



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES IÕES METÁLICOS DIVALENTES NO ESMALTE HUMANO SÃO**

Trabalho submetido por  
**Ana Margarida da Luz Ramos**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2020**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES IÕES  
METÁLICOS DIVALENTES NO ESMALTE HUMANO SÃO**

Trabalho submetido por  
**Ana Margarida da Luz Ramos**  
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**  
**Mestre Joana Carmo**

**outubro de 2020**



**Dedicatória**

*Aos meus pais, Elsa e Paulo, por tudo.*



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Carla Ascenso, por todo o apoio, disponibilidade e motivação prestados ao longo da realização deste trabalho, por toda a confiança, simpatia e compreensão.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Cristina Manso, quero agradecer a oportunidade de ingressar neste projeto e por me ter despertado interesse pelo tema desenvolvido. Agradeço o envolvimento permanente e o rigor exigido que fez com que se tornasse possível.

À minha coorientadora, Mestre Joana Carmo agradeço pela transmissão de conhecimentos essenciais à execução deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, agradeço por conceder a utilização do Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, lugar de muitas angústias e felicidades, onde aprendi e cresci, tanto a nível pessoal como profissional. A todos os colegas professores e funcionários que fizeram parte destes 5 anos, certamente tiveram um papel fundamental no meu percurso académico.

Às minhas colegas ao longo deste projeto, Patrícia e Alice, pelas longas horas bem passadas no laboratório e pelo companheirismo.

À minha querida amiga e colega de box, Raquel Fernandes, por todo o apoio ao longo destes anos, por me ter dado força nos momentos mais difíceis e por ter sido a minha companheira nas maiores aventuras. Sem ti não teria sido a mesma coisa.

Quero deixar o meu agradecimento profundo aos meus amigos, João Geraudes e Miguel Alves, por ter tido o privilégio de trabalhar com eles, e por tudo o que me ensinaram. Aos meus amigos Carolina Pereira, Gonçalo Santos e Carolina Lopes, por ter tido a sorte de vos conhecer, revelaram-se pessoas muito especiais. Um obrigada especial à minha amiga Patrícia Lyra, um exemplo que levarei para a vida. Não consigo imaginar estes 5 anos sem todos na minha vida.

Ao Pedro, pelo apoio incondicional, pela compreensão e por toda a paciência e amor que sempre me deu.

Por fim, aos meus pais, por toda a confiança depositada e mim, por serem os meus alicerces e, acima de tudo, por toda a educação e amor que me proporcionaram. À minha irmã e à minha família, que estiveram sempre presentes.



## RESUMO

**Objetivo:** Medir e comparar os valores de microdureza de superfície de esmalte após a incorporação de diferentes metais divalentes em lesões de cárie dentária, artificialmente induzidas.

**Materiais e métodos:** Prepararam-se 18 molares humanos intactos e livres de cáries, originando 70 fragmentos. Estes foram divididos em 7 grupos de 10 fragmentos cada (A-G). O grupo A não sofreu qualquer intervenção. Os restantes grupos (B-G) sofreram um processo de desmineralização por imersão numa solução tampão de ácido láctico a pH 5,5. Posteriormente, foi medida a dureza do grupo B, que sofreu apenas desmineralização e os grupos C a G foram colocados em soluções de saliva artificial contendo diferentes metais divalentes. O grupo C foi tratado com uma solução de saliva artificial sem cálcio, o grupo D com uma solução de saliva artificial com cálcio, o grupo E com uma solução de saliva artificial com estrôncio, o grupo F com uma solução de saliva artificial com magnésio e o grupo G com uma solução de saliva artificial com zinco. Submeteram-se todas as amostras à análise quantitativa de avaliação dos valores de microdureza de superfície de esmalte, através da técnica de Vickers. Os resultados foram tratados estatisticamente através de ANOVA a um fator com um grau de confiança de 95%, que determinou a existência de diferenças entre as médias. De seguida, aplicou-se um teste de comparação múltipla (teste de Bonferroni) que aferiu que todos os grupos diferiam significativamente.

**Resultados:** Obtiveram-se os valores médios de microdureza de Vickers (A -  $468,560 \pm 3,7592$  HV; B -  $258,680 \pm 4,6982$  HV; C -  $376,86 \pm 6,3112$  HV; D -  $398,540 \pm 8,1644$  HV; E -  $362,540 \pm 6,4684$  HV; F -  $440,480 \pm 7,5820$  HV; G -  $310,440 \pm 6,4338$  HV).

**Conclusões:** Os grupos com lesões de cárie artificialmente induzidas e posteriormente, sujeitos a tratamento por incorporação dos metais divalentes em estudo (cálcio, estrôncio, magnésio e zinco) revelaram aumentos significativos dos valores de microdureza da superfície de esmalte em relação ao grupo sofreu apenas desmineralização, indicando remineralização. O grupo que apresentou maior capacidade de remineralização foi o magnésio, seguido do cálcio, estrôncio e zinco.

**Palavras-Chave:** Esmalte; Hidroxiapatite; Remineralização; Estrôncio, Magnésio; Zinco.



## ABSTRACT

**Objectives:** To measure and compare the enamel microhardness following the incorporation of different divalent metals in hydroxyapatite, in induced dental caries lesions.

**Materials and methods:** 18 intact and caries-free human molars were prepared and separated into 70 fragments. These were divided into 7 groups of 10 fragments each (A-G). Group A did not undergo any intervention. The remaining groups (B-G) suffered a demineralization process, by immersion in a buffer solution of lactic acid at pH 5.5. On the 7th day, groups C to G were placed in solutions of artificial saliva containing different divalent metals. Group C was treated with a solution of artificial saliva without calcium, group D with a solution of artificial saliva with calcium, group E with a solution of artificial saliva with strontium, group F with a solution of artificial saliva with magnesium and group G with a solution of artificial saliva with zinc. Quantitative analysis of the enamel surface microhardness assessment took place in all groups, using the Vickers technique. Statistical analysis was carried out according to the one-way ANOVA parametric test, with a 95% confidence level. The latter confirmed the existence of differences between the mean values. Thereafter, a multiple comparison test (Bonferroni test) verified that all groups significantly differed.

**Results:** Average of the obtained Vickers microhardness values (A -  $468.560 \pm 3.7592$  HV; B -  $258.680 \pm 4.6982$  HV; C -  $376.86 \pm 6.3112$  HV; D -  $398.540 \pm 8.1644$  HV; E -  $362.540 \pm 6.4684$  HV; F -  $440,480 \pm 7.5820$  HV; G -  $310.440 \pm 6.4338$  HV)

**Conclusions:** The groups to which dental caries lesions were artificially induced, and to which were subsequently subjected to treatment by incorporation of the divalent metals under study (calcium, strontium, magnesium and zinc) revealed an increased microhardness when compared to the group that only underwent demineralization. This indicates that remineralization occurred. The group that showed the greatest remineralization capacity was magnesium, followed by calcium, strontium and zinc.

**Key Words:** Enamel; Hydroxyapatite; Remineralization; Strontium; Magnesium; Zinc.



## ÍNDICE GERAL

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>ÍNDICE GERAL.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE SIGLAS .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>13</b> |
| I.1.    CARACTERIZAÇÃO DO ESMALTE .....  | 14        |
| I.2.    CÁRIE DENTÁRIA .....   | 16        |
| I.3.    DESMINERALIZAÇÃO/ REMINERALIZAÇÃO.....                                 | 17        |
| I.4.    SALIVA .....   | 19        |
| I.5.    FLÚOR.....   | 22        |
| I.6.    ESTRÔNCIO.....   | 23        |
| I.7.    MAGNÉSIO.....  | 24        |
| I.8.    ZINCO .....  | 25        |
| I.9.    CÁLCIO .....   | 26        |
| I.10.   OBJETIVO DO ESTUDO .....   | 26        |
| I.11.   HIPÓTESES DE ESTUDO.....   | 26        |
| <b>II. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>29</b> |
| II.1.   TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....                               | 29        |
| II.2.   LOCAL DO ESTUDO.....   | 29        |
| II.3.   CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....  | 29        |
| II.4.   PREPARAÇÃO DA AMOSTRA .....  | 30        |
| II.5.   PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES REMINERALIZANTES.....                          | 33        |
| II.5.1. Saliva artificial sem metais divalentes.....                           | 33        |
| II.5.2. Saliva artificial com metais divalentes .....                          | 34        |
| II.6.   DESMINERLAIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO.....                                | 36        |
| II.6.1. Indução de lesões artificiais de cárie .....                           | 36        |
| II.6.2. Remineralização com saliva artificial sem e com metais divalentes..... | 37        |
| II.7.   MEDIÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE.....                              | 39        |
| <b>III. RESULTADOS.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>IV. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>V. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>55</b> |

**ANEXOS ..... 63**

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Representação estrutural do cristal de hidroxiapatite. Adaptado de Bulina et al. (2020).....  | 15 |
| Figura 2 Desenho do estudo .....   | 31 |
| Figura 3 Aparelho usado para o polimento das amostras, LaboPol- 4®, .....  | 32 |
| Figura 4 Micrótomo de tecidos duros Accuton 50 (Struers A7S, Ballerup, Dinamarca)32  |    |
| Figura 5 i- dente colado em bloco acrílico com cera colante; ii - marcação da linha do sulco central; iii – marcação das linhas dos 3 mm; iv - marcação da linha da JAC, linha 4 mm acima da JAC.....  | 33 |
| Figura 6 Solução de Saliva Artificial, a pH 7, sem metais divalentes utilizada na preparação das soluções remineralizantes.....  | 34 |
| Figura 7 Cloreto de cálcio (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo $Ca^{2+}$ (Grupo D). .....  | 35 |
| Figura 8 Cloreto de estrôncio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo $Sr^{2+}$ (Grupo E). .....   | 35 |
| Figura 9 Cloreto de magnésio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo $Mg^{2+}$ (Grupo F). .....  | 36 |
| Figura 10 Cloreto de zinco (Chem-Lab NV, Zedelgem) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo $Zn^{2+}$ (Grupo G). .....   | 36 |
| Figura 11 Solução de Ácido Láctico 50mM, pH5.50, utilizado na desmineralização das amostras.....   | 37 |
| Figura 12 Testes de Microdureza de Vickers: <b>i</b> : Máquina utilizada para medir a dureza de Vickers - HSV-30®, Shimadzu Corporation; <b>ii</b> : Máquina a realizar a indentação no fragmento; <b>iii</b> : Visualização do losango criado pela indentação. .... | 39 |
| Figura 13 Gráfico representativo dos valores médios das microdurezas de Vickers médias obtidas em cada grupo de estudo. ....   | 46 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 Estatística descritiva dos valores médios das médias de microdureza de Vickers obtidos para cada grupo de estudo, obtida com recurso ao software SPSS. .. | 41 |
| Tabela 2 Resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk dos grupos de estudo. ....  | 43 |
| Tabela 3 Resultados da análise de homogeneidade de variância dos grupos de estudo.   | 44 |
| Tabela 4 Resultados do teste ANOVA a um fator obtido para um intervalo de confiança de 95%.....  | 44 |
| Tabela 5 Resultado do teste de comparações múltiplas através da análise de Bonferroni entre todos os grupos de estudo. ....  | 45 |



## **LISTA DE SIGLAS**

**$\mu\text{M}$**  - Micromolar

**HA** - Hidroxiapatite

**HV** - Dureza de Vickers

**JAC** - Junção amelo-cementária

**mg** - Miligrama

**ml** - Mililitro

**mm** - Milímetro

**mM** - Milimolar

**N** - Newton

**°C** - Graus Celsius

**pH** -  $-\log[\text{H}^+]$

**ppm** - Partes por milhão

**rpm** - Rotações por minuto



## **I. INTRODUÇÃO**

O esmalte é um tecido biológico altamente mineralizado que protege os dentes e que apresenta elevada dureza. Por ser acelular, a sua capacidade de regeneração é limitada. Como tal, o desenvolvimento de técnicas que auxiliem na sua regeneração e manutenção tem suscitado grande interesse (Ruan & Moradian-Oldak, 2015).

A principal ameaça à integridade do esmalte é a cárie dentária. Esta apresenta uma elevada prevalência a nível mundial, tanto em crianças como em adultos, e, em casos extremos, pode levar à perda do dente (Vargas-Ferreira et al., 2015; Pitts et al., 2017). A cárie é consequência da desmineralização progressiva da superfície do dente, resultante da metabolização dos açúcares fermentáveis, presentes no biofilme, por parte de bactérias cariogénicas (Fejerskov et al., 2015). Isto provoca alterações na estrutura do esmalte por meio da dissolução de iões de cálcio e fosfato da cadeia cristalina.

Numa fase inicial, é possível reverter naturalmente este processo através da aposição de iões na cadeia de esmalte, quando presentes na saliva em quantidades apropriadas. Esta remineralização pode também ser potenciada por fatores ou elementos externos, como o flúor. Nos últimos anos, inúmeros estudos têm demonstrado o papel relevante do flúor no processo de remineralização, bem como algumas limitações do mesmo. Assim, é essencial o estudo e desenvolvimento tanto de terapêuticas alternativas como de terapêuticas potenciadoras, clinicamente eficazes, de forma a favorecer a remineralização multifatorial em detrimento da desmineralização. Isto permite travar e reverter o desenvolvimento de cárie inicial, prevenindo a necessidade de tratamentos posteriores mais invasivos, tal como ditam os princípios da medicina dentária minimamente invasiva (González-Cabezas & Fernández, 2018; Philip, 2019).

É conhecido que a matéria orgânica presente no esmalte contribui significativamente para o fortalecimento e aumento da sua dureza, sendo também refletido pelo aumento da resistência à propagação de fraturas do mesmo (Elfallah et al., 2015; Kis et al., 2020). Adicionalmente, estudos sugerem que as propriedades mecânicas do esmalte são dependentes do seu conteúdo em alguns iões metálicos divalentes (Ruan & Moradian-Oldak, 2015). A substituição dos iões hidroxilo, presentes na estrutura de esmalte, por outros iões, possibilita a formação de outras apatites biológicas e consequente alteração

das suas propriedades (Abou Neel et al., 2016). Assim, podemos inferir que existe margem de progressão no desenvolvimento e estudo da formação de outras apatites.

