de ácidos na cavidade oral. Os íons bicarbonato desempenham um papel importante na determinação do pH e da capacidade tampão da saliva, ajudando a proteger os dentes contra ataques de ácidos produzidos por bactérias (Buzalaf, Hannas & Kato, 2012; West & Joiner, 2014; Dawes *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).

A saliva encontra-se supersaturada em relação ao conteúdo mineral do dente. Portanto, na ausência de comida ou bebida em boca, não há tendência para os dentes se dissolverem na saliva (o contrário já não se verifica). Para além disso a saliva contém cálcio, fosfato e flúor para ajudar remineralização, ou seja, a diminuir os efeitos erosivos induzidos pelos ácidos (Buzalaf *et al.*, 2012; West & Joiner, 2014; Dawes *et al.*, 2015). Neste contexto, o flúor é proveniente, principalmente, de alimentos e de pastas dentífricas. O flúor faz com que haja um aumento da saturação da saliva reduzindo os

efeitos erosivos induzidos por ácidos. Finalmente, quantidades vestigiais de outros íons originários de alimentos e água potável podem também ter um efeito na dissolução da substância dentária. No entanto, todas estas capacidades da saliva não podem ser determinadas sem testes específicos, uma vez que variam de indivíduo para indivíduo (Jensdottir, Jensen, Nauntofte & Buchwald, 2017).

Outra das funções mais importantes da saliva é sua participação na formação da película adquirida de esmalte. Esta película é essencialmente uma camada de proteínas que cobre toda a superfície do esmalte e da dentina, ou cemento subjacente, quando estas ficam expostas pela perda de esmalte (Buzalaf *et al.*, 2012; West & Joiner, 2014; Dawes *et al.*, 2015). A película adquirida é, portanto, um biofilme orgânico livre de bactérias formado *in vivo* que inicia a sua formação logo após a escovagem dentária, em que há adsorção de peptídeos e proteínas na superfície do dente. Trata-se de um processo seletivo, pois apenas um subconjunto específico de proteínas salivares se encontra presente nesta película (Buzalaf *et al.*, 2012; West & Joiner, 2014; Dawes *et al.*, 2015, Baumann, Kozik, Lussi & Carvalho, 2016). Também contém, em concentrações mais baixas, outras macromoléculas, como lípidos. Os componentes orgânicos da película conferem funções importantes, como lubrificação e proteção da superfície dentária. A película adquirida tem um papel importante nos processos cariogénicos e erosivos. Devido à sua permeabilidade seletiva há uma redução do transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos dentários. Promove também uma barreira mecânica reduzindo o contato entre a superfície do dente e os ácidos e modula a colonização bacteriana (Delecrode *et al.*, 2015).

A saliva facilita a remoção de alimentos, bebidas e restos de comida da boca. Em termos de saúde oral, os resíduos mais importantes a eliminar da cavidade oral, assim que possível, são a sacarose, a glicose e alimentos/bebidas ácidos. (Buzalaf *et al.*, 2012; West & Joiner, 2014; Dawes *et al.*, 2015).

Quanto à sua secreção, sabe-se que é secretada por três pares de glândulas salivares maior (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas salivares menor. Este fluido é constituído por componentes inorgânicos e orgânicos. Entre os componentes inorgânicos, o bicarbonato (HCO_3^-) está relacionado com a capacidade tampão da saliva como já referido, enquanto o cálcio (Ca^{2+}) e o fosfato (PO_4^{3-}) permitem a manutenção da integridade dos minerais dos dentes (Buzalaf *et al.*, 2012). Na composição orgânica, existem várias proteínas e glicoproteínas na saliva humana que podem influenciar vários aspetos da saúde oral. Muitas destas proteínas contêm níveis elevados (35-40%) de

prolina, e são, portanto, designadas proteínas ricas em prolina (PRPs), que compreendem quase 70% do conteúdo total de proteína da saliva da parótida humana. A amilase compreende a maior parte do conteúdo proteico total da saliva, mas existem outras proteínas como lisozima, lactoferrina, peroxidase e IgA secretora que são, de fato, componentes relativamente menores (Buzalaf *et al.*, 2012).

A estaterina permite que a saliva mantenha seu estado de supersaturação em relação aos sais de cálcio e fosfato. Assim, estes componentes proteicos contribuem grandemente para a manutenção de uma dentição sã através da sua ligação e inibição da precipitação espontânea de fosfato de cálcio e crescimento de cristais, enquanto, que ao mesmo tempo, proporcionam possibilidades para heterogeneidades na colonização microbiana através dos seus padrões específicos de ligação bacteriana (Buzalaf *et al.*, 2012; Pedersen, Sørensen, Proctor, Carpenter & Ekström, 2018).

As histatinas intactas foram identificadas na película adquirida formada *in vivo* e foram atribuídas por possuírem propriedades anti-desmineralização quando fosforiladas. Parece que a ligação das histatinas à superfície do esmalte ocorre antes da sua degradação proteolítica, e que a ligação ao mineral exerce um efeito protetor contra a posterior degradação proteolítica enzimática (Siqueira, Margolis, Helmerhorst, Mendes, & Oppenheim, 2010; Buzalaf *et al.*, 2012).

As mucinas são o componente orgânico principal da saliva proveniente das glândulas submandibular / sublingual, sendo consideradas glicoproteínas. Devido ao seu alto grau de glicosilação e potencial de hidratação conseguem proporcionar uma lubrificação da cavidade oral. Por outro lado, também se podem ligar a toxinas, aglutinar bactérias e interagir com células hospedeiras. Ou seja, as mucinas têm uma elevada importância na formação da película adquirida, uma vez que atribuem a esta película o efeito protetor contra a erosão do esmalte (Buzalaf *et al.*, 2012).

A saliva também contém metaloproteínases de matriz (MMPs) que, devido a estudos desenvolvidos nos últimos dez anos, foram implicadas na progressão da erosão. Supõe-se que a maioria das MMPs da saliva sejam provenientes do fluido crevicular, sendo que também estão presentes na saliva total e na dentina. Há estudos que sugerem que, pelo menos as MMP-2 e MMP-9, também são secretadas pela glândula parótida (Kato *et al.*, 2010; Buzalaf *et al.*, 2012; Pádua, 2018).

A saliva é um fluido complexo que, como já referido precedentemente, possui muitas funções importantes em relação à saúde oral. No entanto, devido à dificuldade de se obterem grandes quantidades, ao seu armazenamento e ainda devido à degradação da

mesma, a saliva natural é comumente substituída por saliva artificial em estudo *in vitro*. É de referir que a saliva natural será sempre o material de primeira escolha, caso as condições o permitam (Björklund, Ouwehand & Forssten, 2011; Mutahar, Carpenter, Bartlett, German & Moazzez, 2017).

A saliva artificial tem sido demonstrada como agente efetivo para remineralização do esmalte dentário amolecido *in vitro*, uma vez que é uma saliva supersaturada relativamente ao esmalte. Além disso, é considerada como um meio apropriado em estudos de erosão em laboratório, visto que a saliva humana apresenta uma alta variabilidade de componentes, não sendo tão previsível (Aykut-Yetkiner, Wiegand & Attin, 2014).

OBJETIVO DO ESTUDO

Pretende-se estudar a incorporação de diferentes catiões divalentes alcalino-terrosos na fluorapatite com o intuito de avaliar propriedades dos cristais resultantes, nomeadamente a microdureza de superfície do esmalte.

HIPÓTESES DE ESTUDO

- i. As amostras desmineralizadas, as amostras desmineralizadas e tratadas apenas com iões fluoreto e as amostras desmineralizadas e tratadas com iões fluoreto e catiões monovalentes não apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte.
- ii. As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e iões de cálcio como único catião divalente alcalino-terroso apresentam valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas.
- iii. As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e iões de estrôncio como único catião divalente alcalino-terroso apresentam valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas.
- iv. As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e iões de magnésio como único catião divalente alcalino-terroso apresentam valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas.
- v. As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e catiões divalentes alcalino-terrosos não apresentam diferenças significativas nos valores médios de

microdureza de superfície de esmalte.

