



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**DES-REMINERALIZAÇÃO EM LESÕES DE CÁRIE INDUZIDAS  
ARTIFICIALMENTE – ESTUDO IN VITRO**

Trabalho submetido por  
**Quevin Argi**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **DES-REMINERALIZAÇÃO EM LESÕES DE CÁRIE INDUZIDAS ARTIFICIALMENTE – ESTUDO IN VITRO**

Trabalho submetido por

**Quevin Argi**

para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Ana Cristina Manso**

e coorientado por

**Prof. Doutora Carla Ascenso**

**Mestre Joana do Carmo**

**setembro de 2017**



Aos meus pais e irmão, pelo apoio e  
incentivo neste meu percurso.



## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Ana Cristina Manso, por ter aceite orientar-me neste projeto, pelo seu apoio, motivação e dedicação que demonstrou ao longo deste projeto. Agradeço ainda todo o conhecimento que me transmitiu ao longo do meu percurso.

À Professora Doutora Carla Ascenso pela sua coorientação, apoio e disponibilidade na concretização deste projeto.

À Mestre Joana do Carmo pela sua coorientação, apoio e incentivo ao longo deste projeto.

Ao ISCSEM e à Cooperativa Egas Moniz pela formação de excelência que proporciona aos seus alunos e por todos os valores transmitidos.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional e incentivo durante todo o meu percurso académico e pelos valores que me transmitiram ao longo da vida.

A todos os meus amigos que contribuíram para o meu crescimento bem como para a minha formação.



## RESUMO

**Objetivo:** Comparar o efeito da combinação de distintos agentes remineralizadores, em cáries de esmalte induzidas artificialmente.

**Materiais e métodos:** 48 espécimes obtidos a partir de 12 molares humanos foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos. Três grupos- A, B e C- foram submetidos a solução tampão de ácido láctico (pH=5), durante 6 dias, a 37°C, simulando lesões artificiais de cárie dentária. Posteriormente foram escovados duas vezes ao dia, com escova elétrica e dentífrico fluoretado (1450ppm de fluoreto de sódio), durante 7 dias. O grupo D (n=12) corresponde ao grupo controlo - esmalte são. No grupo B (n=12), aplicou-se uma única vez, ao 7º dia, um verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. No grupo C (n=12), foi aplicada uma pasta de fosfopéptido de caseína – fosfato de cálcio amorfo, 1 vez por dia, durante 7 dias. Durante os ciclos de escovagem, os espécimes estiveram submersos em água desionizada.

Foi realizada uma análise da superfície do esmalte através da microscopia eletrónica de varrimento e pelo teste de microdureza *Vickers*.

Os dados obtidos foram estatisticamente tratados com os testes de Shapiro-Wilk, Levene, ANOVA *one-way* (intervalo de confiança de 95%), Games Howell e de contraste.

**Resultados:** Os grupos B (295,74±10,65 HV) e C (308,16±25,29 HV) demonstraram um aumento na microdureza do esmalte, não diferindo entre si (p>0,05), contudo menor que o grupo D (340,02±17,24 HV) (p<0,05). O grupo A (246,62±23,90 HV) apresentou menores valores de microdureza, diferindo dos restantes grupos (p<0,05). O grupo C apresenta um aspeto mais homogéneo e uma melhor reorganização da camada superficial do esmalte.

**Conclusões:** A aplicação de pasta de fosfopéptido de caseína – fosfato de cálcio amorfo e o verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, ambos combinados com dentífrico fluoretado, demonstrou maior potencial de remineralização do esmalte após um desafio cariogénico.

**Palavras-chave:** Esmalte, *white spot*, remineralização, CPP-ACP

## ABSTRACT

**Objective:** To assess the effect of the combination of different remineralizing agents on artificial enamel caries lesions.

**Materials and methods:** 48 enamel specimens obtained from 12 human molars were selected and randomly divided to 4 groups. Three groups (A, B and C) were treated with to a lactic acid buffer solution at pH 5 for 6 days at 37°C, simulating artificial white spot lesions. They were then brushed twice a day with an electric toothbrush and fluoride toothpaste (1450 ppm sodium fluoride) for 7 days. Group D (n=12) corresponds to the control – sound enamel. In group B (n=12), a high concentration fluoride varnish with calcium phosphate was applied one single time, on the 7<sup>th</sup> day. In group C (n=12), a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste was applied once a day for 7 days. In groups A-C, during the brushing cycles, the specimens were submerged in deionized water.

An analysis of the enamel surface was carried out using scanning electron microscopy and the Vickers micro-hardness test.

The data obtained were statistically treated with the Shapiro-Wilk test, Levene test, ANOVA one-way test (95% confidence interval), Games-Howell post-hoc test and Contrast test.

**Results:** Groups B (295,74±10,65 HV) and C (308,16±25,29 HV) showed a marked increase in enamel micro-hardness, not differing from each other ( $p > 0.05$ ), however different from the values of group D (340,02±17,24 HV) ( $p < 0.05$ ). Group A (246,62±23,90 HV) presented lower micro-hardness values, being different from the other groups ( $p < 0.05$ ). Group C is the one that presents a more homogeneous aspect and a better reorganization of the surface layer of the enamel.

**Conclusion:** The application of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste and high concentration fluoride varnish with calcium phosphate, both combined with fluoride toothpaste, showed the highest remineralization potential of enamel after an acidic challenge.

**Keywords:** Enamel, white spot, remineralization, CPP-ACP

## ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
ÍNDICE GERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	9
INTRODUÇÃO .....	11
ESMALTE HUMANO .....	14
Constituição e propriedades químicas.....	14
Microestrutura .....	15
Macroestrutura .....	17
Propriedades mecânicas .....	17
Papel da saliva na proteção do esmalte.....	18
CÁRIE DENTÁRIA.....	20
Definição .....	20
Aspetos Bioquímicos .....	21
Classificação .....	22
Epidemiologia .....	23
Manifestações Clínicas.....	24
Diagnóstico e Índices de classificação.....	25
Prevenção e remineralização de lesões cariogénicas .....	27
Flúor.....	28
CPP-ACP e CPP-ACFP .....	31
PERTINÊNCIA DO ESTUDO .....	32
OBJETIVOS.....	32
HIPÓTESE NULA .....	33
MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	35
LOCAL DO ESTUDO .....	35
DESENHO DO ESTUDO .....	35
SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	36
PREPARAÇÃO DA AMOSTRA .....	37

SIMULAÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE <i>WHITE SPOT</i> ATRAVÉS DE UM CICLO DE DESMINERALIZAÇÃO .....	39
APLICAÇÃO DE AGENTES INDUTORES DA REMINERALIZAÇÃO .....	40
ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE .....	43
Teste de microdureza de Vickers .....	43
Observação através do microscópio eletrônico de varrimento .....	44
RESULTADOS .....	47
TESTE DE MICRODUREZA DE <i>VICKERS</i> .....	47
ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARRIMENTO	53
DISCUSSÃO .....	61
CONCLUSÕES .....	69
BIBLIOGRAFIA .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do procedimento experimental.....	36
Figura 2 – Micrótopo de tecidos duros Accutom-50® (Struers A/S).....	37
Figura 3 - Secção de um molar no sentido mesio-distal .....	38
Figura 4 - Fragmentos resultantes após secção no sentido vestibulo-lingual .....	38
Figura 5 - Secção da porção radicular.....	38
Figura 6 - Quatro fragmentos obtidos com área de 3x4 mm .....	39
Figura 7 - Máquina de polimento LaboPol-4® (Struers).....	39
Figura 8 - Escova elétrica ( <i>Oral B Vitality, Braun, P&amp;G</i> ).....	40
Figura 9 - Pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm NaF) ( <i>Colgate™ Triple Action, Colgate-Palmolive</i> ).....	41
Figura 10 – Verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio ( <i>Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE</i> ) .....	41
Figura 11 - Paste de CPP-ACP ( <i>GC Tooth Mousse, Recaldent™, GC Corporation</i> ).....	42
Figura 12 - Máquina HSV-30T (Shimadzu Corporation).....	43
Figura 13 - Exemplo de uma indentação de <i>Vickers</i> .....	43
Figura 14 - Exemplo de dados obtidos através da indentação de <i>Vickers</i> .....	44
Figura 15 – Microscópio eletrónico de varrimento (JEOL-JSM 7001F).....	45
Figura 16 - Especímenes metalizados com liga de Au-Pd.....	45
Figura 17 – <i>Boxplot</i> dos valores de microdureza dos grupos de estudo A-D ( <i>output</i> obtido recorrendo ao software de análise estatística <i>SPSS</i> ).....	47
Figura 18 – Descrição gráfica dos valores médios da microdureza (HV) dos grupos estudo A-D, ( <i>output</i> obtido recorrendo ao software de análise estatística <i>SPSS</i> ) .....	48
Figura 19 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. Observam-se zonas de desmineralização dos prismas de esmalte, semelhante a um padrão de “favo de mel” e zonas com aspeto uniforme, em menor extensão, correspondente a depósito mineral.....	53
Figura 20 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. Existem uma grande área de zonas lacunares com desorganização prismática evidente. É possível verificar oclusão prismática pela cristalização induzida pelo fluoreto de sódio numa menor extensão de superfície. ....	54

- Figura 21 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. É de salientar as diferentes orientações dos prismas de esmalte, com uma desorganização evidente..... 54
- Figura 22 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada mais verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Verifica-se uma película sobre a superfície do esmalte, correspondendo à camada de verniz de flúor..... 55
- Figura 23 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Observa-se uma estrutura mais homogénea na disposição dos prismas de esmalte, sugestiva de remineralização considerável. .... 55
- Figura 24 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada mais verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Evidente remineralização pela presença abundante de matéria mineral (presumivelmente de fosfato de cálcio), apresentando uma superfície do esmalte mais regular. Menor presença de espaços lacunares..... 56
- Figura 25 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP..... 56
- Figura 26 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observa-se que os prismas de esmalte se encontram organizados de uma forma homogénea, com poucos espaços interprismáticos visíveis à superfície..... 57
- Figura 27 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. É possível verificar redução das microporosidades e um recobrimento da estrutura prismática do esmalte por aglomerados de matéria mineral, compatível com CPP-ACP. .... 57
- Figura 28 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x1000. .... 58

Figura 29 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x10000. É possível verificar um padrão prismático homogêneo, e pequenas irregularidades características do esmalte. .... 58

Figura 30 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x30000. .... 59

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da codificação do primeiro dígito do código ICDAS .....	26
Tabela 2 - Descrição da codificação do segundo dígito do código ICDAS.....	27
Tabela 3 – Estatística descritiva dos grupos de estudo A-D ( <i>output</i> obtido recorrendo ao software de análise estatística <i>SPSS</i> ) .....	47
Tabela 4 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk ( <i>output</i> obtido recorrendo ao software de análise estatística <i>SPSS</i> ) .....	49
Tabela 5 – Teste de homogeneidade das variâncias de Levene ( $gl_1 = n^\circ \text{grupos} - 1$ ; $gl_2 = n^\circ \text{especímenes} - n^\circ \text{grupos}$ ) ( <i>output</i> obtido recorrendo ao software de análise estatística <i>SPSS</i> ).....	49
Tabela 6 - Teste paramétrico ANOVA <i>one-way</i> ( <i>output</i> obtido pelo software de análise estatística <i>SPSS</i> ).....	50
Tabela 7 – Teste <i>post-hoc</i> Games-Howell ( <i>output</i> obtido pelo software de análise estatística <i>SPSS</i> ).....	51
Tabela 8 – Teste de contraste ( <i>output</i> adaptado obtido pelo software de análise estatística <i>SPSS</i> ). Foi omitido o parâmetro “Considera variâncias iguais”.....	52
Tabela 9 - Quadro comparativo das imagens MEV dos diferentes grupos, com ampliações de x1000, x10000 e x30000.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(w/w): massa por massa (*w*e*ight/w*e*ight*)

%: percentagem

°C: graus Celsius

AMELX: Amelogenina (*A*m*e*l*o*g*e*n*i*n)

AMNB: Ameloblastina (*A*m*e*l*ob*l*a*s*t*i*n)***

CPP-ACFP: Fosfopéptido de Caseína-Fosfato de Cálcio Amorfo e Fluoreto (*C*a*s*e*in  
*P*h*o*s*p*h*o*p*e*p*t*id*e*  
- *A*m*o*r*p*h*o*u*s*  
*C*a*l*c*iu*m*  
*F*l*u*o*r*id*e*  
*P*h*o*s*p*h*a*t*e)*******

CPP-ACP: Fosfopéptido de Caseína-Fosfato de Cálcio Amorfo (*C*a*s*e*in  
*P*h*o*s*p*h*o*p*e*p*t*id*e*  
- *A*m*o*r*p*h*o*u*s*  
*C*a*l*c*iu*m*  
*P*h*o**s*p*h*a*t*e)****

ENAM: Enamelina (*E*n*am*e*l*in)**

ESRRB: Recetor beta relacionado com estrogénio (*E*s*t*r*o*g*e*n*o*  
-*r*e*l*a*t*e*d*e*  
*r*e*c*ep*t*o  
*β*)***

FDI: Federação Dentária Internacional

fTCP: Fosfato de cálcio funcional (*F*u*nctionalised  
*t*ricalcium  
*p*h*o**s*p*h*a*t*e)*

HAp: Hidroxiapatite

HV: Dureza de Vickers (*H*ardnes  
*v*ickers)

JAC: Junção Amelocimentária

MEV: Microscopia Eletrónica de Varrimento

mm: milímetro

mN: miliNewton

N: Newton

pH:  $-\log[H^+]$

ppb: parte por bilião

ppm: parte por milhão

PRP: Proteínas Ricas em Prolina

Ser(P): Resíduos de fosfoserilo (*p*h*o**s*p*h*o*s*er*y*l  
*r*e*s*id*u*e)

SPSS: Software de análise estatística (*S*t*a*t*ist*ica  
*P*aket*a*g*e*  
*f*o*r*t*h*e*  
*S*o*c*ial  
*S*cien*c*e*s*)***

TCP: Fosfato de cálcio (*T*ricalcium  
*p*h*o**s*p*h*a*t*e)

TUFT1: Tuftelina (*T*u*f*t*e*l*in)*

$\bar{u}$ : média

WSL: Lesões de *White Spot* (*W*h*i*t*e*  
*s*p*o**t*  
*l*e*s*io*n**s*)**

$\mu$ m: micrómetro



## INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a doença crónica, oral, mais prevalente a nível global, atingindo quase metade da população mundial (44%), de acordo com a Federação Dentária Internacional (FDI), sendo comum na infância e afetando os indivíduos durante toda a sua vida (Federación Dental Internacional, 2015). Tem aumentado nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sobretudo nas crianças, devido ao aumento da popularidade dos produtos com açúcares refinados (Sultan et al., 2016). É definida como uma destruição localizada de tecidos dentários pelos ácidos provenientes do metabolismo bacteriano que se difundem pelo esmalte e dentina, promovendo uma dissolução do conteúdo mineral, (Featherstone, 2008; Tuloglu, Bayrak, Tunc, & Ozer, 2016), ou seja, um desequilíbrio no processo dinâmico de desmineralização e remineralização (X. Zhang et al., 2014).

Na fase inicial do processo cariioso, a fermentação dos hidratos de carbono pelas bactérias diminui o nível de pH local abaixo do valor crítico ( $\text{pH} < 5.5$ ), resultando na desmineralização do substrato mineral (Tuloglu et al., 2016).

É nesta fase inicial do processo cariioso, onde são visíveis os primeiros sinais de desmineralização do esmalte denominadas lesões de *white spot* (WSL), que o tema deste trabalho incide. Antes da existência de cavitação, é sabido que o mesmo processo pode ser interrompido ou revertido, através do processo de remineralização (Featherstone, 2008; Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007).

A remineralização, neste caso, representa um processo fisiológico de reparação de superfícies não cavitadas de lesões cariosas (Featherstone, 2008), em que iões de cálcio e fosfato presentes na saliva estabelecem ligações químicas, que permitem uma reconstrução parcial dos cristais de apatite dissolvidos e também uma neutralização do pH oral (Elkassas & Arafa, 2013; Gangrade et al., 2016).

Contudo, a remineralização fisiológica promovida pela saliva é pequena e um processo lento, em que se obtém apenas a remineralização da camada superficial das WSL e não das camadas mais profundas da lesão, havendo alterações a nível estrutural e estético. A maior parte das WSL não mostram sinais de regressão após 2 anos, sendo que algumas perduram entre 5 a 12 anos (Cochrane, Cai, Huq, Burrow, & Reynolds, 2010; Singh, Singh, Goyal, Utreja, & Jena, 2016).

Atendendo, que um dos objetivos contemporâneos da Medicina Dentária Preventiva reside no conceito de dentisteria minimamente invasiva (X. Zhang et al., 2014)

e de gestão não invasiva da cárie dentária, deve-se proceder ao controlo de lesões cariosas não cavitadas de forma não invasiva, através de métodos alternativos de remineralização, numa tentativa de prevenir a progressão da doença e preservar a integridade do substrato dentário saudável (Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013; G. M. S. Oliveira et al., 2014; X. Zhang et al., 2014).

Existem inúmeros métodos que permitem acelerar a remineralização, através de mecanismos que transportam iões para a área afetada (Gangrade et al., 2016), permitindo a reparação das camadas mais profundas das WSL, uma regressão da lesão e consequentemente uma melhoria estética (Singh et al., 2016).

Com base em anos de investigações clinicamente comprovadas, a aplicação de fluoreto promove a remineralização da estrutura dentária (Grewal, Gumber, & Kaur, 2017), tendo sido descrito como o método mais eficaz para prevenção da cárie (Neel et al., 2016).

Os vernizes de flúor tem sido usados amplamente na prevenção de lesões cariosas, devido à sua fácil aplicabilidade e ser bem tolerada pelos pacientes (Shen et al., 2015). Foram desenvolvidos com o objetivo de promover um contacto prolongado entre o ião fluoreto e a superfície dentária, sendo que o seu mecanismo de atuação baseia-se na criação de um reservatório intraoral de fluoreto devido à formação de um complexo  $\text{CaF}_2$ , que é retido no esmalte e na placa bacteriana e é lentamente libertado para ajudar a inibir perda mineral durante a desmineralização (Cardoso et al., 2014; Shen et al., 2015).

Apesar do flúor ser considerado como elemento essencial no processo de remineralização, a sua capacidade de remineralização é limitada pela disponibilidade de iões de cálcio e de fosfato no meio oral (Elkassas & Arafa, 2013; Grewal et al., 2017).

Pela facto da disponibilidade de iões de cálcio e fosfato ser um fator limitante para a remineralização do esmalte (Grewal et al., 2017), foram desenvolvidos novos agentes remineralizadores que visam manter a biodisponibilidade de iões de cálcio, fosfato e fluoreto, protegendo o esmalte contra a desmineralização, constituindo uma alternativa significativamente melhor relativamente aos vernizes que biodisponibilizam unicamente fluoretos (J. Li et al., 2014; Shen et al., 2015).

Estes novos sistemas podem ser classificados em 3 formulações: cristalino, amorfo não estabilizado e amorfo estabilizado. Um exemplo de sistema cristalino é à base de fosfato de cálcio ( $\beta$ -TCP – *beta tricalcium phosphate*), que demonstrou capacidade de disponibilizar iões cálcio e fósforo nas lesões de esmalte. O  $\beta$ -TCP ao ser acoplado com

porções orgânicas e/ou inorgânicas, como ácidos carboxílicos ou surfactantes, resulta na formação do fTCP (*functionalized  $\beta$ -tricalcium phosphate*) (Karlinsky & Pfarrer, 2012).

O  $\beta$ -TCP apresenta incompatibilidade com o flúor, o que poderia afetar a terapêutica remineralizante. Devido a esta incompatibilidade, a funcionalização do  $\beta$ -TCP permite a criação de uma barreira previne interações indesejáveis entre o cálcio e o fluoreto, que poderia inativar ambos (Cochrane et al., 2010; Jo et al., 2014; Karlinsky & Pfarrer, 2012), e facilita a sua distribuição na superfície dentária (Karlinsky & Pfarrer, 2012). O fTCP estabiliza o fluoreto na solução e permite manter altas concentrações de fosfato de cálcio e fluoreto nas zonas desmineralizadas (Jo et al., 2014).

