



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA HIDROXIAPATITE MODIFICADA  
COM ZINCO POR ANÁLISE DA MICRODUREZA DE  
SUPERFÍCIE DO ESMALTE**

Trabalho submetido por  
**Patrícia Filipa dos Santos Lucas**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2020**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO DO EFEITO DA HIDROXIAPATITE MODIFICADA  
COM ZINCO POR ANÁLISE DA MICRODUREZA DE  
SUPERFÍCIE DO ESMALTE**

Trabalho submetido por  
**Patrícia Filipa dos Santos Lucas**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof<sup>a</sup> Doutora Carla Ascenso**

E coorientado por  
**Mestre Joana do Carmo**  
**Mestre André Peixoto**

**Outubro de 2020**



## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a microdureza de superfície do esmalte, pela incorporação do cátion zinco na hidroxiapatite.

**Materiais e métodos:** 40 espécimes foram obtidos a partir de 10 molares humanos e divididos aleatoriamente em quatro grupos (A, B, C e D). Grupo A – esmalte são. Três destes grupos (B, C e D) foram expostos à desmineralização através da solução tampão de ácido láctico a pH 5 durante 6 dias, seguidos de imersão em água destilada durante 2h, seguida da aplicação de verniz de fluoreto de sódio a 5%. Posteriormente, os grupos C e D foram tratados com soluções de saliva artificial diferentes, durante 6 dias e com renovação diária: C, imersão em saliva artificial com cálcio; D, imersão em saliva artificial com zinco. Todos os grupos foram submetidos à análise de microdureza Vickers. Após a recolha dos dados, sucedeu-se a análise estatística por aplicação do teste ANOVA *One-way* (intervalo de confiança de 95%), seguido de comparação múltipla pelo teste de Bonferroni (software SPSS, versão 24).

**Resultados:** O teste ANOVA *One-way* e de Bonferroni garantiram que existem diferenças significativas entre os valores médios dos grupos de estudo ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respetivamente). A -  $518,620 \pm 4,4726$ ; B -  $320,200 \pm 5,7240$ ; C -  $500,120 \pm 4,1986$ ; D -  $409,920 \pm 4,6878$

**Conclusões:** A modificação na HA com a incorporação de zinco levou a um aumento da microdureza de superfície sugestivo de remineralização. Contudo, estes os valores obtidos pelo zinco foram inferiores aos do cálcio.

**Palavras-chave:** Zinco, hidroxiapatite, remineralização, microdureza



## ABSTRACT

**Objectives:** Evaluate the enamel surface microhardness by incorporating the zinc cation in hydroxyapatite.

**Materials and methods:** 40 specimens were obtained from 10 human molars and randomly divided in 4 groups (A, B, C e D). Group A – sound enamel. 3 of these groups (B, C and D) were subjected to lactic acid buffer at pH 5 for 6 days, followed by immersion in distilled water for 2h and then application of 5% sodium fluoride varnish. Subsequently, groups C and D were treated with different artificial saliva solutions, for 6 days with daily renewal: C, immersion in artificial saliva with calcium; D, immersion in artificial saliva with zinc. Group A was not subjected to demineralization neither to treatment. All groups were submitted to Vickers microhardness test. After data collection, statistical analysis was performed by applying a one-way ANOVA test (95% confidence interval), followed by multiple comparison by Bonferroni test (SPSS software, version 24).

**Results:** ANOVA test and Bonferroni test guaranteed that there are significant differences between the mean values of the study groups ( $p < 0,001$  and  $p < 0,05$ , respectively). A -  $518,620 \pm 4,4726$ ; B -  $320,200 \pm 5,7240$ ; C -  $500,120 \pm 4,1986$ ; D -  $409,920 \pm 4,6878$

**Conclusions:** The modification of hydroxyapatite, with the incorporation of zinc, led to an increase of surface microhardness suggestive of remineralization. However, these values obtained by zinc were lower than calcium.

**Keywords:** Zinc, hydroxyapatite, remineralization, microhardness



# ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE GERAL .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	11
I. INTRODUÇÃO.....	13
I.1. ESMALTE.....	14
I.1.1. PROPRIEDADES QUÍMICAS E MICROESTRUTURA.....	14
I.1.2. MACROESTRUTURA .....	17
I.1.3. PAPEL DA SALIVA NA PROTEÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO .....	18
I.1.3.1. CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES .....	18
I.1.3.2. COMPONENTES ORGÂNICOS .....	19
I.1.3.3. COMPONENTES INORGÂNICOS.....	22
I.2. CÁRIE DENTÁRIA.....	22
I.2.1. DEFINIÇÃO .....	22
I.2.2. POTENCIAL CARIOGÉNICO.....	23
I.2.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS.....	24
I.2.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	25
I.2.5. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO .....	26
I.2.6. PREVENÇÃO E REMINERALIZAÇÃO.....	27
I.2.6.1. FLÚOR.....	28
I.2.6.2. CÁLCIO.....	29
I.2.6.3. ZINCO.....	30
I.3. OBJETIVOS DE ESTUDO.....	32
I.4. HIPÓTESES DE ESTUDO .....	32
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
II.1. DESENHO DE ESTUDO.....	33
II.2. TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	33
II.3. LOCAL DE ESTUDO.....	34
II.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	34

II.5. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	34
II.6. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA.....	36
II.7. DESMINERALIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	37
II.7.1. INDUÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAS DE CÁRIE DENTÁRIA .....	37
II.8. SOLUÇÕES REMINERALIZANTES.....	38
II.8.1. SALIVA ARTIFICIAL COM $\text{CaCl}_2$ .....	38
II.8.2. SOLUÇÃO DE SALIVA ARTIFICIAL COM $\text{ZnCl}_2$ .....	39
II.9. ANÁLISE DE MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE.....	40
III. RESULTADOS.....	41
IV. DISCUSSÃO.....	47
V. CONCLUSÃO.....	51
VI. BIBLIOGRAFIA.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho de Estudo .....	33
Figura 2 - Máquina de polimento LaboPol-4® usada no polimento dos espécimes.....	35
Figura 3 - Preparação dos espécimes. I: Linhas marcadas no dente molar para efetuar a sua secção   II: Micrómetro de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup)   III: Corte da coroa do dente no sentido mesio-distal   IV: fragmentos obtidos após o corte com .....	36
Figura 4 - Soluções. I: Verniz de floureto de sódio 5% utilizado neste trabalho (Profluorid® Varnish, VOCO)   II: Imagem do modo de aplicação do verniz de flúor na face vestibular/lingual dos espécimes .....	37
Figura 5 - Soluções utilizadas neste trabalho. I: Solução mãe de saliva artificial 1,25x concentrada sem catiões com pH 7   II: Solução de ácido láctico 50 mM com pH 5 .....	38
Figura 6 - Cloreto de zinco anidro (98%) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo Zn <sup>2+</sup> do grupo D; Fornecedor Chem-Lab NV .....	39
Figura 7 - Análise da microdureza de superfície de Vickers. I: Equipamento HSV-30®, Shimadzu Corporation   II: Observação da indentação   III: Indentação com forma tetrapiramidal .....	40
Figura 8 - Gráfico comparativo das médias de dureza de superfície dos diferentes grupos .....	42



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores obtidos na análise descritiva de cada grupo de estudo.....	41
Tabela 3 - Resultados obtidos com a aplicação do teste de homogeneidade de variâncias de Levene ( $gl_1 = n^\circ$ de grupos-1; $gl_2 = n^\circ$ de espécimes- $n^\circ$ de grupos) .....	43
Tabela 4 – Resultados obtidos pela aplicação do teste ANOVA a um fator (one-way ANOVA).....	44



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**h** - Horas

**HA** – Hidroxiapatite

**JAD** – Junção amelodentinária

**mg** - Miligramas

**ml** - Mililitros

**mM** – Milimolar

**MMPs**- Metaloproteinases

**N** -Newton

**P** - Significância

**pH** –  $-\log [H^+]$

**ppm** - Partes por milhão

**PRPs**- Proteínas ricas em prolina

**rpm** - Rotações por minuto

**min** - Minutos

**SPSS** – *Statistical Package for the Social Sciences*



## I. INTRODUÇÃO

O esmalte dentário, localizado na camada superficial, é descrito como uma barreira isoladora que protege o dente (Y. L. Wang et al., 2019) de forças físicas, térmicas e químicas (Lacruz et al., 2017; Li et al., 2014; Valente et al., 2018). O esmalte exhibe grande dureza, sendo mesmo considerado o tecido mais duro do corpo humano e tal permite-lhe tolerar condições adversas (Pitts et al., 2017).