MATERIAIS E MÉTODOS

TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foi realizado um estudo observacional, analítico em 16 molares humanos, intactos, livres de cáries e fraturas, dos quais foram obtidos 60 fragmentos de esmalte. Selecionaram-se 6 grupos de estudo: Grupo A (n=10), Grupo B (n=10), Grupo C (n=10); Grupo D (n=10), Grupo E (n=10) e Grupo F (n=10) que foram submetidos a um procedimento de desmineralização e, posteriormente, aplicadas diferentes estratégias de remineralização, como se encontra representado na figura 1.

Foram considerados como critérios de inclusão: dentes hígidos, não cariados, livres de fraturas e sem alterações de superfícies expostas a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos.

Como critérios de exclusão: dentes com malformações, não hígidos, que tiverem sido submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio, ou outros), ou eletromagnéticos (radiação laser).

LOCAL DO ESTUDO

Todo o estudo experimental foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz, entre Junho e Julho de 2019.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz e os dentes usados foram fornecidos pelo Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária Egas Moniz.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Após a recolha dos dentes, iniciou-se a curetagem dos mesmos, com curetas de *gracey*. Este procedimento teve como objetivo eliminar tanto tecidos, como tártaro das superfícies dentárias (Caneppele, Jeronymo, Di Nicoló, de Araújo, & Soares, 2012). De seguida, no Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária Egas Moniz, estes foram preservados em Cloramina T a 1 % durante uma semana e, posteriormente, em água destilada a 4 °C, não por mais de 6 meses. De forma a minimizar a sua deterioração, o meio de armazenamento foi substituído pelo menos a cada dois meses.

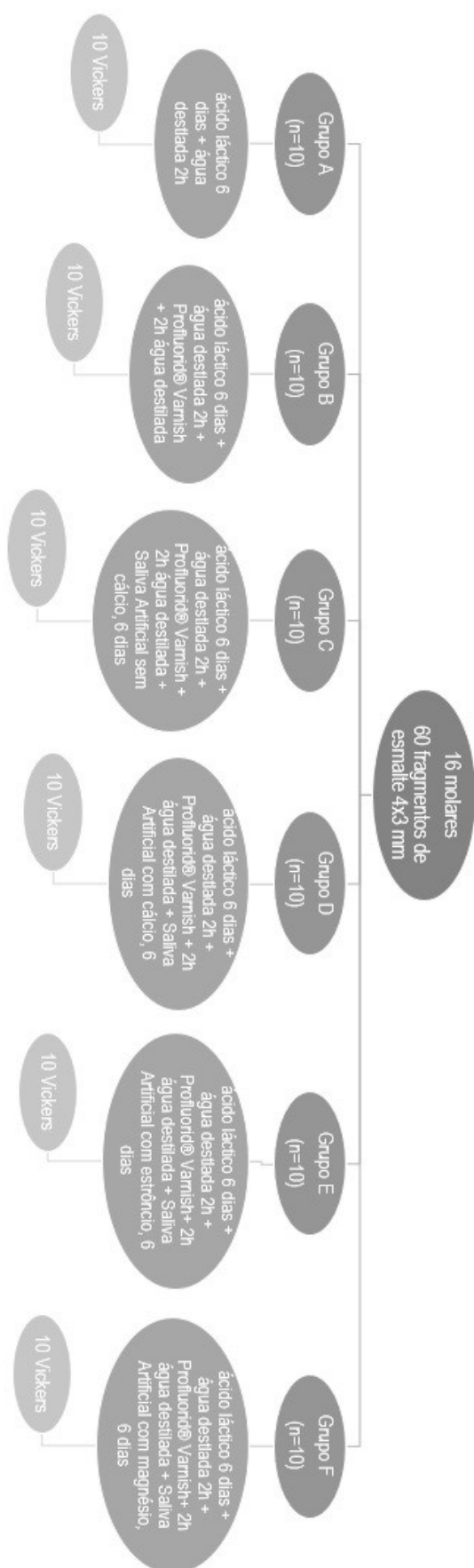


Figura 1. Desenho do estudo

Logo, os fragmentos foram polidos com discos de lixa de granulação 320, 600 e/ou 1200 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) sob arrefecimento com água na máquina polidora *LaboPol- 4®* (*WS Struers 18-B*, Dinamarca) a 40 rotações por minuto (rpm) (figura 2A), para obtenção de uma superfície homogênea (figura 2B) (Cassiano *et al.*, 2017; Comar *et al.*, 2012; Magalhães, Comar, Rios, Delbem, & Buzalaf, 2008; Moron *et al.*, 2013). Depois da superfície polida e da superfície de teste estar posicionada perpendicularmente ao longo eixo do indentador, realizaram-se avaliações de microdureza mais precisas, recorrendo ao Teste de *Vickers* (Schlueter, Hara, Shellis & Ganss, 2011; Shellis, Ganss, Ren, Zero, & Lussi, 2011; Elkassas & Arafa, 2014).

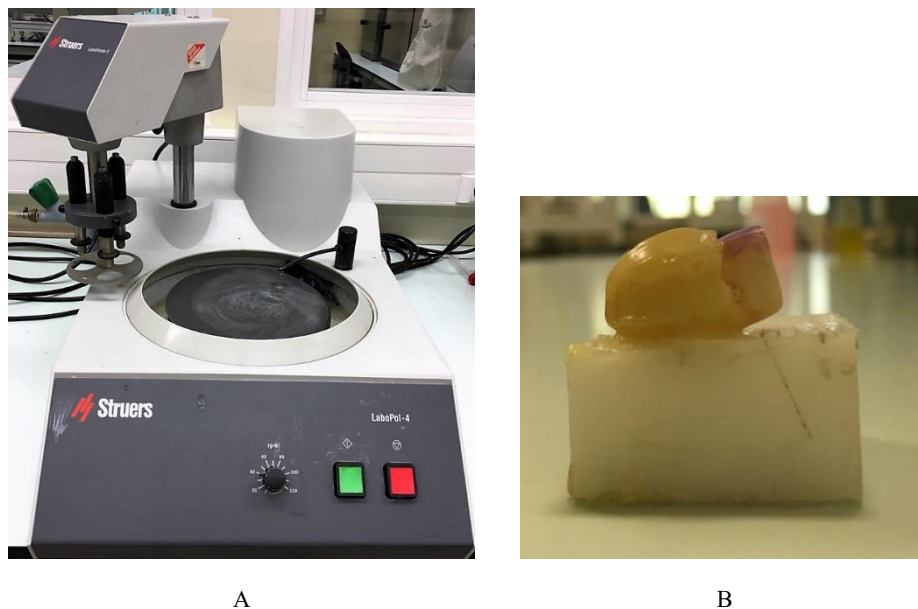


Figura 2. Polimento das amostras. A: Aparelho usado no polimento das amostras LaboPol – 4® | B: Espécime após ser submetido ao polimento.

Relativamente à secção das amostras, foram realizadas com um micrótomato de tecidos duros *Accutom 50* (*Struers A/S, Ballerup*, Dinamarca) (Rizvi *et al.*, 2016), como mostra a figura 3, sendo que cada molar foi colado a um suporte de acrílico, com cera colante (Paris, Lausch, Selje, Dörfer, & Meyer-Lueckel, 2014).



Figura 3. Micrótomo de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup).

Cada molar foi seccionado, no sentido mesio-distal, seguindo o sulco central da superfície oclusal (Elkassas & Arafa, 2014), obtendo-se assim, dois fragmentos de cada dente, um vestibular e outro lingual / palatino. Seguidamente, cada um dos fragmentos obtidos foi novamente seccionado, no sentido vestibulo-palatino/lingual, em dois fragmentos de 3 mm de largura, mesio-vestibular, mesio-palatino/lingual, disto-vestibular e disto-palatino/lingual. Por fim, os fragmentos foram separados da raiz, 1 mm acima da junção amelo-cimentária (Caneppele *et al.*, 2012; Cassiano *et al.*, 2017), resultando de cada molar quatro fragmentos de 4x3 mm. Todo este procedimento encontra-se exemplificado na figura 4.