A funcionalização do  $\beta$ -TCP pode ser obtida pela sua moagem com lauril sulfato de sódio (Jo et al., 2014), ou ser preparado com sílica ou ácido fumárico (Karlinsky & Pfarrer, 2012).

O fosfato de cálcio amorfo (*ACP-amorphous calcium phosphate*) é baseado num sistema amorfo não estabilizado, em que iões de cálcio e o fosfato são disponibilizados de forma independente na forma de sais, isto é, um sistema de duas fases, que impede os dois elementos de reagirem antes da sua aplicabilidade (Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013).

Este sistema promove a remineralização, diminui a desmineralização ou a combinação dos dois efeitos (Elkassas & Arafa, 2013).

Nas formulações amorfas estabilizadas encontra-se o CPP (*casein phosphopetide*) (Cochrane et al., 2010), derivada da caseína, uma fosfoproteína do leite bovino. Apresenta baixa antigenicidade, é insípida e possui aminoácidos -Ser(P) (*phosphoserine residue*), que permitem estabilizar fosfato de cálcio, numa fase metaestável, formando nano-aglomerados de CPP-ACP (*casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate*). (Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013).

O CPP-ACP possibilita manter um estado de supersaturação de fosfato e cálcio, funcionando como um reservatório de fosfato de cálcio, inibindo a desmineralização e promovendo a remineralização do esmalte (Elkassas & Arafa, 2013; J. Li et al., 2014).

Numerosos estudos tem sido publicados relativos à atividade anticariogénica do CPP-ACP e o seu efeito sinérgico com outros agentes remineralizadores (Tuloglu et al., 2016).

É importante assegurar que estes novos materiais biodisponibilizem iões de cálcio, fosfato e fluoreto de forma a proteger o esmalte de eventos de desmineralização,

apresentando, assim, resultados superiores relativamente aos vernizes de princípio ativo unicamente de flúor (Shen et al., 2015).

Assim é importante fazer um estudo comparativo dos diferentes agentes remineralizadores que libertam fosfato e cálcio e o efeito sinérgico quando utilizados com produtos fluoretados, sobre lesões iniciais de cárie, com o intuito de adotar uma abordagem terapêutica de maior evidência científica.

## ESMALTE HUMANO

### Constituição e propriedades químicas

O esmalte é um tecido acelular altamente mineralizado, de origem ectodérmica, constituído por matéria inorgânica (92-96% w/w), matéria orgânica (1-2% w/w) e água (3%-4%) (De Dios Teruel, Alcolea, Hernández, & Ruiz, 2015; Zheng et al., 2013), o que o torna o tecido mineralizado mais duro do corpo humano (Cao, Mei, Li, Lo, & Chu, 2015).

A matéria orgânica é constituída sobretudo por proteínas não colagénicas (Neel et al., 2016; Rodrigues, Serro, Polido, Ramalho, & Figueiredo-Pina, 2017), como a amelogenina, cerca de 90%, e enamelinina (Neel et al., 2016; Rodrigues et al., 2017) e por lípidos (De Dios Teruel et al., 2015).

A porção mineral constituinte do esmalte genericamente é um fosfato de cálcio idealizado (De Dios Teruel et al., 2015) como hidroxiapatite (HAp) carbonatada deficiente em cálcio, apresentando uma fórmula não estequiométrica  $Ca_{10-x}Na_n(PO_4)_6-y(CO_3)_z(OH)_{2-u}F_u$ , que difere da hidroxiapatite (HAp) mineral  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (Lussi & Carvalho, 2015; Rodrigues et al., 2017).

Foram identificados outros complexos como o fosfato de cálcio e fosfato de magnésio associado ou não com a apatite: *brushite* ( $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ ), fosfato de octacálcio ( $Ca_8H_2[PO_4]_6 \cdot 5H_2O$ ), fosfato de cálcio ou *whitlockita* ( $\beta$ -TCP,  $\beta$ - $Ca_3[PO_4]_2$ ), *struvite* ( $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ) entre outros (De Dios Teruel et al., 2015). Os iões de cálcio, fosfato e hidroxilo são organizados em padrões repetitivos formando uma rede cristalina. A inclusão de sódio, fluoreto, carbonato e outros iões, representam uma forma impura de mineral (Fejerskov et al., 2015).

Vários catiões e aniões são incorporados nos centros catiónicos ( $Ca^{2+}$ ) e aniónicos ( $OH^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ) da matriz de hidroxiapatite. O cálcio pode ser substituído por iões de sódio

(Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>), enquanto que o fluoreto (F<sup>-</sup>) e o cloreto (Cl<sup>-</sup>) podem substituir o hidroxilo (OH<sup>-</sup>); o carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) pode alternar com os iões hidroxilo (OH<sup>-</sup>) e fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (De Dios Teruel et al., 2015).

Muitos outros elementos foram descritos na estrutura da hidroxiapatite, alguns em maior quantidade  $\geq 1000$  ppm como o Zn, Sr, Fe, Al, B, Ba, Pb, etc, e outros em menor ( $\leq 100$  ppb), como o Ni, Li, Ag, As, Se, Nb, Hg, etc.

Catiões metálicos como Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou o Zn<sup>2+</sup> podem ocupar a posição do Ca<sup>2+</sup>, complexos aniônicos como AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> podem substituir o PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> na estrutura cristalina (De Dios Teruel et al., 2015).

A incorporação de quantidades vestigiais dos elementos supramencionados na estrutura cristalina irá modificar as propriedades mecânicas e físico-químicas e a solubilidade da hidroxiapatite (De Dios Teruel et al., 2015), ocorrendo alterações na rede cristalina (Neel et al., 2016).

Desta forma, foi descrito por Schofield, Nesson e Richardson (2002), uma elevada correlação entre a rigidez do dente e o conteúdo em zinco; enquanto que o magnésio torna o substrato mais poroso (De Dios Teruel et al., 2015) e inibe o crescimento dos cristais (Neel et al., 2016) e o fluoreto torna o dente mais resistente a agressões de carácter ácido (De Dios Teruel et al., 2015) e diminui a solubilidade (Neel et al., 2016).

### **Microestrutura**

As moléculas de hidroxiapatite formam longos e finos cristais (Baumann, Carvalho, & Lussi, 2015). Os cristais apresentam uma forma hexagonal num corte transversal e tem uma espessura média de 26 nm e 68 nm de largura. O espaço entre os cristais é de 1-2 nm e são preenchidos com matriz orgânica (Baumann et al., 2015). Aproximadamente 10000-40000 destes cristais, com uma densidade de empacotamento de 550 cristais/ $\mu$ m formam um prisma (Baumann et al., 2015; Neel et al., 2016).

O prisma de esmalte, uma estrutura semelhante a um “buraco da fechadura” com diâmetro aproximadamente de 5  $\mu$ m, é perpendicular à junção amelodentinária e principalmente composta por prismas hexagonais de cristais de hidroxiapatite (Neel et al., 2016; Y. R. Zhang, Du, Zhou, & Yu, 2014).

Os cristais de hidroxiapatite no centro são paralelos ao longo eixo do próprio prisma. Contudo os cristais nas zonas marginais do prisma formam um ângulo de 45° em relação ao eixo axial (Y. R. Zhang et al., 2014). Esta configuração geométrica origina um

espaço intercrystalino que permite a passagem de elementos iônicos (hidrogênio e cálcio) e de pequenas moléculas como o ácido láctico (Featherstone, 1999), ocorrendo processos de desmineralização e remineralização (Buzalaf, Pessan, Honório, & ten Cate, 2011). Estes prismas são organizados numa estrutura tridimensional, estão dispostos em colunas e são parcialmente rodeados por uma bainha de matriz orgânica, também denominada de *rod sheath* ou bainha do prisma de esmalte. Apesar da matriz orgânica constituir apenas 1% do peso do esmalte, esta encontra-se finamente presente em toda a estrutura do esmalte, tanto dentro como entre os prismas (Baumann et al., 2015).

A matriz orgânica é composta por proteínas que foram secretadas pelos ameloblastos durante a formação do esmalte (Baumann et al., 2015). Estas são quase todas reabsorvidas pelos próprios ameloblastos durante a maturação, mantendo-se algumas proteínas residuais, como a enamelinina, a tuftelina (He & Swain, 2007a) e a ameloblastina (Rodrigues et al., 2017), que tem como função “colar” os cristalitos, mantendo a estrutura hierárquica do esmalte (He & Swain, 2007b). Esta estrutura tem um efeito relevante nas propriedades mecânicas do esmalte, alterando propriedades como a dureza e a resistência à fratura (He & Swain, 2007b).

Existem várias técnicas que podem ser aplicadas para uma análise dos tecidos duros dentários, como a microrradiografia, microscopia eletrónica de varrimento (MEV), microscópio de força atómica, teste de nano- e micro- dureza, entre outros (Attin & Wegehaupt, 2014).

A MEV é um método que permite obter informação sobre a reabsorção dos tecidos duros dentários. Este tipo de técnica consiste na dispersão de electrões sobre a superfície da amostra, que é previamente revestida por um material electrocondutor (geralmente ouro), de modo a evitar a acumulação de energia electrostática, e o sinal resultante fornece imagens de grande profundidade de foco, mesmo a diferentes profundidades, conferindo imagens tridimensionais de alta resolução, que permitem obter informação sobre a composição e a topografia da superfície (Field, Waterhouse, & German, 2010). Neste sentido, é um meio que nos ajuda a compreender as alterações morfológicas induzidas pelos agentes remineralizadores na estrutura do esmalte.

O esmalte hígido apresenta uma aparência suave e homogénea, quando observado no microscópio electrónico de varrimento; quando é sujeito a um processo de desmineralização ocorre um aumento da microporosidade, apresentando um padrão escamoso (Elkassas & Arafa, 2013).

## Macroestrutura

O esmalte que cobre a coroa anatômica varia na espessura nas diferentes áreas. É mais fina nas áreas incisais e oclusais, tornando-se progressivamente mais fina até terminar na junção amelocimentária (JAC).

A espessura é variável entre os diferentes tipos de dentes, sendo que os bordos incisais apresentam cerca de 2mm, até 2,5 mm nas cúspides do pré-molares e entre 2,5mm-3mm nos molares (Heymann, Swift Jr, & Ritter, 2013; L. Zheng, Zheng, Weng, Qian, & Zhou, 2011).

## Propriedades mecânicas

O processo de biomineralização altamente preciso permite que o dente apresente características ímpares ao nível estrutural e composicional (He & Swain, 2007b), contribuindo de modo favorável para as suas propriedades mecânicas (He & Swain, 2007b; Y. R. Zhang et al., 2014), apresentando uma força única e propriedades antiabrasivas (Cao et al., 2015).

Nas propriedades mecânicas incluem-se a elasticidade, a dureza, a viscoelasticidade e a resistência à fratura (Y. R. Zhang et al., 2014).

A dureza é uma medida que representa capacidade de um material sólido em resistir à deformação elástica, deformação plástica e fratura (Y. R. Zhang et al., 2014) e no caso do esmalte depende do seu conteúdo mineral e proteico, sendo a parte proteica responsável por alguma ductilidade e conseqüente resistência (Rodrigues et al., 2017).

Devido à variação quantitativa destes componentes em profundidade, a rigidez do esmalte também varia nas diferentes localizações do esmalte (Rodrigues et al., 2017), apresentando valores superiores nas superfícies oclusais e diminuindo até à JAC, devido ao aumento da matriz orgânica e à diminuição da densidade mineral (Elfallah, Bertassoni, Charadram, Rathsam, & Swain, 2015).

É referido na literatura a variação da microdureza do esmalte com os genes *TUFT1* e *TUIP11* (Küchler et al., 2017).

Os teste de dureza são utilizados para o estudo das propriedades mecânicas dos materiais, sendo amplamente usados para medição da microdureza dos tecidos dentários (Chuenarrom, Benjakul, & Daosodsai, 2009). Este é um método rápido, de fácil aplicabilidade e requer uma área pequena do espécimen para proceder ao teste (Chuenarrom et al., 2009).

Existe uma grande variedade de testes de dureza, em que a maior parte se baseia na capacidade da superfície de um material em resistir à penetração através de um indentador de ponta diamantada ou uma esfera metálica, sobre uma carga específica e durante um certo intervalo de tempo (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013; Chuenarrom et al., 2009).

Os testes mais aplicados para determinação da dureza incluem dureza de *Vickers*, dureza de *Knoop* e a nano-dureza (Y. R. Zhang et al., 2014). No teste de dureza de *Vickers*, após aplicação da carga por meio de um indentador diamantado com a forma de uma pirâmide quadrangular, em que os ângulos opostos são de 136°, as diagonais da indentação são medidas através de um microscópio óptico. O valor da dureza é obtido através do rácio entre o quociente da força da indentação e a área residual de impressão (Chuenarrom et al., 2009; Y. R. Zhang et al., 2014).

Tanto os testes de dureza *Vickers* como os de *Knoop*, são classificados como testes de microdureza em vez de testes de macrodureza (*Brinell* e *Rockwell*), visto que permitem aplicar forças de 10 mN a 10 N (Anusavice et al., 2013; Y. R. Zhang et al., 2014). Para avaliação da microdureza é necessário proceder ao polimento para remoção das variações superficiais existentes no esmalte com intuito de uniformizar todos os espécimes (Elkassas & Arafa, 2013) e para que o processo de desmineralização não tenha diferenças entre os diferentes espécimes (Kim, Lee, Lee, & Lee, 2013).

O polimento permite que obter uma superfície plana que é necessária para uma medição precisa da indentação (Srinivasan, Kavitha, & Loganathan, 2010).

### **Papel da saliva na proteção do esmalte**

A saliva é o componente químico mais importante da cavidade oral (Y. F. Zhang et al., 2013). Secretada pelas glândulas salivares, sendo constituída 99% por água e em menor percentagem, por componentes orgânicos e inorgânicos que se encontram dissolvidos no meio aquoso (Lima, Diniz, Moimaz, Sumida, & Okamoto, 2010). Este líquido orgânico, apresenta várias funções, desempenhando um papel importante na mastigação, fonação, deglutição, nas sensações gustativas, lubrificação tecidual, proteção da mucosa oral e esofágica, na digestão alimentar, atividade antibacteriana, antivírica e antifúngica, na regulação do balanço iónico na remineralização do esmalte, na deposição da película adquirida e capacidade de tamponamento dos ácidos (Dawes et al., 2015; Lima et al., 2010).

A componente inorgânica é composta por cálcio, fosfato, fluoreto, carbonato de hidrogénio, ácido carbónico e di-hidrogenofosfato (Hara & Zero, 2010). A saliva rica nestes iões, pode funcionar como um tampão fisiológico para neutralização dos ácidos e assim diminuir a desmineralização. A um  $\text{pH} > 5.5$  e associado a uma alta concentração iónica de cálcio e fosfato, o fosfato de cálcio pode ser precipitado, promovendo remineralização dos tecidos desmineralizados (X. Li, Wang, Joiner, & Chang, 2014), mantendo a integridade da estrutura do esmalte através da regulação do processo binominal de desmineralização/remineralização (Hara & Zero, 2010).

A parte orgânica é constituída por ureia, ácido úrico, creatinina, lípidos como o colesterol e ácidos gordos, e proteínas (histatina, alfa-amilase, mucinas, lactoferrina, lisoenzimas, cistatina, PRP, transferrina e imunoglobulina secretória A ) (Lima et al., 2010). As proteínas constituintes da saliva estão envolvidas no processo de regulação da desmineralização/remineralização e conseqüentemente no desenvolvimento da cárie dentária (Hara & Zero, 2010). Estas proteínas juntamente com glicoproteínas salivares, proteínas com origem no fluido crevicular, sangue, alimentos e componentes bacterianos (Pitts et al., 2017), que possuem carga eletronegativa apresentam alta afinidade para a superfície do esmalte, que embora seja também eletronegativa é revestida sobretudo por  $\text{Ca}^{2+}$  (eletropositivo), que desta forma atrai moléculas eletronegativas estabelecendo ligações fracas e reversíveis do tipo forças de *van der Waals* e ligações mais fortes e permanentes entre as adesinas (bactérias) e recetores complementares do biofilme do tipo iónicas e covalentes, formando uma película denominada por película adquirida (Fejerskov et al., 2015; C. Hannig, Hannig, Kensche, & Carpenter, 2017; M. Hannig & Joiner, 2006; Hara & Zero, 2010; Pitts et al., 2017), que apresenta uma espessura entre 0.3 a 1.1  $\mu\text{m}$  (Dawes et al., 2015).

A película adquirida é uma subestrutura específica das biomoléculas salivares que estabelecem fortes ligações à superfície iónica do esmalte (C. Hannig et al., 2017), atuando como uma barreira semipermeável na prevenção da difusão acídica como um reservatório de eletrólitos remineralizadores ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{F}^-$ ), mantendo a integridade do esmalte (M. Hannig & Joiner, 2006; Hara & Zero, 2010).

Küchler *et al.* (2017), avaliaram a relação entre as variações existentes nos genes associados ao desenvolvimento do esmalte com os níveis de cálcio e fósforo na saliva e concluíram que as variações genéticas no *AMELX*, *AMNB* e *ESRRB* estão associadas aos níveis de cálcio na saliva e que as variações genéticas ocorridas no *ENAM* estão associadas ao nível de fósforo na saliva.

## **CÁRIE DENTÁRIA**

### **Definição**

A cárie dentária é uma doença dinâmica, multifatorial, que envolve interações entre o biofilme microbiano mediado e formado na superfície da estrutura dentária, os açúcares, a saliva, a exposição inadequada ao flúor e fatores genéticos (Buzalaf et al., 2011; Pitts et al., 2017).

O processo dinâmico da cárie consiste em alterações repentinas intercaladas dos processos de desmineralização e remineralização, em que se a desmineralização se perpetuar durante tempo suficiente, resulta no aparecimento de lesões de cárie em zonas específicas dos dentes (Pitts et al., 2017).

A cárie pode desenvolver-se ao longo da vida, afetando a dentição decídua como a definitiva, danificando a coroa dentária e ao longo do tempo expor as superfícies radiculares (Pitts et al., 2017).

Os mecanismos subjacentes à progressão da cárie estão bem explícitos, sobretudo nos aspetos relacionados com os tecidos duros e com a microbiologia da doença, conhecendo nós, que estes dois fatores, não são independentes um do outro. A cárie pode ser considerada uma doença dieto-microbiana, visto que não ocorre na ausência de biofilme dentário cariogénico e é dependente da presença de hidratos de carbono, fermentáveis.

O conceito moderno de cárie também inclui fatores comportamentais, sociais, psicológicos e biológicos e o seu envolvimento na doença (Pitts et al., 2017), sendo de extrema importância a existência de um equilíbrio entre os fatores protetores e patológicos que influenciam a iniciação e progressão da cárie dentária. Uma otimização dos fatores protetores (dieta saudável, escovagem com pasta fluoretada bi-diária, aplicação profissional tópica de fluoretos, aplicação de selantes e função salivar normal) promovem a remineralização alterando a dinâmica do processo carioso, impedindo a progressão da lesão e que ocorra a intercorrência da sua regressão (Featherstone, 2008; Pitts et al., 2017). Contudo, caso não se invertam os fatores patológicos, entre os quais o consumo frequente de alimentos açucarados, uma higiene oral deficitária, baixa aplicação de fluoretos e uma disfunção salivar, estes ao desequilibrarem o balanço dinâmico, promovem a desmineralização e conduzem processo carioso no seu início e progressão (Pitts et al., 2017).

A cárie dentária é uma doença prevenível, distribuída de forma heterogênea, tendo encargos significativos a nível económico e na qualidade de vida (Pitts et al., 2017).

### Aspetos Bioquímicos

A cárie dentária tem início na superfície do esmalte, em que a estrutura mineral cristalina do dente é desmineralizada por ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de hidratos de carbono fermentáveis pelas bactérias do biofilme (Pitts et al., 2017), sobretudo pelos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus spp* (Selwitz et al., 2007).