A cárie dentária é a patologia mais prevalente da cavidade oral (Peres et al., 2019; Shahmoradi et al., 2017; Tao et al., 2018). As lesões de cárie traduzem-se na destruição localizada de tecidos duros devido à presença de subprodutos acídicos produzido na fermentação bacteriana dos hidratos de carbono (Peres et al., 2019; Shen et al., 2018; WHO, 2017; Yadav & Prakash, 2016). A sua progressão desenvolve-se através de interações gradualmente mais complexas entre bactérias acidogénicas, hidratos de carbono fermentáveis e fatores do hospedeiro, como os dentes e a saliva (Veiga et al., 2016). Todavia, a doença cárie não é simplesmente um processo contínuo e unidirecional de desmineralização da fase mineral, mas sim um ciclo de eventos de desmineralização e remineralização. Assim, quando os períodos de desmineralização são dominantes, ocorre progressão da doença (Arifa et al., 2019; Pitts et al., 2017). Nas etapas iniciais, quando foi perdido mineral suficiente para o aparecimento clínico sob a forma de uma mancha branca opaca na superfície dentária, a lesão poderá ser revertida ou inativada, especialmente quando há exposição ao flúor (Peres et al., 2019). Esta lesão inicial de cárie é denominada de *white spot*, o que implica que, apesar de existir uma perda mineral ao nível superficial, o esmalte inferior a esta camada encontra-se intacto (S. Pathak et al., 2015).

A saliva desempenha um papel importante na interrupção do avanço desta patologia (Marsh et al., 2016). Trata-se de uma mistura complexa de componentes orgânicos, onde predominam as proteínas salivares e péptidos que concebem a película adquirida, e componentes inorgânicos, onde predominam os iões fosfato e cálcio relacionados com o processo de remineralização do esmalte dentário, prevenindo as cáries dentárias (Valente et al., 2018).

Os tratamentos com base preventiva da cárie giram em redor das diversas substâncias que provaram ser potentes fatores de inibição da doença, sendo uma delas o flúor (Molaasadolah, 2017; Naik et al., 2019). Nas últimas décadas, a utilização do ião

flúor conduziu a um drástico decréscimo da incidência e prevalência de cáries a nível mundial (Cassiano et al., 2017). A aplicação desde ião permite o fortalecimento da estrutura e melhor remineralização do esmalte, tornando-o menos suscetível à desmineralização através da formação de cristais de fluorapatite (Naik et al., 2019; Tao et al., 2018). Existem inúmeras formas de emprego, no entanto os vernizes de fluor a 5% são a preferência da maioria dos médicos dentistas devido à sua fácil e rápida aplicação assim como baixo risco de ingestão (Molaasadolah, 2017).

## **I.1.ESMALTE**

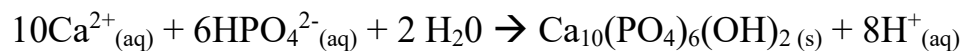
### **I.1.1. PROPRIEDADES QUÍMICAS E MICROESTRUTURA**

Localizado na camada externa do dente, o esmalte dentário é considerado o tecido mais duro presente no corpo humano. Este facto deve-se ao elevado nível de mineralização da sua matriz extracelular (Zaharia et al., 2017). Este composto avascular é produzido por células denominadas por ameloblastos e que, após a sua formação, ou seja a amelogenese, não possui capacidade de reparação (Lacruz et al., 2017; Zaytsev, 2016).

Quanto à sua composição, o esmalte apresenta entre 92 a 94% de matéria inorgânica, 2 a 3% de água, 2% matéria orgânica, 1% de oligoelementos (magnésio, sódio, zinco, cloro, potássio), menos de 1% de lípidos e 0,01-0,05% de flúor (Zaharia et al., 2017). Certos fatores químicos e biológicos no ambiente na cavidade oral influenciam a progressão da perda de dureza do esmalte, conferida pela matéria inorgânica (Colombo et al., 2017). Contrariamente, a saliva humana, um elemento protetor, contribui com uma grande concentração de iões, o que se traduz num estado de supersaturação no que diz respeito ao cristal de hidroxiapatite, o maior componente do esmalte dentário (Valente et al., 2018).

Estruturalmente, o esmalte organiza-se em três níveis hierárquicos o que explica a sua resistência mecânica, sendo estes, por ordem crescente: os cristais de hidroxiapatite, os prismas de esmalte e substância interprismática, e por fim, as bandas de *Hunterschreger* (Shahmoradi et al., 2014). Os cristais de hidroxiapatite presentes no esmalte são maioritariamente compostos por cálcio e fosfato, iões estes que sofrem precipitação originando, na fase final, um sólido cristalino denominado por apatite. Esta constitui a

parte inorgânica dos tecidos mineralizados do seres vertebrados (Lacruz et al., 2017; Nurbaeva et al., 2017) e, em condições fisiológicas, a apatite possui reduzida solubilidade o que se traduz numa elevada estabilidade química (Lacruz et al., 2017; Skucha-Nowak et al., 2015). A hidroxiapatite biológica difere da hidroxiapatite derivada empiricamente, não seguindo a fórmula estequiométrica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  explicada pela equação 1 (Abou Neel et al., 2016; Lussi & Carvalho, 2015).



Equação 1

Na estrutura do cristal podem estar ausentes alguns iões e ocorrer substituição de certos elementos deste mineral (Abou Neel et al., 2016; West & Joiner, 2014). A estrutura dentária é normalmente composta por hidroxiapatite carbonatada, densamente compactada (Abou Neel et al., 2016; Beniash et al., 2019). O cristal exhibe também um défice de cálcio, possuindo um rácio de cálcio-fosfato de 1,61 em vez de 1,66 (Abou Neel et al., 2016). A fórmula simplificada deste mineral corresponde a  $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_{2-z}\text{F}_z$  (Abou Neel et al., 2016; Lussi & Carvalho, 2015). Existem diversos locais de substituição atómica, podendo ocorrer, por exemplo, a permuta do cálcio por iões como o estrôncio (Y. L. Wang et al., 2019), zinco (West & Joiner, 2014), magnésio ou sódio, entre outros (Y. L. Wang et al., 2019; West & Joiner, 2014). Já o fosfato presente neste cristal hexagonal podem ser substituídos por carbonato, o que se traduz num aumento da solubilidade do mineral (Abou Neel et al., 2016; Skucha-Nowak et al., 2015; Y. L. Wang et al., 2019; West & Joiner, 2014). O conteúdo de carbonato na hidroxiapatite presente nos ossos e dentes varia entre 4% a 8% existindo, no entanto, há um aumento da sua concentração com o avançar da idade (Abou Neel et al., 2016). Principalmente em regiões do cristal com elevada quantidade de carbonato e deficit de cálcio são especialmente suscetíveis à desmineralização por parte do ácido (West & Joiner, 2014). Relativamente ao grupo hidroxilo, este pode ser trocado pelo ião flúor (West & Joiner, 2014) ou pelo cloro (Abou Neel et al., 2016). Esta troca do hidroxilo por flúor permite um aumento da resistência à desmineralização por ácido. Contudo, estas substituições e ausências podem ter um efeito marcado no comportamento da hidroxiapatite (HA), sobretudo na sua solubilidade quando ocorre um decréscimo do pH (West & Joiner, 2014).

Através dos processos de *Tomes*, após a formação dos primeiros cristais, os ameloblastos distanciam-se da superfície de dentina e depositam a matriz de proteínas de esmalte (Abou Neel et al., 2016; Shahmoradi et al., 2014). Ocorre a mineralização desta matriz através do processo de modulação na fase de maturação (Shahmoradi et al., 2014), obtendo cristais alongados denominados de prismas de esmalte, a unidade base do esmalte (Shahmoradi et al., 2014; Skucha-Nowak et al., 2015; Zaharia et al., 2017). A formação destes prismas é explicada como o alinhamento de um conjunto de cristais de hidroxiapatite carbonatada (Beniash et al., 2019). Cada ameloblasto produz um prisma com aproximadamente 10 000 a 40 000 cristais (Abou Neel et al., 2016) cujo diâmetro é  $\sim 5\mu\text{m}$  (Abou Neel et al., 2016; Beniash et al., 2019). O longo eixo destes cristais é paralelo ao eixo longitudinal dos prismas (Beniash et al., 2019; Shahmoradi et al., 2014; West & Joiner, 2014). Numa trajetória ondulatória, os prismas de esmalte prolongam-se desde a junção amelodentinária (JAD) até à superfície externa do dente, criando assim as bandas de *Hunter-Schreger*, o que torna o esmalte mais resistente do que o osso (Beniash et al., 2019).