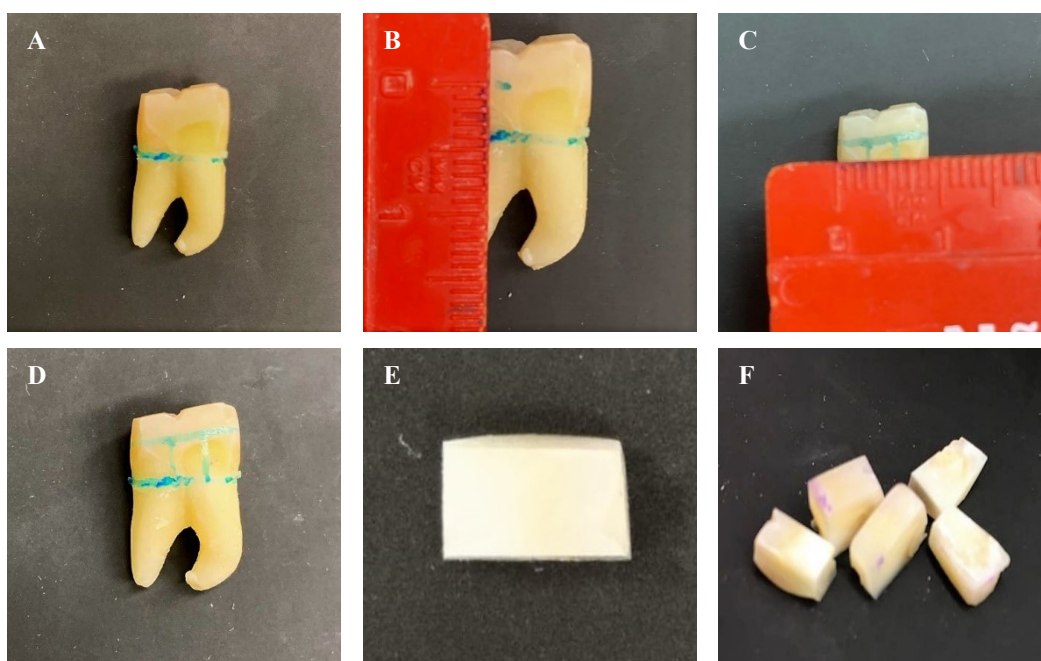


Figura 4. A: marcação da linha da junção amelo-cimentária (JAC) | B: marcação da linha 4mm acima da JAC | C: marcação das linhas verticais com 3mm de distância | D: dente com todas as linhas de corte | E e F: fragmentos obtidos após processo de corte com as dimensões 4x3.

SOLUÇÕES REMINERALIZANTES

SALIVA ARTIFICIAL SEM METAIS DIVALENTES

Com o intuito de variar apenas o metal divalente em cada um dos ensaios, preparou-se uma solução mãe 1,25x concentrada, adaptada de Urban et al., 2009. Esta solução de saliva artificial mãe continha 80,09 μM de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfito de sódio nano-hidratado), 8,55 mM de NaCl (cloreto de sódio), 6,7 mM de KCl (cloreto de potássio), 2,64 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado), 20,81 mM de Ureia e 3,60 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hidrogénofosfato de sódio di-hidratado), em água desionizada, apresentando um valor de pH de 7.

Para a preparação da solução de saliva artificial desprovida de metais divalentes, usada no grupo C, adicionou-se 50 ml de água desionizada a 200 mL da solução de saliva artificial mãe descrita anteriormente, de forma a ficar 1x concentrada.

SOLUÇÕES DE SALIVA ARTIFICIAL COM METAIS DIVALENTES

As soluções de saliva artificial contendo o metal divalente em estudo, Ca^{2+} , Sr^{2+} e Mg^{2+} , usadas nos ensaios dos grupos D, E e F, respectivamente, foram preparadas por adição de 50 ml de solução aquosa 5,44 mM em $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (grupo D), 50 ml de solução aquosa 5,44 mM em $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Grupo E) ou 50 ml de solução aquosa 5,44 mM em $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Grupo F) a 200 mL de saliva artificial mãe. As soluções finais de saliva artificial assim obtidas, todas 1x concentradas, continham 4,35 mM de metal divalente.

As figuras 5 e 6 mostram as embalagens dos reagentes usados na preparação destas soluções de saliva artificial.

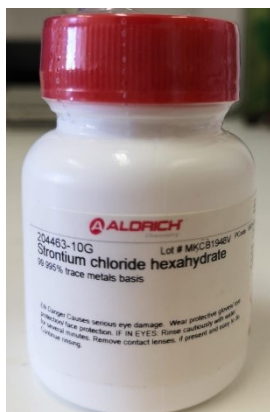


Figura 5. Cloreto de estrôncio hexa-hidratado utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo Sr^{2+} (Grupo E).

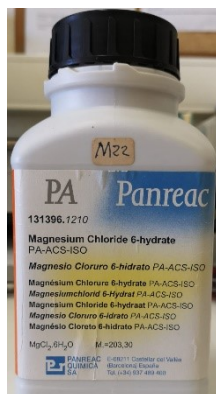


Figura 6. Cloreto de magnésio hexa-hidratado utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo Mg^{2+} (Grupo F).

DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DA AMOSTRA

INDUÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE

Para a indução de lesões artificiais de cárie, os 60 fragmentos sofreram um processo de desmineralização com 30 mL de uma solução tampão de ácido láctico 50 mM, pH=5 (figura 7), durante 6 dias a temperatura constante de 37°C (Jo *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014; Abufarwa, Noureldin, Campbell & Buschang, 2017).



Figura 7. Solução de ácido láctico, utilizada como agente desmineralizante artificial para mimetizar as lesões de cárie no esmalte

A escolha de condições para a exposição ácida foi baseada em muitos fatores. Um desses fatores centra-se no facto de uma das espécies bacterianas mais prevalentes em biofilmes orais, *Streptococcus mutans*, produzir ácido láctico após a metabolização dos hidratos de carbono fermentáveis (Buzalaf *et al.*, 2011; West & Joiner, 2014; Orrego, Xu & Arola, 2017). Para além disso, *S. mutans* contém uma proteína que se liga à superfície do dente e que é capaz de tolerar níveis de pH entre 4,5 e 5,5. Assim, uma solução de ácido láctico com pH 5 foi considerada um modelo clinicamente pertinente e é consistente com o ambiente ácido utilizado em investigações anteriores (Orrego *et al.*, 2017).

ALEATORIZAÇÃO DA AMOSTRA

Após o processo de desmineralização, os 60 fragmentos foram distribuídos aleatória e equitativamente pelos 6 grupos de estudo, designados de A a F.

REMINERALIZAÇÃO COM SALIVA ARTIFICIAL SEM/COM METAIS DIVALENTES

Uma vez concluído o processo de desmineralização, ao qual foram sujeitos os 60 fragmentos do estudo, e de formação dos 6 grupos de estudo, procedeu-se ao tratamento das amostras com vista a remineralização com diferentes agentes. Cada grupo foi submetido a um tratamento destinto, que seguidamente se descreve:

Grupo A (n=10)

10 fragmentos foram imersos em água destilada durante 2 horas.

Grupo B (n=10)

10 fragmentos onde se aplicou verniz de fluoreto de sódio 5%, pH 6,64 (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote: 1844182, validade: 10/2020), segundo as instruções do fabricante (figura 8). Após este tratamento, os espécimes foram imersos em água desionizada durante 2 horas à temperatura ambiente (Cardoso *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2008).

Grupo C (n=10)

10 fragmentos tratados como descrito no grupo B, após o que, findo o período de 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente, foram imersos numa solução de saliva

artificial sem metais divalentes, a uma temperatura de 37°C durante 6 dias com renovação diária. Ao 7º dia foram imersos 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente.



Figura 8. A: Verniz de fluoreto de sódio 5% usado neste trabalho (Profluorid® Varnish, VOCO) | B: Imagem do modo de aplicação do verniz de fluor na face lingual/vestibular.

Grupo D (n=10)

10 fragmentos tratados como descrito no grupo B, após o que, findo o período de 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente, foram imersos numa solução de saliva artificial contendo cloreto de cálcio, a uma temperatura de 37°C e durante 6 dias, com renovação diária. Ao 7º dia foram imersos 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente.

Grupo E (n=10)

10 fragmentos tratados como descrito no grupo B, após o que, findo o período de 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente, foram imersos numa solução de saliva artificial contendo cloreto de estrôncio, a uma temperatura de 37°C e durante 6 dias, com renovação diária. Ao 7º dia foram imersos 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente.