Apesar da possibilidade de formação de distintos ácidos pelos microrganismos do biofilme dentário, o ácido láctico é o predominante e é considerado o principal ácido envolvido no processo cariioso (Pitts et al., 2017).

Alguns estudos laboratoriais confirmaram a presença de diferentes bactérias presentes no biofilme dentário capazes de produzir ácidos a partir de açúcares (acidogénicas) e outras do tipo acidúricas (ácido-tolerantes), incluindo os tipos: *Bifidobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Scardovia wiggsiae* (Fejerskov et al., 2015; Rosier, De Jager, Zaura, & Krom, 2014).

Também existem certos tipos de bactérias que atenuam o potencial efeito nocivo do ácido láctico, ao utilizá-lo como fonte nutricional e convertendo-o em ácido fraco, como é o exemplo da *Veillonella spp.*, ou produzir compostos alcalinos através do metabolismo da arginina ou ureia na saliva, como é o caso *S.salivarius*, *S.sanguinis* e *A.naeshlundii* (Fejerskov et al., 2015; Pitts et al., 2017).

À medida que a concentração de ácidos aumenta na fase fluída do biofilme, o valor de pH diminui e o ácido desmineraliza a camada superficial do dente. A perda de substância mineral conduz ao aumento da porosidade, aumentando assim o espaço entre os cristais e ocorre um enfraquecimento da superfície, permitindo uma difusão em profundidade no dente tendo como consequência uma desmineralização subsuperficial.

À medida que a desmineralização progride e na presença de um meio ácido, a taxa de perda mineral é superior nas camadas inferiores quando comparado às camadas mais superficiais, formando uma lesão subsuperficial (Pitts et al., 2017).

Os produtos resultantes da desmineralização, sobretudo cálcio e fosfato, aumentam o seu grau de saturação podendo ter um papel de proteção parcial sobre a camada superficial desmineralizada. A presença do ião fluoreto inibe a desmineralização da

camada superficial (Pitts et al., 2017), funcionando como catalisador para a difusão do cálcio e fosfato para o dente (Featherstone, 2008; Selwitz et al., 2007).

Os ácidos presentes no biofilme são neutralizados pela capacidade tampão da saliva; o pH do fluído do biofilme torna-se neutro e suficientemente saturado de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  e  $\text{F}^-$  impedindo a desmineralização e promovendo a re-deposição de minerais-remineralização (Featherstone, 2008; Pitts et al., 2017). Estas alterações dinâmicas no processo carioso permitem que os estágios iniciais da cárie (subclínicos) possam ser parados e revertidos (Pitts et al., 2017)

A cárie é o resultado desfavorável das mudanças que ocorrem na flora microbiana residente provocadas pelo ambiente oral. Um aumento do consumo de hidratos de carbono fermentáveis resulta na exposição do biofilme a um pH baixo durante um período de tempo maior, favorecendo o desenvolvimento de bactérias acidúricas. Pode-se considerar que a acidificação da placa bacteriana atua como principal fator de seleção de uma comunidade bacteriana acidúrica e acidogénica, que aumenta o risco de cárie (Takahashi & Nyvad, 2008).

### **Classificação**

Uma das formas que existe de classificação de lesões de cárie é relativamente à sua localização anatómica. Por exemplo, pode-se dizer que existem cáries de sulco e fissuras e cáries de superfícies lisas. Nas superfícies lisas, as lesões podem iniciar-se no esmalte ou nas zonas que apresentem superfícies radiculares expostas, afetando o cimento e dentina (cáries radiculares).

Quando as lesões de cárie afetam superfícies íntegras naturais, designa-se por cárie primária; caso as lesões se localizem próximas de uma restauração designam-se por cáries secundárias ou recorrentes (Fejerskov et al., 2015).

Outra classificação que se pode aplicar é em relação à atividade das lesões cariosas. Uma lesão é considerada ativa quando está em progressão, isto é, quando ocorre uma desmineralização contínua (Young et al., 2015). Uma lesão de cárie inativa é uma lesão que já teve um período de atividade, mas que a sua progressão foi interrompida. Há que salientar que a distinção entre uma lesão ativa e inativa por vezes é de difícil apreciação, sendo necessário recorrer a um conjunto de fatores de avaliação, tácteis e visuais, para poder classificar (Fejerskov et al., 2015; Young et al., 2015).

O estado de atividade lesão irá influenciar a decisão do clínico em optar uma intervenção não cirúrgica ou cirúrgica (Young et al., 2015), em que cáries inativas não necessitam de tratamento para além de uma escovagem diária com pasta fluoretada (Fejerskov et al., 2015).

A terminologia, cáries oculta ou *hidden caries*, é usada para classificar lesões presentes na dentina impercetíveis no exame visual, necessitando de um exame radiográfico complementar (Fejerskov et al., 2015).

## **Epidemiologia**

Durante décadas, têm-se realizado estudos epidemiológicos de cárie a nível mundial, com o intuito de obter dados que estejam enquadrados nas seguintes especificações: dados precisos e significativos de faixas etárias relevantes sobre a quantificação da doença (prevalência), a taxa de progressão da mesma- novos casos – (incidência) e o seu comportamento temporal (Pitts et al., 2017).

Contudo nem sempre é possível fazer comparações entre os estudos, pelo facto dos critérios de diagnóstico aplicados diferirem um dos outros (Selwitz et al., 2007).

A cárie dentária continua a ser um problema de saúde major na maioria dos países industrializados, em que 60-90% da população pediátrica e a grande parte dos adultos apresentam, sinais de cárie (Pitts et al., 2017). Apesar de existir um decréscimo na sua prevalência (Selwitz et al., 2007), têm-se verificado o seu aumento, em certos grupos populacionais, sobretudo nos estratos socioeconómicos mais desfavorecidos, em minorias étnicas e populações migrantes (Bagramian, Garcia-Godoy, & Volpe, 2009; Pitts et al., 2017). Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto das medidas preventivas não abrangerem esses grupos (Bagramian et al., 2009). O contexto geográfico da população a nível mundial é outro fator que ajuda a explicar mudanças, visto que o crescimento económico dos países promove um fluxo das zonas rurais para os centros urbanos, promovendo alterações no estilo de vida e na dieta das populações (Bagramian et al., 2009; Pitts et al., 2017).

Num estudo publicado em 2017, referente à prevalência de cárie e a necessidade de tratamento nas crianças e adolescentes portuguesas, englobado no III Estudo Nacional de Prevalência de Doenças Orais, foi selecionado uma amostra aleatória de 3710 participantes, de 6, 12 e 18 anos, em que foi aplicado um questionário relativo a aspetos sociodemográficos e sobre a saúde oral. O exame clínico foi baseado nos critérios do

ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System*). Os resultados demonstraram que aos 6, 12 e 18 anos, a prevalência de cárie era de 45,2%, 47% e 67,6%, respectivamente, revelando uma grande redução dos níveis da doença nas crianças e adolescentes ao longo dos últimos anos, devido à existência do Programa Nacional de Promoção da Saúde Oral que foi implementado (Calado, Ferreira, Nogueira, & Melo, 2017).

Nos Estados Unidos da América, cerca de 50% das crianças com idades compreendidas entre os 5 os 9 anos de idade, tem pelo menos um dente cariado ou restaurado, com maior prevalência na faixa etária do 17 anos (78%) (Bagramian et al., 2009).

As lesões de cárie por tratar na dentição definitiva, englobando todas as idades, apresentam uma prevalência de 35%, o que a nível global corresponde a 2,4 mil milhões de pessoas afetadas (Pitts et al., 2017).

### **Manifestações Clínicas**

Quando ocorre uma perda mineral significativa, surgem os primeiros sinais de cárie dentária, as lesões de *white spot* (WSL). As WSL são definidas com uma desmineralização da superfície e a subsuperfície do esmalte, sem a presença de cavitação (Paula et al., 2017).

Esta estágio da doença é clinicamente relevante, visto que a lesão pode ser interrompida ou mesmo revertida (Abdullah & John, 2016; Paula et al., 2017).

Apresentam uma aparência branca e opaca, particularmente quando desidratada, suscetível à deterioração quando sondadas, aumento da porosidade sobretudo na subsuperfície, localizando-se nos sulcos, fissuras e superfícies lisas dos dentes (Paula et al., 2017). A formação de WSL pode estar também associada à utilização de aparelhos ortodônticos fixos (bandas, *brackets* e outros componentes) que dificultam a higiene oral, aumentando assim o risco de desmineralização e conseqüentemente o aparecimento de WSL (Jo et al., 2014; Sudjalim, Woods, & Manton, 2006).

A perda de translucidez do esmalte é um fenómeno ótico que ocorre devido desmineralização das camadas mais externas do esmalte. As alterações do índice de refração nas zonas afetadas são consequência da rugosidade de superfície, da perda de brilho e alterações na reflexão interna em que o esmalte poroso dispersa mais luz do que

o esmalte são, apresentando um esmalte com maior opacidade visual (Sudjalim et al., 2006).

Neste estágio de evolução do processo cariioso, as lesões podem ser interrompidas ou revertidas através da modificação dos fatores causais ou da aplicação de medidas preventivas; caso a lesão de cárie continue ativa, esta irá progredir para estágios mais avançados de destruição da estrutura dentária (Pitts et al., 2017).

Quando a cárie se encontra nos estádios iniciais, esta encontra-se circunscrita ao esmalte e na forma inativa apresenta uma superfície lisa, dura e brilhante, de cor branca ou castanha; no sistema fissurário apresenta uma mudança evidente de cor, tornando-se castanha, sem sinais significativos de desmineralização da dentina.

Quando ocorre progressão da lesão, o esmalte apresenta cavitação e aspeto rugoso, sendo visível uma sombra da dentina através do esmalte. A dentina apresenta uma perda de brilho, de aspeto mate, com um coloração branco-amarelada e de consistência mole. (Young et al., 2015).

Deve-se realizar um diagnóstico diferencial das WSL, de fluorose e hipomineralização, em que estes 2 apresentam uma origem intrínseca e não resultam de fatores causais de cárie dentária já mencionados anteriormente (Denis, Atlan, Vennat, Tirlet, & Attal, 2013).

### **Diagnóstico e Índices de classificação**

O diagnóstico da cárie quer seja efetuado de forma precoce ou avançada, é feito através de um exame visual e táctil das superfícies dentárias. Embora este método esteja bem estabelecido e universalmente aceite, não é possível aplicar em todas as superfícies dentárias, sobretudo nas zonas proximais dos dentes posteriores (Selwitz et al., 2007).

Neste sentido foram desenvolvidos outros métodos de diagnóstico, como o exame radiográfico (Selwitz et al., 2007), o *quantitative light-induced fluorescence* (QLF), *laser fluorescence*, *digital imaging fiber-optic transillumination* (FOTI), *electrical resistance caries monitoring device* e *optical coherence tomography* (Aykut-Yetkiner, Kara, Ates, Ersin, & Ertugrul, 2014; Fejerskov et al., 2015). Estas técnicas são consideradas como complementares na deteção de lesões de carie incipientes (Aykut-Yetkiner et al., 2014).

A avaliação clínica da gravidade de lesões, o tamanho e a sua atividade podem ser classificados através de sistemas clínicos indexados. A gravidade das WSL podem ser quantificadas de acordo com *International Caries Detection and Assessment System II*

(ICDAS II), que foi desenvolvido com a necessidade de padronizar a quantificação das lesões de cárie e facilitar a comparação entre estudos (Bailey et al., 2009).

Existem outros indicadores epidemiológicos utilizados em estudos, como é o caso do Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados (CPO), desenvolvido em 1937, que continua a ser ainda muito utilizado (Veiga, Pereira, Ferreira, & Correia, 2015), apesar de demonstrar muitas limitações (Fejerskov et al., 2015). Para mitigar algumas limitações do índice CPO, foi apresentado o *Significant Caries Index* (SiC), que não é um novo índice, mas sim uma forma de apresentação de dados que ajuda a ter uma melhor visão sobre a distribuição da cárie na população, dando maior atenção aos indivíduos de risco elevado (Bratthall, 2000; Fejerskov et al., 2015). Contudo, os indicadores referidos anteriormente não possuem os requisitos para avaliação de lesões não cavitadas, que é importante no processo de diagnóstico (De Almeida Pinto-Sarmiento et al., 2016).

Os critérios do ICDAS baseiam-se numa avaliação combinada das características e atividade das lesões, em que a cor do dente, aparência clínica da lesão, sensação táctil (rugosidade) e áreas de estagnação de placa bacteriana são tidos em conta para a elaboração do diagnóstico (De Almeida Pinto-Sarmiento et al., 2016).

Neste sistema, é feita a avaliação da condição do dente (integridade ou a presença de restaurações) atribuindo uma codificação numérica de 0 a 8, que corresponde ao primeiro dígito (tabela 1); outro critério que é o estágio de desenvolvimento da cárie, é atribuído um código de 0 a 6, correspondendo ao segundo dígito (Banava et al., 2012; Sala & García, 2013).

Tabela 1 - Descrição da codificação do primeiro dígito do código ICDAS

Código	Descrição do código
0	Não restaurado, nem selado
1	Selado parcialmente
2	Selado totalmente
3	Restaurado com resina composta ou ionómero de vidro
4	Restauração a amálgama
5	Coroa metálica
6	Coroa de cerâmica, faceta ou ponte
7	Restauração perdida ou fraturada
8	Restauração provisória

Tabela 2 - Descrição da codificação do segundo dígito do código ICDAS

Código	Descrição do código
0	Superfície dentária intacta e sem lesões
1	Cavitação incipiente no esmalte
2	Alterações visuais proeminentes no esmalte
3	Cavidade em esmalte opaco e pigmentado sem dentina visível
4	Sombreamento da dentina adjacente
5	Cavidade distinta em redor de uma restauração ou selante, de dimensão superior a 0,5 mm
6	Cavidade extensa, com exposição da dentina

### Prevenção e remineralização de lesões cariogénicas

As lesões de cárie desenvolvem-se gradualmente, iniciando-se com alterações estruturais mínimas, não detetáveis clinicamente, progredindo até desmineralização com uma contínua destruição dos tecidos dentários. Contudo, nos estados iniciais da patologia, a relação existente entre os fatores patológicos e protetores é dinâmica e reversível (Llena, C., Leyda M., Forner, 2015).

A saliva pode remineralizar as lesões iniciais até certo ponto, mas este processo fisiológico é lento e não é eficaz na remineralização de todas as lesões (Abdullah & John, 2016).

O objetivo da Prevenção moderna tem em conta a abordagem profilática e preventiva no tratamento de lesões iniciais de cárie, através de métodos não invasivos que previnem a desmineralização e promovem a remineralização, impedindo a progressão da doença e preservando a integridade do dente, ao invés da abordagem mais tradicional que consiste no tratamento restaurador, que na maioria das vezes é invasivo (Abdullah & John, 2016; Elkassas & Arafá, 2013).

A decisão clínica sobre o tipo de terapêutica a abordar deve ter em conta a avaliação do risco de cárie, para assim estabelecer um protocolo terapêutico adequado com base no

risco de cárie determinado (baixo, médio ou alto). Na presença de uma lesão de cárie, a decisão por escolher uma abordagem preventiva ou cirúrgica deve ser baseada na localização, extensão e atividade da lesão. Há que realçar que não se deve optar por uma terapêutica cirúrgica com base no alto risco de cárie. Em todas as categorias de risco deve-se poder aplicar uma terapêutica de remineralização nas lesões não cavitadas (Young & Featherstone, 2013).

Para minimizar a ocorrência e a disseminação das WSL, é possível encontrar inúmeras terapêuticas na literatura como a educação para a higiene oral, flúor, compostos à base de fosfopéptidos de caseína, xilitol, resinas infiltrantes entre outros (Abdullah & John, 2016; Paula et al., 2017), devendo existir uma biodisponibilidade quantitativa suficiente ou supersaturada de cálcio, fosfato e flúor, para que possa haver uma eficiente remineralização (Llena, C., Leyda M., Forner, 2015).

### *Flúor*

Os benefícios do flúor em relação à prevenção e controlo da cárie são amplamente reconhecidos pelos investigadores e profissionais de saúde oral (Abdullah & John, 2016; Pitts et al., 2017).

Na cavidade oral, a presença do flúor diminui o desenvolvimento da patologia através 3 diferentes mecanismos: aumento da remineralização do esmalte, inibição dos enzimas bacterianos acidogénicos e através da inibição da desmineralização do esmalte (Paula et al., 2017).

O flúor pode ser aplicado em estratégias de âmbito comunitário como a fluoretação da água, leite e sal, ou veiculados em agentes terapêuticos de aplicação profissional ou em ambulatório, na forma de pasta (máximo de 5000 ppm), gel (máximo 5000 ppm), vernizes (23000 ppm), espuma, colutórios (223 ppm) ou comprimidos (Paula et al., 2017; Pitts et al., 2017).

A aplicação tópica de flúor em concentrações elevadas (superior a 2500 ppm) permite criar um fluxo capaz de penetrar no biofilme dentário que cobre a superfície dentária, fornecendo o flúor para a superfície do dente e sendo capaz de se concentrar nas lesões incipientes, verificando-se um aumento na taxa de remineralização do esmalte (Pitts et al., 2017).

Concentrações elevadas de flúor são importantes para a criação de reservatórios de fluoreto de cálcio na superfície do dente e na placa dentária (Pitts et al., 2017),

promovendo a remineralização por hipermineralização do esmalte, de acordo com a literatura. No entanto esta hipermineralização incide sobre a zona mais superficial do esmalte, impedindo a fluxo iônico para a subsuperfície do esmalte, afetando a sua remineralização e conseqüentemente as propriedades ópticas do esmalte (Paula et al., 2017).

Verificou-se que altas concentrações de flúor podem apresentar propriedades bactericidas, embora com efeito de curta duração (Pitts et al., 2017). Também foi demonstrado o efeito benéfico de concentrações elevadas de fluoreto nos desafios erosivos e o aumento da resistência do dente à abrasão (X. Li et al., 2014).

A concentração e doses da aplicação de fluoretos é um tema controverso. De acordo com alguns autores, a utilização de doses altas apresenta melhores resultados no aumento da resistência do esmalte contra a desmineralização, enquanto que doses baixas de fluoreto tem melhor efeito de remineralização do esmalte (Singh et al., 2016).

Há que salientar que a administração de doses elevadas pode ter efeitos tóxicos sobre os indivíduos e no caso de ser administrado em excesso durante o desenvolvimento dentário pode conduzir a situações de fluorose dentária (G. M. S. Oliveira et al., 2014).

O flúor é apresentado em 3 tipos de formulações: fluoreto de sódio (NaF), monofluorfosfato de sódio e fluoreto de amina (Paula et al., 2017; Pitts et al., 2017).

Certos produtos fluoretados são acidulados, apresentando um pH entre 3 a 4. Foi demonstrado em estudo laboratoriais, que o valor de pH baixo permite a penetração de iões a zonas mais profundas das lesões, evitando o bloqueio por parte do poros mais superficiais do esmalte (Pitts et al., 2017).

As pastas dentífricas fluoretadas são a forma mais usada de veiculação de flúor mundialmente, tendo demonstrado efetividade contra a cárie dentária, reduzindo a incidência a nível global. Esta efetividade relaciona-se com uma aplicação frequente em baixas doses (Pitts et al., 2017).

A utilização da pasta dentífrica permite que o fluoreto que se difunda por várias partes da cavidade oral (dentes, saliva e biofilme residual), onde forma depósitos de fosfato de cálcio. Estes depósitos desempenham a função de reservatórios de flúor, que servem como proteção da superfície mineral contra os desafios acidogénicos subsequentes (X. Li et al., 2014).