## **I.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESMALTE**

O esmalte, camada externa de revestimento da coroa dentária, é o tecido com maior dureza no corpo humano, tendo como função proteger o dente contra agressões físicas, térmicas e químicas que, na sua ausência, seriam prejudiciais à vitalidade do órgão dentário (Lacruz et al., 2017). O esmalte é altamente específico, sendo caracterizado por propriedades físicas e mecânicas excepcionais, além de beleza estética (Pandya & Diekwisch, 2019).

O esmalte maduro é constituído maioritariamente por matéria inorgânica (95%) que se integra numa matriz constituída por água (2-4%) e matéria orgânica (1-2%) e, ao contrário dos restantes tecidos mineralizados (dentina e osso) de origem mesenquimatosa, tem origem epitelial. Por ser acelular e avascular, quando exposto a agressões como cárie ou fraturas, a sua capacidade de autorregeneração é limitada (Abou Neel et al., 2016; Lacruz et al., 2017; Farooq & Bugshan, 2020).

O principal componente inorgânico do esmalte, assim como de todos os tecidos mineralizados dos animais vertebrados, é a hidroxiapatite (HA) (Bowes & Murray, 1935; Shao et al., 2019). Esta corresponde a um cristal de fosfato de cálcio que, em condições fisiológicas, é o que apresenta menor solubilidade e conseqüentemente maior estabilidade química (Lacruz et al., 2017). As propriedades físico-químicas únicas do esmalte são devidas ao seu alto conteúdo em hidroxiapatite. Este apresenta um arranjo paralelo de cristais de apatite em prismas de esmalte, interpostos com prismas perpendiculares, conferindo uma ordem tridimensional. Juntas, essas características resultam num material de grande dureza e resiliência física (Pandya & Diekwisch, 2019). A fórmula química da hidroxiapatite do esmalte difere da sua forma estequiométrica:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Kis et al., 2020). Esta apresenta uma forma hexagonal e, como descrito na fórmula química, é constituída por cálcio, fosfato e hidroxilo, representado na Figura 1 (Bulina et al., 2020). Devido à posição do  $\text{Ca}^{2+}$  na cadeia, ocorre a formação de canais que permitem a movimentação de aniões, o que torna este cristal altamente adaptável ao meio em que se encontra. Isto possibilita inúmeras trocas iónicas como a substituição dos iões hidroxilo por outros iões tais como o fluoreto ( $\text{F}^-$ ) e o cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), a substituição dos iões fosfato

( $\text{PO}_4^{3-}$ ) por íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e a substituição de íons cálcio por íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ou zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Consequentemente, ocorrem alterações das propriedades e formação de outras apatites biológicas (Abou Neel et al., 2016). A substituição por carbonato irá afetar a estrutura cristalina da apatite, diminuindo a sua simetria e, conseqüentemente, as suas forças de coesão, aumentando simultaneamente a solubilidade da mesma. Isto irá fazer com que se torne mais suscetível à dissolução ácida pelo processo cariogénico. Por outro lado, o íon flúor adapta-se perfeitamente na estrutura hexagonal dos cristais de hidroxiapatite, o que leva à estabilização da cadeia do cristal, o que por sua vez, leva à diminuição da solubilidade perante agressões químicas (Abou Neel et al., 2016; Lacruz et al., 2017).

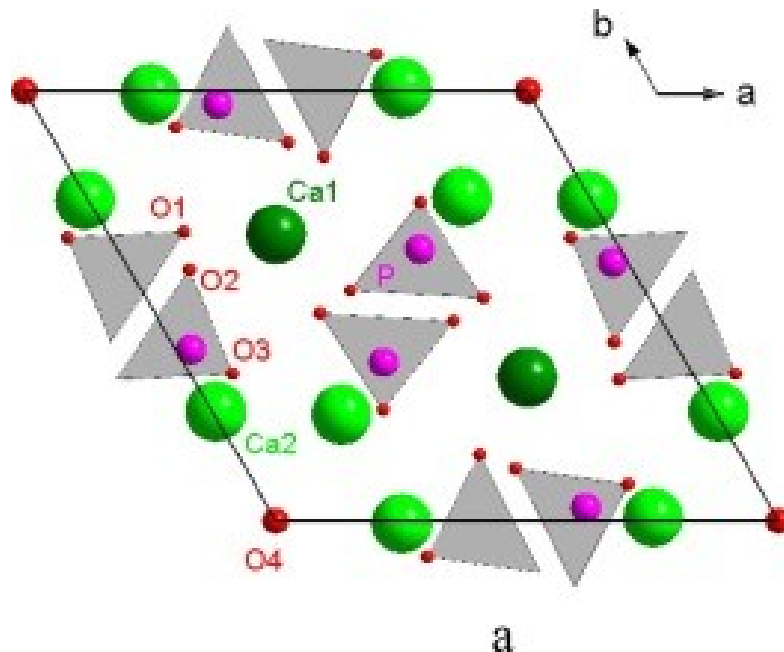


Figura 1 Representação estrutural do cristal de hidroxiapatite. Adaptado de Bulina et al. (2020)

Embora o conteúdo orgânico do esmalte represente menos de 1% da sua constituição, este tem um papel significativo na determinação das propriedades mecânicas (dureza, módulo de elasticidade) e vai também impedir a propagação de fraturas e permitir a movimentação dos prismas de esmalte perante stress (Elfallah et al., 2015; Kis et al., 2020).

É sabido que as propriedades estruturais do dente variam entre as pessoas e esta variedade é que determina a suscetibilidade a problemas dentários (Abdallah et al., 2016).

## 1.2. CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é um dos principais problemas de saúde pública nos países desenvolvidos e uma das doenças crônicas mais comuns do mundo, afetando não só crianças em idade escolar (60 a 90%) como também a maioria dos adultos (Yeung et al., 2015). É uma doença desigualmente distribuída, entre e dentro de países, podendo variar consoante as comunidades e posição socioeconómica (Yeung et al., 2015; Pitts et al., 2017; Hatipoglu & Saydam, 2019).

A cárie é caracterizada por ser a doença dos tecidos duros dentários mediada pela interação entre bactérias e hidratos de carbono fermentáveis presentes no biofilme que, por sua vez, provoca a produção de ácido na superfície dentária e a sua consequente desmineralização (Yeung et al., 2015). É considerada uma doença dinâmica e multifatorial, pelo que é importante ter em conta fatores cruciais na sua progressão como hábitos alimentares, flora bacteriana, ingestão de flúor, toma regular de medicamentos com açúcar na sua constituição, posição dentária e características morfológicas, hábitos de escovagem, quantidade e composição da saliva, genética, entre outros. (Pitts et al., 2017; Hatipoglu & Saydam, 2019).

A cárie dentária pode ocorrer ao longo da vida e possui vários estágios de evolução. Em processos mais avançados, a cárie dentária pode ser mais invasiva e afetar irreversivelmente o esmalte e dentina da coroa do dente, superfícies radiculares expostas e, em último caso, levar à inviabilidade do dente (Yeung et al., 2015; Pitts et al., 2017). Por outro lado, na fase inicial a sua progressão pode ser travada e revertida através de processo de remineralização.

Durante décadas, os *Streptococcus mutans* e os lactobacilos foram considerados os principais patógenos causadores da cárie e a maioria das estratégias diagnósticas, preventivas e terapêuticas têm sido direcionadas para estes microrganismos. No entanto, outras espécies microbianas foram também isoladas de lesões de cárie e têm sido relacionadas ao processo de cárie dentária, incluindo bifidobactérias. Foi demonstrado que várias espécies orais podem atuar sinergicamente para aumentar o seu efeito patogénico (Simón-Soro & Mira, 2015; Colombo & Tanner, 2019).

O primeiro estágio clínico de cárie é denominado de *White Spot*, sendo caracterizada por uma lesão subsuperficial desmineralizada sob uma superfície porosa de esmalte intacto

que confere uma coloração esbranquiçada e opaca (Abdullah & John, 2016; Pitts et al., 2017). Esta é uma lesão incipiente, não cavitada, caracterizada por duas zonas de desmineralização: a zona superficial, porosa e rica em minerais, cuja morfologia difere da do esmalte adjacente; e uma área sobrejacente à superfície, onde ocorre a dissolução e perda da maior parte do conteúdo mineral interprismático (30-90% em volume). (Pathak et al., 2015). Esta fase da lesão é de extrema importância pois, aqui, a lesão ainda é reversível, podendo ser travada através da modificação dos fatores causais, aplicação de medidas preventivas e através de processos de remineralização (Abdullah & John, 2016; Pitts et al., 2017).

Com isto, a fisiopatologia da cárie dentária não é simplesmente uma perda cumulativa contínua de minerais, mas sim um processo dinâmico caracterizado por períodos alternados de desmineralização e remineralização. A progressão ou reversão da lesão depende do equilíbrio entre os fatores patológicos que favorecem a desmineralização (bactérias cariogênicas, glicídios fermentáveis, disfunção salivar) e os fatores de proteção (agentes antibacterianos, saliva, iões remineralizantes) que promovem a remineralização (Featherstone & Chaffee, 2018; Philip, 2019). Portanto, a cárie pode ser considerada uma doença evitável (Pitts et al., 2017).

### **I.3. DESMINERALIZAÇÃO/REMINERALIZAÇÃO**

O processo de desmineralização resulta da interação entre bactérias e o biofilme sobre a superfície dentária. Esta interação leva à produção de componentes ácidos, como o ácido lático, que, ao atuarem na camada subsuperficial do esmalte, vão levar à desmineralização da sua estrutura cristalina mineral (Pitts et al., 2017).

As taxas de desmineralização e remineralização são mediadas pelo pH (Xin et al., 2016). A pH normal, a saliva apresenta-se supersaturada em iões de cálcio e fosfato, pelo que não ocorre desmineralização (Xin et al., 2016; Farooq & Bugshan, 2020). À medida que a produção de ácido vai aumentando o pH vai diminuindo. Esta descida do pH abaixo do nível crítico provoca a dissolução do componente mineral do dente (hidroxiapatite), o que resulta na libertação de iões de cálcio e fosfato, e, conseqüentemente, no aumento da sua porosidade (Parnell et al., 2012; Xin et al., 2016; Pitts et al., 2017). Isto irá permitir a difusão do ácido, tendo como consequência a desmineralização da porção mineral de uma parte mais profunda (Pitts et al., 2017). A capacidade de o esmalte resistir à

desmineralização depende do conteúdo mineral encontrado na sua estrutura (Uwitonze et al., 2020).

Devido à constante exposição da cavidade oral a condições ácidas, tanto provenientes do biofilme como provenientes dos ácidos da dieta, para manter uma homeostase mineral e consequente integridade dentária é essencial a capacidade de remineralização (Farooq & Bugshan, 2020).

A remineralização pode ocorrer como um processo natural de reparação do esmalte e caracteriza-se pelo processo de deposição de minerais saturados sobre a superfície dentária desmineralizada, resultando num ganho mineral (Pitts et al., 2017; Philip, 2019). Os ácidos do biofilme podem ser neutralizados pela capacidade tampão da saliva, aquando da eliminação dos hidratos de carbono fermentáveis da cavidade oral (Pitts et al., 2017). Com isto, ocorre a neutralização do pH do fluido do biofilme e este torna-se suficientemente saturado em iões de cálcio, fosfato e flúor. Isto leva à interrupção do processo de desmineralização e passa a ocorrer remineralização por difusão de iões de cálcio e fosfato para as porosidades da superfície do esmalte criadas anteriormente (Parnell et al., 2012; Pitts et al., 2017). Aqui, pode ocorrer integração destes iões nos espaços criados previamente pela desmineralização, ou por outro lado, pode ocorrer a criação de um mineral amorfo, pela deposição de precipitados nos espaços interprismáticos. Este é então um processo que pode ocorrer de forma natural, ou ser induzido por terapias visando a restituição de minerais na cadeia de hidroxiapatite (Abdallah et al., 2016; González-Cabezas & Fernández, 2018).

Segundo Philip (2019), tanto a remineralização natural (incorporação de iões de cálcio e fosfato) como a remineralização com a incorporação de flúor têm tendência à integração destes minerais apenas na zona superficial do esmalte, sem alteração das propriedades na camada subsuperficial. A presença de iões extrínsecos como estrôncio, ferro, magnésio e zinco poderá potenciar a remineralização natural, aumentando a taxa de difusão iónica e a sua profundidade, alterando as propriedades físicas e químicas do dente (Abdallah et al., 2016).

Assim, ao longo da vida de um dente, estão presentes ciclos de desmineralização/remineralização do esmalte que determinam o equilíbrio mineral e a integridade ou degradação do mesmo (Farooq & Bugshan, 2020).

#### I.4. SALIVA

A saliva desempenha um papel essencial na manutenção da saúde oral. Esta importância advém da sua capacidade de manter a integridade estrutural do dente por diminuir a desmineralização, aumentar a remineralização, ter ação antibacteriana e de autolimpeza, atuar como fonte constante de nutrientes e por ter capacidade de neutralizar o pH (capacidade tampão)(Abou Neel et al., 2016; Marsh et al., 2016). A saliva desempenha também um papel essencial na articulação da fala, na mastigação e deglutição e na manutenção da microbiota equilibrada. A alteração do equilíbrio da secreção salivar pode levar a patologias entre as quais se destacam a xerostomia, cárie dentária, erosão dentária e infeções fúngicas (Pedersen et al., 2018).