Grupo F (n=10)

10 fragmentos tratados como descrito no grupo B, após o que, findo o período de 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente, foram imersos numa solução de saliva artificial contendo cloreto de magnésio, a uma temperatura de 37°C e durante 6 dias, com renovação diária. Ao 7º dia foram imersos 2 horas em água desionizada à temperatura ambiente.

ANÁLISE DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

A superfície do esmalte foi analisada de acordo com a microdureza de superfície. Esta medida foi realizada através dos testes de *Vickers* (HSV-30®, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão). O indentador de diamante *Vickers* (figuras 9A e 9B) exerce uma pressão de 4.903 N, durante 15 s (Baumann, Bereiter, Lussi & Carvalho, 2017), na superfície do dente produzindo uma forma tetra-piramidal (figura 9C) (Attin, 2006). Em cada espécime de esmalte foram realizadas 5 indentações. Com o intuito de reduzir ao máximo o número de possíveis erros, todo este procedimento foi realizado pelo mesmo examinador e com a mesma máquina calibrada (Elkassas & Arafa, 2014) e após a obtenção dos resultados das 5 indentações realizou-se a média e o desvio padrão da microdureza de *Vickers* de cada espécime de esmalte.

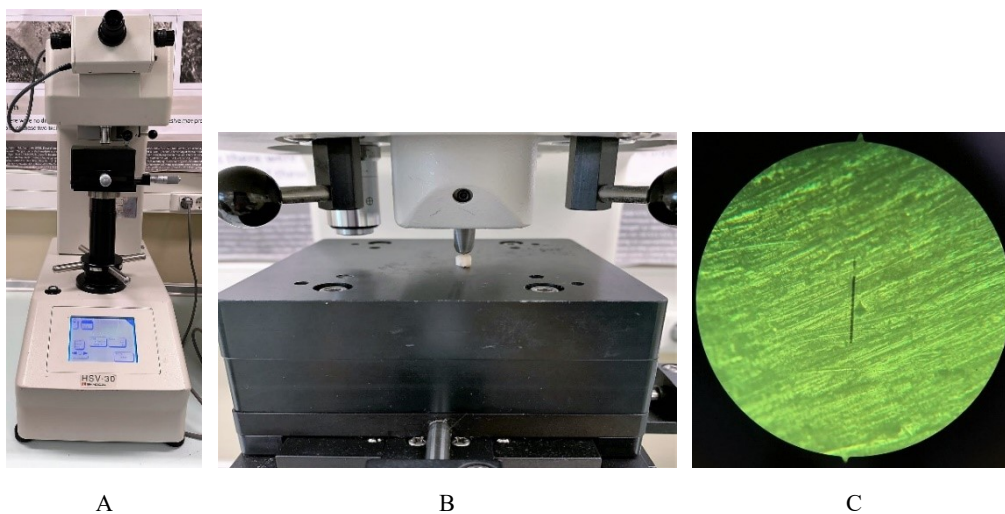


Figura 9. Testes de Microdureza de Vickers. A: Equipamento HSV-30®, Shimadzu Corporation | B: Pormenor da indentação com pressão 4,903 N, durante 15 segundos | C: Observação da Indentação.

Após a recolha, os dados foram tratados estatisticamente, tendo-se aplicado o teste ANOVA a um fator, num intervalo de confiança de 95%, recorrendo ao *software* IBM SPSS *Statistics*, versão 24).

RESULTADOS

Após o tratamento da amostra como descrito na seção anterior, cada fragmento foi analisado quanto à microdureza da superfície do esmalte pelo teste de Vickers. Realizaram-se 5 indentações em cada fragmento (pentaplicados), com o objetivo de se associar um valor médio de microdureza a cada fragmento e assim diminuir os erros aleatórios relacionados com as imperfeições da superfície. Os 6 grupos de estudo independentes, constituídos por 10 fragmentos cada e, portanto, 10 valores médios de microdureza de esmalte (N=10), foram analisados estatisticamente quanto à sua semelhança por aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator, após confirmação que os pressupostos para a sua aplicação se verificavam.

A tabela 1 mostra a análise descritiva dos valores médios de cada grupo de estudo, identificado de A-F, com uma dimensão de N=10 (correspondentes aos 10 valores médios de microdureza, estimados para os 10 fragmentos que constituem cada grupo).

Tabela 1. Medidas estatísticas descritivas obtidas para cada grupo de estudo.

<i>Grupos</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
A	261,7200	2,58233	259,8727	263,5673
B	364,0444	1,69935	362,7382	365,3507
C	551,2600	1,76648	549,9963	552,5237
D	597,8600	2,62306	595,9836	599,7364
E	483,0600	2,96356	480,9400	485,1800
F	444,4200	2,56203	442,5872	446,2528

O grupo A, correspondente ao grupo submetido apenas a desmineralização com ácido láctico, é o grupo que aparentemente apresentou o menor valor médio de microdureza de superfície, $261,720 \pm 2,582$ HV.

O grupo B, correspondente ao grupo submetido a desmineralização com ácido láctico e posterior aplicação de verniz de flúor, originou um valor médio de microdureza de $364,044 \pm 1,699$ HV.

O grupo C, correspondente ao grupo submetido a desmineralização com ácido láctico, seguido de aplicação de verniz de flúor e posterior imersão em saliva artificial

sem metais divalentes, originou um valor médio de microdureza de $551,260 \pm 1,766$ HV.

O grupo D, correspondente ao grupo submetido a desmineralização com ácido láctico, seguido de aplicação de verniz de flúor e posterior indução da remineralização com saliva artificial contendo cálcio, originou um valor médio de microdureza de $597,860 \pm 2,623$ HV, aparentemente o maior valor obtido.

O grupo E, correspondente ao grupo submetido a desmineralização com ácido láctico, seguido de aplicação de verniz de flúor e posterior indução da remineralização com saliva artificial contendo estrôncio, originou um valor médio de microdureza de $483,060 \pm 2,963$ HV, aparentemente inferior ao do grupo D, onde se promoveu a remineralização na presença de cálcio.

Por fim, o grupo F, correspondente ao grupo submetido a desmineralização com ácido láctico, seguido de aplicação de verniz de flúor e posterior indução da remineralização com saliva artificial contendo magnésio, originou valores médios de microdureza de $444,420 \pm 2,562$ HV, aparentemente inferior aos grupos D e E, onde se promoveu a remineralização na presença de cálcio ou estrôncio, respetivamente.

A não sobreposição das gamas de valores de cada grupo (limites inferior e superior) indicia o afastamento da igualdade entre grupos.

Como referido anteriormente, a aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator requer a validação prévia de alguns pressupostos, nomeadamente a independência das amostras, a normalidade de cada uma e a homogeneidade das suas variâncias. A independência das amostras, ou seja, a ausência de fatores que possam estar a condicionar os valores médios de microdureza obtidos num grupo de estudo em relação aos outros, foi garantida no procedimento experimental, nomeadamente com a utilização de fragmentos distintos em cada ensaio e no passo de aleatorização da amostra.

A normalidade de cada grupo de estudo foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, mais robusto no caso amostras de pequena dimensão. Este teste, aplicado num intervalo de confiança de 95% como foi o caso, permite determinar se os valores de cada grupo se distribuem segundo uma função gaussiana com máximo no valor médio, através da avaliação do valor de significância que se obtém e os 5% de erro. Valores de significância superiores a 0,05 ($p > 0,05$) indicam não ser estatisticamente relevante o erro cometido ao considerar-se o valor médio do grupo em representação do próprio grupo, permitindo o recurso a métodos paramétricos, de robustez superior aos não paramétricos. Do ponto de vista prático, ao aplicar-se o teste de normalidade considera-se, para cada grupo de estudo, o seguinte par de hipóteses nula e alternativa:

H_0 : Os valores médios de microdureza obtidos para o grupo X seguem uma distribuição normal

H_A : Os valores médios de microdureza obtidos para o grupo X não seguem uma distribuição normal

A tabela 2 mostra os valores de significância (valores p) obtidos pela aplicação do teste de Shapiro-Wilk a cada um dos grupos, para um intervalo de confiança de 95%. Em todos os casos se obteve $p > 0,05$, garantindo-se que todas as amostras são normais. Porém, no caso do grupo B, e para garantir a normalidade, houve a necessidade de eliminar um *outlier* moderado (11;372,60), passando este grupo a ter uma dimensão $N=9$.