Os vernizes de flúor são amplamente usados com uma estratégia de aplicação tópica para o controlo da cárie (Cardoso et al., 2014), sendo a sua eficácia descrita na literatura (Duraisamy, Xavier, Nayak, Reddy, & Rao, 2015). A utilização deste tipo de formulações

de flúor apresenta diversos benefícios: aderem à superfície do esmalte, funcionando com um reservatório de libertação lenta de flúor, que conduz a uma biodisponibilidade mais prolongada de flúor na cavidade oral (Duraismy et al., 2015). Esta libertação lenta e contínua de fluoreto reage com os cristais de hidroxiapatite do esmalte durante um período mais longo, conduzindo a penetração mais profunda que resulta na formação de cristais de fluoro-hidroxiapatite mais estáveis (Singh et al., 2016), tendo implicações importantes na redução da desmineralização e no aumento da remineralização (Duraismy et al., 2015).

Outras vantagens residem na sua fácil aplicabilidade, seguros, bem aceites pelos pacientes, visto que não depende da sua cooperação diária e endurecem com a saliva (Cardoso et al., 2014; Duraismy et al., 2015).

O verniz dentário que foi descrito na literatura com maior efetividade como agente anticariogénico é o constituído por fluoreto de sódio (Cardoso et al., 2014).

Os vernizes de flúor apresentam um tempo de vida útil curto na cavidade oral porque estão sujeitos a constantes agressões de natureza mecânica ou química (hábitos de higiene oral, ação mastigatória dos tecidos orais, fluxo salivar). Supõem-se que os vernizes permaneçam até 24h na superfície dentária. É importante que os vernizes, neste período curto libertem os iões, antes que sejam removidos (Shen et al., 2015).

Apesar das propriedades do flúor como agente remineralizador, a sua presença única não permite um remineralização mais substancial da subsuperfície do esmalte (Llena, C., Leyda M., Forner, 2015). Tem sido demonstrado um aumento da eficácia anticariogénica e um aumento da remineralização de lesões iniciais de cárie, quando existe a presença de cálcio e fosfato. Assim foram desenvolvidos novos produtos para melhorar a eficiência dos vernizes, como por exemplo os vernizes de flúor (fluoreto de sódio) com fosfato de cálcio modificado por ácido fumárico (fTCP) (Bajaj et al., 2016; Shen et al., 2015).

Contudo a combinação iónica de fosfato de cálcio e o fluoreto no ambiente oral pode ser problemático, podendo levar à formação de um composto de fluoreto, cálcio e fosfato de baixa solubilidade, diminuindo a disponibilidade iónica para a remineralização (Bajaj et al., 2016; Shen et al., 2015).

### CPP-ACP e CPP-ACFP

Os fosfopéptidos de caseína apresentam uma capacidade notável em estabilizar os íons de cálcio e fosfato em solução, formando o complexo fosfopéptido de caseína – fosfato de cálcio amorfo sendo que este complexo aumenta os níveis de fosfato e cálcio promovendo a remineralização (Paula et al., 2017).

O CPP-ACP é considerado como um reservatório de fosfato de cálcio, capaz de regular a atividade dos íons livres de cálcio e fosfato, ajudando a manter um estado de supersaturação que inibe a desmineralização e promove a remineralização, tendo sido demonstrado que o CPP-ACP apresenta adesão à placa bacteriana (Bajaj et al., 2016; J. Li et al., 2014), sendo capaz de incorporar o ACP na placa bacteriana, prevenindo a desmineralização da subsuperfície do esmalte (Abdullah & John, 2016; X. Li et al., 2014).

O potencial do CPP-ACP na prevenção da desmineralização e na promoção da remineralização tem sido descrito na comunidade científica, em estudos *in vitro*, ensaios clínicos e modelos humanos *in situ* (Abdullah & John, 2016).

Foi descrito que o CPP-ACP quando usado em combinação com fluoretos demonstrou maior efeito inibitório de desmineralização e menor incidência de cárie em comparação com o seu uso individual (Bajaj et al., 2016; Duraisamy et al., 2015).

Esta melhoria deve-se à capacidade do CPP-ACP em interagir com o fluoreto, produzindo um efeito anticariogénico aditivo através da formação de um complexo de fosfato de cálcio amorfo e fluoretos (ACFP), que é estabilizado pelo CPP na superfície dentária (Bajaj et al., 2016; J. Li et al., 2014).

O complexo ACFP fornece todos os componentes necessários para que ocorra a remineralização com fluorapatite, que é mais resistente aos ataques ácidos do que a hidroxiapatite (J. Li et al., 2014).

Apesar de haver produtos comerciais que têm na sua composição CPP-ACP, as vantagens do seu uso como agente suplementar aos produtos fluoretados continua incerto (Bajaj et al., 2016; G. M. S. Oliveira et al., 2014). São necessários estudos clínicos de alta qualidade para proceder a recomendações definitivas (Bajaj et al., 2016; J. Li et al., 2014).

## **PERTINÊNCIA DO ESTUDO**

A elevada prevalência da cárie dentária a nível mundial tem repercussões ao nível da saúde oral, das condições sociais e económicas dos indivíduos, contudo tem-se procurado encontrar as melhores estratégias e/ou agentes terapêuticos que os médicos dentistas possam utilizar para contribuir para diminuir a incidência e prevalência desta doença progressiva e reversível, atuando de forma preventiva e não invasiva no tratamento desta doença.

## **OBJETIVOS**

São objetivos deste estudo comparar o efeito da combinação de distintos agentes promotores de remineralização, em cáries de esmalte induzidas artificialmente:

- Medir a microdureza superficial do esmalte humano, após indução de lesões de cárie e aplicação de pasta dentífrica fluoretada;
- Medir a microdureza superficial do esmalte humano, após indução de lesões de cárie e aplicação combinada de pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio;
- Medir a microdureza superficial do esmalte humano, após indução de lesões de cárie e aplicação combinada de pasta dentífrica fluoretada e CPP-ACP;
- Comparar a microdureza superficial do esmalte humano, após indução de lesões de cárie e aplicação isolada e combinada, dos distintos agentes promotores de remineralização;
- Avaliar microscopicamente o efeito que a pasta dentífrica fluoretada tem sobre esmalte humano, após a indução de lesões de cárie;
- Avaliar microscopicamente o efeito que a combinação de pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio têm sobre esmalte humano, após a indução de lesões de cárie;
- Avaliar microscopicamente o efeito que a combinação de pasta dentífrica fluoretada e CPP-ACP tem sobre esmalte humano, após a indução de lesões de cárie;

## **HIPÓTESE NULA**

Foram equacionadas as seguintes hipóteses:

- Não existem diferenças significativas na microdureza de superfície do esmalte humano quando comparados os distintos agentes de remineralização sobre as lesões iniciais de cárie.
- Não existem diferenças significativas no aspeto microscópico da superfície do esmalte humano quando comparados os distintos agentes de remineralização sobre as lesões iniciais de cárie.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto de investigação em questão foi apresentado sob a forma de Proposta Final da Tese do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Superior Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), tendo sido submetido e aprovado pelas seguintes entidades responsáveis, Comissão Científica do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do ISCSEM e Comissão de Ética para a saúde da Cooperativa Egas Moniz.

Os dentes do estudo foram fornecidos pelo banco de dentes humanos da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz, sendo obtidos indivíduos anónimos que assinaram o seu termo de consentimento informado. Todos os dentes foram preservados numa solução de Cloramina T (1%) e água desionizada a 4°C, de acordo com a Norma ISO/TS 11405:2015.

### **LOCAL DO ESTUDO**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biomateriais do ISCSEM, durante o período de maio a julho de 2017. A análise dos espécimes através da Microscopia Eletrónica de Varrimento foi realizada no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa em julho 2017.

### **DESENHO DO ESTUDO**

Foi realizado um estudo *in vitro*, observacional e analítico, em 12 molares humanos hígidos, sem cáries, nem fraturas, dos quais se obteve 48 fragmentos, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: Grupo A (n=12), Grupo B (n=12) e Grupo C (n= 12) – grupos de estudo - foram sujeitos a um processo de desmineralização e de seguida foram aplicados os diferentes agentes de remineralização; o Grupo D (n=12), controlo, não foi sujeito a nenhum processo de desmineralização nem aplicado algum agente de remineralização (Fig.1).

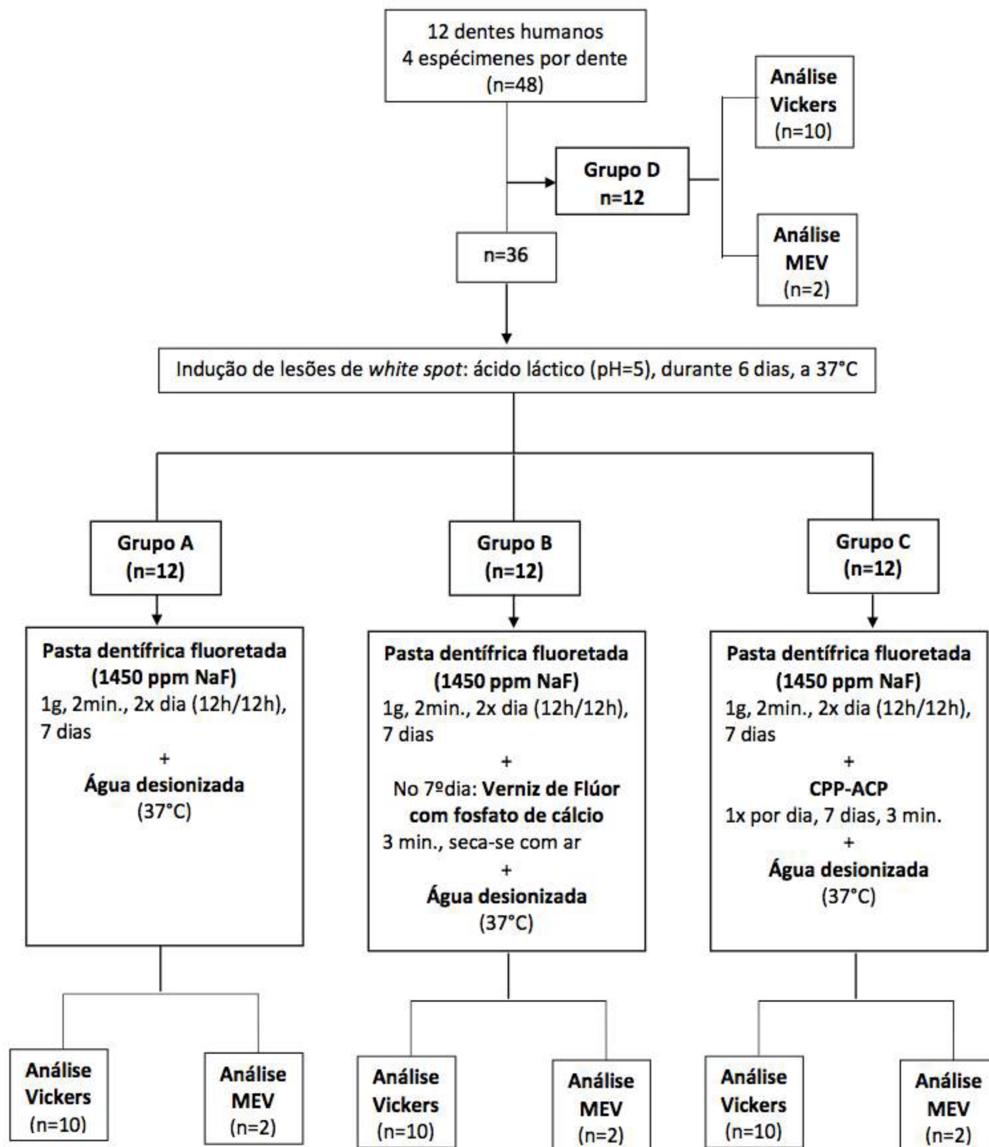


Figura 1 - Fluxograma do procedimento experimental

## SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 12 molares humanos hígidos, respeitando os seguintes critérios de inclusão: íntegros, não cariados, livres de fraturas e sem terem alterações de superfícies expostas a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico, entre outros) ou eletromagnéticos (radiação laser), à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos.

Como critérios de exclusão foram definidos: dentes com malformações, não íntegros, que tivessem sido submetidos a tratamentos químicos, mecânicos ou eletromagnéticos (anteriormente referidos).

Para se proceder à seleção dos dentes, respeitando os critérios de inclusão, foi realizada uma inspeção visual através de uma lupa estereomicroscópica Leica™ MZ6 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) (Tuloglu et al., 2016).

## **PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Após a seleção da amostra de estudo, foram removidos, com recurso a curetas periodontais, todo o cálculo e tecido mole das superfícies coronal e radicular (Cardoso et al., 2014; Jo et al., 2014).

Para obtenção de fragmentos a partir dos dentes, foi utilizado um micrótopo de tecidos duros, o Accutom-50® (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig.2).



Figura 2 – Micrótopo de tecidos duros Accutom-50® (Struers A/S)

Cada dente foi seccionado no sentido mesio-distal, seguindo o sulco central da face oclusal, obtendo-se 2 fragmentos, um vestibular e um palatino/lingual (Fig.3).



Figura 3 - Secção de um molar no sentido mesio-distal

Cada fragmento obtido foi cortado nos sentido vestibulo-palatino/lingual, perpendicularmente ao longo eixo do dente (Fig.4) (Chen, Parolia, Pau, & Celerino De Moraes Porto, 2015; Y. F. Zhang et al., 2013), obtendo-se outros 4 fragmentos no total (mesio-vestibular, mesio- palatino/lingual, disto-vestibular e disto-palatino/lingual).

A porção coronária foi separada da porção radicular, ao nível da junção amelo-cimentaria (Vyavhare, Sharma, & Kulkarni, 2015), com recurso ao micrótomo (Fig.5).



Figura 4 - Fragmentos resultantes após secção no sentido vestibulo-lingual



Figura 5 - Secção da porção radicular



Figura 6 - Quatro fragmentos obtidos com área de 3x4 mm

Os espécimes submetidos ao teste de microdureza foram previamente, polidos através uma máquina rotatória refrigerada com discos de carbetto (de granulometria 320, 600 e 1200 grits) (Fig.7), até obtenção de uma superfície lisa e plana (Buzalaf et al., 2010; Cardoso et al., 2014; A. F. B. de Oliveira et al., 2016; Magalhães, Comar, Rios, Delbem, & Buzalaf, 2008; Tuloglu et al., 2016).



Figura 7 - Máquina de polimento LaboPol-4® (Struers)

Seguidamente todos os espécimes foram lavados em água desionizada, para remover as partículas resultantes do polimento.

### **SIMULAÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE *WHITE SPOT* ATRAVÉS DE UM CICLO DE DESMINERALIZAÇÃO**

Para a indução de lesões artificiais de *white spot*, os 36 espécimes foram selecionados, sendo imersos numa solução tampão de 50 mL ácido láctico, a pH=5 durante 6 dias (Buzalaf et al., 2010; Cardoso et al., 2014; Gangrade et al., 2016), a uma temperatura de 37°C (Jo et al., 2014; Oliveira et al., 2014). A solução tampão de ácido

lático foi preparada com: 50 mM de ácido láctico (Fluka® Analytical, SIGMA – ALDRICH, Co., Espanha, lote: #BCBN4919V), 3 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Chem-Lab NV, Zedelgem, Bélgica, Lote 21.0070103.1000), 6 mM tetraetil-metil-difosfonato e vestígios de timol, tendo sido o pH ajustado para 5,0 com KOH (Laborspirit, Lisboa, Portugal, Lote: 201210) (Cardoso et al., 2014).

## APLICAÇÃO DE AGENTES INDUTORES DA REMINERALIZAÇÃO

### Grupo A (n=12)

Os espécimes foram escovados com uma escova elétrica (*Oral B Vitality*, Braun, P&G, Cincinnati, EUA) (Fig.8) (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012), duas vezes por dia (8h00 e 20h00), com 1.0 g de pasta dentífrica com 1450ppm NaF (*Colgate™ Triple Action*, Colgate-Palmolive, Nova Iorque, EUA, lote: 7094PL112A) (Fig.9) por um período de 2 minutos, durante 7 dias (Cardoso et al., 2014; Singh et al., 2016; Wang et al., 2011).

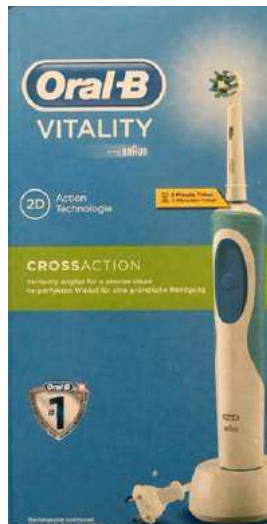


Figura 8 - Escova elétrica (*Oral B Vitality*, Braun, P&G)

Os espécimes foram colocados numa solução de água desionizada e armazenados numa estufa a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Schwabach, Alemanha) (Shetty, Hegde, & Bopanna, 2014), entre os ciclos de escovagem e durante 7 dias.

Após estes 7 dias, de armazenamento, 10 espécimes foram submetidos ao teste de microdureza de *Vickers* e 2 a microscopia eletrónica de varrimento (MEV).



Figura 9 - Pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm NaF) (*Colgate™ Triple Action*, Colgate-Palmolive)

#### Grupo B (n=12)

Os espécimes foram escovados com uma escova elétrica (*Oral B Vitality, Braun, P&G, Cincinnati, EUA*) (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012), duas vezes por dia (8h00 e 20h00), com 1.0 g de pasta dentífrica (1450ppm NaF), por um período de 2 minutos, durante 7 dias (Cardoso et al., 2014; Singh et al., 2016; Wang et al., 2011). Os espécimes foram colocados numa solução de água desionizada e armazenados a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Schwabach, Alemanha) (Shetty et al., 2014), entre os ciclos de escovagem e durante 7 dias.

Ao 7º dia, fez-se uma aplicação única de verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (*Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE, Neuss, Alemanha, lote: #N722972 e validade: 10/2017*) (Fig.10). Secou-se a superfície e aplicou-se uma camada de verniz, deixando-se absorver durante 10 segundos. De seguida submergiram-se os espécimes em água desionizada, mantendo-os na estufa a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Schwabach, Alemanha). Após um período de 24h, o verniz foi removido com uma compressa embebida em água desionizada (Duraisamy et al., 2015) e seguidamente 10 espécimes foram submetidos ao teste de microdureza de *Vickers* e 2 a microscopia eletrónica de varrimento (MEV).



Figura 10 – Verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (*Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE*)

### Grupo C (n=12)

Os espécimes foram escovados com uma escova eléctrica (*Oral B Vitality, Braun, P&G, Cincinnati, EUA*) (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012), duas vezes por dia (8h00 e 20h00), com 1.0 g de pasta dentífrica (1450ppm NaF), por um período de 2 minutos, durante 7 dias (Cardoso et al., 2014; Singh et al., 2016; Wang et al., 2011).

Posteriormente à escovagem aplicou-se com um *microbrush*, uma vez por dia, durante 3 minutos, por 7 dias consecutivos, uma camada de CPP-ACP (*GC Tooth Mousse, Recaldent™, GC Corporation, Tóquio, Japão, lote:160114S e validade: 01/2018*) (Fig.11) (Duraisamy et al., 2015; Jo et al., 2014). As amostras foram colocadas numa solução de água desionizada e armazenadas numa estufa a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Schwabach, Alemanha) (Duraisamy et al., 2015) entre os ciclos de aplicação do CPP-ACP (*GC Tooth Mousse, Recaldent™*). Após estes 7 dias, de armazenamento, 10 espécimes foram submetidos ao teste de microdureza de *Vickers* e 2 a microscopia electrónica de varrimento (MEV).



Figura 11 - Paste de CPP-ACP (*GC Tooth Mousse, Recaldent™, GC Corporation*)

### Grupo D (n=12)

Os 12 espécimes não foram sujeitos a qualquer tipo processo de desmineralização nem sujeitos a agentes remineralizadores. Foram seleccionados 10 espécimes para o teste de microdureza de *Vickers* e 2 para microscopia electrónica de varrimento (MEV).

## **ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE**

### **Teste de microdureza de Vickers**

10 espécimes, de cada grupo, foram sujeitos ao teste de microdureza de *Vickers*, utilizando a máquina HSV-30T (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) (Fig.12).