A saliva é secretada pelas glândulas salivares que se dividem em glândulas *major* e *minor*. As glândulas salivares *major* são constituídas por 3 pares de glândulas (parótida, submandibular e sublingual) que se situam extra-oralmente e comunicam com a cavidade oral através de sistemas de ductos. Por outro lado, as inúmeras glândulas salivares *minor*, cerca de 600 a 1.000, situam-se na cavidade oral, particularmente ao nível das regiões da mucosa e submucosa labial, lingual, palatina, bucal e retro-molar, comunicando diretamente com a mesma (Pedersen et al., 2018; Farooq & Bugshan, 2020).

A saliva final que entra na cavidade oral, aproximadamente 0,6L por dia, é composta por cerca de 99% de água e apenas 1% equivale a componentes sólidos como proteínas e iões inorgânicos (Pedersen et al., 2018). Aproximadamente 90% desta saliva é proveniente das glândulas salivares *major* e menos de 10% é secretada pelas glândulas salivares *minor*. No entanto, estes 10% são relevantes devido ao seu elevado conteúdo em mucinas, proteínas responsáveis pela lubrificação das superfícies orais (Carpenter, 2013; Pedersen et al., 2018). Por outro lado, quando a saliva entra na cavidade oral, torna-se numa mistura complexa de fluidos, composta tanto pela saliva secretada pelas glândulas salivares como também por fluido gengival, microrganismos, células epiteliais descamadas e restos alimentares e é denominada de saliva total ou mista. A saliva total/mista tem na sua constituição cerca de 2500 proteínas das quais apenas 10% são de origem glandular (Pedersen et al., 2018).

Entre as proteínas mais relevantes, destacam-se os péptidos ricos em prolina, amilase, péptidos de defesa do hospedeiro, mucinas e anidrase carbónica (Marsh et al., 2016). Os

péptidos de defesa do hospedeiro apresentam múltiplas atividades na imunidade, sendo cruciais para a modulação de respostas imunes, cicatrização de feridas, regulação das populações microbianas residentes e preservação da harmonia entre as comunidades hospedeira e residente (Marsh et al., 2016). Vários estudos relataram que, devido à fraca atividade *in vitro* resultante da sua baixa concentração, não seria expectável que estes péptidos demonstrassem atividade na cavidade oral. Contudo, por estes componentes atuarem em sinergia com uma ampla gama de moléculas, conseguem atingir-se concentrações eficazes na cavidade oral (Marsh et al., 2016). A amilase é uma enzima responsável pela transformação de polissacáridos não solúveis em partículas de menores dimensões solúveis. Esta particularidade oferece benefícios, tais como a capacidade de dissolução de partículas de alimentos retidas nos dentes e a diminuição da disponibilidade de substratos para o desenvolvimento microbiano (Carpenter, 2013). Certas proteínas salivares têm afinidade à superfície dentária, como é o caso de proteínas ricas em prolina, estaterina e histatinas, e, como tal, ao potenciarem a concentração de cálcio junto ao esmalte, irão potenciar a remineralização (Farooq & Bugshan, 2020).

Como referido anteriormente, a saliva é constituída maioritariamente por água, mas também por componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os componentes inorgânicos mais prevalentes estão os iões bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), responsáveis pelos principais sistemas tampão da saliva. Pode ainda ser considerado como um terceiro sistema tampão, o sistema tampão proteico que atua em caudais muito baixos de saliva e com pH abaixo de 5,0 (Marsh et al., 2016). Aquando da presença de saliva não estimulada, os sistemas tampão relevantes são os sistemas bicarbonato e fosfato, contribuindo igualmente para a restituição do pH. Quando ocorre o aumento da taxa de secreção salivar, verifica-se o aumento da concentração de bicarbonato e a diminuição da concentração de potássio, sendo então o sistema bicarbonato responsável por mais de 90% da capacidade tampão nesta fase. Este último sistema, por ter a capacidade de transformar o dióxido de carbono dissolvido na cavidade oral para a sua fase volátil, permite que o seu carácter ácido seja eliminado (Pedersen et al., 2018). A saliva atua também como veículo de transporte de iões como cálcio, fosfato e flúor. A presença destes elementos na saliva permite a manutenção da supersaturação dos mesmos no esmalte, impedindo a desmineralização durante os períodos a pH fisiológico na cavidade oral (~pH 7). Aquando da descida do pH abaixo do nível crítico (pH 5,5), ocorre um desequilíbrio na saturação de iões e conseqüente perda mineral, a desmineralização.

Quando se restabelece a neutralidade, a saliva adquire a capacidade de promover a remineralização (Abou Neel et al., 2016; Farooq & Bugshan, 2020; Shimomura-Kuroki et al., 2020).

Outra das funções da saliva reside na sua participação na formação da película adquirida. Logo após a erupção dentária ou higienização, inicia-se a formação de uma película na superfície dentária por adsorção de proteínas e glicoproteínas salivares denominada de “película adquirida” (Marsh et al., 2016; Pitts et al., 2017). Esta é composta por componentes derivados da saliva (glicoproteínas, fosfoproteínas, lípidos, estaterina, amilase, péptidos ricos em prolina, MUC5B, lisozima, lactoperoxidase e fatores defensores do hospedeiro), por componentes bacterianos (glicotransferases e glucano) e por componentes do líquido gengival (Marsh et al., 2016). Esta película adquirida tem como função proteger a superfície dentária ao impedir a difusão ácida. O fosfato de cálcio incorporado na película tem elevada solubilidade e surge em altas concentrações, como tal, atua como mineral sacrificial, impedindo que o fosfato de cálcio da superfície dentária se dissolva aquando do ataque ácido, o que leva à redução da desmineralização (Carpenter, 2013; Abou Neel et al., 2016; Farooq & Bugshan, 2020). Para além de ter uma função protetora de barreira física, também determina a adesão e colonização inicial e a composição da microbiota oral residente (Pitts et al., 2017; Pedersen et al., 2018). Esta microbiota residente concede inúmeras vantagens ao hospedeiro entre as quais se destacam o facto de regular negativamente as respostas pró-inflamatórias, ter características antimicrobianas, e de reduzir a colonização por parte de micro-organismos exógenos, possivelmente cariogénicos (Marsh et al., 2016).

O potencial protetor da saliva tem sido descrito na literatura como um fator biológico de extrema importância o que suscita elevado interesse no seu estudo e no seu potencial remineralizador, consoante a sua constituição. No entanto, a saliva humana que se encontra fora da cavidade oral tende a sofrer alterações na sua constituição, o que leva à alteração das suas propriedades. Isto, juntamente com a dificuldade de colheita, faz com que, para a realização de estudos *in vitro*, seja geralmente utilizada saliva artificial para simular as condições orais (Ionta et al., 2014). A saliva artificial pode apresentar diferentes formulações, semelhantes à da saliva natural, sendo fiel no seu conteúdo mineral e diferindo no seu conteúdo proteico. Não obstante, a sua utilização em estudos *in-vitro* tem-se demonstrado comum (Mutahar et al., 2017).

## 1.5. FLÚOR

O flúor é reconhecido como sendo o elemento remineralizante clinicamente mais utilizado. É extensivamente utilizado pela sua eficácia na prevenção da cárie dentária por inibir a desmineralização, promover a remineralização de lesões iniciais e também pelo seu efeito bacteriostático (Xin et al., 2016; Wu et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020). A administração deste elemento na cavidade oral pode ter diversos veículos como a aplicação tópica por via de pastas, elixires, vernizes ou géis e também pela fluoretação das águas (Xin et al., 2016; Shahmoradi et al., 2017; Wu et al., 2019).

A eficácia do ião flúor na redução da desmineralização da estrutura mineral do esmalte deve-se ao facto de, quando aplicado em altas concentrações, ter a capacidade de se ligar às superfícies dos cristais de hidroxiapatite, formando fluoreto de cálcio. Este elemento resultante vai ter um papel sacrificial. Assim, aquando de uma posterior descida do pH, este fluoreto será libertado, reduzindo a desmineralização do esmalte e a suscetibilidade à cárie (Shahmoradi et al., 2017).

O ião flúor presente na saliva tem também a capacidade de preencher ou substituir o ião hidroxilo na estrutura cristalina da hidroxiapatite, transformando em fluoroapatite, uma estrutura mais estável e mais resistente a ataques ácidos pela sua menor solubilidade (Shahmoradi et al., 2017; Wu et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020). É de destacar que pode não ocorrer a substituição completa dos iões de hidroxilos pelos iões de flúor. No entanto, por menor que a mesma seja, proporciona uma redução significativa da incidência de cárie e um aumento da remineralização, o que permite a preservação da estrutura mineral e integridade mecânica do esmalte (Shahmoradi et al., 2017; Wu et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020).

O flúor tem um papel determinante na remineralização e prevenção da desmineralização, todavia, por si só é insuficiente. A cadeia de fluorapatite é composta por dois iões fluor, 10 iões de cálcio e 6 iões de fosfato. Como tal, a biodisponibilidade de iões de cálcio e fosfato é crucial no processo de remineralização, e a sua ausência torna-se limitante (Shahmoradi et al., 2017; Wu et al., 2019).

Apesar do flúor ser considerado o *gold standard* na prevenção de cáries, o seu papel começa a ser questionado. Quando este elemento começou a ser introduzido como agente de prevenção da cárie dentária, observou-se uma diminuição desta doença a nível

mundial. No entanto, atualmente, essa redução da incidência tem desacelerado, o que se pode justificar pela alteração dos hábitos alimentares, que incluem alimentos ricos em hidratos de carbono fermentáveis. Como o flúor tem um efeito dose-dependente, uma resolução para esse problema poderia passar pelo aumento da sua concentração nos produtos de higiene oral. Porém, quando administrado em grandes quantidades, este elemento pode provocar toxicidade. Isto faz com que este elemento, sozinho, seja insuficiente como agente remineralizante num ambiente altamente cariogénico (Philip, 2019).

## **I.6. ESTRÔNCIO**

O estrôncio é um elemento químico pertencente ao grupo dos metais alcalinoterrosos. A sua presença no corpo humano provém principalmente da água e da alimentação (cereais e marisco), mas também pode entrar no corpo humano através dos pulmões e da pele. A maior parte deste elemento é absorvido pelos ossos e dentes, tendo uma excelente capacidade de ligação à sua fase mineral, a hidroxiapatite (Pilmane et al., 2017; Wang et al., 2019). Devido à semelhança das propriedades deste elemento com as do cálcio, a sua aplicação na cavidade oral tem vindo a ser estudada (Yassen et al., 2012; Wang et al., 2019).

Estudos sugerem que quando a concentração de estrôncio é mais elevada na água potável a sua presença no esmalte aumenta. O mesmo acontece aquando da utilização de pastas de dentes com estrôncio na sua constituição, podendo ser uma vantagem na prevenção de cáries (Yassen et al., 2012; Wang et al., 2019). Pela sua semelhança com o cálcio, este elemento tem a capacidade de reagir com os iões fosfato presentes no esmalte. (Wang et al., 2019).

Os efeitos do ião estrôncio variam consoante a sua concentração (Yassen et al., 2012; Wang et al., 2019). Num estudo de Wang et al (2019) foi reportado que a adição de certas concentrações de estrôncio podem reduzir efetivamente o impacto erosivo da solução acídica na superfície do esmalte, resultando numa diminuição da redução da dureza, da dissolução de iões de fosfato na solução e da rugosidade de superfície do esmalte quando sujeito a ataques ácidos. No entanto, os mesmos autores presumem que, a baixas concentrações, o ião estrôncio perde a capacidade de gerar uma camada protetora, levando ao aumento da dissolução de iões fosfato e à redução da dureza de superfície.

O estrôncio tem a capacidade de reforçar a estrutura dentária pela substituição de iões de cálcio, transformando a hidroxiapatite numa apatite rica em estrôncio, resultando numa camada ácido-resistente na superfície do dente (Kaga et al., 2019).

Visto que, tanto o flúor como o estrôncio têm demonstrado efeitos significativos na redução da cárie, colocou-se a hipótese da combinação destes dois elementos. Esta combinação, a concentrações específicas, demonstrou um forte efeito anticariogénico e um aumento da capacidade de remineralização (Yassen et al., 2012; Kaga et al., 2019).

## **I.7. MAGNÉSIO**

O magnésio, à semelhança do estrôncio, é um elemento químico que pertence ao grupo dos metais alcalinoterrosos. Este mineral é abundante nos tecidos mineralizados do corpo humano e a sua depleção pode levar a um osso alveolar fragilizado, incapacidade de ativação da vitamina D, diminuição da capacidade anti-inflamatória, inflamação e hipertrofia gengival, atrasos na erupção dentária, entre outros (Abdallah et al., 2016; Uwitonze et al., 2020). Encontra-se presente no esmalte dentário, principalmente na forma de fosfato de magnésio, em concentrações que podem variar entre 0,25 e 0,56% e é um elemento que afeta a qualidade e anatomia dos tecidos duros dos dentes, sendo essencial para o desenvolvimento adequado da estrutura dentária (Klimuszko et al., 2018).

A concentração média de magnésio encontrada em dentes saudáveis é estatisticamente superior à encontrada em dentes não saudáveis. Este elemento fornece ao dente uma maior capacidade de resistir à deterioração por conferir maior dureza à estrutura do esmalte. É também essencial no processo de remineralização, participando na formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatite (Uwitonze et al., 2020).

Os iões de magnésio têm a capacidade de substituir os iões de cálcio na hidroxiapatite por processos de dissolução e remineralização, alterando as propriedades físicas e óticas do dente (Abdallah et al., 2016; Wang et al., 2019). Esta substituição leva à inibição do crescimento dos cristais de apatite. A diminuição da cristalinidade e do tamanho dos cristais de esmalte resulta no aumento da sua microdureza e resistência à fratura, sem provocar alterações significativas no peso, volume, densidade e porosidade (Abdallah et al., 2016; Klimuszko et al., 2018). A alteração destas propriedades pode justificar a importância do magnésio na prevenção da cárie dentária (Uwitonze et al., 2020).