Tabela 2. Resultados da aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk a cada grupo de estudo, após eliminação de um *outlier* ao grupo B.

Grupos	Estatística	Dimensão	Significância
A	0,932	10	0,466
B	0,888	9	0,189
C	0,956	10	0,736
D	0,921	10	0,366
E	0,854	10	0,065
F	0,866	10	0,090

O teste de Levene, aplicado para avaliar a homogeneidade das variâncias, revela que estas não diferem significativamente entre os diferentes grupos, uma vez que o nível de significância é 0,411 ($p > 0,05$). Os testes de hipóteses considerados neste caso foram:

H_0 : Os grupos A-F apresentam variâncias homogêneas

H_A : Os grupos A-F não apresentam variâncias homogêneas

sendo que o valor de significância para um intervalo de confiança de 95% sugere que se aceite a hipótese nula. A tabela 3 mostra os resultados obtidos por aplicação do teste de Levene aos grupos de estudo.

Tabela 3. Teste de homogeneidade de variância de Levene aplicado aos seis grupos de estudo para avaliar a homogeneidade das suas variâncias ($df1 = n^\circ$ de grupos-1; $df2 = n^\circ$ de espécimes - n° de grupos).

Estatística de Levene	df1	df2	Significância
1,028	5	53	0,411

Uma vez garantida a independência das amostras e confirmada a normalidade dos grupos (conseguida por eliminação de um *outlier*) e a homogeneidade das variâncias, pôde aplicar-se o teste ANOVA a um fator para avaliar a igualdade dos valores médios entre os grupos. Foram considerados as seguintes hipóteses:

H_0 : as médias dos grupos não variam estatisticamente.

H_A : existe pelo menos um grupo em que a média é diferente.

Na tabela 4 estão representados os resultados do teste ANOVA. De acordo com a tabela conclui-se que as médias da microdureza de superfície varia entre grupos, rejeitando-se a hipótese nula.

Tabela 4. Resultado do teste ANOVA a um fator obtido utilizando o *software* IBM SPSS Statistics versão 24.

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Significância
Entre grupos	753187,878	5	150637,576	25651,047	0,001
Nos grupos	311,246	53	5,873		
Total	753499,124	58			

De acordo com a tabela obtida, a estatística F revela um valor de 25651 e uma significância de 0,001 – $F(5,53)=25651$, $p<0,05$. Desta forma, conclui-se que pelo menos um dos grupos apresenta um valor médio de microdureza de superfície de esmalte que difere significativamente dos restantes: aceita-se a hipótese alternativa.

Uma vez que foram detetadas diferenças, realizou-se um teste complementar ao ANOVA, teste este que permite verificar quais os pares de grupos cujos valores médios de microdureza de Vickers diferem entre si, genericamente designados de testes de comparações múltiplas. No caso concreto do presente trabalho, em que se comparavam seis grupos e em que os resultados médios obtidos não sugeriam qualquer igualdade evidente entre pares de grupos, optou-se por um teste *post-hoc*, em concreto pelo teste de Bonferroni, por ser o mais indicado para amostras homogêneas e de pequenas dimensões. Tal como qualquer teste *post-hoc*, o teste de Bonferroni compara indiscriminadamente os vários pares de grupos em estudo, considerando, para cada par possível mas aqui exemplificado apenas para os grupos A e B, o seguinte teste de hipóteses:

H_0 : A média do grupo A é igual à média do grupo B

H_A : A média do grupo A é diferente da média do grupo B

O teste apresenta um valor de significância como resultado, o qual permite aceitar a hipótese nula ou a alternativa consoante o seu valor seja superior ou inferior a 0,05, respetivamente, considerando um intervalo de confiança de 95%. Pelo facto de envolver a comparação múltipla e indiscriminada entre pares de grupos de estudo, este tipo de testes produz redundância de resultados, apresentando, por exemplo, o resultado da comparação do grupo A com o grupo B e do grupo B com o grupo A. A tabela 5 mostra os resultados obtidos para os grupos de estudo A-F.

Tabela 5. Resultados da comparação múltipla das médias dos grupos estudados pelo teste de Bonferroni.

Grupos		Significância	Grupos		Significância
A	B	0,001	D	A	0,001
	C	0,001		B	0,001
	D	0,001		C	0,001
	E	0,001		E	0,001
	F	0,001		F	0,001
B	A	0,001	E	A	0,001
	C	0,001		B	0,001
	D	0,001		B	0,001
	E	0,001		D	0,001
	F	0,001		F	0,001
C	A	0,001	F	A	0,001
	B	0,001		B	0,001
	D	0,001		C	0,001
	E	0,001		D	0,001
	F	0,001		E	0,001

Os resultados indicam que, para um intervalo de confiança de 95%, as médias dos vários pares de grupos diferem estatisticamente ($p < 0,05$ para todos os pares), ou seja, os valores médios de microdureza de superfície do esmalte diferem significativamente nos vários grupos de estudo. Assim, podemos afirmar que:

O valor de microdureza de Vickers foi mais baixo após desmineralização (grupo A, $261,720 \pm 2,582$ HV), tendo aumentado com a aplicação de verniz de flúor (grupo B, $364,044 \pm 1,699$ HV) e atingido valores ainda superiores após o tratamento com saliva artificial na ausência de metais divalentes (grupo C, $551,260 \pm 1,766$ HV). O tratamento com saliva artificial contendo cálcio originou o maior valor de microdureza média obtida (grupo D, $597,860 \pm 2,623$ HV). O tratamento com saliva artificial contendo estrôncio resultou num valor de microdureza médio (grupo E, $483,060 \pm 2,963$ HV) superior ao

obtido por tratamento das amostras com saliva artificial contendo magnésio (grupo F, $444,420 \pm 2,562$ HV), tendo ambos apresentado valores inferiores ao valor médio registado no grupo C, onde não se usou qualquer metal divalente suscetível de formar cristais de apatite. Na figura 10 encontra-se representada o gráfico da variação dos valores médios da média dos valores de microdureza da superfície do esmalte de cada grupo de estudo

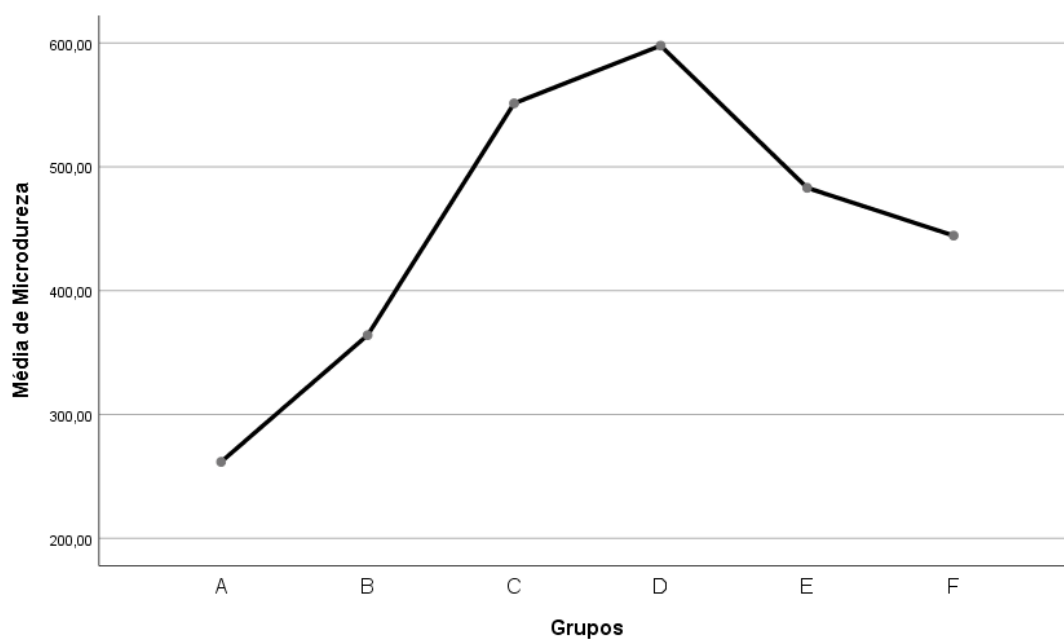


Figura 10. Gráfico comparativo dos valores estatísticos médios de microdureza de superfície do esmalte dos diferentes grupos.