Figura 12 - Máquina HSV-30T (Shimadzu Corporation)

Foram realizadas 5 indentações em cada um dos espécimes (Fig.13), sendo distribuídas de forma aleatória e espaçadas entre eles, sendo sujeitos a uma carga de 4,903 N, durante 15 segundos (Fig.14) (Ar, Kazemi, Ataei, Vatanpour, & Abdollahi, 2012; Vyavhare et al., 2015).

Os valores obtidos foram expressos em HV, unidade de dureza de *Vickers*.

Na totalidade efetuaram-se 50 indentações para cada grupo, num total de 200.

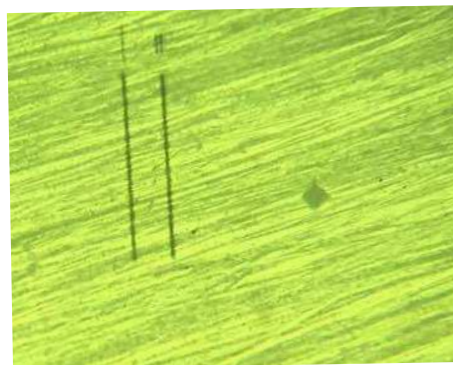


Figura 13 - Exemplo de uma indentação de *Vickers*



Figura 14 - Exemplo de dados obtidos através da indentação de *Vickers*

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com recurso ao software *SPSS Statistics* (IBM SPSS Statistics, versão 24.0, Nova Iorque, EUA).

Foi calculada a média e o desvio padrão (medidas de tendência central) para cada um dos grupos, com um intervalo de confiança de 95%.

Para averiguar diferenças estatísticas entre os diferentes, foi aplicado um teste paramétrico, ANOVA a um fator (*one way*), tendo como pressupostos a normalidade e a homogeneidade das variâncias, sendo avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk e teste de Levene respetivamente.

Considerou-se estatisticamente significativo as diferenças dos valores de significância superiores a 0,05 (*p-value* inferior ou igual a 0,05).

### **Observação através do microscópio eletrónico de varrimento**

De cada grupo, foi feita a análise da topografia superficial de 2 espécimes, com recurso ao microscopia eletrónica de varrimento JEOL-JSM 7001F (Fig.15).



Figura 15 – Microscópio eletrônico de varrimento (JEOL-JSM 7001F)

Previamente os espécimes foram recobertos com uma liga de Ouro-Paládio (Au-Pd) a 20mA e 1,4kV (Fig.16), em vácuo, utilizando um *Sputter coater* Q150T ES (Quorum Technologies, Sussex Reino Unido).

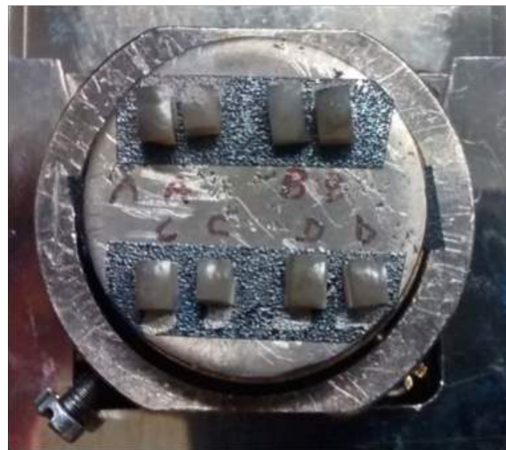


Figura 16 - Especímenes metalizados com liga de Au-Pd



## RESULTADOS

### TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS

Na tabela 3 estão descritos os resultados da média, desvio padrão e limite inferior e limite superior, com um intervalo de confiança de 95%, dos 4 grupos.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos grupos de estudo A-D (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
A	10	246,6200	23,90489	7,55939	229,5195	263,7205	212,20	274,80
B	10	295,7400	10,65209	3,36849	288,1200	303,3600	275,40	307,80
C	10	308,1600	25,29133	7,99782	290,0677	326,2523	262,40	349,00
D	10	340,0200	17,23986	5,45172	327,6873	352,3527	312,60	367,40
Total	40	297,6350	39,13482	6,18776	285,1191	310,1509	212,20	367,40

#### Descritivas MICRODUREZA

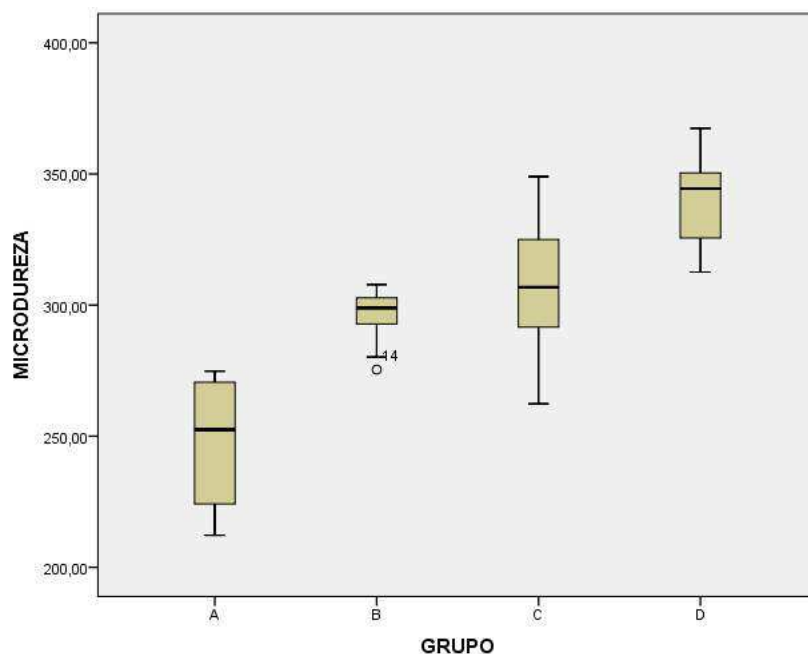


Figura 17 – *Boxsplot* dos valores de microdureza dos grupos de estudo A-D (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

O grupo A, onde houve aplicação de pasta fluoretada (1450 ppm), apresenta um valor médio de  $246,65 \pm 23,90$  HV.

O grupo B, onde houve aplicação de pasta fluoretada (1450 ppm) mais verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, apresenta um valor médio de  $295,74 \pm 10,65$  HV.

O grupo C, onde houve aplicação de pasta fluoretada (1450 ppm) e também CPP-ACP, apresenta um valor médio de  $308,16 \pm 25,29$  HV, sendo o grupo que apresenta o valor mais alto de microdureza *Vickers*.

O grupo D, correspondente ao controlo - esmalte são, apresenta um valor médio de  $340,02 \pm 17,24$  HV.

Por ordem crescente de valores de microdureza:  $\bar{u}_A < \bar{u}_B < \bar{u}_C < \bar{u}_D$ .

Na figura seguinte, pode-se verificar a comparação dos diferentes valores médios de microdureza para cada um dos 4 grupos (Fig.18).

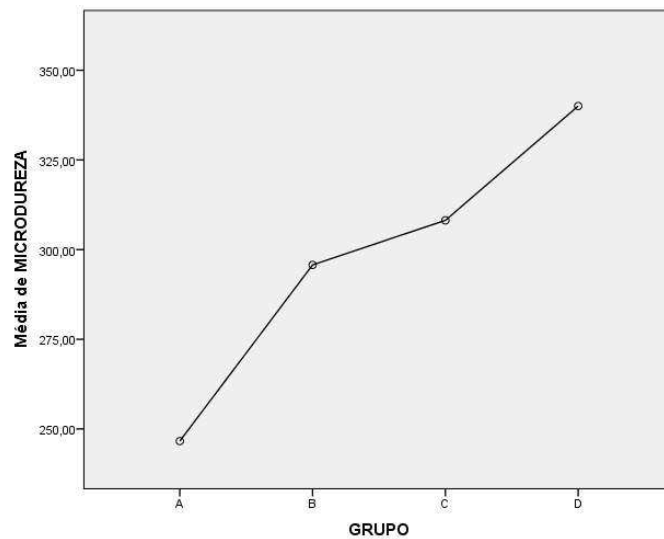


Figura 18 – Descrição gráfica dos valores médios da microdureza (HV) dos grupos estudo A-D, (output obtido recorrendo ao software de análise estatística SPSS)

Como pretende-se fazer uma análise comparativa dos valores médios entre os grupos, procedeu-se ao teste paramétrico ANOVA, o qual exige a confirmação dos seguintes pressupostos:

- As amostras são independentes;
- As amostras apresentam distribuição normal.
- A variância das amostras deve ser igual, isto é, a homogeneidade das variâncias;

O pressuposto da independência das amostras é válido, tendo sido garantido pelo processo de recolha e aleatorização da amostra.

Para verificar a normalidade, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk, indicado para amostras pequenas, tendo-se obtido os resultados que se apresentam na tabela 4.

Tabela 4 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística *SPSS*)

### Testes de Normalidade

	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
MICRODUREZA	A	,183	10	,200*	,901	10	,222
	B	,199	10	,200*	,896	10	,196
	C	,151	10	,200*	,968	10	,875
	D	,159	10	,200*	,962	10	,810

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Todos os grupos apresentam níveis de significância superiores a 0,05 ( $p > 0,05$ ), pelo que pode-se afirmar, com um nível de confiança de 95%, que as amostras são normais.

Para verificar o pressuposto da homogeneidade das variâncias, realizou-se o teste de Levene, cujos resultados se mostram na tabela 5.

Tabela 5 – Teste de homogeneidade das variâncias de Levene (gl1= n°grupos-1; gl2 = n°especímenes-n°grupos) (*output* obtido recorrendo ao software de análise estatística *SPSS*)

MICRODUREZA			
Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,681	3	36	,021

O teste da homogeneidade das variâncias revela existirem diferenças entre as variâncias dos vários grupos, dado que o nível de significância é inferior a 0,05 ( $p = 0,021$ ), pelo que não se pode assumir a homogeneidade das variâncias. Ainda assim pode-se

prosseguir com a análise recorrendo a testes paramétricos, por um lado porque as amostras em análise têm igual dimensão (N=10 em todos os grupos), por outro porque o próprio programa utilizado para a análise estatística o permite, ao incluir testes apropriados a esta situação.

Aplicou-se o teste ANOVA a um fator (ANOVA *one-way*) para detetar diferenças entre os grupos, tendo-se formulado como hipóteses:

- Hipótese nula (H<sub>0</sub>): as médias dos grupos não diferem estatisticamente;
- Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): as médias dos grupos diferem estatisticamente.

Para assumir a rejeição da H<sub>0</sub>, o *p-value* (significância) deve ser inferior a 0,05. Os resultados obtidos com a aplicação deste teste encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 - Teste paramétrico ANOVA *one-way* (output obtido pelo software de análise estatística SPSS)

<b>ANOVA</b>					
MICRODUREZA					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	45133,851	3	15044,617	37,107	,000
Nos grupos	14595,980	36	405,444		
Total	59729,831	39			

De acordo com a tabela anterior,  $F(3,36)=37,107$ ,  $p<0,001$ , pode concluir-se que existem diferenças entre as amostras, ou seja, é válida a hipótese alternativa. Uma vez que foram detetadas diferenças, foi aplicado um teste de comparação múltipla (teste *post-hoc*), o qual permite comparar pares de amostras. Para o efeito, recorreu-se ao teste de Games-Howell (tabela7) por ser o mais indicado quando as amostras são pequenas e não se pode assumir a igualdade de variâncias.

Tabela 7 – Teste *post-hoc* Games-Howell (*output* obtido pelo software de análise estatística SPSS)**Comparações múltiplas**

Variável dependente: MICRODUREZA

Games-Howell

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferença média	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
		(I-J)			Limite inferior	Limite superior
A	B	-49,12000*	8,27594	,000	-73,5617	-24,6783
	C	-61,54000*	11,00498	,000	-92,6529	-30,4271
	D	-93,40000*	9,32018	,000	-119,9991	-66,8009
B	A	49,12000*	8,27594	,000	24,6783	73,5617
	C	-12,42000	8,67824	,505	-38,1545	13,3145
	D	-44,28000*	6,40843	,000	-62,7504	-25,8096
C	A	61,54000*	11,00498	,000	30,4271	92,6529
	B	12,42000	8,67824	,505	-13,3145	38,1545
	D	-31,86000*	9,67918	,022	-59,5757	-4,1443
D	A	93,40000*	9,32018	,000	66,8009	119,9991
	B	44,28000*	6,40843	,000	25,8096	62,7504
	C	31,86000*	9,67918	,022	4,1443	59,5757

\*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

De acordo com a tabela, os resultados sugerem que a média do grupo A difere significativamente ( $p < 0,001$ ) da dos restantes grupos. A média do grupo B não difere significativamente ( $p = 0,505$ ) da do grupo C, isto é, pode-se afirmar, com um intervalo de confiança de 95%, que  $\bar{u}_B = \bar{u}_C$ . Entre o grupo B e D existem diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) para os valores médios da microdureza de *Vickers*. Finalmente, entre os grupos C e D verificam-se diferenças significativas ( $p = 0,022$ ) entre os valores médios da microdureza de *Vickers*, ou seja, estatisticamente podemos afirmar, com um intervalo de confiança de 95%, que  $\bar{u}_C \neq \bar{u}_D$ .

Para validação destas conclusões, aplicou-se um segundo teste, o teste de contrastes (tabela 8), que permitiu comparar grupos específicos:

Tabela 8 – Teste de contraste (*output* adaptado obtido pelo software de análise estatística *SPSS*). Foi omitido o parâmetro “Considera variâncias iguais”.

## Testes de contraste

		Contraste	Valor de Contraste	Erro Padrão	t	gl	Sig. (bilateral)
MICRODUREZA	Não considera variâncias iguais	$\bar{u}_A$ vs $\bar{u}_B$	-49,1200	8,27594	-5,935	12,439	,000
		$\bar{u}_B$ vs $\bar{u}_C$	-12,4200	8,67824	-1,431	12,096	,178
		$\bar{u}_C$ vs $\bar{u}_D$	-31,8600	9,67918	-3,292	15,879	,005

O teste de contraste permite comprovar que não existem diferenças significativas ( $p=0,178$ ) entre as médias de microdureza de *Vickers* dos grupos B e C, contudo é possível verificar diferenças significativas entre as médias de microdureza de *Vickers* dos grupos A e B ( $p=0,001$ ), e dos grupos C e D ( $p=0,005$ );

Assim, os resultados da aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator, juntamente com os testes de comparação de médias entre os grupos de estudo (teste de Games-Howell de comparações múltiplas e teste de contrastes considerando variâncias não homogêneas) e os valores médios de microdureza obtidos para cada grupo, indicam, estatisticamente e com um intervalo de confiança de 95%, que o grupo A (pasta dentífrica fluoretada) teve menor efeito de remineralização do esmalte uma vez que os valores de microdureza do esmalte são inferiores aos dos restantes grupos. O grupo B (pasta dentífrica fluoretada + verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio) e o grupo C (pasta dentífrica fluoretada com CPP-ACP) apresentam um efeito estatisticamente semelhante na remineralização avaliada pelos valores de microdureza do esmalte, sendo superiores aos do grupo A e inferiores aos do grupo D (controle).

## ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARRIMENTO

De cada grupo, 2 espécimes foram analisados através do microscópio eletrônico de varrimento, tendo-se efetuado ampliações de x1000, x10000 e x30000, que se encontram nas figuras abaixo indicadas (Fig.19 a 30).

### Grupo A

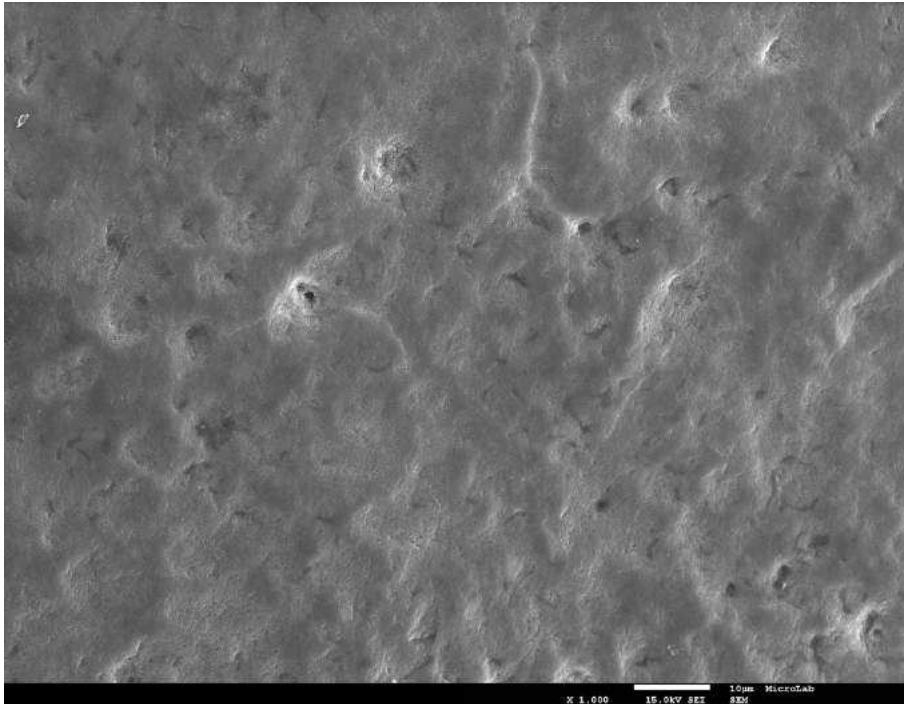


Figura 19 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. Observam-se zonas de desmineralização dos prismas de esmalte, semelhante a um padrão de “favo de mel” e zonas com aspeto uniforme, em menor extensão, correspondente a depósito mineral.

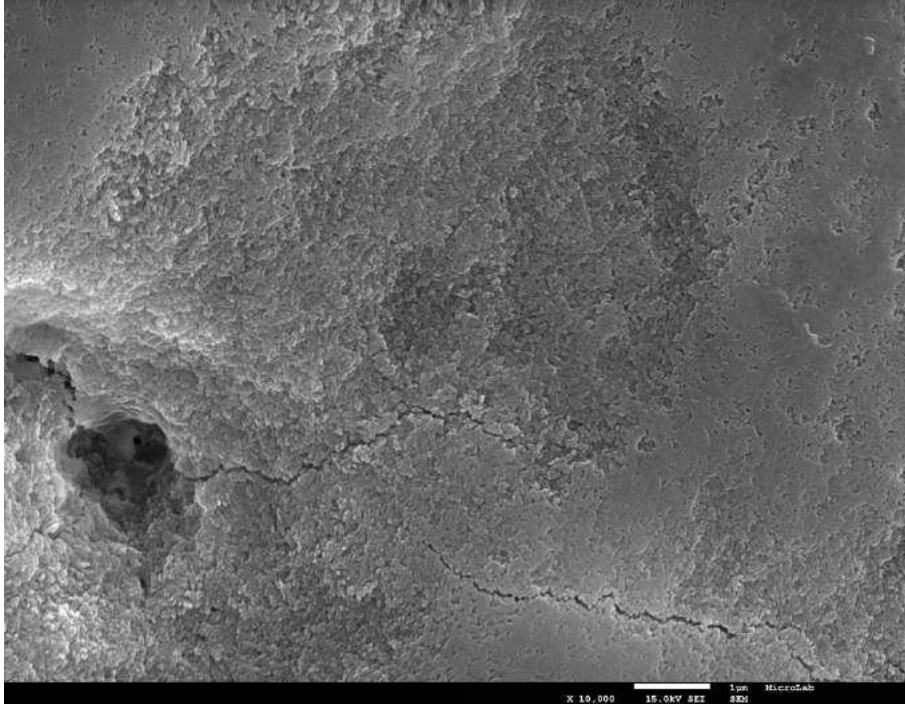


Figura 20 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de white spot e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. Existem uma grande área de zonas lacunares com desorganização prismática evidente. É possível verificar oclusão prismática pela cristalização induzida pelo fluoreto de sódio numa menor extensão de superfície.