## 1.8. ZINCO

O zinco é um elemento químico que pertence aos metais de transição, na tabela periódica. A principal fonte de zinco no organismo provém da alimentação e deve variar entre 3 a 15mg diárias, consoante a idade. Este elemento vestigial está presente em mais de 300 enzimas e proteínas, tornando a sua presença essencial para o funcionamento normal do organismo (Białek & Zyska, 2014).

Na cavidade oral, o zinco está usualmente presente na placa dentária, saliva e tecidos duros, como o esmalte, dentina e cimento. O zinco está presente em maiores concentrações na camada superficial do esmalte em relação às camadas mais profundas e, dependendo da camada, a sua concentração pode variar entre 430 e 2100 ppm. Tem sido observado que esta concentração tende a aumentar ao longo da vida, o que sugere que ocorra a incorporação do zinco na estrutura do esmalte (Fatima et al., 2016). Atualmente, o zinco pode encontrar-se incorporado em inúmeros produtos de higiene oral, como pastas e vernizes, nas formas de cloreto de zinco, citrato de zinco, sulfato de zinco e lactato de zinco (Fatima et al., 2016).

O ião zinco pode ser facilmente incorporado na rede de apatite, por substituição do cálcio ou por adsorção na superfície da rede cristalina (Lippert, 2012). Este elemento exerce um papel na modulação da cristalinidade da apatite, resultando na redução da solubilidade da mesma, ajudando a prevenir a desmineralização (Lippert, 2012; Fatima et al., 2016; Creeth et al., 2018). A certas concentrações, o zinco é capaz de favorecer a remineralização do esmalte, ao atuar sinergicamente com o flúor. No entanto, por vezes pode ter o efeito contrário (Lippert, 2012; Creeth et al., 2018).

O zinco apresenta também atividade antimicrobiana contra inúmeras bactérias. É de destacar a sua atividade contra *Streptococcus mutans*, uma das principais bactérias responsáveis pelo processo de cárie e interrupção do processo de glicólise, aquando da fermentação de açúcares, impedindo a descida do pH e conseqüente desmineralização. O zinco tem também a capacidade de inibir a produção de glicosiltransferases nas bactérias, o que afeta a colonização de patógenos bacterianos e o subsequente desenvolvimento e acumulação de placa dentária (Fatima et al., 2016). Este elemento diminui também a halitose por inibir a produção de compostos sulfurosos voláteis (Fatima et al., 2016). Por estas razões, o zinco é bastante utilizado em dentífricos pelo seu poder antibacteriano,

ajudando a controlar a formação de placa e de cálculo em cerca de 30% e pelas suas propriedades contra a halitose (Lippert, 2012; Fatima et al., 2016; Creeth et al., 2018).

## **I.9. CÁLCIO**

O cálcio é um elemento essencial na constituição do órgão dentário, sendo o principal ião presente na estrutura cristalina do esmalte totalmente mineralizado (Nurbaeva et al., 2017). Como referido, o cálcio é um dos principais constituintes do esmalte, na forma de fosfato de cálcio (Reynolds, 1997). Para que ocorra remineralização é crucial que haja uma elevada biodisponibilidade do ião cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), visto que o mesmo é dissolvido aquando da desmineralização. Este ião pode ser encontrado na constituição da saliva, mas a sua quantidade depende do estado de saúde, estilo de vida e hábitos alimentares (Shen et al., 2018).

Segundo Shen et al. (2018) a presença de cálcio, associado ao fosfato, em pastas fluoretadas, aumenta o potencial de remineralização de lesões cariosas sub-superficiais.

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

Constitui objetivo deste projeto, medir e comparar os valores de microdureza de superfície de esmalte após a incorporação de diferentes metais divalentes em lesões de cárie dentária, induzidas artificialmente.

## **I.11. HIPÓTESES DE ESTUDO**

Colocamos como hipóteses de estudo, as seguintes:

1. As amostras desmineralizadas e as amostras desmineralizadas e tratadas com catiões monovalentes não apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza da superfície do esmalte;
2. A desmineralização seguida de remineralização na presença de iões cálcio como único metal divalente presente origina valores de microdureza da superfície do esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas;
3. A desmineralização seguida de remineralização na presença de iões estrôncio, iões magnésio ou iões zinco apresentam sempre valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas;

4. Os valores médios de microdureza de superfície do esmalte de amostras desmineralizadas artificialmente e submetidas a um tratamento de remineralização com saliva artificial contendo, como fonte de cátions, um metal divalente, apresentam diferenças significativas consoante esse metal é o cálcio, o estrôncio, o magnésio ou o zinco.



## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **II.1. TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Foi efetuado um estudo experimental e analítico em 18 molares humanos, intactos, livres de cáries e fraturas, obtidos de sujeitos anónimos e preservados até ao seu uso, no máximo durante 6 meses. A partir dos 18 dentes foram obtidos 70 fragmentos de esmalte de 4x3 mm que foram aleatoriamente distribuídos em 7 grupos de observação: Grupo A (n=10); Grupo B (n=10); Grupo C (n=10); Grupo D (n=10); Grupo E (n=10); Grupo F (n=10); Grupo G (n=10). Estes grupos foram sujeitos a desmineralização e posterior remineralização por imersão em soluções com diferentes catiões.

Foram tidos como critérios de inclusão: 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 tenham sido submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio ou outros) ou eletromagnéticos (radiação laser).

Todas as amostras foram submetidas à análise quantitativa de avaliação dos valores de microdureza de superfície de esmalte, através da técnica de Vickers e os resultados tratados estatisticamente por SPSS (IBM SPSS Statistics) versão 24.

### **II.2. LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz, entre Julho e Agosto de 2020.

### **II.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Universitário Egas Moniz e os dentes fornecidos pelo banco de dentes da Clínica Universitária Egas Moniz (Proc.Interno nº809).

#### **II.4. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Após a seleção da amostra procedeu-se à limpeza dos dentes com o objetivo de eliminar restos de tecidos moles e tártaro, por curetagem manual com curetas de Gracey (Cardoso et al., 2016; Wang et al., 2019). De seguida, estes foram colocados numa solução de cloramina tri-hidratada a 1% durante 7 dias à temperatura de 4°C. Posteriormente, foram colocados em água desionizada até à sua utilização (Eimar et al., 2012; Baumann et al., 2017).

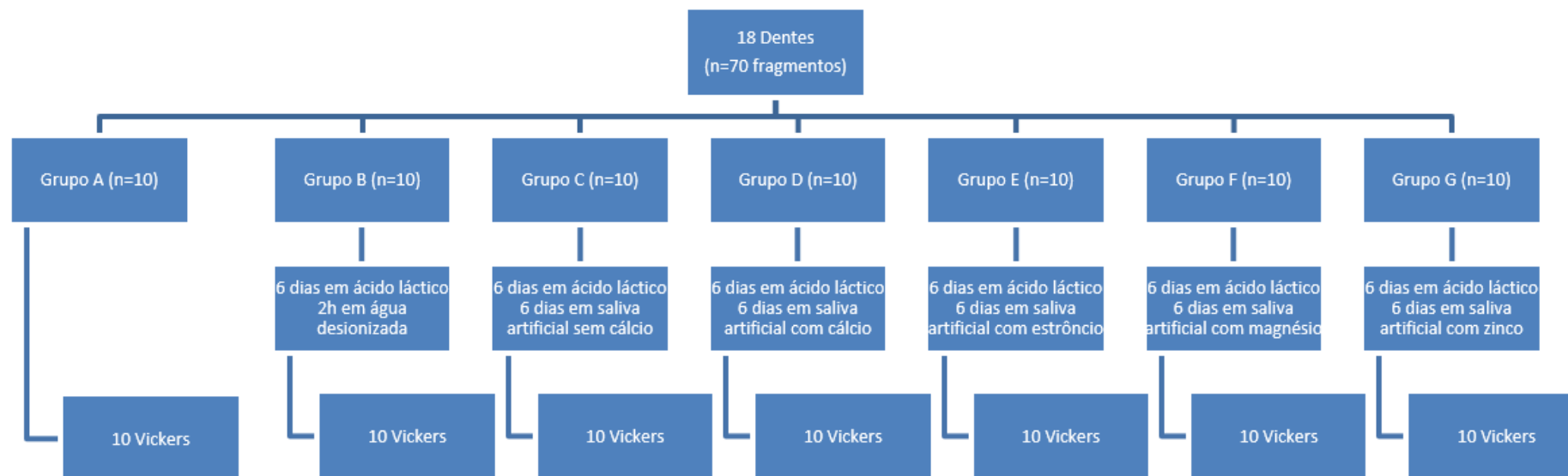


Figura 2 Desenho do estudo

Posteriormente, os fragmentos foram polidos sequencialmente com lixas de granulação 320, 600 e 1200, na máquina polidora LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca – figura 3), com refrigeração para evitar o sobreaquecimento, a uma velocidade de 40 rpm (Yassen et al., 2012; Shahmoradi et al., 2017; Wang et al., 2019).



Figura 3 Aparelho usado para o polimento das amostras, LaboPol- 4®,

De seguida, procedeu-se ao seccionamento das amostras, realizadas com um micrótomato de tecidos duros Accuton 50 (Struers A7S, Ballerup, Dinamarca – figura 4), com irrigação com água e a uma velocidade de 4 rpm x 100.



Figura 4 Micrótomato de tecidos duros Accuton 50 (Struers A7S, Ballerup, Dinamarca)

Cada dente foi inicialmente colado a um suporte acrílico com cera colante (Sticky Wax, Kemdent®, Wiltshire, Inglaterra) (figura 5*i*) e foram desenhadas as linhas de corte (figura 5 *ii-iv*). Seguiu-se a secção dos mesmos, inicialmente no sentido mesio-distal, tendo o sulco central como orientação, obtendo, assim dois fragmentos de cada dente, um vestibular e um palatino/lingual. Cada um dos fragmentos obtidos foi novamente seccionado no sentido vestibulo-palatino em dois fragmentos. Finalmente procedeu-se à separação da porção coronal da porção radicular, tendo como linha orientadora a linha amelo-cementária (JAC). A partir de cada dente, obtiveram-se 4 fragmentos com as dimensões de 4x3 mm. (Eimar et al., 2012; Cardoso et al., 2016; Shahmoradi et al., 2017; Wang et al., 2019)

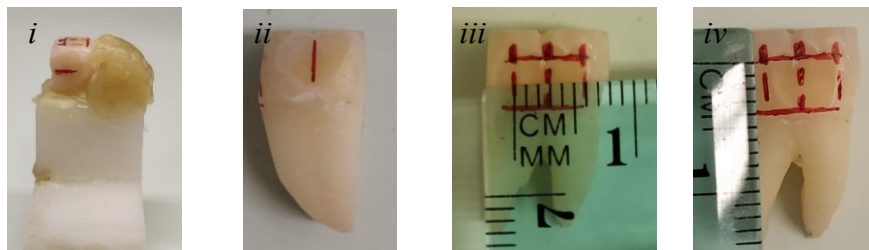


Figura 5 i- dente colado em bloco acrílico com cera colante; ii - marcação da linha do sulco central; iii – marcação das linhas dos 3 mm; iv - marcação da linha da JAC, linha 4 mm acima da JAC

## II.5. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES REMINERALIZANTES

### II.5.1. Saliva artificial sem metais divalentes

Foi preparada uma solução de saliva artificial sem adição de metais divalentes 1,25x concentrada (figura 6) tendo por base o protocolo descrito por Urban et al. (2009). Esta preparação apresentava um valor de pH 7 e continha 80,1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (sulfito de sódio nano-hidratado), 8,55 mM de  $\text{NaCl}$  (cloreto de sódio), 6,7 mM de  $\text{KCl}$  (cloreto de potássio), 2,64 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  (di-hidrogenofosfato de sódio 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). Com isto, foi possível utilizar esta preparação de saliva artificial, adicionando a cada grupo apenas o volume de solução contendo cada um dos metais que se pretendia estudar. No grupo C (saliva artificial sem metais divalentes), em vez de serem adicionados metais

divalentes, foi adicionada água desionizada. A adição das soluções contendo os metais divalentes ou água desionizada provocou diluição da saliva artificial ultra-concentrada resultando numa solução final 1x concentrada que apresentavam 64,08  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 6,84 mM de  $\text{NaCl}$ , 5,36 mM de  $\text{KCl}$ , 2,11 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 16,65 mM de Ureia e 2,88 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

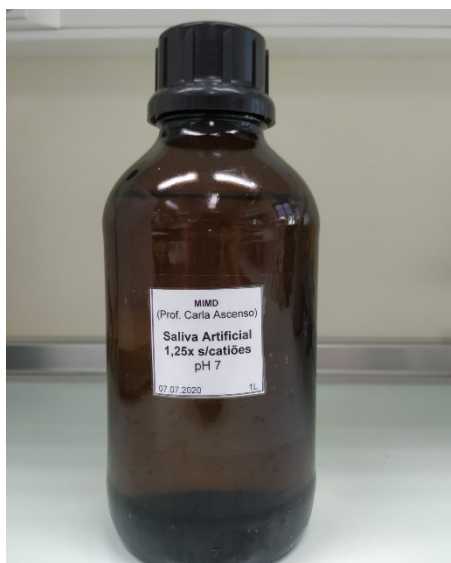


Figura 6 Solução de Saliva Artificial, a pH 7, sem metais divalentes utilizada na preparação das soluções remineralizantes

### **II.5.2. Saliva artificial com metais divalentes**

Os grupos D, E, F e G foram imersos em soluções de saliva artificial contendo os metais divalentes em estudo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , respetivamente.

Estas soluções foram individualmente preparadas por adição de 6 ml de cloreto de cálcio (27 mM de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 24 ml de água desionizada – grupo D –, 6 ml de cloreto de estrôncio (27 mM de  $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a 24 ml de água desionizada – grupo E –, 6 ml de cloreto de magnésio (27 mM de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a 24 ml de água desionizada – grupo F – e 6 ml de cloreto de zinco (27 mM de  $\text{ZnCl}_2$  anidro) a 24 ml de água desionizada – grupo G. As soluções finais apresentavam então 5,4 mM de cada elemento em estudo: cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio, cloreto de magnésio e cloreto de zinco.