A região interprismática encontra-se associada ao esmalte prismático, porém possui um arranjo cristalino divergente deste (Beniash et al., 2019; Shahmoradi et al., 2014). Os seus cristais encontram-se num ângulo de  $60^\circ$  relativamente ao eixo longitudinal dos prismas (Beniash et al., 2019). A espaço limite entre a região interprismática e os prismas é preenchido por uma matriz de matéria orgânica e água (Beniash et al., 2019; West & Joiner, 2014; Zaytsev, 2016). Este zona permitirá a passagem de pequenas moléculas como é o caso do ácido láctico, peróxido de hidrogénio e igualmente iões, como o hidrogénio e o cálcio (West & Joiner, 2014).

Além de prismático, o esmalte pode ser aprismático. Este é caracterizado pelo arranjo aleatório dos cristais de HA, não existindo a organização em prismas (Beniash et al., 2019). Quando exposto ao processo de desmineralização, o esmalte aprismático apresenta uma dissolução irregular da substância mineral (Warreth et al., 2019). Esta camada densamente mineralizada apresenta variações entre os diversos dentes e os diferentes locais de cada dente, especialmente nos dentes decíduos (Arafa, 2017). Ao se localizar na zona mais exterior do esmalte, é gradualmente desgasto durante a mastigação, porém mantém-se em áreas mais protegidas (Arafa, 2017).

A constituição do esmalte não é a mesma desde a sua superfície até à JAD. Ao nível superficial, verificamos uma elevada concentração de iões, como por exemplo fosfato, flúor, entre outros elementos, o que se traduz numa maior dureza (Skucha-Nowak

et al., 2015). Nesta zona, encontramos também prismas com maior diâmetro quando comparado com o esmalte próximo da JAD. Além disso, a camada exterior do esmalte aparenta ser mais densa, menos permeável e mais resistente à dissolução (Shahmoradi et al., 2014; Skucha-Nowak et al., 2015).

### **I.1.2. MACROESTRUTURA**

No que diz respeito à macroestrutura, as superfícies de trabalho possuem uma camada de esmalte com elevada espessura quando comparadas com a restante constituição. Estas superfícies correspondem às cúspides que apresentam cerca de 2,5 mm de esmalte. Quanto às zonas menos expostas ao desgaste, a espessura diminui até alcançar a margem cervical (West & Joiner, 2014).

As extraordinárias propriedades mecânicas do esmalte dentário conjugam dureza extrema e rigidez com resiliência excepcional, permitindo tolerar centenas de ciclos mastigatórios com forças até 770N. Aliás, ocorrem também grandes flutuações de pH e temperatura, o que torna o ambiente da cavidade oral momentaneamente hostil (Beniash et al., 2019). Não obstante, as propriedades mecânicas do esmalte variam com localização, mas também com a constituição química local e com a orientação dos prismas (Y. L. Wang et al., 2019). A análise da microdureza do esmalte superficial foi aceite como uma técnica de medição do valor do conteúdo mineral de um local específico (Arafa, 2017). Diversos protocolos laboratoriais incluem a técnica de microdureza Vickers sendo este considerado um teste simples, razoavelmente confiável (Elkassas & Arafa, 2014), de elevada precisão e capacidade de medição quantitativa (Molaasadolah, 2017). Por meio do teste de Knoop ou da técnica de microdureza de Vickers, os valores de microdureza do esmalte atingem um maior número na ponta da cúspide, contrariamente à superfície lateral. Desde a camada externa até ao nível da JAD, a dureza apresenta um trajeto decrescente (Y. L. Wang et al., 2019).

O processo de desmineralização consiste na remoção de íões do cristal de HA dos tecidos duros, por exemplo, do esmalte, que por fim conduz a uma redução do conteúdo mineral (Abou Neel et al., 2016; Skucha-Nowak et al., 2015). Existem duas formas de desmineralização química, são estas a erosão, através do consumo de comida e bebidas ácidas, e a cárie dentária, com o ataque microbiano por parte das bactérias presentes na cavidade oral (Abou Neel et al., 2016; Y. L. Wang et al., 2019).

### **I.1.3. PAPEL DA SALIVA NA PROTEÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

A cavidade oral está constantemente exposta aos fatores ambientais adversos, sendo a saliva a primeira secreção que entra em contacto com as substâncias exógenas (Shikha Singh et al., 2015).

#### **I.1.3.1. CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES**

A saliva possui um importante papel na manutenção de uma cavidade oral saudável (Marsh et al., 2016; Shikha Singh et al., 2015). Além da ação de diluição, limpeza, lubrificação, neutralização e capacidade de tamponamento de ácidos, a saliva humana também minimiza a desmineralização da superfície dentária assim como altera o processo de remineralização (Baumann et al., 2017; Colombo et al., 2017; Marsh et al., 2016). A saliva é composta por uma mistura complexa de fluidos produzidos pelas glândulas salivares (Bilbilova et al., 2013; Shikha Singh et al., 2015), existindo um contributo de 90% por parte das major (Pedersen et al., 2018). As propriedades e eficácia desta são maioritariamente determinadas pelas secreções das glândulas salivares major e minor (Proctor, 2016). A sua composição varia de acordo com o fluxo, natureza e duração da estimulação, composição do plasma e em que hora do dia é coletada (Bilbilova et al., 2013). No entanto, no que diz respeito à sua constituição, cerca de 99% corresponde a água (Bilbilova et al., 2013; Dawes et al., 2015). Na restante percentagem são contemplados componentes orgânicos e inorgânicos (Bilbilova et al., 2013). No que diz respeito aos constituintes orgânicos, este fluido possui uma ampla variedade de moléculas hospedeiras, proteínas e glicoproteínas, estruturalmente e funcionalmente complexas (Marsh et al., 2016).

As glândulas salivares são categorizadas em 3 pares de glândulas major, incluindo parótidas, submandibulares e sublinguais e cerca de 600 a 1000 glândulas salivares *minor*, particularmente localizadas na mucosa labial, jugal, na área palatina, lingual e retromolar (Pedersen et al., 2018). A parótida, glândula acinosa com células serosas, é responsável pela produção de uma saliva bastante aquosa com diminuta ou nenhuma presença de mucinas (Dawes et al., 2015; Proctor, 2016). Esta saliva alcança a cavidade oral através do canal de Stenon (Proctor, 2016). A função desta glândula, que mais contribui para a secreção da saliva estimulada, permanece estável durante o envelhecimento em pessoas saudáveis, não medicadas (Pedersen et al., 2018).

No que diz respeito à glândula submandibular, esta detém uma população de células acinares mistas que expõem o seu fluido através do ducto de Wharton. Similarmente a esta, a sublingual segrega maior quantidade de saliva em resposta a estímulos olfativos, não se verificando essa ação por parte da parótida (Proctor, 2016). Apesar da saliva possuir elevada percentagem de água, existe uma diferença importante entre estes dois fluidos que se cinge na presença de mucinas. A saliva contém estas proteínas que são sintetizadas pelas glândulas submandibulares, sublinguais e *minor* que se encontram submucosa oral (Dawes et al., 2015).

Num indivíduo saudável, a secreção salivar diária média ronda os 600 mililitros (ml) (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Um fluxo de saliva não estimulação previne a entrada de microrganismos nos ductos salivares, impedindo infeções nas glândulas salivares. Em média, o fluxo de saliva não estimulada de um indivíduo saudável pode alcançar 0,3-0,4 ml por minuto (ml/min). Caso este valor se encontre abaixo de 0,1 ml/min, estamos perante uma patologia denominada de hipossalialia (Dawes et al., 2015). A função exígua das glândulas salivares aumenta o risco de doenças orais tais como cáries dentárias, erosão e infeções fúngicas, podendo afetar a ingestão alimentar conduzindo a desnutrição e perda de peso. Inevitavelmente, nestas situações há comprometimento da qualidade de vida (Pedersen et al., 2018).

O sabor, cheiro e/ou mastigação dos alimentos são estímulos para a produção da saliva estimulada. Esta é maioritariamente proveniente das glândulas parótidas (Proctor, 2016), rondando uma taxa média de 1.5 a 2.0 ml/min de saliva (Pedersen et al., 2018).

### I.1.3.2. COMPONENTES ORGÂNICOS

No que diz respeito aos constituintes orgânicos, a saliva possui uma ampla variedade de moléculas hospedeiras, proteínas e glicoproteínas, estruturalmente e funcionalmente complexas (Marsh et al., 2016). Apesar da maioria da constituição da saliva humana ser água, existe uma diferença relevante entre estes dois fluidos que corresponde à presença de específicas glicoproteínas e proteínas (Dawes et al., 2015).

Uma das proteínas mais prevalentes na saliva diz respeito às proteínas ricas em prolina (PRP) (Marsh et al., 2016). Para além de serem um constituinte da película adquirida devido à sua elevada afinidade ao cálcio e fosfato presente à estrutura dentária, as PRP possuem uma ação antimicrobiana ao se agregarem microrganismos não aderidos à superfície, promovendo a sua eliminação (Baumann et al., 2016; Hof et al., 2014).