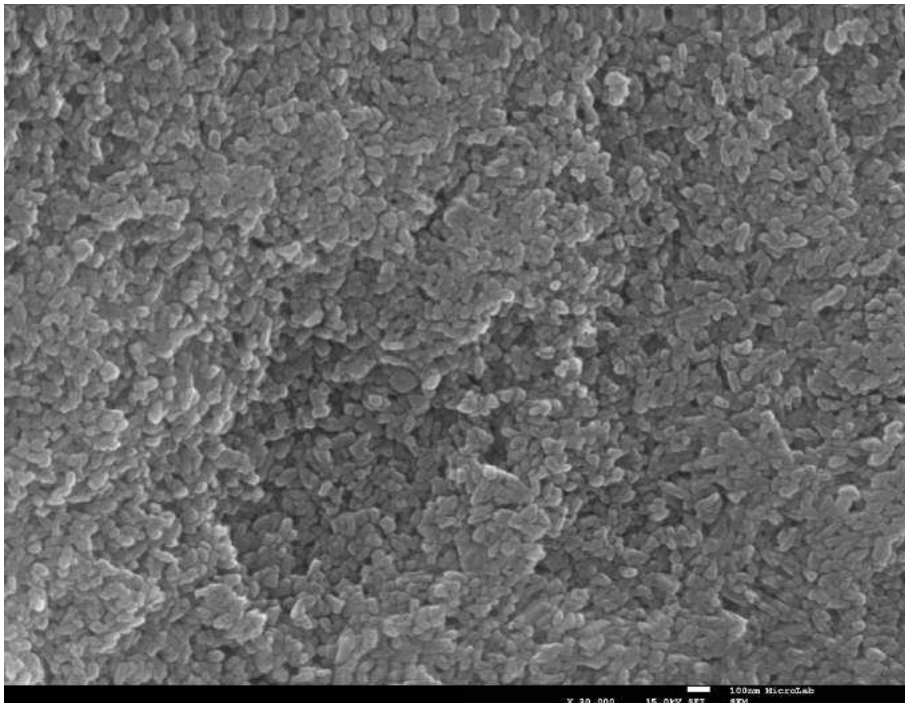


Figura 21 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. É de salientar as diferentes orientações dos prismas de esmalte, com uma desorganização evidente.

## Grupo B

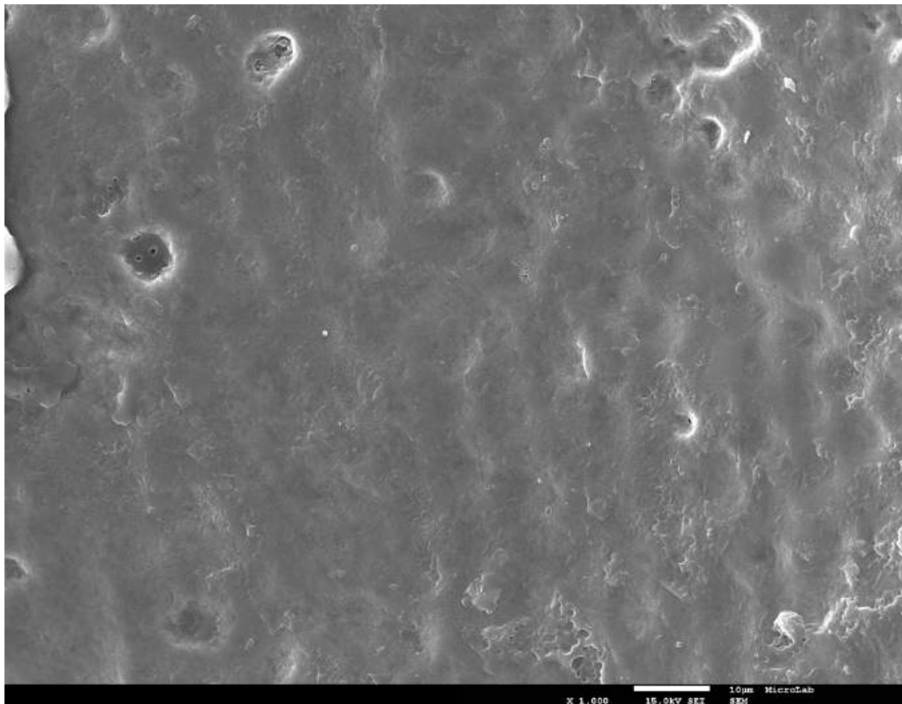


Figura 22 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada mais verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Verifica-se uma película sobre a superfície do esmalte, correspondendo à camada de verniz de flúor.

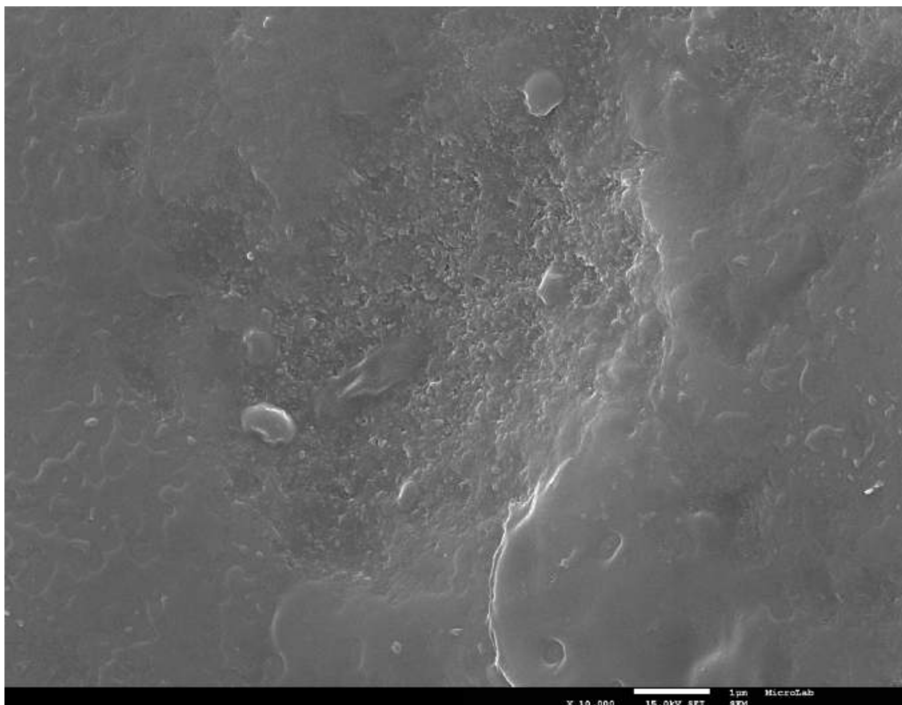


Figura 23 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Observa-se uma estrutura mais homogênea na disposição dos prismas de esmalte, sugestiva de remineralização considerável.

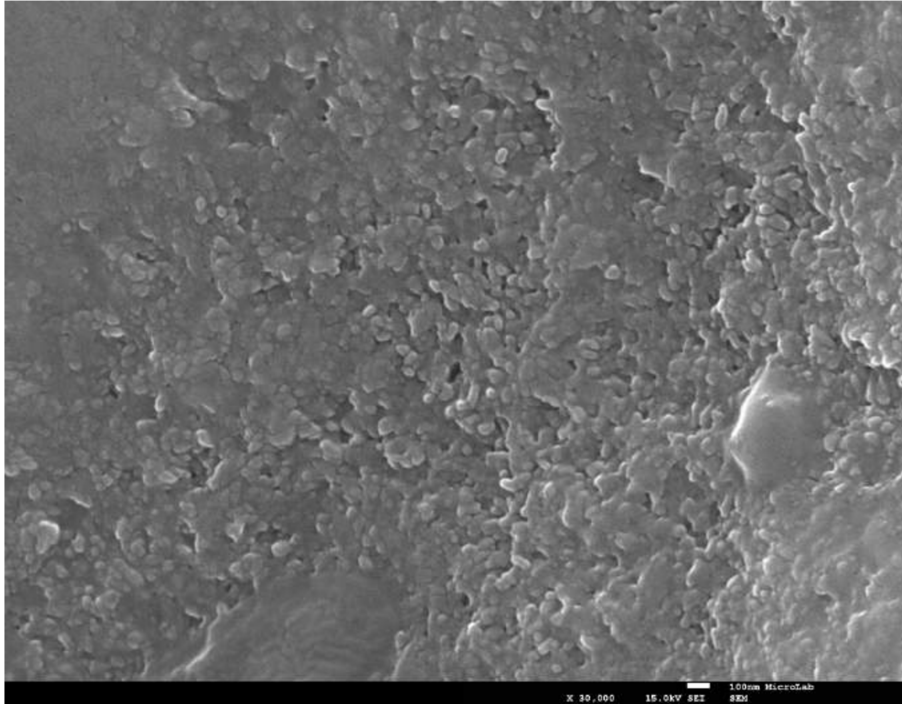


Figura 24 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada mais verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio. Evidente remineralização pela presença abundante de matéria mineral (presumivelmente de fosfato de cálcio), apresentando uma superfície do esmalte mais regular. Menor presença de espaços lacunares.

### Grupo C

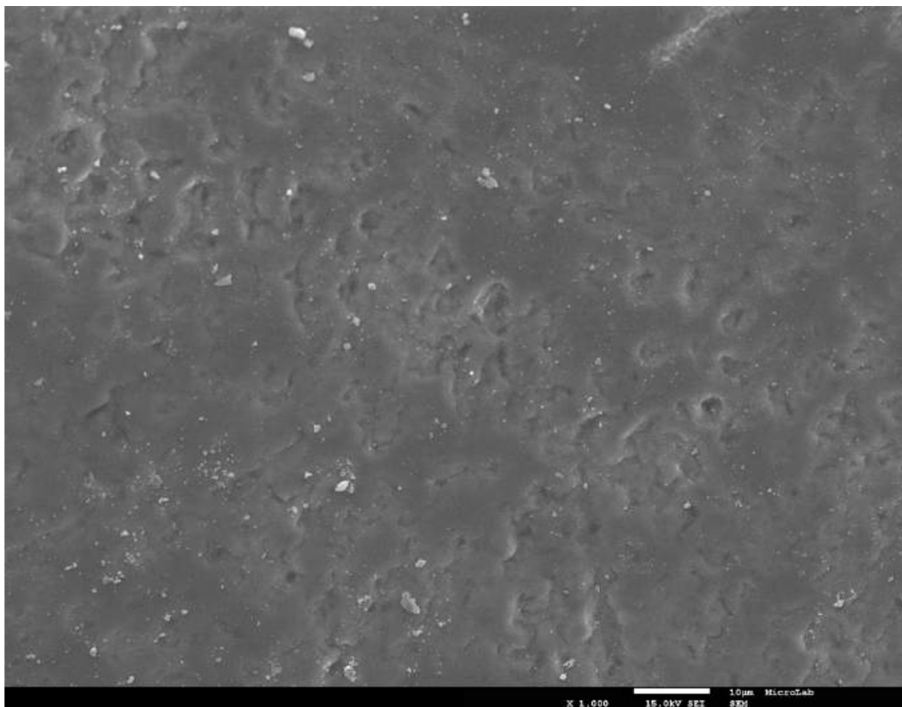


Figura 25 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x1000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP.

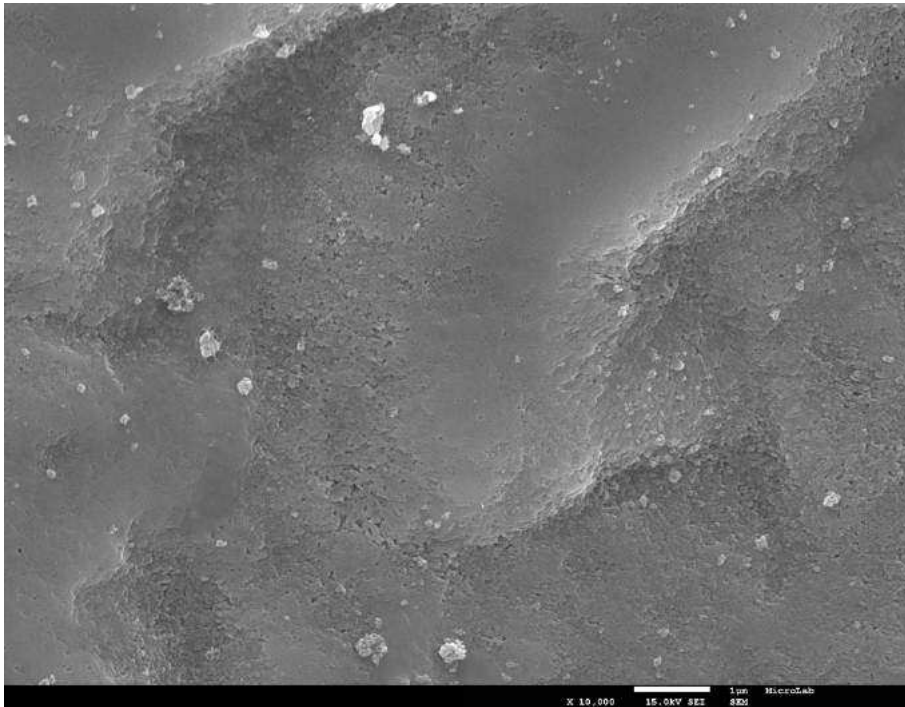


Figura 26 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x10000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observa-se que os prismas de esmalte se encontram organizados de uma forma homogênea, com poucos espaços interprismáticos visíveis à superfície.

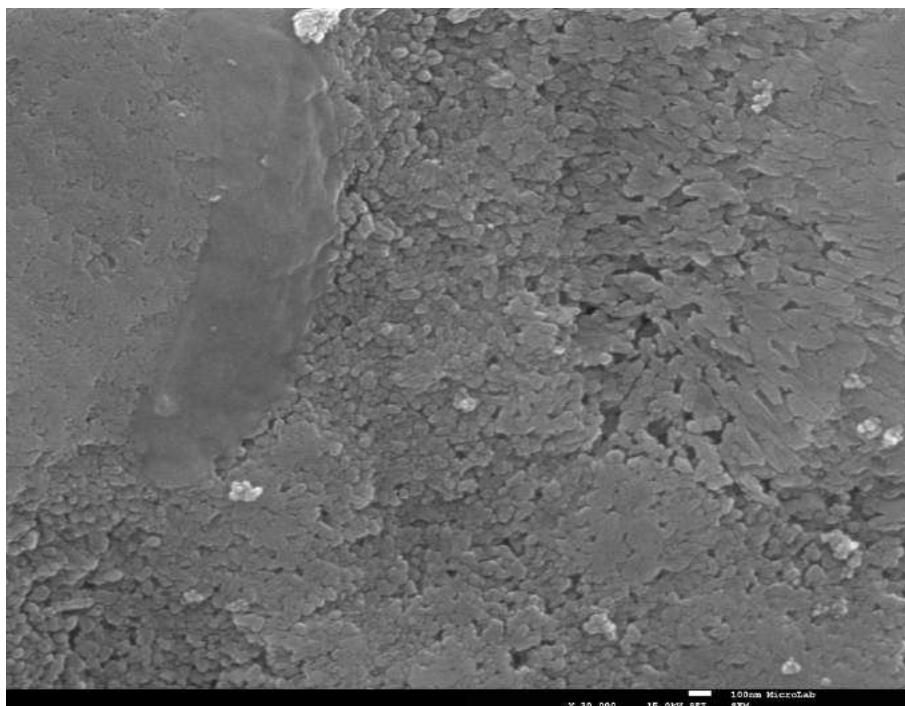


Figura 27 - Imagem de MEV da superfície do esmalte x30000, após indução artificial de lesões de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. É possível verificar redução das microporosidades e um recobrimento da estrutura prismática do esmalte por aglomerados de matéria mineral, compatível com CPP-ACP.

Grupo D

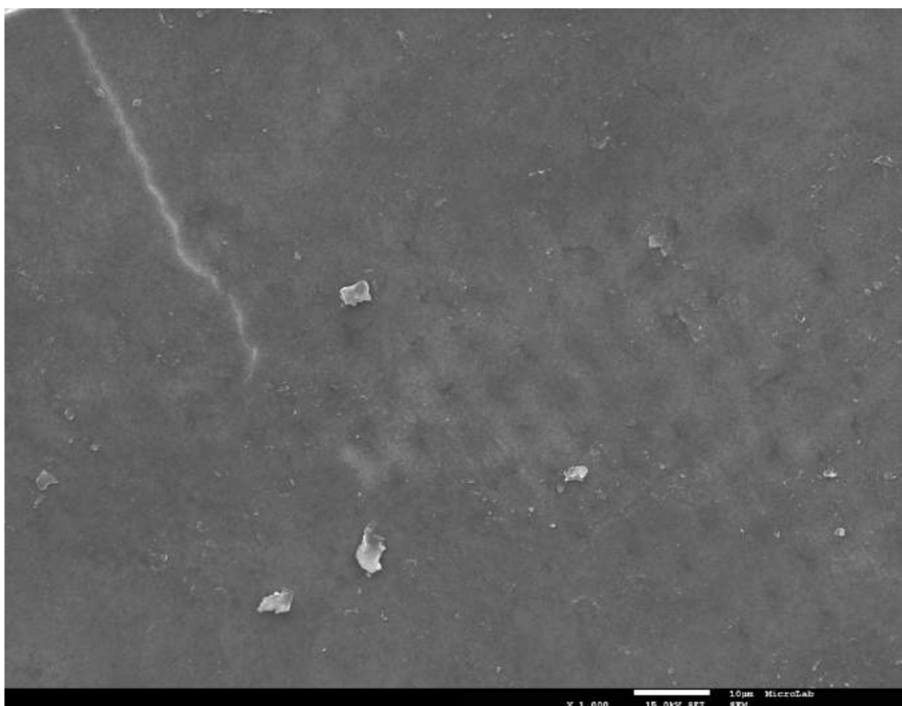


Figura 28 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x1000.



Figura 29 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x10000. É possível verificar um padrão prismático homogêneo, e pequenas irregularidades características do esmalte.