As figuras abaixo mostram os reagentes utilizados na preparação das soluções. A figura 7, referente cloreto de cálcio (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , grupo D. A figura 8, referente cloreto de estrôncio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Sr}^{2+}$  (Grupo E), a figura 9, referente ao cloreto de magnésio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Mg}^{2+}$  (Grupo F), e a figura 10, referente ao cloreto de zinco (Chem-Lab NV, Zedelgem) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Zn}^{2+}$  (Grupo G).

Cloreto de cálcio (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Ca}^{2+}$  (Grupo D).

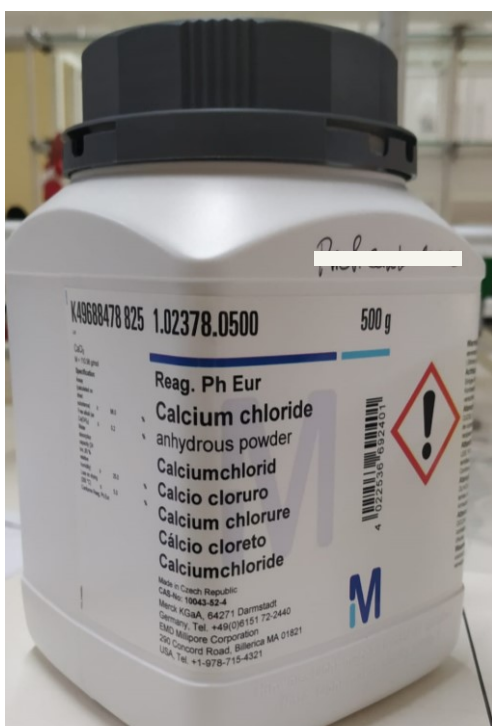


Figura 7 Cloreto de cálcio (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Ca}^{2+}$  (Grupo D).

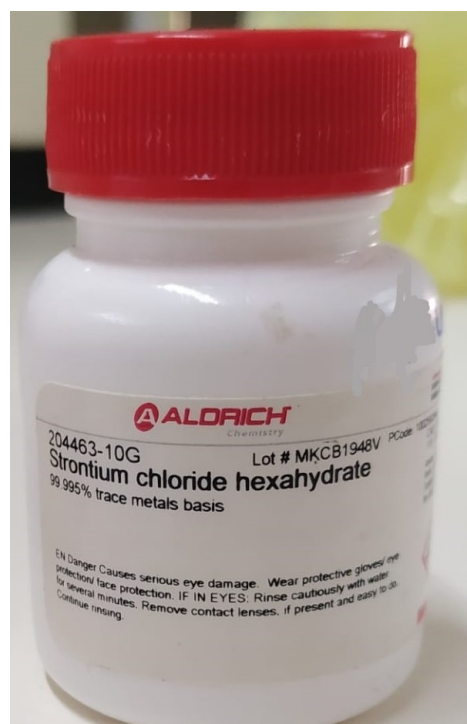


Figura 8 Cloreto de estrôncio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Sr}^{2+}$  (Grupo E).

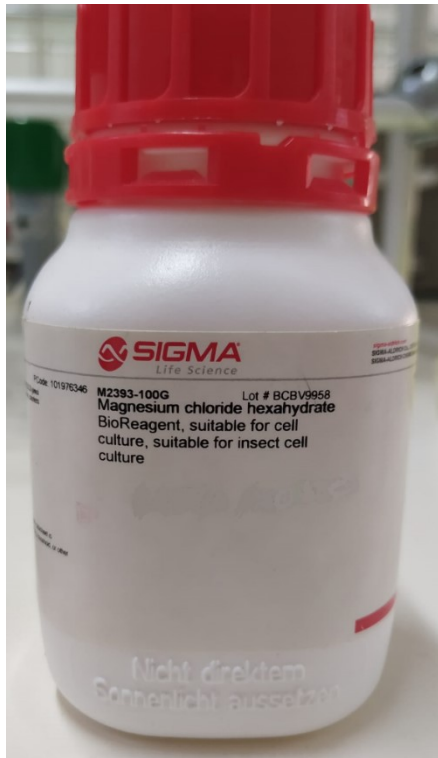


Figura 9 Cloreto de magnésio hexahidratado (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $Mg^{2+}$  (Grupo F).

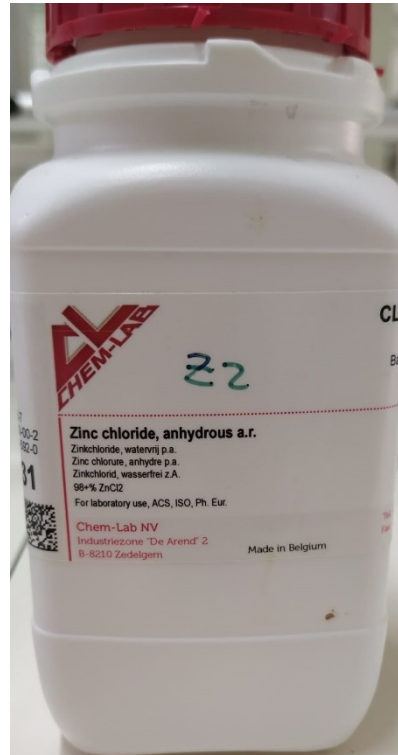


Figura 10 Cloreto de zinco (Chem-Lab NV, Zedelgem) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $Zn^{2+}$  (Grupo G).

## II.6. DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO

### II.6.1. Indução de lesões artificiais de cárie

Uma vez preparadas as amostras, iniciou-se a desmineralização das mesmas. Em seis dos grupos de estudo (B, C, D, E, F e G) foram induzidas lesões artificiais de cárie dentária por tratamento com solução tampão de ácido láctico 50 mM a pH 5,5 (figura 11), durante 6 dias à temperatura de 37°C (Lippert, 2012; Cardoso et al., 2016). Optou-se pela utilização de ácido láctico por ser um dos principais contribuintes para o processo de desmineralização (Skucha-Nowak et al., 2015). Esta solução foi renovada diariamente (Elkassas & Arafa, 2014).

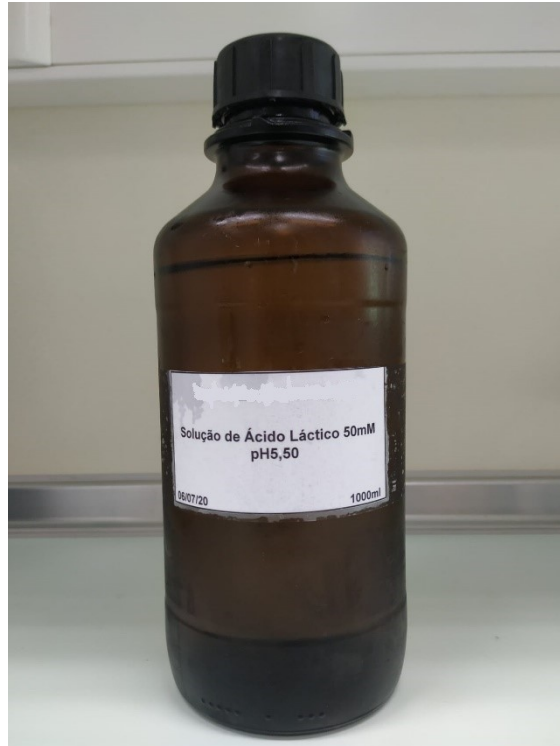


Figura 11 Solução de Ácido Láctico 50mM, pH5.50, utilizado na desmineralização das amostras

### **II.6.2. Remineralização com saliva artificial sem e com metais divalentes**

Após o término da desmineralização, iniciou-se o tratamento das amostras com diferentes agentes remineralizantes. As amostras foram aleatoriamente distribuídas por grupos e estes foram tratados por imersão em soluções de saliva artificial alterada com distintas iões:

#### Grupo A (n=10)

Fragmentos de esmalte são;

#### Grupo B (n=10)

Em 10 fragmentos induziu-se lesões artificiais de cárie dentária de acordo com o protocolo desenvolvido por Cardoso et al. (2016), por tratamento com solução tampão de ácido láctico 50 mM, pH 5 durante 6 dias, seguido de imersão em água destilada durante 2 horas;

Grupo C (n=10)

Em 10 fragmentos efetuou-se o procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos mesmos em saliva artificial alterada, sem cloreto de cálcio, durante 6 dias e renovando a solução a cada dia. No 7º dia, a fim de parar o processo de remineralização, procedeu-se à imersão dos fragmentos em água desionizada, por duas horas, à temperatura ambiente.

Grupo D (n=10)

Em 10 fragmentos efetuou-se o procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos mesmos em saliva artificial contendo 5,4 mM de cloreto de cálcio, durante 6 dias e renovando a solução a cada dia. No 7º dia, a fim de parar o processo de remineralização, procedeu-se à imersão dos fragmentos em água desionizada, por duas horas, à temperatura ambiente.

Grupo E (n=10)

Em 10 fragmentos efetuou-se o procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos mesmos em saliva artificial alterada, por substituição do cloreto de cálcio por 5,4 mM de cloreto de estrôncio, durante 6 dias e renovando a solução a cada dia. No 7º dia, a fim de parar o processo de remineralização, procedeu-se à imersão dos fragmentos em água desionizada, por duas horas, à temperatura ambiente.

Grupo F (n=10)

Em 10 fragmentos efetuou-se o procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos mesmos em saliva artificial alterada, por substituição do cloreto de cálcio por 5,4 mM de cloreto de magnésio, durante 6 dias e renovando a solução a cada dia. No 7º dia, a fim de parar o processo de remineralização, procedeu-se à imersão dos fragmentos em água desionizada, por duas horas, à temperatura ambiente.

Grupo G (n=10)

Em 10 fragmentos efetuou-se o procedimento idêntico ao do grupo B, seguido de imersão dos mesmos em saliva artificial alterada, por substituição do cloreto de cálcio por 5,4 mM de cloreto de zinco, durante 6 dias e renovando a solução a cada dia. No 7º dia, a fim de

parar o processo de remineralização, procedeu-se à imersão dos fragmentos em água desionizada, por duas horas, à temperatura ambiente.

## II.7. MEDIÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

As amostras foram submetidas à análise quantitativa de avaliação dos valores de microdureza de superfície de esmalte, através da técnica de Vickers (HSV-30®, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão). O indentador de diamante Vickers (figura 12) exerce uma força de 4.903 N durante 15 segundos (Baumann et al., 2017). Após indentação aparecerá um losango. Devido às variações dos valores de microdureza na superfície de esmalte, em cada fragmento foram realizadas 5 indentações. O perfil de microdureza de cada fragmento foi obtido calculando a média e o desvio padrão das 5 leituras (Eimar et al., 2012; Cardoso et al., 2016). Todas as leituras foram realizadas pelo mesmo examinador usando a mesma máquina calibrada de forma a minimizar possíveis erros (Elkassas & Arafa, 2014).

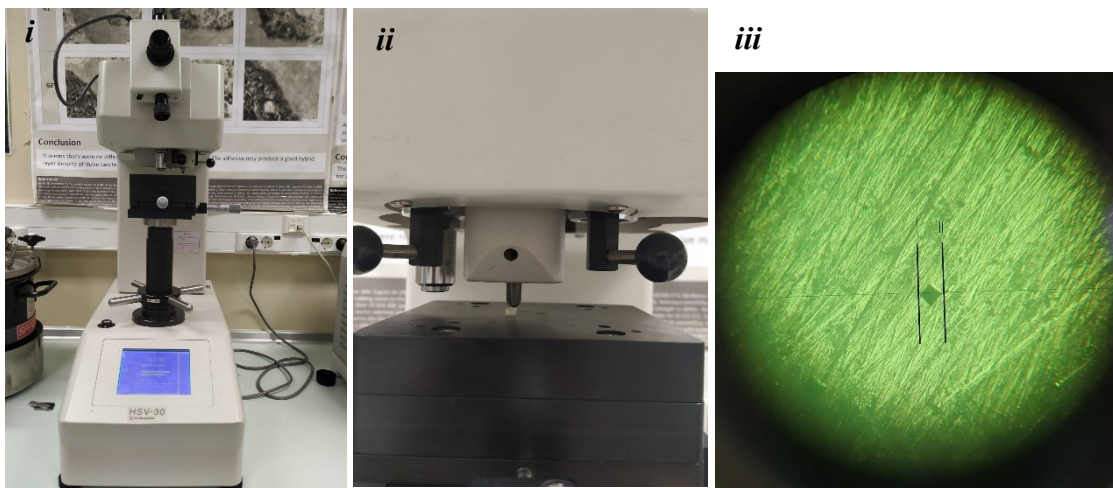


Figura 12 Testes de Microdureza de Vickers: **i**: Máquina utilizada para medir a dureza de Vickers - HSV-30®, Shimadzu Corporation; **ii**: Máquina a realizar a indentação no fragmento; **iii**: Visualização do losango criado pela indentação.

Após a medição dos valores de microdureza de Vickers de todas as amostras, procedeu-se à análise estatística com o *software* IBM SPSS Statistics. Aplicou-se o teste ANOVA (ANalysis Of VAriance) a um fator com um grau de confiança de 95%, apropriado à comparação de um total de sete grupos independentes.



### III. RESULTADOS

Todas as amostras tratadas foram submetidas a análise de Vickers de forma a avaliar a microdureza da superfície de esmalte. Cada grupo de estudo foi constituído por 10 fragmentos de esmalte e, em cada um, foram realizadas 5 indentações de forma a diminuir o erro relativo à heterogeneidade da superfície do esmalte. A cada fragmento foi atribuído o valor da média das 5 indentações realizadas, sendo conferido a cada grupo 10 valores médios de dureza (N=10).