A amilase salivar é uma enzima digestiva cujo o seu conteúdo ao nível salivar encontra-se entre 0,25 e 1,2 mg/ml de saliva (Björklund et al., 2011). Trata-se de uma das proteínas mais abundantes da saliva humana e também se encontra presente na película adquirida (Marsh et al., 2016). A agregação da alfa-amilase às bactérias e à estrutura dentária tem um grande impacto na formação de placa bacteriana e cárie dentária. Assim sendo, a concentração da amilase é superior aos grupos com cáries ativas comparativamente ao grupo livre da doença cárie (Shikha Singh et al., 2015).

As glândulas salivares também secretam a histatina, que corresponde a 2,6% da totalidade das proteínas salivares. Este péptido está presente na película, contribuindo para a remineralização e proteção contra a desmineralização. Além disso, possui uma função antifúngica e alguma ação antibacteriana (Proctor, 2016).

As mucinas representam mais de 15% do conteúdo proteico presente na saliva humana (Marsh et al., 2016). Apesar de contribuírem somente 10% da totalidade do fluxo salivar, as glândulas *minor* são responsáveis pela secreção de uma maior porção de mucinas salivares (Pedersen et al., 2018). Estas glicoproteínas contribuem para a lubrificação das superfícies da cavidade oral (Dawes et al., 2015; Pedersen et al., 2018). Inclusivamente, as mucinas são um dos constituintes da película protetora formada sobre o esmalte dentário denominada de película adquirida (Björklund et al., 2011). Na presença de diminuta quantidade de nutrientes, esta glicoproteína é utilizada como fonte de carbono por diferentes estirpes de microrganismos. Deste modo, possível promover uma complexidade microbiana oral que, por sua vez, impede o crescimento excessivo de seres patogénicos (Hof et al., 2014).

O fluido salivar possui igualmente metaloproteinases da matriz (MMP), existindo inúmeros tipos de MMP com diferentes ações. De acordo com Proctor (2016), os indivíduos que apresentem cáries dentárias, a sua saliva exhibe elevada concentração de Metalloproteinase-8 da matriz. Esta enzima, libertada por neutrófilos e fibroblastos, é responsável pela degradação de colagénio na dentina. O mesmo é verificado em pacientes com periodontite (Proctor, 2016). Diversas enzimas interferem no processo da dentinogénese, sendo uma delas a metaloproteinase 9 da matriz, MMP-9, que demonstra uma dependência pelo ião zinco para o seu correto funcionamento (Rahman et al., 2019). As MMP, como por exemplo a MMP20, são também responsáveis pela degradação seletiva e remoção da matriz proteica. Com esta eliminação ocorre a deposição mineral (Shahmoradi et al., 2014).

Na presença de pH fisiológico, superior ao pH crítico do esmalte, a saliva humana encontra-se supersaturada com iões de cálcio e fosfato (Philip, 2019; Y. L. Wang et al., 2019). No entanto, a despeito deste estado de supersaturação, os iões não precipitam. Este fenómeno deve-se a proteínas como a estaterina que se adere aos iões (Dawes et al., 2015; Philip, 2019). A estaterina é ativamente excretada pelas glândulas salivares (Proctor, 2016) e, ao estabelecer a ligação com os iões, assegura a biodisponibilidade destes para que se difundam em futuras lesões de deficiência mineral (Philip, 2019).

Ademais, a estaterina possui a capacidade de inibir o crescimento de bactérias anaeróbias (Dawes et al., 2015). Na presença de ácidos bacterianos, o pH salivar diminui podendo alcançar valores abaixo do pH crítico. Neste contexto, os minerais presentes na estrutura dentária dissolvem-se até a solução tornar-se saturada (Y. L. Wang et al., 2019). Contudo, quando restabelecidas as condições fisiológicas, o ambiente supersaturado na saliva impulsiona uma segunda mineralização da superfície de esmalte (Valente et al., 2018).

A saliva protege a estrutura dentária dos ácidos orgânicos ao contribuírem na película adquirida de esmalte, por ser supersaturada no que diz respeito ao mineral dentário, por conter bicarbonato como tampão por facilitar a depuração de materiais ácidos da boca (Dawes et al., 2015).

Os componentes orgânicos da saliva, juntamente com algumas proteínas provenientes do fluído crevicular, originam uma fina camada proteica aderente à superfície de esmalte, a película adquirida (Marsh et al., 2016; Proctor, 2016; Valente et al., 2018). Os constituintes major desta película derivados da saliva incluem glicoproteínas, lípidos e fosfoproteínas (Marsh et al., 2016). A formação da película adquirida de esmalte inicia-se imediatamente após a escovagem, gerando-se ligações van der waals entre as proteínas e a superfície do esmalte. A primeira camada da película possui péptidos e proteínas, especialmente as estaterina, histatinas e proteínas ricas em prolina (PRP), que se ligam com elevada afinidade ao cálcio e fosfato na superfície dentária (Baumann et al., 2016). Esta barreira possui proteínas de absorção seletiva que protegem o dente da desmineralização ao evitar o contacto direto entre os ácidos e a superfície dentária (Valente et al., 2018; X. Wang et al., 2011). Os péptidos de ligação ao cálcio presentes na película adquirida também estabelecem ligação com os iões de cálcio que se encontram livres na saliva circundante. Esta conexão permite o estabelecimento de reservatório de cálcio na película, possibilitando uma difusão facilitada desde ião para estrutura dentária no processo de remineralização (Baumann et al., 2017).

### **I.1.3.3. COMPONENTES INORGÂNICOS**

Os elementos inorgânicos presentes na saliva humana, nomeadamente o sódio, potássio, cloro e o bicarbonato desempenham um importante papel na osmolaridade. (Bilbilova et al., 2013). Os fatores como fluxo salivar, composição proteica, eletrólitos e capacidade de tamponamento influenciam a velocidade com que a saliva retorna ao seu estado saturado e recupera o seu potencial remineralizador após um ataque ácido (Rizvi et al., 2016; Warreth et al., 2019). A presença de ácido na cavidade oral estimula significativamente a taxa de fluxo salivar. Simultaneamente, ocorre um aumento da concentração de bicarbonato uma vez que a sua concentração depende do fluxo de saliva (Dawes et al., 2015). A desmineralização dentária causada por ácidos bacterianos ou ácidos alimentares pode ser inibida pelo bicarbonato salivar (Shikha Singh et al., 2015; Warreth et al., 2019), sendo considerado o sistema ácido carbónico/bicarbonato o mais importante no tamponamento salivar (Bilbilova et al., 2013). Na presença de ácido, o bicarbonato reage com os iões de hidrogénio originando ácido carbónico. Ao nível salivar, encontramos a enzima anidrase carbónica que converte o ácido carbónico em água e no gás volátil dióxido de carbono, sendo este posteriormente eliminado para a atmosfera (Dawes et al., 2015). Deste modo, ocorre a manutenção dos valores fisiológicos de pH na cavidade oral (Shikha Singh et al., 2015).

Já a presença dos iões cálcio e fosfato permite a manutenção da estabilidade do mineral dentário (Arifa et al., 2019).

## **I.2. CÁRIE DENTÁRIA**

### **I.2.1. DEFINIÇÃO**

As doenças orais representam um problema colossal de saúde a nível mundial, afetando economicamente a população dos países desenvolvidos. No que diz respeito à medicina dentária, esta representa um gasto de 10% relativamente ao total das despesas na área da saúde destas populações (Tahir & Nazir, 2018; WHO, 2017).

Considerada a patologia mais prevalente na cavidade oral, a cárie dentária atinge indivíduos de todas as idades e de ambos os géneros (Skucha-Nowak et al., 2015; Tahir & Nazir, 2018). Segundo a Organização Mundial de saúde (2017), cerca de 2,3 biliões de

peças possuem dentes cariados. Esta doença pandémica afeta a estrutura dentária através da desmineralização e da cavitação (Arifa et al., 2019) por meio da disrupção da homeostasia microbiana e consequente quebra do equilíbrio mineral (Meyer-Lueckel & Paris, 2016; Shahmoradi et al., 2017). Certas alterações ambientais, distúrbios fisiológicos ou pressões seletivas que ocorrem durante o crescimento do biofilme dentário possuem a capacidade de estimular a proliferação de microrganismos específicos que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de um biofilme potencialmente cariogénico (Maske et al., 2017).