DISCUSSÃO

A cavidade oral é um meio onde há constante desmineralização e remineralização. No entanto, em saúde, há um equilíbrio que mantém intacta a superfície de esmalte (Abou Neel *et al.*, 2016). Por vezes, em estados iniciais de desmineralização, esta pode ser revertida por meio de agentes remineralizantes adequados (Abou Neel *et al.*, 2016; Katakam *et al.*, 2017). A remineralização é um procedimento no qual os iões de cálcio, fosfato e ião hidroxilo são reposicionados em vazios de hidroxiapatite desmineralizada para criar um ganho mineral que melhora a estética, a força e a função (Mohd Said, Ekambaram & Yiu, 2016). O ganho ou perda de minerais no esmalte como resultado da desmineralização ou remineralização pode ser medida através de alterações na dureza de superfície do esmalte (Katakam *et al.*, 2017).

No presente trabalho pretendia-se estudar a capacidade remineralizante de diferentes catiões divalentes com base no aumento da microdureza de superfícies desmineralizadas artificialmente com ácido láctico, tendo-se recorrido ao teste de microdureza de Vickers. O grupo A, correspondente ao esmalte desmineralizado com ácido láctico; serviu de controlo para comparação dos restantes grupos. A dureza de superfície deste grupo, $261,720 \pm 2,582$ HV, foi a mais baixa de todo o estudo, como seria o expectável pela perda de densidade mineral aquando da desmineralização (Laurance-Young *et al.*, 2011).

Após a desmineralização aplicou-se em todos os grupos, exceto no grupo A, verniz de fluoreto de sódio a 5%. Este verniz visava ser uma fonte de flúor, para induzir a formação de fluorapatite em vez de hidroxiapatite e assim eliminar a dependência do pH, já que esta última apatite exige a presença de iões hidroxilo livres. Optou-se por esta abordagem pelo sucesso de trabalhos anteriores (Assunção *et al.*, 2016; Carvalho, 2016; Pádua, 2018).

O mecanismo de ação do flúor promove o processo de remineralização através da precipitação de cristais de apatite. No entanto, a biodisponibilidade dos iões de cálcio e fosfato representa o fator determinante para a remineralização, apesar do papel fundamental do fluoreto na obtenção de um precipitado mineral estável (Reynolds *et al.*, 2008; Cochrane, Cai, Huq, Burrow & Reynolds, 2010; Arafa, 2017). Num processo de remineralização ideal em que há uma biodisponibilidade de todos os iões (cálcio, fosfato e flúor), os iões hidroxilo (OH^-) presentes na hidroxiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ do esmalte podem ser substituídos por iões de flúor (F^-), obtendo-se um novo cristal denominado por

fluorapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, que possui maior resistência (Featherstone, 2004; Memarpour, Soltanimehr & Sattarahmady, 2015; Mohd Said *et al.*, 2016). A formação da fluorapatite requer, no entanto, a presença de cálcio ou de um outro metal capaz de o substituir no cristal recém-formado.

Para além do aporte de flúor, o grupo B não sofreu mais nenhum tratamento, sendo que apresentou uma dureza de superfície de $364,044 \pm 1,699$ HV, que, por ser superior à do grupo A, sugere ter havido remineralização. Pela ausência de uma fonte de metal, seria exetável que este grupo apresentasse um valor de microdureza semelhante ao do grupo A, compatível com a inexistência de remineralização e apresentado como hipótese de estudo *i* (página 23). A observação de um valor de microdureza de superfície superior no grupo B em relação ao grupo A, apenas é justificável com a formação de um precipitado à superfície do esmalte, nada nos indicando sobre a natureza do mesmo. Uma vez que se usou um verniz comercial, de composição não totalmente conhecida, pode ser que o mesmo contenha metais divalentes, promotores da formação de apatites.

O grupo C, correspondente às amostras desmineralizadas artificialmente e tratadas com flúor e saliva artificial sem cálcio ou qualquer outro metal divalente, originou um valor de microdureza de superfície de $551,260 \pm 1,766$ HV, valor este significativamente superior a qualquer dos grupos A e B. Este resultado, que sugere ter havido remineralização e mais expressiva do que no grupo B, contraria novamente o esperado pela ausência de catiões divalentes para formar fluorapatite (hipótese *i* – página 23). O aumento de microdureza da superfície do esmalte poderia ser fundamentado com a presença de flúor, fosfato e sódio. O sódio (Na^+) é encontrado na HA como elemento minor, tal como o magnésio e o carbonato (Zhu, Li & Han, 2015). Ao longo dos anos, a HA substituída tem sido estudada e sabe-se que o sódio tem a capacidade de substituir o cálcio no cristal. Esta substituição pode ser justificada com a proximidade dos raios atômicos destes dois catiões ($\text{Na}^+ = 1,02 \text{ \AA}$; $\text{Ca}^{2+} = 1,00 \text{ \AA}$) (Matsunaga & Murata, 2009; Laurencin *et al.*, 2010). Em 1993, Fulmer e Brown, desenvolveram um estudo onde avaliaram os efeitos de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 na formação de hidroxiapatite e concluíram que sempre que se forma uma nova HA, o sódio é completamente esgotado das soluções. Esta conclusão é sugestiva da impregnação dos iões Na^+ na apatite (Laurencin *et al.*, 2010). Por sua vez, a HA substituída por sódio apresenta uma maior solubilidade em meios aquosos devido à diferença da carga iónica entre o cálcio e o sódio (Sang Cho *et al.*, 2013). Para além disto, o sódio é incapaz de formar precipitados cristalinos e neste caso, os restantes grupos (D, E e F) teriam que apresentar valores de microdureza

superiores ao grupo C, tendo em conta que em adição ao sódio também estão na presença de metais divalentes, mas no entanto esta hipótese não é verificável. Portanto é corroborativo de que o verniz de flúor utilizado no estudo terá na sua constituição uma fonte de metais, que não o sódio.

O Grupo D apresentou o maior valor de microdureza de todo o estudo, $597,860 \pm 2,623$ HV. Esta evidência comprova a hipótese *ii* (página 23) de que houve um aumento da microdureza, que é justificável com a presença dos três elementos fundamentais da remineralização – flúor, cálcio e fosfato. A saliva artificial recria um ambiente natural da cavidade oral com um valor de pH 7,0 onde ocorre a remineralização das camadas superiores do esmalte dentário e, para além disso, fornece iões de cálcio e fosfato para a formação de cristais de HA em vazios do cristal do esmalte desmineralizado (Zaharia *et al.*, 2017). Sabe-se que o uso de produtos contendo cálcio tem como objetivo aumentar a disponibilidade e retenção de flúor na cavidade oral (Ionta *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Shen *et al.* (2018), onde foram avaliadas pastas dentífricas fluoretadas enriquecidas com cálcio na remineralização da superfície de esmalte, concluiu que o cálcio, juntamente com o fosfato e o flúor originou valores mais altos ao nível de remineralização, quando comparado com outras pastas dentífricas. No entanto, é importante salientar que a saliva artificial não é capaz de devolver a normalidade morfológica nem a microdureza inicial do esmalte, mas consegue possibilitar a formação de uma camada de fosfato de cálcio sobre a superfície desmineralizada, a qual é sugestiva de ação remineralizante (Xavier, Cavalcanti, Montenegro & Melo, 2010). Os iões de Ca^{2+} e PO_4^{3-} biodisponíveis podem ser fornecidos pela saliva, mas mesmo em pessoas saudáveis, o estilo de vida, a dieta e outros fatores podem afetar a biodisponibilidade salivar do cálcio. Desde meados dos anos 90 que houve um aumento no consumo de refrigerantes. Estas bebidas açucaradas não contém apenas açúcares, mas muitas também possuem ácidos alimentares complexos de cálcio (por exemplo, ácidos cítrico e fosfórico), que podem atuar para reduzir a biodisponibilidade de cálcio na saliva. O aumento do consumo global dessas bebidas está associado a um aumento na prevalência global de cárie dentária e erosão (Shen *et al.*, 2018).