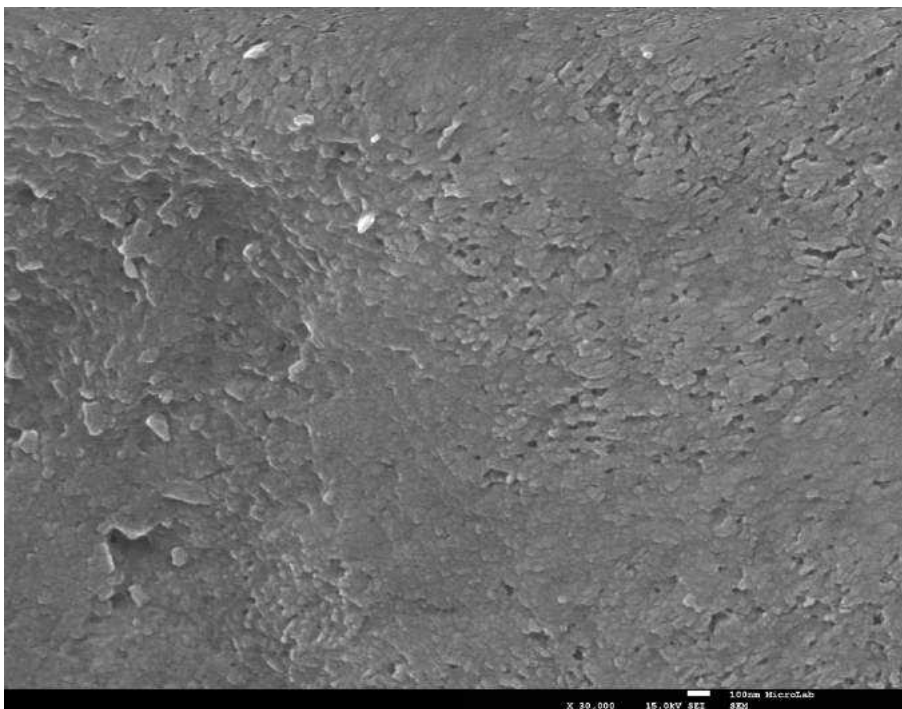
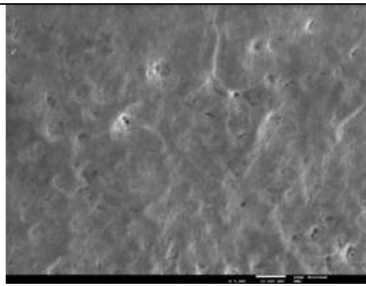
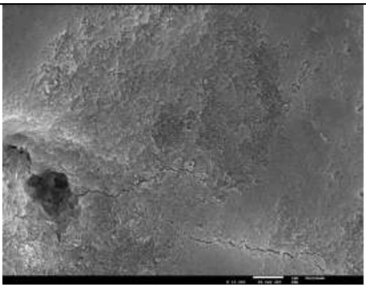
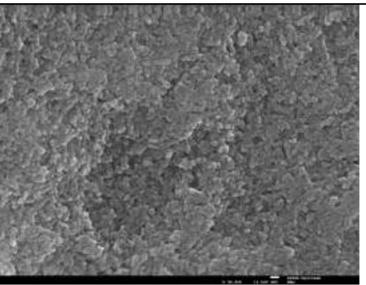
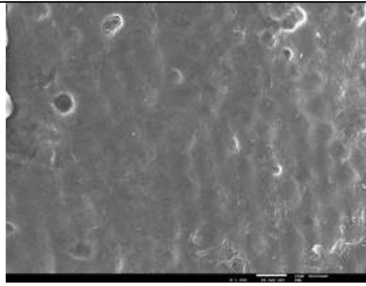
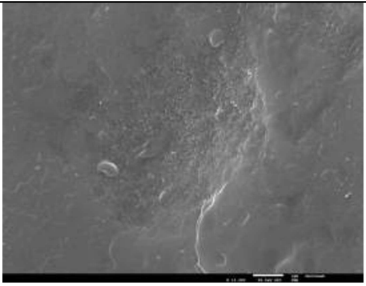
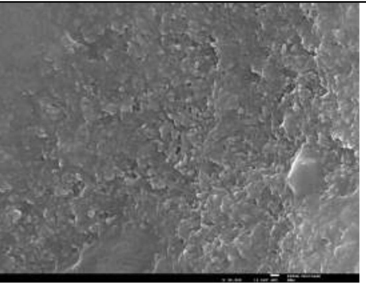
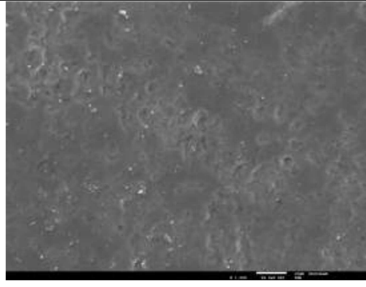
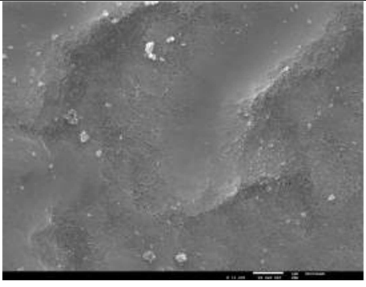
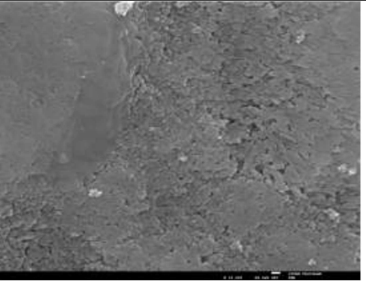

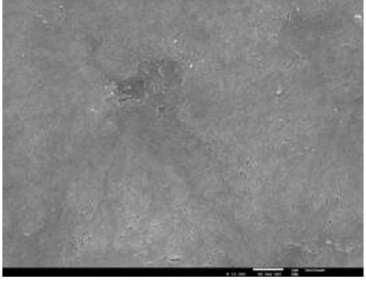
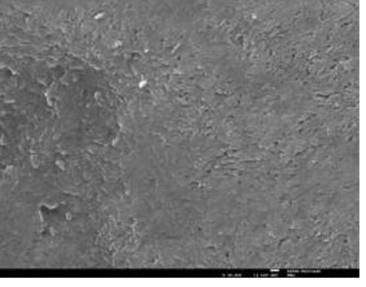


Figura 30 - Imagem de MEV da superfície do esmalte são a x30000.

Tabela 9 - Quadro comparativo das imagens MEV dos diferentes grupos, com ampliações de x1000, x10000 e x30000.

<b>Grupo A</b>		
x1000	x10000	x30000
		
<b>Grupo B</b>		
x1000	x10000	x30000
		
<b>Grupo C</b>		
x1000	x10000	x30000
		
<b>Grupo D</b>		
x1000	x10000	x30000
		

## DISCUSSÃO

Na elaboração deste estudo foram utilizados três agentes de remineralização, dois de uso em ambulatório (pasta dentífrica de fluoreto de sódio e pasta de CPP-ACP) e um de aplicação profissional (o verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio), com o objetivo de comparar a eficácia de remineralização sobre esmalte desmineralizado, por lesão cariosa. As suas propriedades na eficácia de remineralização de lesões iniciais de cárie (Bajaj et al., 2016; Elkassas & Arafa, 2013; Neel et al., 2016), estão descritas na literatura, contudo não existe consenso em relação à taxa de sucesso destes agentes (Singh et al., 2016).

A avaliação da microdureza é uma técnica simples, rápida, fácil de executar, sendo um método não destrutivo, fiável e eficaz, pois reflete as alterações minerais que ocorrem em consequência da aplicação de agentes remineralizadores nos tecidos duros dentários, amplamente usados em estudos in vitro (P. R. A. Oliveira, Fonseca, Silva, Coutinho, & Tostes, 2016; Soares, Ataide, Fernandes, & Lambor, 2017; Tuloglu et al., 2016).

Este método permite medições repetidas do mesmo espécimen durante um período de tempo, reduzindo assim a variação experimental.

Tendo em conta a importância da camada superficial no desenvolvimento da lesão cariosa, é relevante avaliar as alterações que ocorrem nesta região, sendo assim a técnica de microdureza apropriada para o estudo do processo de des-remineralização (Soares et al., 2017)

Os resultados obtidos pelo teste de microdureza de *Vickers* do grupo D (esmalte são  $340,02 \pm 17,24$  HV), enquadram-se nos valores obtidos noutros estudos similares, anteriormente publicados (Memarpour, Soltanimehr, & Sattarahmady, 2015; Soares et al., 2017; Vyavhare et al., 2015).

Os espécimenes dos distintos grupos (A, B e C), foram sujeitos a desmineralização de superfície com ácido láctico, simulando de lesões artificiais de cárie, que são consideradas mais reprodutíveis do que as lesões naturais de cárie, tornando o modelo experimental mais fidedigno. Se por um lado, a solução desmineralizadora promove uma dissolução do conteúdo mineral, criando espaços ou lacunas na superfície do esmalte (Memarpour et al., 2015; Soares et al., 2017; Vyavhare et al., 2015), por outro, este modelo, permite o teste de múltiplas áreas em intervalos de tempo distintos, de modo a poder avaliar o efeito dos produtos de remineralização (Vyavhare et al., 2015).

Relativamente ao grupo A, que corresponde aos espécimes em que foi aplicado pasta dentífrica de fluoreto de sódio, verificou-se que os valores obtidos após o período de remineralização são inferiores ao esmalte são e também comparativamente inferiores aos outros grupos. Este facto sugere que o efeito da desmineralização supera o efeito da aplicação de um agente remineralizador, com Pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm NaF) (Colgate™ Triple Action, Colgate-Palmolive), eventualmente por se salientarem factores relacionados com a abrasão da escovagem e irregularidades de superfície não homogéneas.

A utilização de agentes fluoretados é um método efetivo na promoção da remineralização das lesões iniciais de cárie. A forma iónica do flúor penetra nos poros do esmalte, que resultam de um evento ácido, e formam cristais de fluoroapatite que é mais resistente ao ataque ácido, apresentando menor solubilidade e um aumento da microdureza do esmalte (Memarpour et al., 2015; Soares et al., 2017), como é demonstrado em alguns estudos publicados (Memarpour et al., 2015; Vyavhare et al., 2015).

Contudo, em diversos estudos publicados demonstrou-se que a pasta fluoretada apresenta menor capacidade de remineralização comparativamente ao CPP-ACP e ao verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (Jo et al., 2014; Peric et al., 2014).

É preciso ter em conta que, por cada 2 iões de flúor, são necessários 10 iões de cálcio e 6 iões de fosfato para formar o cristal de fluorapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ . Assim, se houver uma inadequada presença de iões de cálcio e fosfato, isto pode limitar a remineralização do esmalte (Soares et al., 2017).

Além disso, a difusão iónica proveniente do biofilme dentário e da saliva para a superfície dentária contribui para a formação dos cristais de fluorapatite (Memarpour et al., 2015). Esta pode ser uma das razões para a obtenção de um menor valor de microdureza do grupo A, visto que espécimes se encontravam em água desionizada e não em saliva artificial, durante os ciclos de remineralização, privando de um meio que contém cálcio e fosfato.

Alguns autores constataam que a formação de fluorapatite pode impedir os iões de cálcio e fosfato de difundirem-se para os poros mais profundos do esmalte, na camada subsuperficial (Memarpour et al., 2015).

O grupo B, correspondente ao grupo em que os espécimes foram sujeitos ao tratamento com pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm NaF) e verniz de flúor de alta

concentração com fosfato de cálcio (*Clinpro™ White Varnish*), apresenta diferenças significativas em comparação com a pasta dentífrica fluoretada (grupo A), apresentando um valor médio de microdureza superior, o que demonstra uma maior capacidade de remineralização. No entanto, o valor médio da microdureza é significativamente inferior quando comparado com o esmalte são.

A tecnologia usada no fTCP *Clinpro™ White Varnish* fornece uma barreira de ácido fumárico que previne interações prematuras e indesejáveis entre o cálcio, o fosfato e o fluoreto durante tempo de vida útil do produto, sendo necessário o contacto com a saliva para dissolver esta barreira e assim permitir a interação entre o cálcio, o fosfato e o fluoreto no meio oral (Memarpour et al., 2015; Rirattanapong et al., 2012).

O fTCP é pouco solúvel e associado ao facto de possuir partículas com um tamanho grande e a sua baixa quantidade presente no verniz, explica fraca libertação de cálcio e fosfato (Chokshi et al., 2016; Memarpour et al., 2015; Shen et al., 2015).

Pelos pressupostos acima mencionados associados à ausência de saliva no presente estudo, podem explicar a diferença existente de microdureza do grupo B quando comparado com o esmalte são (grupo D).

Num estudo datado de 2011, foi descrito que a remineralização promovida pela aplicação de fTCP não era significativamente diferente de pasta dentífrica fluoretada na remineralização de lesões em esmalte *in situ* (Shen et al., 2011).

Contrariamente a este estudo, existe outro que sugerem que a utilização de fTCP aumenta a microdureza do esmalte significativamente quando comparado com aplicação única de fluoreto, tanto na formulação de verniz de fluoreto de sódio (5%) como em pasta dentífrica fluoretada (500ppm) (Memarpour et al., 2015).

Um outro estudo publicado em 2014, concluiu que a combinação de fluoreto de sódio com fTCP, numa solução aquosa, produz um aumento significativo da dureza da superfície e da subsuperfície das WSL, em comparação com a aplicação de única de fluoreto (Jo et al., 2014), o que é consistente com os resultados apresentados nesta investigação.

Segundo o estudo de Elkassas e Arafa (2013), onde foi avaliado a superfície da microdureza do esmalte, o *Clinpro™ White Varnish* demonstrou maior capacidade de remineralização, ao apresentar um maior potencial na inibição de um evento cariogénico sobre a superfície do esmalte, quando comparado com CPP-ACP e CPP-ACFP. Este facto pode ser atribuído à alta concentração de fluoreto presente no verniz (22600 ppm), que cria um gradiente elevado de fluoreto que o conduz a zonas mais profundas da lesão,

remineralizando a subsuperfície do esmalte. Outra característica dos produtos contendo fTCP é a presença de sílica na sua composição, que permite estabelecer ligações com zonas de esmalte afetadas durante um evento acidogénico; pela sua capacidade de penetrar no esmalte, sem afectar a matéria orgânica interprismática, possibilita um maior fluxo de cálcio, fosfato e fluoreto para as zonas desmineralizadas (Elkassas & Arafa, 2013)

No grupo C, onde foi aplicado pasta fluoretada com pasta de CPP-ACP, obteve-se resultados superiores de microdureza comparativamente ao grupo A (pasta dentífrica NaF 1450 ppm), mas estatisticamente equivalentes ao grupo B (Clinpro™ *White Varnish*). Em relação ao grupo C, apresentou uma média de superfície de dureza inferior ao esmalte sã, o que significa que não houve uma remineralização suficiente da superfície de esmalte.

Estes resultados obtidos são corroborados por alguns estudos publicados, em que descrevem que a pasta de CPP-ACP e o fTCP aumentam a microdureza do esmalte igualmente (Haghgou, Haghgoo, Roholahi, & Ghorbani, 2017; Rirattanapong et al., 2012), e que o efeito de remineralização do CPP-ACP com fluoreto é superior em relação ao uso do CPP-ACP apenas (Duraisamy et al., 2015; Llena, C., Leyda M., Forner, 2015; Singh et al., 2016; Srinivasan et al., 2010).

Este efeito sinérgico resultante do CPP-ACP com o fluoreto, é devido à formação de um complexo de fosfopéptido de caseína – fosfato de cálcio amorfo e fluoreto, que aumenta os níveis de biodisponibilidade dos iões de cálcio e fosfato (Bajaj et al., 2016; Singh et al., 2016).

O CPP une-se aos tecidos duros dentários, promovendo um reservatório de biodisponibilidade de cálcio e fosfato na superfície do esmalte. Esta molécula de fosfopéptido de caseína contém resíduos fosforilados (aglomerados de aminoácidos sequenciais - Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-), que estabilizam e unem-se de forma espontânea ao fosfato de cálcio amorfo, formando pequenos aglomerados de CPP-ACP (Duraisamy et al., 2015; Elkassas & Arafa, 2013). Esta disposição molecular evita que estes aglomerados atinjam o tamanho crítico para a sua nucleação e precipitação, estabilizando assim o fosfato de cálcio na proximidade do dente, tornando disponível o ACP quando sujeito a um desafio cariogénico (Duraisamy et al., 2015; Elkassas & Arafa, 2013).

Quando o ião fluoreto se encontra presente concomitantemente com o CPP-ACP, formam-se nanocomplexos de CPP-ACFP sobre a superfície do esmalte (Rirattanapong

et al., 2012), que quando sujeitos a uma acidificação do meio, ocorre quebra do complexo CPP-ACFP, libertando íons de cálcio, fosfato e espécies eletricamente neutras, como o fosfato dicálcio ( $\text{CaHPO}_4^0$ ) e o ácido fluorídrico ( $\text{HF}^0$ ). Estas espécies químicas movem-se pelo gradiente de concentração para zonas mais profundas das lesões, promovendo a remineralização através da formação de cristais de fluorapatite (Singh et al., 2016).

Num estudo publicado em 2014, durante um período de avaliação de 3 meses, o CPP-ACP apresentou um ligeiro efeito de remineralização sobre lesões de cárie iniciais (Aykut-Yetkiner et al., 2014). Shen et al. (2015), demonstraram que o verniz de CPP-ACP era o agente remineralizador, em que os íons fluoreto, fosfato e cálcio eram libertados numa maior quantidade, quando comparado com Clinpro™ *White Varnish* e outros compostos fluoretados; a percentagem de libertação de flúor no verniz de CPP-ACP foi de 96%, em contraste com o de Clinpro™ *White Varnish* que foi de 16%.

Estes resultados estão em concordância com os de um estudo de 2014, que concluíram o CPP-ACP e o CPP-ACFP apresentaram potencial para remineralização das lesões superficiais de esmalte e que os efeitos remineralizadores do CPP-ACP e CPP-ACFP são comparáveis, sendo superior ao efeito do fluoreto de sódio (Peric et al., 2014).

Contudo existem estudos discordantes, como um publicado em 2015, que demonstra que o CPP-ACP não demonstrou remineralização significativa da superfície do esmalte quando comparado pasta de fluoreto de sódio (1000 ppm) (Vyavhare et al., 2015), e um outro estudo de 2013, que conclui que sistema de remineralização à base de fTCP demonstrou maior tendência de remineralização do que o CPP-ACP e CPP-ACFP (Elkassas & Arafa, 2013).

Um estudo publicado em 2017, em que avalia a microdureza do esmalte desmineralizado após aplicação de distintos agentes remineralizadores (CPP-ACP, fluoreto de amina e fluoreto de sódio com fTCP), cada um deles num meio com saliva artificial e outro em água desionizada. Após análise estatística dos valores obtidos pelo teste de microdureza de *Vickers*, concluíram que os 3 agentes demonstram eficácia na remineralização do esmalte, sendo equiparáveis, e que os espécimes que se encontravam em saliva artificial apresentaram resultados superiores em relação aos que se encontravam em água desionizada (Katakam et al., 2017).

Estas diferenças de resultados existentes entre os diversos estudos podem estar relacionadas com diferentes métodos de avaliação, do tipo de amostra e o número selecionado, das diferentes metodologias de aplicação dos agentes de remineralização, dos distintos procedimentos de desmineralização entre outros fatores.

Para uma análise detalhada da superfície topográfica do esmalte tratado com os distintos agentes de remineralização, a MEV é uma ferramenta complementar que permite avaliar as alterações estruturais induzidas pelos produtos de remineralização e confirmar os resultados obtidos pela microdureza (Elkassas & Arafa, 2013; Tuloglu et al., 2016)

Através da análise das imagens correspondentes aos espécimes submetidos à pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm NaF), é perceptível zonas de diferentes configurações, em que nas zonas onde não houve deposição mineral, provavelmente pela ausência de cristalização induzida pelo fluoreto de sódio, verifica-se uma desorganização estrutural dos prismas de esmalte e a presença de espaços lacunares.

É descrito por Vyavhare e colaboradores (2015), que após aplicação de uma pasta fluoretada sobre uma superfície desmineralizada, ocorre sedimentação de estruturas globulares minerais, de diferentes tamanhos e com irregularidades superficiais.

No grupo B, onde foi aplicado verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio e pasta dentífrica de NaF (1450 ppm), é de notar uma estrutura mais homogênea dos prismas de esmalte, que evidencia uma superfície mais regular do esmalte. Há uma redução substancial dos espaços lacunares em comparação com as imagens do grupo A, devido à deposição nestes espaços de complexos iónicos, presumivelmente de fosfato de cálcio. Estes resultados são suportados pelo estudo feito por Elkassas e Arafa (2013), que verificaram que no grupo FTCP, houve redução das microporosidades da superfície do esmalte e que os prismas de esmalte se encontravam numa disposição homogênea, sem existência de espaços intercrystalinos visíveis.

No grupo C, onde foi aplicado pasta fluoretada (1450 ppm NaF) e CPP-ACP, verifica-se que os prismas de esmalte se encontram organizados de forma homogênea e com poucos espaços intercrystalinos visíveis à superfície, presumivelmente pela deposição de cristais amorfos ao longo dos prismas.

Em concordância com estes resultados existe um estudo de 2014, que demonstra que a aplicação de CPP-ACP e CPP-ACFP promoveu alterações significativas na morfologia do esmalte, com redução do tamanho dos defeitos existentes no esmalte sujeito a desmineralização (Peric et al., 2014). Porém, outros estudos, referem que o CPP-ACP demonstrou muito pouca ou nenhuma remineralização na superfície do esmalte (Vyavhare et al., 2015), e que apresentava mais irregularidades, demonstrando uma camada mais porosa no esmalte (P. R. A. Oliveira et al., 2016).

Num outro estudo verificou-se que as imagens obtidas da MEV do CPP-ACP e de uma pasta dentífrica de NaF eram semelhantes (P. R. A. Oliveira et al., 2016).