## **I.2.2. POTENCIAL CARIOGÉNICO**

Segundo o investigador Keyes, a cárie dentária resulta da interação de 3 determinantes: o substrato, o hospedeiro e os microrganismos. Neste esquema, o hospedeiro engloba a morfologia e composição química da estrutura dentária e a saliva (Veiga et al., 2016). Posteriormente, acrescentou-se o fator tempo à equação, aumentando assim a componente multifatorial (Tahir & Nazir, 2018; Tao et al., 2018; Veiga et al., 2016). Porém, o desenvolvimento desta patologia é adicionalmente influenciado pela componente socioeconómica, por fatores comportamentais, assim como presença ou não de flúor, bolsas escolares, hábitos de higiene oral entre muitos outros agentes que contribuem para o avanço da doença cárie (Veiga et al., 2016). A placa bacteriana assume um importante papel no desenvolvimento da cárie dentária (Abou Neel et al., 2016; Maske et al., 2017; Tahir & Nazir, 2018). Segundo Tahir & Nazir (2018), a placa bacteriana consiste numa acumulação de microrganismos na superfície dentária. Ao se associarem de forma estruturada, estes seres patogénicos conseguem resistir aos fatores antimicrobianos do hospedeiro (Tahir & Nazir, 2018).

A cariogénese, isto é, o processo de formação de cárie, é iniciado por bactérias cariogénicas presentes na placa bacteriana (Rahman et al., 2019; Skucha-Nowak et al., 2015). O *Streptococcus mutans* é considerado o elemento mais cariogénico (Al Harbi et al., 2020; Meyer-Lueckel & Paris, 2016; Tahir & Nazir, 2018) devido ao facto de possuir uma elevada tolerância ao ambiente ácido (Abou Neel et al., 2016; Skucha-Nowak et al., 2015). Porém, comunidade microbiana responsável pela cárie dentária é diversa e contém inúmeras bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas (Yadav & Prakash, 2016). Estão incluídas neste processo as bactérias *Streptococcus Sobrinus* e *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *lactobacillus* (Abou Neel et al., 2016; Rahman et al., 2019; Yadav &

Prakash, 2016). No entanto, entre estes, o *Streptococcus Sobrinus* e *Lactobacillus*, juntamente com o *S.mutans*, destacam-se devido à sua habilidade de produzir elevados níveis de ácido láctico após a fermentação e graças à sua resistência aos efeitos adversos do baixo pH. O *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus coccobacilli* possuem a particularidade de, apesar de participarem no processo de desenvolvimento da cárie dentária ao produzir ácido, são incapazes de iniciar o processo cariogénico (Abou Neel et al., 2016; Skucha-Nowak et al., 2015).

O habitat ideal para as bactérias cariogénicas é provido de hidratos de carbono provenientes da dieta (Meyer-Lueckel & Paris, 2016; Shen et al., 2018). Qualquer hidrato de carbono fermentável, como por exemplo a glucose, frutose, sacarose ou amido, consegue ser metabolizado por estas bactérias (Abou Neel et al., 2016; West & Joiner, 2014). Durante o processo de glicólise, a célula bacteriana produz energia necessária para a sua sobrevivência e multiplicação (Skucha-Nowak et al., 2015). Da fermentação, resultam subprodutos como os ácidos cárie-indutores e substâncias que facilitam a adesão de mais microrganismos à superfície. No que diz respeito aos ácidos orgânicos produzidos, estes variaram entre láctico e acético (Skucha-Nowak et al., 2015; West & Joiner, 2014), tendo em conta que a presença de ambos origina um decréscimo do pH do meio. Inicialmente, os prótons do ácido são neutralizados pelo tampão da saliva (Warreth et al., 2019). Porém, após o término desta capacidade, ocorre a diminuição gradual do pH (West & Joiner, 2014).

### **I.2.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS**

O ritmo e quantidade de dissolução não depende somente do pH mas também da concentração de cálcio e fosfato em solução. O esmalte mineralizado é relativamente estável devido ao processo natural que ocorre na interface dente/saliva (Zaharia et al., 2017). Quando, no meio oral, existem em concentração suficiente iões como o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$  e  $\text{F}^-$ , é estabelecido um equilíbrio nas proximidades dos cristais de hidroxiapatite. As concentrações destes iões determinam o grau de saturação desta solução. Isto, por sua vez, determina se a porção mineral do dente se dissolve, caso o meio em redor esteja insaturado, ou se formam depósitos minerais a partir fluido circundante para o esmalte (supersaturação) (Lussi & Carvalho, 2015). A unidade base do esmalte, a hidroxiapatite, possui um nível crítico de pH de 5.5, abaixo do qual ocorre a sua desmineralização (Skucha-Nowak et al., 2015; Warreth et al., 2019). Na presença dos subprodutos

bacterianos, são libertados iões de  $H^+$  dos ácidos orgânicos, diminuindo assim o pH e, por consequente, as concentrações dos iões  $PO_4^{3-}$  e  $OH^-$  no meio também decrescem. Como resultado, ocorre a dissolução do esmalte com a libertação de cálcio e fosfato para a saliva (Abdullah & John, 2016; Lussi & Carvalho, 2015; Skucha-Nowak et al., 2015; West & Joiner, 2014). Desta forma, é mantido o equilíbrio das soluções nas imediações da superfície dentária (Lussi & Carvalho, 2015). Caso ocorram repetidos ataques ácidos por bactérias cariogénicas presentes no biofilme da placa, é alcançada uma perda da integridade superficial (Abdullah & John, 2016; Abou Neel et al., 2016) e consequentemente obtida maior porosidade na subsuperfície do esmalte (Arafa, 2017; West & Joiner, 2014). Esta porosidade manifesta-se como rugosidade superficial e que contribui na formação de placa bacteriana e agregação de mais bactérias à superfície do esmalte (Arafa, 2017).

#### **1.2.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

Porém, como mencionado anteriormente, o desenvolvimento de lesões resultantes da doença cárie não é um processo linear. Na cavidade oral, o esmalte dentário é exposto a episódios de desmineralização e remineralização (Abdullah & John, 2016; Arifa et al., 2019; Pitts et al., 2017). Caso os períodos de desmineralização predominem, ocorre desenvolvimento gradual das lesões de cárie (Llena et al., 2015; Veiga et al., 2016), iniciando com uma modificação mínima estrutural que não é detetável clinicamente, progredindo para uma mancha clinicamente visível de desmineralização. Com a gradual destruição de tecidos dentários originam-se áreas cavitadas (Llena et al., 2015)

Nas etapas iniciais, após a perda de substância mineral suficiente para o aparecimento clínico, sob a forma de uma mancha branca opaca na superfície dentária, a lesão poderá ser revertida ou inativada, especialmente quando há exposição ao flúor (Peres et al., 2019). O processo de desmineralização conduz a uma ampliação do espaço entre os cristais, o que torna o esmalte mais poroso (Arafa, 2017; Skucha-Nowak et al., 2015). Quando a água presente nos poros é substituída por ar, o esmalte dentário altera a sua cor para branco opaco (Mohd Said et al., 2017; S. Pathak et al., 2015; Skucha-Nowak et al., 2015). Esta variação deve-se ao evento ótico que resulta da alteração do índice de refração. No esmalte são, este índice adota o valor de 1,65, enquanto que o esmalte com água e ar assumem valores de 1,33 e 1,00, respetivamente. Esta modificação do índice de refração conduz ao aumento da dispersão da luz na área da lesão, resultando visualmente

numa opacidade na superfície do esmalte (Skucha-Nowak et al., 2015). Esta lesão inicial de cárie detetável clinicamente é denominada de *white spot*, o que implica que, apesar de existir uma perda de substância mineral na rede subsuperficial, o esmalte inferior a esta camada encontra-se intacto (Mohd Said et al., 2017; S. Pathak et al., 2015; Skucha-Nowak et al., 2015). A solubilidade do esmalte depende da sua composição química e porosidade. O avanço em profundidade das lesões de desmineralização é maior quanto mais poroso for o esmalte (Y. L. Wang et al., 2019). Em termos clínicos, este aumento de porosidade representa uma intensificação da branquidão e opacidade da lesão (Skucha-Nowak et al., 2015). Se o processo de cárie progredir, à porosidade da superfície sucede a microcavitação do esmalte. Com a extensão da lesão, a dentina é contaminada e sofre amolecimento. Em cáries localizadas na zona da coroa do dente, com o amolecimento progressivo ocorre o colapso da camada superficial da lesão, formando-se uma cavidade (Pitts et al., 2017).