Na tabela abaixo, constam as médias e desvios padrão obtidos após a análise dos valores de microdureza de Vickers em cada grupo.

Tabela 1 Estatística descritiva dos valores médios das médias de microdureza de Vickers obtidos para cada grupo de estudo, obtida com recurso ao *software* SPSS.

|                | <b>N</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|----------------|----------|--------------|----------------------|
| <b>Grupo A</b> | 10       | 468,560      | 3,7592               |
| <b>Grupo B</b> | 10       | 258,680      | 4,6982               |
| <b>Grupo C</b> | 10       | 376,860      | 6,3112               |
| <b>Grupo D</b> | 10       | 398,540      | 8,1644               |
| <b>Grupo E</b> | 10       | 362,340      | 6,4684               |
| <b>Grupo F</b> | 10       | 440,480      | 7,5820               |
| <b>Grupo G</b> | 10       | 310,440      | 6,4338               |
| <b>Total</b>   | 70       | 373,700      | 67,7811              |

O grupo A, referente ao grupo controlo, apresentou um valor médio de  $468,560 \pm 3,7592$  HV. Este será o valor base, alusivo ao esmalte são, a partir do qual se vão comparar as variações de dureza consoante o tratamento realizado.

O grupo B, referente ao grupo que sofreu apenas desmineralização, apresentou um valor médio de dureza de  $258,680 \pm 4,6982$  HV, o mais baixo de todo o estudo, o que era expectável por não ter sido submetido a nenhum tratamento de remineralização subsequente.

O grupo C, referente ao grupo que sofreu desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial sem iões metálicos divalentes, apenas com catiões monovalentes, apresentou um valor médio de dureza de  $376,86 \pm 6,3112$  HV.

O grupo D, referente ao grupo que sofreu desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial com cloreto de cálcio, apresentou um valor médio de dureza de  $398,540 \pm 8,1644$  HV.

O grupo E, referente ao grupo que sofreu desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial com cloreto de estrôncio, apresentou um valor médio de dureza de  $362,540 \pm 6,4684$  HV.

O grupo F, referente ao grupo que sofreu desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial com magnésio, apresentou um valor médio de dureza de  $440,480 \pm 7,5820$  HV. Aparentemente, este foi o grupo que registou maiores valores de microdureza de Vickers dos grupos que sofreram remineralização.

O grupo G, referente ao grupo que sofreu desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial com cloreto de zinco, apresentou um valor médio de dureza de  $310,440 \pm 6,4338$  HV.

Com vista a aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator, o teste paramétrico mais adequado à comparação dos valores médios de variáveis escalares entre mais de dois grupos com distribuições normais, o primeiro passo consistiu na verificação dos pressupostos para aplicação deste teste, nomeadamente a independência dos grupos de estudo, a normalidade da amostra e a homogeneidade das variâncias.

Para a análise destes parâmetros foram realizados testes de hipótese em que, para cada um deles, foram desenhadas uma hipótese nula ( $H_0$ ), hipótese esta que foi submetida a teste, e uma hipótese alternativa ( $H_1$ ). Por estes testes serem realizados com um nível de confiança de 95%, consoante o nível de significância obtido (inferior ou superior a 0,05 ( $p > 0,05$ ))  $H_0$  é ou não aceite, respetivamente.

No que toca à independência da amostra, esta foi assegurada tanto pelo desenho de estudo realizado como pela distribuição aleatória dos fragmentos de esmalte por grupo. Sendo os grupos tratados e analisados separadamente, foi então garantido que os resultados obtidos em cada um deles não estivessem dependentes entre si.

Para se analisar a normalidade da amostra de cada grupo foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, apropriado a amostras de dimensão pequena ( $N=10$ ). Para um nível de significância de 5%, este teste considera as seguintes hipóteses:

$H_0$ : O grupo X apresenta valores de microdureza de Vickers normalmente distribuídos;

$H_1$ : O grupo X não apresenta valores de microdureza de Vickers normalmente distribuídos.

Na tabela abaixo pode observar-se o resultado do teste Shapiro-Wilk onde se verifica que, em todos os grupos, o valor de significância é superior a 0,05 ( $p>0,05$ ). Como tal, pode aferir-se que a hipótese nula é aceite. Todos os grupos apresentam uma distribuição normal.

Tabela 2 Resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk dos grupos de estudo.

| Grupos  | Shapiro-Wilk |    |       |
|---------|--------------|----|-------|
|         | Estatística  | gl | Sig.  |
| Grupo A | 0,929        | 10 | 0,440 |
| Grupo B | 0,961        | 10 | 0,800 |
| Grupo C | 0,966        | 10 | 0,854 |
| Grupo D | 0,929        | 10 | 0,435 |
| Grupo E | 0,876        | 10 | 0,117 |
| Grupo F | 0,899        | 10 | 0,213 |
| Grupo G | 0,876        | 10 | 0,117 |

Outro requisito para aplicação do teste ANOVA consiste na homogeneidade de variâncias, a qual foi analisada pelo teste de Levene aos sete grupos de estudo. Para aplicação deste teste consideraram-se as hipóteses:

$H_0$ : Os grupos de estudo apresentam homogeneidade de variâncias;

$H_1$ : Os grupos de estudo não apresentam homogeneidade de variâncias.

A tabela 3 apresenta os resultados do teste de Levene onde se pode ler que a significância obtida foi 0,054 ( $p>0,05$ ), ou seja, podemos aceitar a hipótese nula. Assim, conclui-se que as variâncias dos grupos de estudo são homogêneas.

Tabela 3 Resultados da análise de homogeneidade de variância dos grupos de estudo.

| Estadística de Levene | gl1 | gl2 | Sig.  |
|-----------------------|-----|-----|-------|
| 2,200                 | 6   | 63  | 0,054 |

Verificados os pressupostos anteriormente referidos pode então realizar-se o teste ANOVA a um fator, para determinar a existência de diferenças entre as médias e ainda quais as médias que diferem.

Foram consideradas as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: As médias dos valores médios dos grupos não diferem significativamente;

H<sub>1</sub>: As médias dos valores médios dos grupos diferem significativamente.

Tabela 4 Resultados do teste ANOVA a um fator obtido para um intervalo de confiança de 95%.

|              | Soma dos Quadrados | gl | Quadrado Médio | F        | Sig.  |
|--------------|--------------------|----|----------------|----------|-------|
| Entre Grupos | 314454,768         | 6  | 52409,128      | 1294,442 | 0,000 |
| Nos grupos   | 2550,732           | 63 | 40,488         |          |       |
| Total        | 317005,500         | 69 |                |          |       |

Na tabela acima, são apresentados os resultados obtidos após realização do teste ANOVA a um fator. Este mostra uma significância de 0,001 ( $P < 0,05$ ) o que indica a aceitação da hipótese alternativa: há diferenças significativas nos valores de microdureza entre grupos.

Uma vez que os resultados do teste ANOVA a um fator levam à exclusão da hipótese nula, que indica a existência de diferenças significativas entre pelo menos dois pares de grupos, o passo seguinte consistiu na aplicação de um teste de comparações múltiplas de modo a comparar valores médios de pares de grupos e determinar quais os grupos que apresentam diferenças significativas. Para tal, aplicou-se o teste de Bonferroni, apropriado a este tipo de análise, no caso dos grupos apresentarem uma dimensão pequena e estar validada a homogeneidade das variâncias.

A tabela abaixo mostra os resultados do teste de Bonferroni. Aqui, para um nível de confiança de 95%, todos os pares de grupos demonstraram valores de significância

inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ), indicando a presença de diferenças significativas entre todos os grupos estudados.

Tabela 5 Resultado do teste de comparações múltiplas através da análise de Bonferroni entre todos os grupos de estudo.

| (I) Grupos | (J) Grupos | Diferença média (I-J)  | Erro Padrão | Sig.  | Intervalo de Confiança 95% |                 |
|------------|------------|------------------------|-------------|-------|----------------------------|-----------------|
|            |            |                        |             |       | Limite inferior            | Limite superior |
| Grupo A    | Grupo B    | 209,8800 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 200,870                    | 218,890         |
|            | Grupo C    | 91,7000 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 82,690                     | 100,710         |
|            | Grupo D    | 70,0200 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 61,010                     | 79,030          |
|            | Grupo E    | 106,2200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 97,210                     | 115,230         |
|            | Grupo F    | 28,0800 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 19,070                     | 37,090          |
|            | Grupo G    | 158,1200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 149,110                    | 167,130         |
| Grupo B    | Grupo A    | -209,8800 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -218,890                   | -200,870        |
|            | Grupo C    | -118,1800 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -127,190                   | -109,170        |
|            | Grupo D    | -139,8600 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -148,870                   | -130,850        |
|            | Grupo E    | -103,6600 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -112,670                   | -94,650         |
|            | Grupo F    | -181,8000 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -190,810                   | -172,790        |
|            | Grupo G    | -51,7600 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -60,770                    | -42,750         |
| Grupo C    | Grupo A    | -91,7000 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -100,710                   | -82,690         |
|            | Grupo B    | 118,1800 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 109,170                    | 127,190         |
|            | Grupo D    | -21,6800 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -30,690                    | -12,670         |
|            | Grupo E    | 14,5200 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 5,510                      | 23,530          |
|            | Grupo F    | -63,6200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -72,630                    | -54,610         |
|            | Grupo G    | 66,4200 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 57,410                     | 75,430          |
| Grupo D    | Grupo A    | -70,0200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -79,030                    | -61,010         |
|            | Grupo B    | 139,8600 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 130,850                    | 148,870         |
|            | Grupo C    | 21,6800 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 12,670                     | 30,690          |
|            | Grupo E    | 36,2000 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 27,190                     | 45,210          |
|            | Grupo F    | -41,9400 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -50,950                    | -32,930         |
|            | Grupo G    | 88,1000 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 79,090                     | 97,110          |
| Grupo E    | Grupo A    | -106,2200 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -115,230                   | -97,210         |
|            | Grupo B    | 103,6600 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 94,650                     | 112,670         |
|            | Grupo C    | -14,5200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -23,530                    | -5,510          |
|            | Grupo D    | -36,2000 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -45,210                    | -27,190         |
|            | Grupo F    | -78,1400 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -87,150                    | -69,130         |
|            | Grupo G    | 51,9000 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 42,890                     | 60,910          |
| Grupo F    | Grupo A    | -28,0800 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -37,090                    | -19,070         |
|            | Grupo B    | 181,8000 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 172,790                    | 190,810         |
|            | Grupo C    | 63,6200 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 54,610                     | 72,630          |
|            | Grupo D    | 41,9400 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 32,930                     | 50,950          |
|            | Grupo E    | 78,1400 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 69,130                     | 87,150          |
|            | Grupo G    | 130,0400 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | 121,030                    | 139,050         |
| Grupo G    | Grupo A    | -158,1200 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -167,130                   | -149,110        |
|            | Grupo B    | 51,7600 <sup>*</sup>   | 2,8456      | 0,000 | 42,750                     | 60,770          |
|            | Grupo C    | -66,4200 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -75,430                    | -57,410         |
|            | Grupo D    | -88,1000 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -97,110                    | -79,090         |
|            | Grupo E    | -51,9000 <sup>*</sup>  | 2,8456      | 0,000 | -60,910                    | -42,890         |
|            | Grupo F    | -130,0400 <sup>*</sup> | 2,8456      | 0,000 | -139,050                   | -121,030        |

Em suma, após a análise estatística dos resultados obtidos, pode constatar-se, com um nível de confiança de 95%, que o grupo que apresentou maiores valores de microdureza de Vickers foi o grupo controlo, que não sofreu qualquer tipo de tratamento, e o que apresentou um valor mais baixo foi o grupo B, que sofreu apenas desmineralização, como seria expectável. Foi possível observar o aumento dos valores de microdureza de Vickers em todos os grupos, após remineralização. O grupo que mostrou maior capacidade de remineralização foi o grupo tratado com magnésio logo seguido pelos grupos, por esta ordem, de cálcio, sem metais divalentes, de estrôncio e por fim de zinco.

A tabela abaixo mostra a representação gráfica da média dos valores de microdureza de Vickers para cada grupo de estudo.

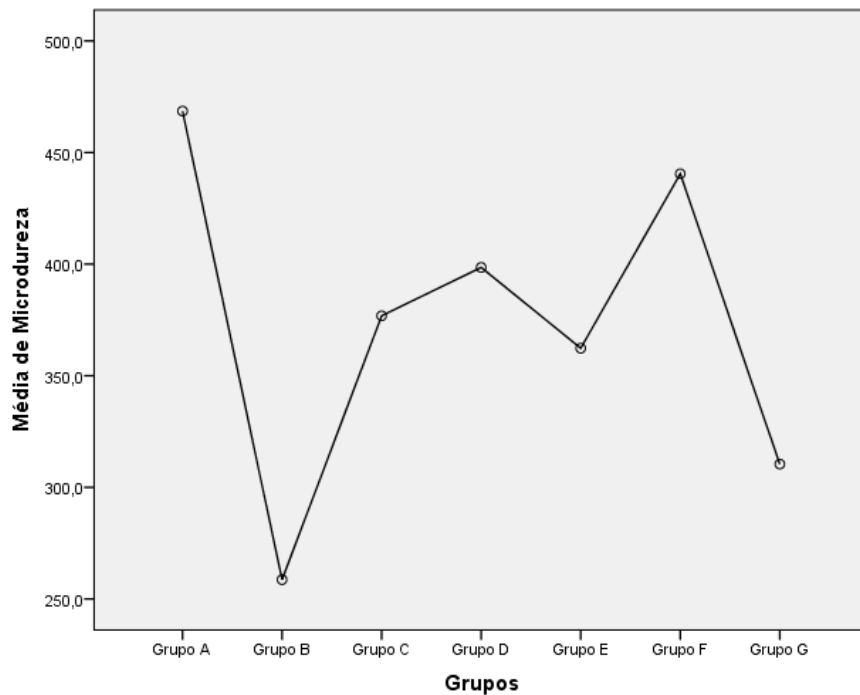


Figura 13 Gráfico representativo dos valores médios das microdurezas de Vickers médias obtidas em cada grupo de estudo.