Os resultados obtidos através do teste de microdureza podem ser relacionados com o conteúdo mineral do esmalte, em que existe uma correlação positiva entre o conteúdo mineral do esmalte e a sua microdureza, tendo sido comprovado através da análise do microscópio de Raman (Akkus, Karasik, & Roperto, 2017).

Neste estudo pode-se verificar que os grupos em que os agentes remineralizadores apresentavam maior preenchimento dos espaços lacunares, correspondente aos grupos B e C, são aqueles que apresentam valores de microdureza superiores.

Este estudo *in vitro* permite compreender melhor o processo de remineralização promovido pelos agentes remineralizadores e os efeitos sinérgicos entre eles, contudo existem limitações que podem afetar os resultados. Uma delas é a dificuldade em simular os aspetos biológicos do processo cariogénico e a complexidade das condições intra-orais que contribuem para o fenómeno da cárie dentária. Apenas é considerado neste estudo as reações do processo físico-químico que ocorre entre os produtos de remineralização e o substrato dentário, excluindo o papel importante que os enzimas desempenham. As propriedades da saliva, como a sua composição iónica e o efeito das proteínas salivares, e o biofilme dentário envolvidos no processo de remineralização/desmineralização também não são tidos em consideração.

Outras limitações podem ser consideradas como o tamanho reduzido da amostra e o tempo curto do processo de remineralização, visto que quanto maior for o tempo de aplicação, melhores serão os resultados da remineralização. A possibilidade de erros experimentais e diferenças na microestrutura entre os espécimes do esmalte é preciso ter em conta, apesar de se ter efetuado o processo de padronização dos mesmos. Poderia ser incluído um grupo, que avaliasse a desmineralização do esmalte quando sujeito a um processo cariogénico.

Linhas de investigação futuras podem ser aplicadas no estudo destes produtos de remineralização por um período mais prolongado de tempo, avaliar o impacto de outros fatores, como a dieta alimentar, a exposição cíclica a soluções de pH baixo, e quantificação da disponibilidade dos iões de cálcio, fosfato e fluoreto que cada um dos produtos consegue disponibilizar ao longo do percurso temporal.



## CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo, considerando as limitações existentes do mesmo é possível concluir que:

- Após a indução artificial de lesões de cárie e subsequente aplicação de pasta dentífrica fluoretada, demonstrou-se que a microdureza de superfície era inferior, sendo essa diferença significativa quando comparado com os restantes grupos, sugerindo que não obteve o efeito remineralizador desejado.
- Após a indução artificial de lesões de cárie e subsequente aplicação estratégica de pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, demonstrou-se que a microdureza de superfície era significativamente inferior ao esmalte são, mas superior à pasta dentífrica fluoretada, sugerindo que a aplicação deste verniz tem resultados vantajosos comparativamente à aplicação única de pasta fluoretada.
- Após a indução artificial de lesões de cárie e subsequente aplicação combinada de pasta dentífrica fluoretada e CPP-ACP, a microdureza de superfície foi significativamente inferior ao esmalte são, no entanto não apresentou diferenças significativas quando comparado com aplicação do verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio e pasta fluoretada, o que sugere que ambos os produtos apresentam um efeito de remineralização similar.
- Numa avaliação microscópica da superfície do esmalte, pode-se concluir que os 3 produtos de remineralização apresentaram melhorias na qualidade superficial do esmalte, sendo o verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio e o CPP-ACP, ambos combinados com pasta dentífrica fluoretada, os que melhoram qualitativamente, a superfície do esmalte.



## BIBLIOGRAFIA

- 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>
- Akkus, A., Karasik, D., & Roperto, R. (2017). Correlation between micro-hardness and mineral content in healthy human enamel. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(4), e569–e573. <https://doi.org/10.4317/jced.53345>
- Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). Mechanical properties of dental materials. In *Phillips' Science of Dental Materials* (12nd ed., pp. 63–65). St. Louis: Elsevier.
- Ar, D., Kazemi, D., Ataei, E., Vatanpour, M., & Abdollahi, H. (2012). Effects of Bleaching and Remineralising Agents on the Surface Hardness of Enamel, 13(4), 156–163.
- Atin, T., & Wegehaupt, F. J. (2014). Methods for assessment of dental erosion. *Monographs in Oral Science*, 25, 123–142. <https://doi.org/10.1159/000360355>
- Aykut-Yetkiner, A., Kara, N., Ates, M., Ersin, N., & Ertugrul, F. (2014). Does casein phosphopeptid amorphous calcium phosphate provide remineralization on white spot lesions and inhibition of *Streptococcus mutans*? *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 38(4), 302–306.
- Bagramian, R. A., Garcia-Godoy, F., & Volpe, A. R. (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, 22(1), 3–8.
- Bailey, D. L., Adams, G. G., Tsao, C. E., Hyslop, A., Escobar, K., Manton, D. J., ... Morgan, M. V. (2009). Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. *Journal of Dental Research*, 88(12), 1148–1153. <https://doi.org/10.1177/0022034509347168>
- Bajaj, M., Poornima, P., Praveen, S., Nagaveni, N., Roopa, K., Neena, I., & Bharath, K. (2016). Comparison of CPP-ACP, Tri-Calcium Phosphate and Hydroxyapatite on Remineralization of Artificial Caries Like Lesions on Primary Enamel -An *in vitro* Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 40(5), 404–409. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-40.5.404>
- Banava, S., Fattah, M., Kharrazifard, M. J., Safaie, T., Askarzadeh, S. H., & Yazdi, M. S. (2012). Clinical comparison of dental caries by DMFT and ICDA, 24(2), 146–151.

- Baumann, T., Carvalho, T. S., & Lussi, A. (2015). *The effect of enamel proteins on erosion. Scientific reports* (Vol. 5). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/srep15194>
- Bratthall, D. (2000). Introducing the Significant Caries Index together with a proposal for a new global oral health goal for 12-year-olds. *International Dental Journal*, 50(6), 378–384. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2000.tb00572.x>
- Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., Magalhães, A. C., Rios, D., Honório, H. M., & Delbem, A. C. B. (2010). pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 18(4), 316–34. <https://doi.org/S1678-77572010000400002> [pii]
- Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M., & ten Cate, J. M. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Fluoride and the Oral Environment*, 22, 97–114. <https://doi.org/10.1159/000325151>
- Calado, R., Ferreira, C. S., Nogueira, P., & Melo, P. (2017). Caries prevalence and treatment needs in young people in Portugal: the third national study. *Community Dental Health*, 34(2), 107–111. [https://doi.org/10.1922/CDH\\_4016Calado05](https://doi.org/10.1922/CDH_4016Calado05)
- Cao, C., Mei, M., Li, Q., Lo, E., & Chu, C. (2015). Methods for Biomimetic Mineralisation of Human Enamel: A Systematic Review. *Materials*, 8(6), 2873–2886. <https://doi.org/10.3390/ma8062873>
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., ... Buzalaf, M. A. R. (2014). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, 50(August 2014), 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>
- Chen, C. L., Parolia, A., Pau, A., & Celerino De Moraes Porto, I. C. (2015). Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Australian Dental Journal*, 60(1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/adj.12275>
- Chokshi, K., Chokshi, A., Konde, S., Shetty, S. R., Chandra, K. N., Jana, S., ... Thakur, S. (2016). An in vitro Comparative Evaluation of Three Remineralizing Agents using Confocal Microscopy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(6), ZC39-42. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18191.7984>
- Chuenarrom, C., Benjakul, P., & Daosodsai, P. (2009). Effect of Indentation Load and Time on Knoop and Vickers Microhardness Tests for Enamel and Dentin. *Materials*

- Research-Ibero-American Journal of Materials*, 12(4), 473–476.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000400016>
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res*, 89(11), 1187–1197. [https://doi.org/Doi 10.1177/0022034510376046](https://doi.org/Doi%2010.1177/0022034510376046)
- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., ... Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>
- De Almeida Pinto-Sarmiento, T. C., Abreu, M. H., Gomes, M. C., De Brito Costa, E. M. M., Martins, C. C., Granville-Garcia, A. F., & Paiva, S. M. (2016). Determinant factors of untreated dental caries and lesion activity in preschool children using ICDAS. *PLoS ONE*, 11(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150116>
- De Dios Teruel, J., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>
- de Oliveira, A. F. B., de Oliveira Diniz, L. V., Forte, F. D. S., Sampaio, F. C., Ccahuana-Vásquez, R. A., & Tochukwu Amaechi, B. (2016). In situ effect of a CPP-ACP chewing gum on enamel erosion associated or not with abrasion. *Clinical Oral Investigations*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1796-1>
- Denis, M., Atlan, A., Vennat, E., Tirlet, G., & Attal, J. P. (2013). White defects on enamel: Diagnosis and anatomopathology: Two essential factors for proper treatment (part 1). *International Orthodontics*, 139–165. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2013.02.014>
- Duraisamy, V., Xavier, A., Nayak, U. A., Reddy, V., & Rao, A. P. (2015). An in vitro evaluation of the demineralization inhibitory effect of F(-) varnish and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel in young permanent teeth. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(Suppl 2), S513-7. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163521>
- 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. (2013). 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>
- Featherstone, J. D. B. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 27(1), 31–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: A dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53(3), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x>
- Federación Dental Internacional. (2015). *El desafío de las enfermedades bucodentales – Una llamada a la acción global* (2ª edición). Ginebra: Myriad Editions.
- Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. A. M. (2015). *Dental caries: the disease and its clinical management* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.
- Field, J., Waterhouse, P., & German, M. (2010). Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *Journal of Dentistry*, 38(3), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.01.002>
- Gangrade, A., Gade, V., Patil, S., Gade, J., Chandhok, D., & Thakur, D. (2016). In vitro evaluation of remineralization efficacy of different calcium- and fluoride-based delivery systems on artificially demineralized enamel surface. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 19(4), 328–331. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.186449>
- Grewal, N., Gumber, S., & Kaur, N. (2017). Comparative evaluation of enamel remineralization potential of processed cheese, calcium phosphate-based synthetic agent, and a fluoride-containing toothpaste: An in situ study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 35(1), 19–27. <https://doi.org/10.4103/0970-4388.199222>
- Haghgou, E. H., Haghgoo, R., Roholahi, M. R., & Ghorbani, Z. (2017). Effect of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate and Three Calcium Phosphate on Enamel Microhardness. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 18(7), 583–586. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2088>
- Hannig, C., Hannig, M., Kensche, A., & Carpenter, G. (2017). The mucosal pellicle - An underestimated factor in oral physiology. *Archives of Oral Biology*, 80, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.001>
- Hannig, M., & Joiner, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Section Title: Mammalian Biochemistry*, 19, 29–64.

- <https://doi.org/10.1159/000090585>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The caries environment: Saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- He, L. H., & Swain, M. V. (2007a). Influence of environment on the mechanical behaviour of mature human enamel. *Biomaterials*, 28(30), 4512–4520. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.020>
- He, L. H., & Swain, M. V. (2007b). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.05.001>
- Heymann, H. O., Swift Jr, E., & Ritter, A. V. (2013). Clinical Significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology and Occlusion. In Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry (6th ed., pp. 1–3). Missouri: Elsevier Mosby.
- Jo, S. Y., Chong, H. J., Lee, E. H., Chang, N. Y., Chae, J. M., Cho, J. H., ... Kang, K. H. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *Korean Journal of Orthodontics*, 44(3), 113–118. <https://doi.org/10.4041/kjod.2014.44.3.113>
- Karlinsey, R. L., & Pfarrer, A. M. (2012). Fluoride Plus Functionalized  $\beta$ -TCP. *Advances in Dental Research*, 24(2), 48–52. <https://doi.org/10.1177/0022034512449463>
- Katakam, D., Sh, P., Raghu, R., Shetty, A., Premlatadevi, T., & Cherukuri, S. (2017). an in Vitro Comparative Evaluation of Enamel Microhardness in Soft Drinks, Cpp-Acp, Amine Fluoride and Sodium Fluoride With Functionalised Tricalcium Phosphate. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 6(4), 273–277. <https://doi.org/10.14260/Jemds/2017/62>
- Kim, M. J., Lee, S. H., Lee, N. Y., & Lee, I. H. (2013). Evaluation of the effect of PVA tape supplemented with 2.26% fluoride on enamel demineralization using microhardness assessment and scanning electron microscopy: In vitro study. *Archives of Oral Biology*, 58(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.06.015>
- Küchler, E. C., Pecharki, G. D., Castro, M. L., Ramos, J., Barbosa Jr., F., Brancher, J. A., ... Trevilatto, P. C. (2017). Genes Involved in the Enamel Development Are Associated with Calcium and Phosphorus Level in Saliva. *Caries Research*, 225–230. <https://doi.org/10.1159/000450764>

- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 42(7), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, S12–S20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
- Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H., & Okamoto, A. C. (2010). Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3), 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022>
- Llena, C., Leyda M., Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP vs fluoride varnish in remineralization of early caries lesions. A prospective study. *EUROPEAN JOURNAL OF PAEDIATRIC DENTISTRY*, 16/3, 181–186.
- Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2015). The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Research*, 49(suppl 1), 18–29. <https://doi.org/10.1159/000380886>
- Magalhães, A. C., Comar, L. P., Rios, D., Delbem, A. C. B., & Buzalaf, M. A. R. (2008). Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*, 36(2), 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.12.001>
- Memarpour, M., Soltanimehr, E., & Sattarahmady, N. (2015). Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion. *Microscopy Research and Technique*, 78(9), 801–806. <https://doi.org/10.1002/jemt.22543>
- Neel, E. A. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., ... Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1592–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.004>
- Oliveira, P. R. A., Fonseca, A. B. ., Silva, E. M., Coutinho, T. C. L., & Tostes, M. A. (2016). Remineralizing potential of CPP-ACP creams with and without fluoride in

- artificial enamel lesions. *Australian Dental Journal*, 61(1), 45–52.  
<https://doi.org/10.1111/adj.12305>
- Paula, A. B. P., Fernandes, A. R., Coelho, A. S., Marto, C. M., Ferreira, M. M., Caramelo, F., ... Carrilho, E. (2017). Therapies for White Spot Lesions-A Systematic Review. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 17(1), 23–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2016.10.003>
- Peric, T. O., Markovic, D. L. J., Radojevic, V. J., Heinemann, R. M. J., Petrovic, B. B., & Lamovec, J. S. (2014). Influence of pastes containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on surface of demineralized enamel. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 12(3), 234–239.  
<https://doi.org/10.5301/jabfm.5000194>
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., ... Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(May), 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Rirattanapong, P., Vongsavan, K., Surarit, R., Tanaiutchawoot, N., Charoenchokdilok, V., Jeansuwannagorn, S., & Yoddee, M. (2012). Effect of various forms of calcium in dental products on human enamel microhardness in vitro. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 43(4), 1053–1058.
- Rodrigues, F. T., Serro, A. P., Polido, M., Ramalho, A., & Figueiredo-Pina, C. G. (2017). Effect of bleaching teeth with hydrogen peroxide on the morphology, hydrophilicity, and mechanical and tribological properties of the enamel. *Wear*, 374–375, 21–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.wear.2016.11.001>
- Rosier, B. T., De Jager, M., Zaura, E., & Krom, B. P. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*, 4(July), 92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092>
- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontología preventiva y comunitaria: principios, métodos y aplicaciones* (4<sup>a</sup> edición). Elsevier Masson.
- Schofield, R. M. S., Nesson, M. H., & Richardson, K. A. (2002). Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. *Die Naturwissenschaften*, 89(2002), 579–583. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0381-4>
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Seminar Dental caries. *Lancet*, 369(4), 51–59.
- Shen, P., Bagheri, R., Walker, G. D., Yuan, Y., Stanton, D. P., Reynolds, C., & Reynolds,

- E. C. (2015). Effect of calcium phosphate addition to fluoride containing dental varnishes on enamel demineralization. *Australian Dental Journal*, 61(3), 357–365. <https://doi.org/10.1111/adj.12385>
- Shen, P., Manton, D. J., Cochrane, N. J., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., & Reynolds, E. C. (2011). Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *Journal of Dentistry*, 39(7), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.05.002>
- Shetty, S., Hegde, M. N., & Bopanna, T. P. (2014). Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 17(1), 49–52. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.124136>
- Singh, S., Singh, S. P., Goyal, A., Utreja, A. K., & Jena, A. K. (2016). Effects of various remineralizing agents on the outcome of post-orthodontic white spot lesions (WSLs): a clinical trial. *Progress in Orthodontics*, 17(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40510-016-0138-9>
- Soares, R., Ataide, I. D. N. De, Fernandes, M., & Lambor, R. (2017). Assessment of Enamel Remineralisation After Treatment with Four Different Remineralising Agents: A Scanning Electron Microscopy (SEM) Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 11(4), ZC136. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/23594.9758>
- Srinivasan, N., Kavitha, M., & Loganathan, S. C. (2010). Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. *Archives of Oral Biology*, 55(7), 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.05.002>
- Sudjalim, T. R., Woods, M. G., & Manton, D. J. (2006). Prevention of white spot lesions in orthodontic practice: A contemporary review. *Australian Dental Journal*, 51(4), 284–289. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2006.tb00445.x>
- Sultan, S., Chaitra, T. R., Chaudhary, S., Manuja, N., Kaur, H., Amit, S. A., & Ravishankar, T. L. (2016). Effect of ACP-CPP chewing gum and natural chewable products on plaque pH: Calcium and phosphate concentration. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(4), ZC13-ZC17. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16645.7533>
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42(6), 409–418.

- <https://doi.org/10.1159/000159604>
- Tschoppe, P., & Meyer-Lueckel, H. (2012). Effects of regular and highly fluoridated toothpastes in combination with saliva substitutes on artificial enamel caries lesions differing in mineral content. *Archives of Oral Biology*, *57*(7), 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.010>
- Tuloglu, N., Bayrak, S., Tunc, E. Sen, & Ozer, F. (2016). Effect of fluoride varnish with added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on the acid resistance of the primary enamel. *BMC Oral Health*, *16*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0299-4>
- Veiga, N. J., Pereira, C. M., Ferreira, P. C., & Correia, I. J. (2015). Prevalence of dental caries and fissure sealants in a Portuguese sample of adolescents. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121299>
- Vyavhare, S., Sharma, D. S., & Kulkarni, V. K. (2015). Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *39*(2), 149–160. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/3/034104>
- Wang, Z., Jiang, T., Sauro, S., Pashley, D. H., Toledano, M., Osorio, R., ... Wang, Y. (2011). The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: An in vitro study. *Australian Dental Journal*, *56*(4), 372–381. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01361.x>
- Young, D. A., & Featherstone, J. D. B. (2013). Caries management by risk assessment. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *41*(1). <https://doi.org/10.1111/cdoe.12031>
- Young, D. A., Novy, B. B., Zeller, G. G., Hale, R., Hart, T. C., Truelove, E. L., & Sci, A. D. A. O. (2015). The American Dental Association Caries Classification System for Clinical Practice A report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *Journal of the American Dental Association*, *146*(2), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>
- Zhang, X., Li, Y., Sun, X., Kishen, A., Deng, X., Yang, X., ... Wu, M. (2014). Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *25*(12), 2619–2628. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5285-2>
- Zhang, Y. F., Zheng, J., Zheng, L., Shi, X. Y., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2013). Effect of adsorption time on the lubricating properties of the salivary pellicle on human

- tooth enamel. *Wear*, 301(1–2), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2012.11.037>
- Zhang, Y. R., Du, W., Zhou, X. D., & Yu, H. Y. (2014). Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International Journal of Oral Science*, 6(2), 61–69. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.21>
- Zheng, J., Weng, L. Q., Shi, M. Y., Zhou, J., Hua, L. C., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2013). Effect of water content on the nanomechanical properties and microtribological behaviour of human tooth enamel. *Wear*, 301(1–2), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2012.12.043>
- Zheng, L., Zheng, J., Weng, L. Q., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2011). Effect of remineralization on the nanomechanical properties and microtribological behaviour of acid-eroded human tooth enamel. *Wear*, 271(9–10), 2297–2304. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2010.11.025>