### **I.2.5. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO**

A deteção clínica de cáries é realizada tradicionalmente pela investigação visual e tátil detalhada da superfície limpa do dente por um profissional (Mendes et al., 2010; Pitts et al., 2017; Young et al., 2015). Durante o check-up, é também necessário secar a superfície do dente para que seja possível visualizar a forma mais ligeira de lesão de cárie, a *white spot* (Skucha-Nowak et al., 2015; Young et al., 2015). As radiografias, especificamente as bitewings entre outros métodos de diagnóstico auxiliares, são necessários para a deteção de lesões que são inacessíveis visualmente, particularmente as superfícies interproximais do dente (Pitts et al., 2017; Young et al., 2015).

A deteção desta doença tem sofrido alterações do que toca aos critérios usados, passando do convencional CPOD da OMS, que soma os dentes cariados, perdidos e obturados, para o ICDAS, que inclui também lesões não cavitadas de esmalte (Philip, 2019). De forma a facilitar a identificação e o diagnóstico de lesões de cárie, foi criado o sistema internacional de deteção e diagnóstico de cáries, também conhecido por ICDAS, que usa as características visíveis na superfície do dente para medir as alterações superficiais e potenciais profundidades histológicas das lesões (Young et al., 2015). Este índice organiza-se duas categorias de códigos, código de dentes e código do estado da lesão de cárie. No que diz respeito ao código referente às etapas da lesão de cárie, este apresenta sete categorias numeradas de 0 a 6: 0 - dente são; 1- primeira alteração visual

no esmalte; 2 - alteração claramente detetável no esmalte; 3 - rotura localizada do esmalte; 4 - sobra escura subjacente na dentina; 5 - cavidade detetável com dentina visível; 6 - cavidade detetável extensa com dentina visível (Mendes et al., 2010; Pitts et al., 2017).

As lesões de cáries devem ser impedidas e revertidas nos estádios mais iniciais, como as classificadas com o código 1 e 2 segundo ICDAS, para prevenir o desenvolvimento de destruição de estrutura dentária (Pitts et al., 2017; Tao et al., 2018). Para tal é necessário o emprego de tratamentos não invasivos ou minimamente invasivos, como por exemplo o controlo da placa e aplicação de flúor (Meyer-Lueckel & Paris, 2016).

### **1.2.6. PREVENÇÃO E REMINERALIZAÇÃO**

A abordagem clínica relativamente à desmineralização dentária deve focar-se na prevenção e deteção precoce (Li et al., 2014). Como tal, a prevenção é a melhor e a mais eficaz forma de evitar a carie dentária, sendo também a mais económica quando comparado ao tratamento invasivo de lesões de cárie (Molaasadolah, 2017).

Quando estamos perante uma lesão inicial de cárie, primeiramente recorre-se à remineralização dentária e posteriormente, caso necessário, aplica-se o tratamento restaurador (Li et al., 2014).

Num ambiente oral saudável, cujo pH encontra-se entre 7 e 7,4, ocorre naturalmente remineralização da camada mais superficial do esmalte dentário, garantindo a manutenção da composição do esmalte (Zaharia et al., 2017). O processo de remineralização consiste num mecanismo de reparação de modo a restabelecer a porção mineral (Arifa et al., 2019).

As lesões incipientes de cárie resultam da dissolução incompleta dos cristais de hidroxiapatite, atuando estes como agentes de nucleação no processo de remineralização (Mohd Said et al., 2017). Após a ação de desmineralização, quando o meio se encontra em condições fisiológicas de pH quase neutras e elevada concentração de iões de cálcio e fosfato, o equilíbrio é restabelecido (Arifa et al., 2019; Li et al., 2014). Nestas condições, sucede-se nova precipitação dos iões cálcio e fosfato provenientes da saliva e do fluido da placa bacteriana. Este precipitado é mantido por fosfoproteínas que garantem a sua biodisponibilidade para se difundir em lesões com deficit mineral (Philip, 2019). Consequentemente, ocorre a agregação do precipitado às lacunas dos cristais presentes no tecido dentário desmineralizado (Li et al., 2014; Philip, 2019). Assim, os cristais de

hidroxiapatite regressam à sua dimensão original (Abou Neel et al., 2016). Este ganho mineral na rede cristalina do esmalte conduz a uma melhoria da estética, dureza e funcionalidade (Mohd Said et al., 2017).

Os princípios da dentisteria minimamente invasiva ditam a necessidade de medidas clinicamente eficazes para remineralizar lesões incipientes de cárie no esmalte (Philip, 2019). A remineralização natural é responsável pelo ganho mineral na camada superficial das whitespot. No entanto, este ganho apenas reflete uma pequena melhoria na estética e nas propriedades estruturais de lesões mais profundas (Sombir Singh et al., 2016). Torna-se necessário a aplicação de agentes remineralizantes para reparar as zonas mais profundas das whitespot.

#### I.2.6.1. FLÚOR

Na segunda metade do século XX ocorreu uma drástica descida da taxa de prevalência de cáries em países desenvolvidos. Este acontecimento é justificado pela utilização generalizada de produtos contendo flúor (Philip, 2019).

Atualmente, os agentes habitualmente usados para o tratamento das lesões incipientes de cárie baseiam-se na aplicação tópica de flúor, estando incluídas pastas, vernizes e colutórios fluoretados (Mishra et al., 2017; Sombir Singh et al., 2016). Estes sistemas fluoretados aprovacionam flúor às superfícies expostas da dentição para um efeito protetor local, possuindo alguns elevadas concentrações sendo por isso desaconselhada a sua ingestão (Mishra et al., 2017).

As pastas dentífricas são uma das mais amplamente aplicadas e eficazes formas de fornecimento de flúor solúvel ou livre (Esteves-Oliveira et al., 2017). O aspeto negativo da grande maioria dos produtos tópicos com flúor é o facto da eficácia depender da correta utilização por parte do paciente. Já os métodos tópicos de administração de flúor como o verniz, entre outros sistemas de remineralização realizados em consultório pelo profissional, proporcionam um controlo adequado e a sua eficácia não depende fortemente do paciente (Mishra et al., 2017; Sombir Singh et al., 2016). As formulações recentes de vernizes fluoretados incluem 5% de NaF (22600ppm) e contêm uma base colofónia que adere à superfície do dente na presença de saliva, auxiliando a retenção e biodisponibilidade do flúor na superfície dentária (Mishra et al., 2017; Shahmoradi et al., 2017). Isto deve-se conjuntamente à ligação estabelecida entre os iões de flúor do verniz e os iões de cálcio provenientes da saliva ou dos cristais de hidroxiapatite presentes na

estrutura dentária. Por conseguinte, ocorre a formação do precipitado fluoreto de cálcio,  $\text{CaF}_2$ , que atua como reservatório superficial do esmalte (Lussi & Carvalho, 2015; Shahmoradi et al., 2017; Sombir Singh et al., 2016). Quando o pH oral diminui devido à presença de ácido, ocorre a libertação gradual de iões flúor. Ao ser libertado, o flúor suprime a desmineralização do esmalte e reduz a suscetibilidade à doença cárie através de distintos mecanismos. Estes abrangem a incorporação deste ião na hidroxiapatite do esmalte através do preenchimento ou deslocamento do grupo hidroxilo, permitindo a estabilização da estrutura do cristal e diminuição da sua solubilidade (Lussi & Carvalho, 2015; Shahmoradi et al., 2017). Esta absorção do flúor conduz a uma conversão parcial da superfície do cristal (Lussi & Carvalho, 2015; Shen et al., 2018). Portanto, os iões de hidroxilo na hidroxiapatite pura  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  do esmalte são substituídos por iões de flúor, resultando num mineral designado de fluorapatite  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$  que é significativamente mais resistente a um subsequente ataque ácido (Mohd Said et al., 2017; Philip, 2019; Tao et al., 2018). Quanto maior a percentagem de flúor na estrutura cristalina, mais acentuado é o decréscimo do pH crítico do esmalte dentário, variando aproximadamente 0,5 a 1 unidades de pH (Esteves-Oliveira et al., 2017; Wierichs et al., 2017). No meio oral, a presença de iões livres de flúor pode conduzir à incorporação de cálcio e fosfato na rede cristalina, devido à elevada atração por estes iões absorvidos ou incorporados na superfície do esmalte (Philip, 2019; Shen et al., 2018; Tao et al., 2018). Outro benefício do flúor é o seu efeito negativo sobre o metabolismo das bactérias cariogénicas (Tao et al., 2018).

#### 1.2.6.2. CÁLCIO

Como mencionado anteriormente, uma grande concentração de cálcio, cerca de 36%, compõe a estrutura da hidroxiapatite (Lacruz et al., 2017; Nurbaeva et al., 2017). Assim como o fosfato e o flúor, o cálcio corresponde ao ião presente na saliva humana que apresenta maior eficácia na proteção contra a desmineralização do tecido dentário (Baumann et al., 2017). Para além dessa função, possui um papel ativo na remineralização do esmalte (Arifa et al., 2019). À semelhança dos tecidos duros dentários, os iões fosfato e cálcio são também responsáveis pela manutenção da saúde ao nível do tecido ósseo (Abou Neel et al., 2016).