## IV. DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma doença altamente prevalente a nível mundial. Esta é causada por bactérias cariogénicas que, ao metabolizarem hidratos de carbono fermentáveis, rompem o equilíbrio dinâmico presente na cavidade oral (desmineralização / remineralização) levando à desmineralização do esmalte (Bijle et al., 2020; Ding et al., 2020). A desmineralização, provocada pela diminuição do pH, incita à dissolução de iões presentes na cadeia de hidroxiapatite, conduzindo à perda mineral e enfraquecimento do esmalte. No entanto, este processo pode ser revertido atempadamente, tanto pela estabilização dos níveis de acidez como pela presença de agentes remineralizantes apropriados (Shen et al., 2018).

Nesta investigação, pretendeu-se estudar a incorporação de diferentes metais divalentes na cadeia de hidroxiapatite com o intuito de avaliar e comparar as propriedades dos cristais resultantes, através da medição dos valores de microdureza de superfície do esmalte.

O grupo A, grupo de controlo, não sofreu qualquer tipo de tratamento. Como tal, logo de seguida à preparação dos fragmentos, foram medidos os valores de microdureza de Vickers onde apresentou uma dureza média de  $468,560 \pm 3,7592$  HV. Este valor serviu como meio de comparação face aos restantes grupos (B-G).

O grupo B sofreu apenas desmineralização por tratamento com ácido láctico e, como esperado, apresentou os valores mais baixos de microdureza de todo o estudo ( $258,680 \pm 4,6982$  HV). A desmineralização leva à perda de conteúdo mineral do esmalte, levando ao aumento da sua porosidade e conseqüente diminuição da dureza (Yuanita et al., 2020). Este grupo também foi utilizado como meio de comparação em relação aos que sofreram remineralização (C-G).

A instabilidade química, provocada pela dissolução de iões, conseqüente à desmineralização, leva à necessidade de incorporação de iões na cadeia de esmalte de forma a compensar esta instabilidade – Remineralização (Philip, 2019). Para que ocorra a remineralização, idealmente, é necessária a presença de iões de cálcio, fosfato e hidroxilo -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . No entanto, na ausência destes elementos, os *gaps* da cadeia de hidroxiapatite podem ser compensados pela incorporação de outros catiões, levando à alteração das propriedades do esmalte (Abou Neel et al., 2016).

Todos os restantes grupos do estudo (C-G) foram submetidos a processos de desmineralização, seguidos de remineralização por imersão em soluções de saliva artificial ou saliva artificial na presença de diferentes catiões de forma a avaliar as alterações provocadas pela sua incorporação na cadeia de esmalte.

No grupo C, as amostras foram desmineralizadas com ácido láctico e posteriormente remineralizadas com uma solução de saliva artificial sem catiões divalentes presentes na sua constituição. Os valores de microdureza de superfície do grupo C, tratado na ausência de iões divalentes, foi superior à apresentada pelo grupo B, sugerindo a incorporação de iões monovalentes na hidroxiapatite quando estes apenas estão presentes na saliva artificial usada após desmineralização. Tratando-se de iões monovalentes, com propriedades físico-químicas necessariamente distintas dos iões divalentes, incluindo na reduzida tendência em estabelecer ligações complexas, levou-nos a considerar como hipótese de estudo que estes iões não conseguiriam substituir os iões cálcio na hidroxiapatite, logo, que os valores de microdureza de superfície de esmalte que originariam seriam idênticos aos observados após desmineralização. Os resultados mostram um aumento significativo dos valores de microdureza ( $376,86 \pm 6,3112$  HV), ou seja, mostram ter havido formação de mineral quando apenas metais monovalentes estavam presentes. Isto conduz à rejeição da primeira hipótese do estudo “As amostras desmineralizadas e as amostras desmineralizadas e tratadas com catiões monovalentes não apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte” (pág.26). Não estando presente em solução qualquer metal divalente, o aumento observado apenas pode ser justificado pela remineralização com incorporação de catiões monovalentes como o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Estudos indicam que certos elementos vestigiais do esmalte, como o sódio e o potássio, têm a capacidade de substituir iões de cálcio na cadeia de hidroxiapatite. No entanto, devido às diferenças de cargas formais bem como de raios iónicos, em relação ao cálcio, os iões monovalente provocam alterações na estrutura criando uma hidroxiapatite menos estável (K. Matsunaga & Murata, 2009).

O grupo D, sofreu desmineralização com ácido láctico seguida de remineralização com fosfato de cálcio. Seria de esperar que este grupo apresentasse os valores de microdureza mais altos em relação aos grupos que sofreram remineralização (C-G), visto que este elemento é o que está presente na forma original da cadeia de hidroxiapatite. No entanto,

isto não se verificou. Este grupo apresentou um valor médio de microdureza de  $398,540 \pm 8,1644$  HV, o segundo mais alto, após remineralização. Apesar disto, demonstrou níveis substanciais de aumento da dureza suportando a segunda hipótese desenhada para este estudo “A desmineralização seguida de remineralização na presença de íões cálcio, como único metal divalente presente origina valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas” (pág.26). Como referido, o cálcio é o principal íão presente na cadeia de esmalte e para que ocorra remineralização, a presença do mesmo e do íão fosfato é fundamental. Apesar destes elementos estarem presentes na saliva, a sua quantidade depende do estado de saúde, hábitos alimentares e estilo de vida de cada indivíduo. Mesmo em indivíduos saudáveis, a biodisponibilidade de cálcio pode não ser suficiente (Ekambaram et al., 2017; Shen et al., 2018).

O grupo E, posteriormente à desmineralização com ácido láctico foi imerso em saliva artificial enriquecida com fosfato de estrôncio. Este grupo apresentou valores médios de microdureza de Vickers de  $362,540 \pm 6,4684$  HV. Estes valores indicam um significativo aumento da dureza de superfície em relação ao grupo desmineralizado, o que suporta a ocorrência de remineralização. Isto suporta a terceira hipótese proposta neste estudo “A desmineralização seguida de remineralização na presença de íões estrôncio, íões magnésio ou íões zinco apresentam sempre valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas” (pág.26). O íão estrôncio tem propriedades periódicas muito semelhantes ao cálcio e, como tal, o seu papel na cavidade oral é bastante estudado (Yassen et al., 2012; Wang et al., 2019). Segundo Pilmane (2017), o estrôncio tem uma excelente capacidade de ligação à fase mineral do esmalte. Num estudo de Wang *et al* (2019) observou-se que, pela adição de estrôncio, o esmalte apresentou diminuição da redução da dureza, da dissolução de íões e da sua microporosidade aquando da redução da acidez do meio. Segundo um estudo de Anjos et al., (2004) sobre análise dentária elementar, o íão estrôncio está presente em maiores concentrações na camada externa do esmalte. Isto suporta o aumento de dureza observado neste estudo.

O grupo F foi sujeito a imersão em saliva artificial contendo fosfato de magnésio, posteriormente à desmineralização com ácido láctico. Apresentou um valor médio de microdureza de superfície de  $440,480 \pm 7,5820$  HV, o maior valor de microdureza de Vickers dos grupos que sofreram remineralização (C-G). Mais uma vez, este valor suporta

a terceira hipótese proposta neste estudo “A desmineralização seguida de remineralização na presença de íons estrôncio, íons magnésio ou íons zinco apresentam sempre valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas” (pág.26). O magnésio é um elemento vestigial presente no esmalte (0,44%)(Gelli et al., 2019). Apesar do baixo conteúdo em magnésio, este exibe um papel importante na formação de hidroxiapatite e na mineralização de tecidos duros. A sua incorporação na cadeia de hidroxiapatite tem um papel na regulação da cristalinidade de cadeias de fosfato de cálcio biológicas e no aumento da dureza de superfície (Kis et al., 2020), conforme verificamos no presente estudo. Segundo o estudo realizado por Gelli et al. (2019), a presença de  $Mg^{2+}$  na cadeia de esmalte diminui a sua solubilidade. Os autores atribuem essas características à habilidade do íon magnésio formar um complexo mais forte do que o cálcio com o fosfato. Este elemento afeta também o momento de cristalinização da cadeia de fosfato de cálcio. Com efeito, ao ser atrasado, exerce fortes efeitos na morfologia, na perfeição cristalina e na nucleação. De acordo com os autores, a ação estabilizadora é atribuída à substituição inicial de  $Mg^{2+}$  por  $Ca^{2+}$ .

O grupo G, correspondente ao grupo cujas amostras sofreram desmineralização com ácido láctico seguida de remineralização com fosfato de zinco, apresentou um valor médio de dureza de  $310,440 \pm 6,4338$  HV, superior ao grupo B, o que sugere a ocorrência de remineralização, tal como esperado e descrito na terceira hipótese do presente estudo “A desmineralização seguida de remineralização na presença de íons estrôncio, íons magnésio ou íons zinco apresentam sempre valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas;” (pág.26). Segundo Lippert, (2012) o íon zinco pode ser facilmente incorporado na rede de apatite, por substituição do cálcio ou por adsorção na superfície da rede cristalina. Este elemento exerce um papel na modulação da cristalinidade da apatite, levando à redução da solubilidade da mesma (Lippert, 2012; Fatima et al., 2016; Creeth et al., 2018). Num estudo *in vitro* realizado por Mohammed et al., (2015) executado em fragmentos de esmalte, os autores concluíram que o zinco demonstra a habilidade de reduzir a taxa de desmineralização da hidroxiapatite aquando sujeita a condições ácidas. A incorporação de zinco, proveniente da saliva, no esmalte desmineralizado é provavelmente necessária para a remineralização. Num estudo relativo à análise elementar com microfluorescência envolvendo lesões de cárie não tratadas Anjos et al., (2004) mostrou um aumento significativo deste elemento em zonas circundantes às lesões. Isto pode ser justificado pela ocorrência de

remineralização por incorporação do íon zinco. A sua presença pode promover o processo de remineralização no esmalte, sendo assim considerado um elemento importante e indispensável para a deposição mineral no processo de remineralização do mesmo e consequente aumento da microdureza (Lynch et al., 2011; T. Matsunaga et al., 2009) o que pode justificar os resultados obtidos neste estudo.

Nos grupos D-G promoveu-se a desmineralização seguida de remineralização com saliva artificial contendo íons divalentes: cálcio, estrôncio, magnésio e zinco. Em teoria, estes catiões têm propriedades para formarem hidroxiapatites substituídas (cálcio é substituído por outro catião). Assim, nestes grupos esperamos observar um aumento o valor de microdureza de superfície devida à remineralização. Ou seja, como referia a terceira hipótese do estudo, espera-se que os valores de microdureza média dos grupos D-G seja superior à do grupo B. Isto foi verificado, pelo que a terceira hipótese de estudo pode ser aceite.

Por fim, a quarta e última hipótese de estudo proposta: “Os valores médios de microdureza de superfície do esmalte de amostras desmineralizadas artificialmente e submetidas a um tratamento de remineralização com saliva artificial contendo, como fonte de catiões, um metal divalente, apresentam diferenças significativas consoante esse metal é o cálcio, o estrôncio, o magnésio ou o zinco.” também foi verificada após análise estatística, com um grau de confiança de 95%.

Como limitações do estudo, é de salientar o facto de não terem sido simuladas com rigor as condições da cavidade oral, bem como a presença de micro-organismos, variações constantes de pH ou alimentos.

Apesar dos valores obtidos serem promissores, este tipo de estudo apenas permite avaliar os valores da microdureza resultantes do tratamento, o qual sugere que tenha ocorrido remineralização. No entanto, não é possível avaliar a estabilidade nem o local de incorporação dos catiões na rede cristalina. Estudos futuros são necessários para explorar com maior rigor o efeito da adição na estrutura da hidroxiapatite de diferentes íons metálicos divalentes.



## V. CONCLUSÕES

O presente estudo, cujo objetivo consistiu na avaliação e comparação do efeito da adição de diferentes íons metálicos divalentes (cálcio, estrôncio, magnésio e zinco) na estrutura da hidroxiapatite, concluiu que todos os grupos de estudo que sofreram adição de íons metálicos divalentes (D-G) apresentaram valores promissores de ocorrência de remineralização. Os valores de microdureza de Vickers para estes grupos revelaram-se significativamente superiores em relação ao grupo que sofreu apenas desmineralização (grupo B). Assim, conclui-se que o grupo que apresentou maior capacidade de remineralização foi o magnésio, seguido do cálcio, estrôncio e zinco.

Adicionalmente, os valores de microdureza de superfície do grupo C, tratado na ausência de íons divalentes, foi superior à apresentada pelo grupo B. Os resultados mostram um aumento significativo dos valores microdureza, ou seja, mostra ter havido formação de mineral quando apenas metais monovalentes estavam presentes.

Podemos ainda apresentar conclusões para além das propostos no estudo. Foi possível constatar que, entre os 4 metais, uns têm mais efeitos na remineralização do que outros. O estrôncio e o zinco apresentaram valores de microdureza inferiores ao grupo C, ficando aquém do efeito provocado por tratamento apenas com saliva. Já o cálcio e magnésio vêm reforçar o efeito mineralizante da saliva.

Visto que todos os grupos de estudo apresentaram valores de microdureza inferiores ao grupo referente ao esmalte são (A), podemos também concluir que a remineralização com os metais em estudo não soluciona 100% as alterações provocadas pela desmineralização, dando um extrema importância à prevenção.

Apesar dos valores obtidos serem promissores, este tipo de estudo apenas permite avaliar os valores da microdureza resultante do tratamento, o qual sugere que tenha ocorrido remineralização. No entanto, não é possível avaliar a estabilidade nem o local de incorporação dos cátions na rede cristalina. Estudos futuros são necessários para explorar com maior rigor o efeito da adição na estrutura da hidroxiapatite de diferentes íons metálicos divalentes.