O grupo E foi sujeito a uma solução de saliva artificial enriquecida com estrôncio em vez de cálcio, após a desmineralização com ácido láctico e aplicação de verniz de flúor. Obteve um valor de microdureza de superfície de $483,060 \pm 2,964$ HV. Portanto, trata-se de outro grupo em que existiu remineralização (hipótese *iii* - página 23). O estrôncio tem propriedades elementares muito semelhantes às do cálcio e por essa razão

a correlação do estrôncio com os dentes é estudada por vários anos. (Marie, 1996; Wang *et al.*, 2019) O estrôncio substitui o cálcio aleatoriamente nos cristais de hidroxiapatite. No entanto, o tamanho dos cristais contendo estrôncio é maior que o dos cristais de hidroxiapatite, o que leva à estabilização desses cristais. Assim, a substituição do cálcio pelo estrôncio e sua incorporação no esmalte dentário induz estabilidade da estrutura apatítica e alta resistência à degradação por ácidos bacterianos. Para além disso, a combinação de estrôncio e fluoreto é mais eficaz na resistência cristalina aos ácidos do que cada elemento isolado. Estudos realizados em Ohio e Wisconsin, demonstraram que, a incidência de cárie nestes dois estados dos EUA, era muito baixa como resultado do alto conteúdo de estrôncio (5-10 mg / l) e de flúor (1 mg) na água potável (Marie, 1996). Porém, o conteúdo de estrôncio nos dentes varia de acordo com a sua biodisponibilidade (dose-dependente). Quando a concentração de estrôncio é elevada na água potável, o conteúdo de estrôncio aumenta no esmalte. Porém, esta tendência é limitada quando a concentração de estrôncio excede 10 mg / ml na água potável, o conteúdo de estrôncio permanece em aproximadamente 300 mg / g no esmalte (Wang *et al.*, 2019).

O grupo F após a desmineralização e a aplicação do verniz de flúor, foi submerso numa solução de saliva artificial, só que na sua constituição continha magnésio ao invés de cálcio. Apresentou um valor de microdureza de $444,420 \pm 2,562$ HV, significando que houve um aumento da microdureza de superfície comparativamente com o grupo A (hipótese iv – página 23). O magnésio é um dos elementos mais abundantes do corpo humano, sendo um mineral essencial no metabolismo humano, inclusivamente sabe-se que pode promover o crescimento do tecido ósseo (Byun *et al.*, 2017). O papel preciso do magnésio na formação de HA ainda é bastante debatido. Pensa-se que os iões de Mg^{2+} substituam os iões de Ca^{2+} na rede cristalina de hidroxiapatite. No entanto, a substituição do cálcio pelo magnésio na HA é limitada devido à grande diferença dos raios atômicos entre o magnésio e o cálcio, reduzindo a cristalinidade da HA. Essas alterações têm um impacto direto nas propriedades do Mg-HA, incluindo aumento da solubilidade e biodegradabilidade do HA em contacto com fluidos fisiológicos. Todavia, sabe-se que é possível que haja esta substituição do magnésio pelo cálcio na rede de HA, mas a sua localização na rede de HA é ambígua (Laurencin *et al.*, 2011; Lala *et al.*, 2016). Estudos desenvolvidos por Boskey e Posner concluíram que a presença de magnésio diminui a solubilidade do Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP), enquanto Bachra *et al.* concluiu que o ião de Mg^{2+} consegue formar um complexo mais forte e estável que o ião de Ca^{2+} com fosfato (Gelli, Ridi & Baglioni, 2019). Em suma, não se sabe ao certo o papel do magnésio

na rede cristalina da hidroxiapatite, no entanto, neste estudo pode-se concluir que teve um papel na remineralização da superfície de esmalte.

CONCLUSÕES

Neste estudo, todos os grupos mostraram resultados motivadores de que houve remineralização, quando comparados com o grupo que apenas sofreu desmineralização (grupo A). No entanto, as hipóteses de estudo *i* e *v* não foram confirmadas.

A hipótese *i* não se verificou devido ao aumento inesperado de microdureza do grupo B, relativamente ao grupo A. Este facto atribui-se à formação de precipitados com outros metais provenientes de fontes não controladas. Já no caso da hipótese *v*, todos os grupos tratados com soluções remineralizantes compostas por metais divalentes (D, E e F) apresentaram valores distintos de microdureza, fazendo com que esta hipótese não fosse verificável. Tendo em conta que todas as soluções apresentavam metais diferentes, sabe-se que diferentes metais têm diferentes durezas e, para além disso, têm tendências diferentes de formar minerais.

Nesta investigação pretendia-se avaliar a microdureza do esmalte após a incorporação de diferentes catiões divalentes, como o cálcio, o magnésio e o estrôncio no cristal de fluorapatite.

O cálcio era o catião mais estudado e com certezas de que apresenta um papel fundamental neste processo. Contudo, o estrôncio também apresentou fortes evidências de que consegue aumentar a dureza de superfície do esmalte quando este se encontra desmineralizado.

Porém, não existem estudos conclusivos que demonstrem a transformação do cristal de FA após a incorporação destes iões. Qual o benefício de um aumento da microdureza de esmalte (remineralização), se o cristal de FA ficar mais fragilizado e mais solúvel em contacto com outros fluídos? Assim, seria benéfico a realização de estudos mais aprofundados sobre este tema, para que se possa concluir a função exata de cada um destes elementos no processo de remineralização, bem como a eficácia de outros metais.

BIBLIOGRAFIA

- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., ... Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11: 4743–4763.
- Abufarwa, M., Noureldin, A., Campbell, P. M., & Buschang, P. H. (2017). Comparative study of two chemical protocols for creating white spot lesions: An in vitro FluoreCam evaluation. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(1): e12274.
- Arafa, A. (2017). Synergetic remineralization effectiveness of calcium, phosphate and fluoride based systems in primary teeth. *Pediatric Dental Journal*, 27(1): 65–71.
- Assunção, P., Carmo, J., Peixoto, A., Carvalho, P., Ascenso, C., & Manso, A. G. (2016). Avaliação de white spots após tratamento com agentes remineralizantes – análise microscópica. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 57 (1): 27.
- Attin, T. (2006). Methods for assessment of dental erosion. *Monographs in Oral Science*, 20: 152–172.
- Aykut-Yetkiner, A., Wiegand, A., & Attin, T. (2014). The effect of saliva substitutes on enamel erosion in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(6): 720–725.
- 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.
- Baumann, T., Kozik, J., Lussi, A. & Carvalho, T.S. (2016). Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Scientific Reports*, 6: 34760.
- Byun, S.-H., Lim, H.-K., Kim, S.-M., Lee, S.-M., Kim, H.-E., & Lee, J.-H. (2017). The Bioresorption and Guided Bone Regeneration of Absorbable Hydroxyapatite-Coated Magnesium Mesh. *Journal of Craniofacial Surgery*, 28(2): 518–523.
- Björklund, M., Ouwehand, A. C., & Forssten, S. D. (2011). Improved Artificial Saliva for Studying the Cariogenic Effect of Carbohydrates. *Current Microbiology*, 63(1): 46–49.
- Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5): 493–502.

- 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, 1495–1501.
- 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.
- Colombo, M., Mirando, M., Rattalino, D., Beltrami, R., Chiesa, M., & Poggio, C. (2017). Remineralizing effect of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion caused by soft drinks: Ultrastructural analysis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(7): e861–e868.
- Comar, L. P., Gomes, M. F., Ito, N., Salomão, P. A., Grizzo, L. T., & Magalhães, A. C. (2012). Effect of NaF , SnF 2 , and TiF 4 Toothpastes on Bovine Enamel and Dentin Erosion-Abrasion In Vitro. *International Journal of Dentistry*, 2012.
- 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.
- Delecrode, T. R., Siqueira, W. L., Zaidan, F. C., Bellini, M. R., Leite, A. L., Xiao, Y., ... Buzalaf, M. A. R. (2015). Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *Journal of Dentistry*, 43(5): 583–588.
- 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. (2004). The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *Journal of Dental Research*, 83: C39–42.
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental Caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53(3): 286-91.

- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D. & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 (18): S94–S105.
- Fulmer, M. T., & Brown, P. W. (1993). Effects of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 on hydroxyapatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(8): 1095–1102.
- 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.
- Ionta, F. Q., dos Santos, N. M., Mesquita, I. M., Dionísio, E. J., Cruvinel, T., Honório, H. M., & Rios, D. (2019). Is the dentifrice containing calcium silicate, sodium phosphate, and fluoride able to protect enamel against chemical mechanical wear? An in situ/ex vivo study. *Clinical Oral Investigations*: 1-8.
- Ingram, G.S., & Edgar, W.M. (1994). Interactions of Fluoride and Non-Fluoride Agents with the Caries Process. *Advances in Dental Research* 8(2): 158-165.
- Jensdottir, T., Jensen, A. B., Nauntofte, B., & Buchwald, C. (2017). *U.S. Patent Application*, 15(485): 1-8.
- Jing, J., Lu, J., Hao, Y., & Han, Y. (2009). Nanobacteria's potencial involvement in enamel repair in caries. *Medical Hypothesis*, 73(3): 359-60.
- 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.
- Katakam, D., Priyadarshini, S., 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. *J. Evolution Med. Dent. Sci*, 6(4):273-277.
- Kato, M. T., Leite, A. L., Hannas, A. R., Oliveira, R. C., Pereira, J. C., Tjäderhane, L., & Buzalaf, M. A. R. (2010). Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Research*, 44(3): 309-316.
- 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.
- Lacruz, R.S., Habelitz, S., Wright, J.T., & Paine, M.L. (2017). Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. *Physiol Rev*, 97(3): 939-993.

- Lala, S., Ghosh, M., Das, P. K., Das, D., Kar, T., & Pradhan, S. K. (2016). Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement. *Materials Chemistry and Physics*, 170: 319–329.
- Laurance-Young, P., Bozec, L., Gracia, L., Rees, G., Lippert, F., Lynch, R. J. M., & Knowles, J. C. (2011). A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *Journal of Dentistry*, 39(4): 266–272.
- Laurencin, D., Almora-Barrios, N., de Leeuw, N. H., Gervais, C., Bonhomme, C., Mauri, F., ... Smith, M. E. (2011). Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials*, 32(7): 1826–1837.
- Laurencin, D., Wong, A., Chrzanowski, W., Knowles, J. C., Qiu, D., Pickup, D. M., ... Smith, M. E. (2010). Probing the calcium and sodium local environment in bones and teeth using multinuclear solid state NMR and X-ray absorption spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12(5): 1081– 1091.
- Levine, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry*. Oklahoma, EUA: Springer.
- Magalhães, A. C., Comar, L. P., Rios, D., Delbem, A. C. B., & Buzalaf, M. A. R. (2008). Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*, 36(2): 158–162.
- Marie, P. J. (1996). Effects of Strontium on bone tissue and bone cells. In J. Nève *et al.* (eds), *Therapeutic Uses of Trace Elements* (pp. 277-278).
- Matsunaga, K., & Murata, H. (2009). Formation Energies of Substitutional Sodium and Potassium in Hydroxyapatite. *Materials Transactions*, 50(5): 1041– 1045.
- Memarpour, M., Soltanimehr, E., & Sattarahmady, N. (2015). Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion. *Microscopy Research and Technique*, 78(9): 801–806.
- Mohd Said, S. N. B., Ekambaram, M., & Yiu, C. K. Y. (2016). Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 27(3): 163–173.
- Moron, B. M., Miyazaki, S. S. H., Ito, N., Wiegand, A., Vilhena, F., Buzalaf, M. A. R., & Magalhães, A. C. (2013). Impact of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on tooth erosion/abrasion in vitro. *Australian Dental Journal*, 58(1): 106–111.

- Mutahar, M., Carpenter, G., Bartlett, D., German, M. & Moazzez, R. (2017). The presence of acquired enamel pellicle chages acid-induced erosion from dissolution to softening process. *Scientific Reports*, 7: 1.
- Nurbaeva, M.K., Eckstein, M., Feske, S., & Lacruz, R.S. (2017). Ca^{2+} Transport and Signalling in Enamel Cells. *The Journal of Physiology*, 595(10): 3015-3039.
- 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.
- Oliver, M. A., & Gregory, P. J. (2014). Soil, food security and human health: a review. *European Journal of Soil Science*, 66(2): 257–276.
- Orrego, S., Xu, H., & Arola, D. (2017). Degradation in the fatigue crack growth resistance of human dentin by lactic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 73: 716–725.
- Pádua, I. C. S. (2018). *Qual o melhor “timing” da escovagem dos dentes, após ataque erosivo ao esmalte? – estudo in vitro* (Unpublished master’s thesis). Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica – Portugal.
- 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
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(9): 730–746.
- Pitts, N.B., Zero, D.T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J.A., Gomez, F.R., ... Ismail, A. (2017). Dental Caries. *Nature Reviews: Disease Primers*, 17030(3): 1-16.
- Reynolds, E. C., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., Walker, G. D., Morgan, M. V., & Reynolds, C. (2008). Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *Journal of Dental Research*, 87(4): 344–348.
- Rizvi, A., Zafar, M. S., Wasifi, Y. Al, Fareed, W., Khurshid, Z., & Zafar, C. M. S. (2016). Role of enamel deminerlization and remineralization on microtensile bond strength of resin composite. *European Journal of Dentistry*, 10(3): 376–380.
- Robinson, C., Kirkham, J., Brookes, S. J., & Shore, R. C. (2017). Chemistry of mature enamel. In *Dental enamel formation to destruction* (pp. 167-191). CRC Press.

- Robinson, C., Connell, S., Kirkham, J., Brookes, S. J., Shore, R. C. & Smith, A. M. (2004). The Effect of Fluoride on the Developing Tooth. *Caries Research*, 38(3): 268-276.
- Salvado, C. C. (2016). *Remineralização de lesões iniciais de cárie dentária – estudo in vitro* (Unpublished master's thesis). Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica – Portugal.
- Sang Cho, J., Um, S.-H., Su Yoo, D., Chung, Y.-C., Hye Chung, S., Lee, J.-C., & Rhee, S.-H. (2013). Enhanced osteoconductivity of sodium-substituted hydroxyapatite by system instability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(5): 1046–1062.
- Schlueter, N., Hara, A., Shellis, R. P., & Ganss, C. (2011). Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Research*, 45(1), 13–23.
- Simmer, J. P. & Fincham, A. G. (1995). Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 6(2): 84–108.
- Singh, S., Sharma, A., Sood, P. B., Sood, A., Zaidi, I., & Sinha, A. (2015). Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(2): 59–64.
- Siqueira, W. L., Margolis, H. C., Helmerhorst, E. J., Mendes, F. M., & Oppenheim, F. G. (2010). Evidence of Intact Histatins in the in vivo Acquired Enamel Pellicle. *Journal of Dental Research*, 89(6): 626–630.
- Shahmoradi, M., Bertassoni, L. E., Elfallah, H. M., & Swain, M. (2014). Fundamental structure and properties of enamel, dentin and cementum. In *Advances in calcium phosphate biomaterials* (pp. 511-547). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shahmoradi, M., Hunter, N., & Swain, M. (2017). Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel. *Biomed Research Internacional*, 2017: 1-7.
- 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.
- Shellis, R. P., Ganss, C., Ren, Y., Zero, D. T., & Lussi, A. (2011). Methodology and models in erosion research: Discussion and conclusions. *Caries Research*, 45(1): 69–77.

- Tahir, L., & Nazir, R. (2018). *Dental Caries, Etiology, and Remedy through Natural Resources. Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management*. Londres, Inglaterra: Zuhre Akarslan.
- 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.
- Valente, M. T., Moffa, E. B., Crosara, K. T. B., Xiao, Y., de Oliveira, T. M., Machado, M. A. de A. M., & Siqueira, W. L. (2018). Acquired Enamel Pellicle Engineered Peptides: Effects on Hydroxyapatite Crystal Growth. *Scientific Reports*, 8(1): 3766.
- Veiga, N., Aires, D., Douglas, F., Pereira, M., Vaz, A. Rama, L., ..., Bexiga, F. (2016). Dental Caries: A review. *Journal of Dental and Oral Health*, 2(5).
- 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.
- Xavier, A. F. C., Cavalcanti, A. L., Montenegro, R. V. & Melo, J. B. 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):
- Zaharia, A., Plescan, V. G., Atkinson, I., Mocioiu, O. C., Cantariagiu, A. & Musat, V. (2017). Remineralization of Natural Tooth Enamel in Artificial Saliva Environment. *Revista de Chimie*, 68(3): 510-514.
- Zaytsev, D. (2016). Mechanical properties of human enamel under compression: On the feature of calculations. *Materials Science and Engineering: C*, 62: 518 – 523.