Segundo Arifa et al. (2019), um dos requisitos de um material remineralizante ideal corresponde à libertação de cálcio e fosfato para a subsuperfície do esmalte. Como

exemplo, temos o sistema caseína fosfopeptídica-fosfato cálcio amorfo (CPP-ACP)(Naik et al., 2019; Tao et al., 2018).

### I.2.6.3. ZINCO

A matéria inorgânica do esmalte abrange essencialmente cristais de hidroxiapatite, cuja estrutura pode apresentar diferentes composições em virtude dos distintos elementos incorporados. Os componentes mais abundantes são o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ . Porém, existem vestígios de certos elementos como por exemplo o  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  que se encontram presentes em toda a espessura da estrutura do esmalte (Fatima et al., 2016).

O ião zinco possui um papel relevante na manutenção da saúde humana, particularmente no crescimento e desenvolvimento, detendo um papel crítico em diversas enzimas e proteínas. Este ião também influencia a atividade osteoclástica e intervém no processo de biomineralização (Fatima et al., 2016; Laskus & Kolmas, 2017; Richard J.M. Lynch, 2011; Matsunaga et al., 2010).

Considerado um elemento precioso para a manutenção da saúde oral, o zinco é encontrado em diversos locais como nos tecidos dentários duros, no cálculo dentário e na saliva (Fatima et al., 2016; Richard J.M. Lynch, 2011). A camada exterior do esmalte contém maior quantidade de zinco comparativamente às concentrações deste ião na subsuperfície, variando entre 430 e 2100 partes por milhão (ppm) dependendo da profundidade (Fatima et al., 2016; Rahman et al., 2019). Esta divergência entre camadas deve-se ao contacto entre os fluídos orais e a superfície dentária (Fatima et al., 2016). Portanto, o ião zinco acumula-se na superfície do esmalte porém a sua deposição é irregular (Rahman et al., 2019).

Após o processo de desmineralização, a rede cristalina da hidroxiapatite apresenta ausências de certos iões (Abdullah & John, 2016) que, por sua vez, promovem trocas iónicas entre os cristais de HA com a solução aquosa que se encontra em redor. A hidroxiapatite desmineralizada é deficiente em cálcio (Abou Neel et al., 2016; Arafa, 2017), tendo sucedido a migração deste ião para a saliva. A lacuna do cálcio da HA pode ser substituída por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Pb}^{2+}$  (Rahman et al., 2019). No que diz respeito ao ião  $\text{Zn}^{2+}$ , as concentrações ao nível salivar variam entre 0,135 ppm e 0,244 (Rahman et al., 2019), enquanto que no cálculo dentário as concentrações oscilam entre 6,41 e 32 ppm (Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020; Rahman et al., 2019). Na presença de

zinco na solução salivar, segue-se uma competição entre ambos os iões, cálcio e zinco, por locais de absorção comuns nos tecidos biológicos. Existindo esta relação, a remineralização do esmalte pode ser influenciada pelo ião zinco presente no fluido salivar (Rahman et al., 2019). Assim sendo, na presença de zinco, as lacunas de cálcio presentes na superfície do cristal de apatite podem ser preenchidas com a difusão do ião zinco (Fatima et al., 2016; Matsunaga et al., 2010; Rahman et al., 2019). Lynch & Duckworth (2020) concluíram que, relativamente à cárie dentária, para além de diminuir a percentagem de desmineralização, o zinco pode aumentar a remineralização. Os estudos de Fatima *et al* (2016) e Rahman *et al* (2017) mencionam o facto de o tratamento prévio da hidroxiapatite com zinco produzir uma maior resistência à dissolução acídica, idêntica à produzida por concentrações molares equivalentes de flúor (Fatima et al., 2016; Richard J.M. Lynch, 2011; Rahman et al., 2019). Existe, por parte do ião zinco, uma ação protetora contra a desmineralização e, de modo consequente, contra o desenvolvimento da cárie dentária (Fatima et al., 2016; Parkinson et al., 2018). Para além, em situação fisiológica de pH salivar, o ião zinco apresenta a capacidade de inibir 50% da produção de ácido formado por *streptococcus mutans*. Quando conjugado com flúor, é exibida uma ação bactericida (Fatima et al., 2016). Num estudo *in situ* foi demonstrado que a associação de zinco e flúor em pastas dentífricas reduz a taxa de desmineralização notavelmente e promove a remineralização, não sendo possível obter o mesmo resultado somente com o uso de flúor (Fatima et al., 2016; Richard J.M. Lynch, 2011). Nas pastas fluoretadas com zinco e aminoácidos, os aminoácidos básicos inibem a formação de fluoreto de zinco, aumentando a concentração deste ião no estado livre (Arifa et al., 2019). O ião zinco retarda a remineralização da lesão de cárie por parte do flúor, permitindo uma mineralização mais completa e profunda (Richard J.M. Lynch, 2011; Nasrine R. Mohammed et al., 2015). Segundo Lynch (2011) e Fatima et al. (2016), a combinação do zinco e do flúor é mais eficaz na redução da desordem da estrutura do cristal induzida pela presença de carbono na rede da HA.

Ademais, é descrito que a utilização de produtos contendo o ião zinco conduzem a uma melhoria da halitose, redução da colonização bacteriana e desenvolvimento de biofilme (Arifa et al., 2019; Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020; Parkinson et al., 2018). A diminuição deve-se à inibição da glicosiltransferase por parte do zinco, conduzindo à diminuição do aparecimento de tártaro dentário. Como resultado, este ião diminui a prevalência de problemas de saúde oral comuns como a gengivite e a periodontite (Fatima et al., 2016).

### **I.3.OBJETIVOS DE ESTUDO**

Pretende-se avaliar a microdureza de superfície do esmalte, pela incorporação do cátion zinco na hidroxiapatite.

### **I.4.HIPÓTESES DE ESTUDO**

Formulam-se as seguintes hipóteses de estudo:

H1: As amostras desmineralizadas, e as amostras desmineralizadas e tratadas com iões fluoreto e metais monovalentes não apresentam diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte;

H2: As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e iões de cálcio como único metal divalente presente apresentam valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas;

H3: As amostras desmineralizadas e tratadas com fluoreto e iões zinco como único metal divalente presente apresentam valores de microdureza de superfície de esmalte superiores aos das amostras desmineralizadas

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. DESENHO DE ESTUDO

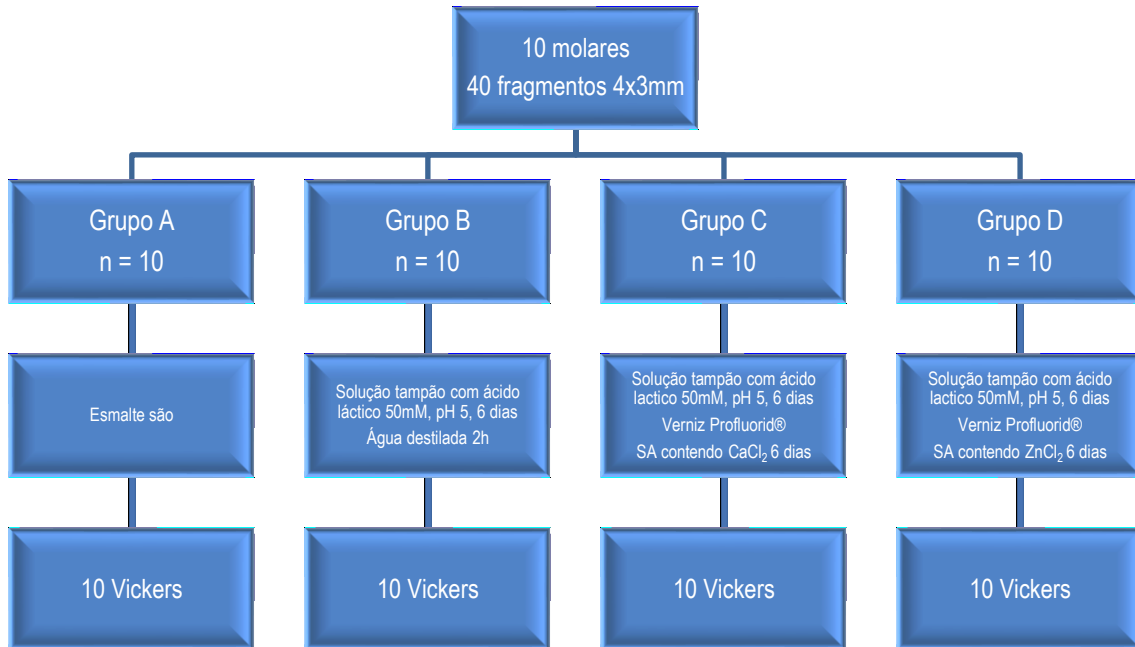


Figura 1 - Desenho de Estudo

### II.2. TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Aplicando uma metodologia de investigação quantitativa, foi realizado um estudo observacional em 10 molares humanos intactos, livres de cáries e de fraturas. A avaliação foi realizada segundo os critérios da OMS (Mendes et al., 2010). A partir dos dentes recolhidos, realizaram-se 40 fragmentos de esmalte 4x3mm que foram aleatoriamente distribuídos por 4 grupos de estudo: Grupo A (n=10), Grupo B (n=10), Grupo C (n=10) e Grupo D (n=10).