## VI. BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, M. N., Eimar, H., Bassett, D. C., Schnabel, M., Ciobanu, O., Nelea, V., McKee, M. D., Cerruti, M., & Tamimi, F. (2016). Diagenesis-inspired reaction of magnesium ions with surface enamel mineral modifies properties of human teeth. *Acta Biomaterialia*, *37*, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.005>
- Abdullah, Z., & John, J. (2016). Minimally Invasive Treatment of White Spot Lesions-- A Systematic Review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, *14*(3), 197–205. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a35745>
- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization&ndash;remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine, Volume 11*, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Anjos, M. J., Barroso, R. C., Pérez, C. A., Braz, D., Moreira, S., Dias, K. R. H. C., & Lopes, R. T. (2004). Elemental mapping of teeth using  $\mu$ SRXRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, *213*, 569–573. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(03\)01673-2](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(03)01673-2)
- Baumann, T., Bereiter, R., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2017). The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13367-3>
- Białek, M., & Zyska, A. (2014). The Biomedical Role of Zinc in the Functioning of the Human Organism. *Polish Journal of Public Health*, *124*(3), 160–163. <https://doi.org/10.2478/pjph-2014-0036>
- Bijle, M. N., Ekambaram, M., Lo, E. C., & Yiu, C. K. Y. (2020). The enamel remineralization potential of fluoride varnishes containing arginine. *Journal of Dentistry*, *99*(May), 103411. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103411>
- Bowes, J. H., & Murray, M. M. (1935). The chemical composition of teeth: The composition of human enamel and dentine. *The Biochemical Journal*, *29*(12), 2721–2727. <https://doi.org/10.1042/bj0292721>
- Bulina, N. V., Chaikina, M. V., Prosanov, I. Y., & Dudina, D. V. (2020). Strontium and silicate co-substituted hydroxyapatite: Mechanochemical synthesis and structural characterization. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for*

- Advanced Technology*, 262(March), 114719.  
<https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114719>
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., Caldana, M. L., Bastos, J. R. M., & Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, 50, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>
- Carpenter, G. H. (2013). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Colombo, A. P. V., & Tanner, A. C. R. (2019). The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *Journal of Dental Research*, 98(4), 373–385.  
<https://doi.org/10.1177/0022034519830686>
- Creeth, J. E., Karwal, R., Hara, A. T., & Zero, D. T. (2018). A Randomized in situ Clinical Study of Fluoride Dentifrices on Enamel Remineralization and Resistance to Demineralization: Effects of Zinc. *Caries Research*, 52(1–2), 129–138.  
<https://doi.org/10.1159/000479823>
- Ding, L., Han, S., Wang, K., Zheng, S., Zheng, W., Peng, X., Niu, Y., Li, W., & Zhang, L. (2020). Remineralization of enamel caries by an amelogenin-derived peptide and fluoride in vitro. *Regenerative Biomaterials*, 7(3), 283–292.  
<https://doi.org/10.1093/rb/rbaa003>
- Eimar, H., Ghadimi, E., Marelli, B., Vali, H., Nazhat, S. N., Amin, W. M., Torres, J., Ciobanu, O., Albuquerque Junior, R. F., & Tamimi, F. (2012). Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3400–3410. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.002>
- Ekambaram, M., Mohd Said, S. N. B., & Yiu, C. K. Y. (2017). A Review of Enamel Remineralisation Potential of Calcium- and Phosphate-based Remineralisation Systems. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 15(5), 415–420.  
<https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a38779>
- Elfallah, H. M., Bertassoni, L. E., Charadram, N., Rathsam, C., & Swain, M. V. (2015). Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. *Acta Biomaterialia*, 20(April), 120–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.035>
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-

- phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>
- Farooq, I., & Bugshan, A. (2020). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a review. *F1000Research*, 9, 171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.1>
- Fatima, T., Rahim, Z. B. H. A., Lin, C. W., & Qamar, Z. (2016). Zinc: A precious trace element for oral health care? *Journal of the Pakistan Medical Association*, 66(8), 1019–1023.
- Featherstone, J. D. B., & Chaffee, B. W. (2018). The Evidence for Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA®). *Advances in Dental Research*, 29(1), 9–14.  
<https://doi.org/10.1177/0022034517736500>
- Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. (2015). *Dental Caries, The Disease and Its Clinical Management*.  
<http://schizophreniabulletin.oxfordjournals.org/content/39/4/766.full.pdf+html>
- Gelli, R., Ridi, F., & Baglioni, P. (2019). The importance of being amorphous : calcium and magnesium phosphates in the human body. *Advances in Colloid and Interface Science*, 269, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.011>
- González-Cabezas, C., & Fernández, C. E. (2018). Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. In *Advances in dental research* (Vol. 29, Issue 1, pp. 55–59). <https://doi.org/10.1177/0022034517740124>
- Hatipoglu, O., & Saydam, F. (2019). Effects of the carbonic anhydrase vi gene polymorphisms on dental caries: A meta-analysis. *Dental and Medical Problems*, 56(4), 395–400. <https://doi.org/10.17219/dmp/110453>
- Ionta, F. Q., Mendonça, F. L., De Oliveira, G. C., De Alencar, C. R. B., Honório, H. M., Magalhães, A. C., & Rios, D. (2014). In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *Journal of Dentistry*, 42(2), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.009>
- Kaga, N., Toshima, H., Nagano-Takebe, F., Hashimoto, M., Nezu, T., Yokoyama, A., Endo, K., & Kaga, M. (2019). Inhibition of enamel demineralization by an ion-releasing tooth-coating material. *American Journal of Dentistry*, 32(1), 27–32.
- Kis, V. K., Sulyok, A., Hegedűs, M., Kovács, I., Rózsa, N., & Kovács, Z. (2020). Magnesium incorporation into primary dental enamel and its effect on mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.035>

- Klimuszko, E., Orywal, K., Sierpiska, T., Sidun, J., & Golebiewska, M. (2018). Evaluation of calcium and magnesium contents in tooth enamel without any pathological changes: in vitro preliminary study. *Odontology*, *106*(4), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0353-6>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. *Physiological Reviews*, *97*(3), 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
- Lippert, F. (2012). Dose-response effects of zinc and fluoride on caries lesion remineralization. *Caries Research*, *46*(1), 62–68. <https://doi.org/10.1159/000335573>
- Lynch, R. J. M., Churchley, D., Butler, A., Kearns, S., Thomas, G. V., Badrock, T. C., Cooper, L., & Higham, S. M. (2011). Effects of Zinc and Fluoride on the Remineralisation of Artificial Carious Lesions under Simulated Plaque Fluid Conditions. *Caries Research*, *45*(3), 313–322. <https://doi.org/10.1159/000324804>
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, *70*(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- Matsunaga, K., & Murata, H. (2009). *Formation Energies of Substitutional Sodium and Potassium in Hydroxyapatite*. *50*(5), 1041–1045. <https://doi.org/10.2320/matertrans.MC200819>
- Matsunaga, T., Ishizaki, H., Tanabe, S., & Hayashi, Y. (2009). Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel in situ. *Archives of Oral Biology*, *54*(5), 420–423. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.01.015>
- Mohammed, N. R., Lynch, R. J. M., & Anderson, P. (2015). Inhibitory Effects of Zinc Ions on Enamel Demineralisation Kinetics in vitro. *Caries Research*, *49*(6), 600–605. <https://doi.org/10.1159/000441014>
- Mutahar, M., Carpenter, G., Bartlett, D., German, M., & Moazzez, R. (2017). The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11498-1>
- Nurbaeva, M. K., Eckstein, M., Feske, S., & Lacruz, R. S. (2017). Ca<sup>2+</sup> transport and signalling in enamel cells. *Journal of Physiology*, *595*(10), 3015–3039. <https://doi.org/10.1113/JP272775>

- Pandya, M., & Diekwisch, T. G. H. (2019). Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. *International Journal of Oral Science*, *11*(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/s41368-018-0038-6>
- Parnell, C., Gugrani, N., Sherriff, A., James, P., & Beirne, P. V. (2012). Non-fluoride topical remineralising agents containing calcium and/or phosphate for controlling dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *3*.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.cd009732>
- Pathak, S., Roopa, K., Poornima, P., & Neena, I. (2015). White spot lesions: A literature review. *Journal of Pediatric Dentistry*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2321-6646.151839>
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. In *Journal of Oral Rehabilitation* (Vol. 45, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/joor.12664>
- Philip, N. (2019). State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Research*, *53*(3), 284–295.  
<https://doi.org/10.1159/000493031>
- Pilmane, M., Salma-Ancane, K., Loca, D., Locs, J., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Materials Science and Engineering C*, *78*, 1222–1230.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.042>
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(May). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Reynolds, E. C. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *Journal of Dental Research*, *76*(9), 1587–1595. <https://doi.org/10.1177/00220345970760091101>
- Ruan, Q., & Moradian-Oldak, J. (2015). Amelogenin and enamel biomimetics. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(16), 3112–3129. <https://doi.org/10.1039/c5tb00163c>
- 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 International*, *2017*.  
<https://doi.org/10.1155/2017/7834905>
- Shao, C., Jin, B., Mu, Z., Lu, H., Zhao, Y., Wu, Z., Yan, L., Zhang, Z., Zhou, Y., Pan, H., Liu, Z., & Tang, R. (2019). Repair of tooth enamel by a biomimetic

- mineralization frontier ensuring epitaxial growth. *Science Advances*, 5(8), 1–10.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw9569>
- 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(June), 59–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.005>
- Shimomura-Kuroki, J., Nashida, T., Miyagawa, Y., Morita, T., & Hayashi-Sakai, S. (2020). Analysis of salivary factors related to the oral health status in children. *Journal of Oral Science*, 62(2), 226–230. <https://doi.org/10.2334/josnusd.18-0293>
- Simón-Soro, A., & Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>
- Skucha-Nowak, M., Gibas, M., Tanasiewicz, M., Twardawa, H., & Szklarski, T. (2015). Natural and controlled demineralization for study purposes in minimally invasive dentistry. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(5), 891–898.  
<https://doi.org/10.17219/acem/28903>
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>
- Uwitonze, A. M., Rahman, S., Ojeh, N., Grant, W. B., Kaur, H., Haq, A., & Razzaque, M. S. (2020). Oral manifestations of magnesium and vitamin D inadequacy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 200, 105636.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105636>
- Vargas-Ferreira, F., Salas, M. M. S., Nascimento, G. G., Tarquinio, S. B. C., Faggion, C. M., Peres, M. A., Thomson, W. M., & Demarco, F. F. (2015). Association between developmental defects of enamel and dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 43(6), 619–628.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.011>
- Wang, Y. L., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Lin, C. H., & Lin, C. P. (2019). Strontium ion can significantly decrease enamel demineralization and prevent the enamel surface hardness loss in acidic environment. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(1P1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.01.001>
- Wu, L. L., Geng, K., & Gao, Q. P. (2019). Early Caries Preventive Effects of Casein

- Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) Compared with Conventional Fluorides: A Meta-analysis. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 17(6), 495–503. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a43637>
- Xin, W., Leung, K. C. M., Lo, E. C. M., Mok, M. Y., & Leung, M. H. (2016). A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of fluoride varnish in preventing dental caries of Sjögren's syndrome patients. *BMC Oral Health*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0296-7>
- Yassen, G. H., Lippert, F., Eckert, G., Eder, J., & Zandona, A. F. (2012). The effect of strontium and combinations of strontium and fluoride on the remineralization of artificial caries lesions in vitro. *Quintessence International*, 43(7), e95–e103.
- Yeung, C. A., Hitchings, J. L., Macfarlane, T. V., Threlfall, A. G., Tickle, M., Glenny, A.-M. M., Chong, L. Y., & Glenny, A.-M. M. (2015). Fluoridated milk for preventing dental caries [Systematic Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9, CD003876. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003876.pub4>. [www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com)
- Yuanita, T., Zubaidah, N., & R, M. I. A. (2020). Enamel hardness differences after topical application of theobromine gel and Casein Phosphopeptide-amorphous Calcium Phosphate. 10(1), 10–13.



## ANEXOS

Comissão de Ética EGAS MONIZ



Proc. Interno nº 809

Ex.ma Senhora  
Ana Margarida da Luz Ramos


Monte de Caparica, 19 de dezembro de 2019.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "**Estudo do efeito da adição de diferentes iões metálicos divalentes no esmalte humano são**", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

  
Prof.ª Doutora Maria Fernanda de Mesquita

This Agreement between Ana Margarida da Ramos ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|  |   |
|--|---|
| License Number                               | 4930420795157   |
| License date                                 | Oct 15, 2020  |
| Licensed Content Publisher                   | Elsevier  |
| Licensed Content Publication                 | Materials Science and Engineering: B  |
| Licensed Content Title                       | Strontium and silicate co-substituted hydroxyapatite: Mechanochemical synthesis and structural characterization |
| Licensed Content Author                      | Natalia V. Bulina, Marina V. Chaikina, Igor Yu. Prosanov, Dina V. Dudina  |
| Licensed Content Date                        | Dec 1, 2020   |
| Licensed Content Volume                      | 262   |
| Licensed Content Issue                       | n/a   |
| Licensed Content Pages                       | 1   |
| Start Page                                   | 114719  |
| End Page                                     | 0   |
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation  |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations  |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1   |
| Format                                       | both print and electronic   |
| Are you the author of this Elsevier article? | No  |
| Will you be translating?                     | Yes, without English rights   |
| Number of languages                          | 1   |
| Title  | ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES IÕES METÁLICOS DIVALENTES NO ESMALTE HUMANO SÃO                        |
| Institution name                             | Instituto Universitário Egas Moniz  |
| Expected presentation date                   | Dec 2020  |
| Portions                                     | Fig. 4. Structural representation of HA (a) and HA-0.5Sr-0.5Si (b).   |
| Specific Languages                           | Português   |