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

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

### **II.3. LOCAL DE ESTUDO**

O seguinte estudo observacional foi realizado no laboratório de materiais dentários do Instituto Universitário Egas Moniz no período entre julho e agosto.

### **II.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

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

### **II.5. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Após a seleção dos molares, os cálculos dentários e outros detritos orgânicos remanescentes foram removidos com o recurso a curetas periodontais gracey (Caneppele et al., 2012; Cassiano et al., 2017; Jo et al., 2014). Posteriormente, no Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária Egas Moniz, foram desinfetados e preservados em cloramina trihidratada a 1% até à execução dos cortes.

Após, os fragmentos foram polidos sob refrigeração constante na máquina polidora *LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca)* a 40 rotações por minuto (rpm) (figura 2) (Batista et al., 2016; Baumann et al., 2016; Caneppele et al., 2012; X. Wang et al., 2011). Executámos este polimento para a obtenção de uma superfície lisa e homogénea e, conseqüentemente, diminuir a probabilidade de divergência de resultados e melhorar a precisão das medições (Arafa, 2017; Ionta et al., 2019; Mohd Said et al., 2017)(Ionta et al., 2019). Este polimento tem também o propósito de remover a camada aprismática e densamente mineralizada do esmalte que se origina no final da amelogenese (Arafa, 2017; Elkassas & Arafa, 2014; Mohd Said et al., 2017). Apesar desta camada não ser frequentemente encontrada na superfície de dentes definitivos comparativamente aos

seus antecessores, é sabido que este esmalte aprismático é gradualmente desgasto durante a mastigação, mas em áreas protegidas é mantido (Elkassas & Arafa, 2014).



Figura 2 - Máquina de polimento LaboPol-4® usada no polimento dos espécimes

Seguiram-se as marcações da linha da junção amelocimentária, da linha localizada a 4 mm acima da mesma e três linhas verticais com 3 mm de distância. Em seguida, cada molar foi colado com cera a um suporte de acrílico para a concretização dos cortes com a utilização do micrómetro de tecidos duros (Naik et al., 2019) Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). Cada molar, inicialmente, foi seccionado longitudinalmente no sentido mesio-distal, resultando duas frações, uma vestibular e uma lingual/palatina (Abufarwa et al., 2018; Cassiano et al., 2017; Naik et al., 2019). Também cada porção foi segmentada no sentido vestibulo-lingual/palatino (Rizvi et al., 2016), resultando 4 fragmentos com 3 mm de largura. Por fim, foi realizado o corte ao nível da linha amelocimentária com o propósito de eliminar a porção radicular (figura 3) (Cassiano et al., 2017). No total, obtiveram-se 40 espécimes.

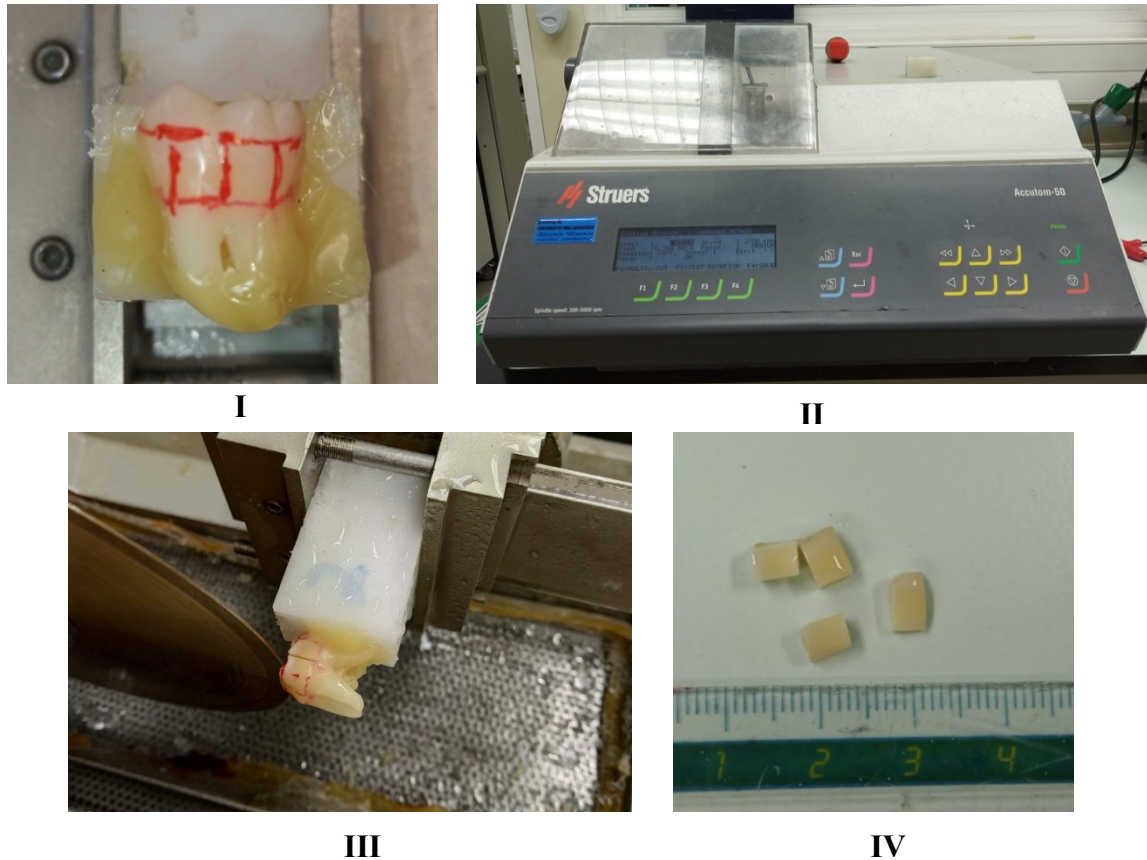


Figura 3 - Preparação dos espécimes. I: Linhas marcadas no dente molar para efetuar a sua secção | II: Micrómetro de tecidos duros Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup) | III: Corte da coroa do dente no sentido mesio-distal | IV: fragmentos obtidos após o corte com

## II.6. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

Após o polimento e corte dos 10 molares seleccionados, obtivemos 40 fragmentos de 4x3mm que foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos de estudo, assinalados de A e D.

Grupo A (n=10) – fragmentos de esmalte são (grupo controlo – esmalte são)

Grupo B (n=10) – indução de lesão de cárie + água desionizada (grupo controlo negativo) – imersão em solução tampão de ácido láctico 50 miliMolar (mM) a pH 5 durante 6 dias seguido de imersão durante 2 horas em água desionizada a 37°C.

Grupo C (n=10) – indução de lesão de cárie + aplicação de verniz Profluorid® + saliva artificial contendo cloreto de cálcio – imersão em solução tampão de ácido láctico

50 mM a pH 5 durante 6 dias. Posteriormente, procedeu-se à aplicação do verniz fluoreto de sódio 5% (figura 4) (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote 2003747, validade: 01/2022), segundo as instruções do fabricante, seguido de imersão em saliva artificial contendo cloreto de cálcio durante 6 dias a 37°C com renovação diária (figura 1).



Figura 4 - Soluções. I: Verniz de floureto de sódio 5% utilizado neste trabalho (Profluorid® Varnish, VOCO) | II: Imagem do modo de aplicação do verniz de flúor na face vestibular/lingual dos espécimes

Grupo D (n=10) – indução de lesão de cárie + aplicação de verniz Profluorid + saliva artificial contendo cloreto de zinco + água desionizada – imersão em solução tampão de ácido láctico 50 mM a pH 5 durante 6 dias. Posteriormente, procedeu-se à aplicação do verniz fluoreto de sódio 5% segundo as instruções do fabricante, seguido de imersão em saliva artificial contendo cloreto de zinco durante 6 dias a 37°C com renovação diária.

## **II.7. DESMINERALIZAÇÃO DA AMOSTRA**

### **II.7.1. INDUÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAS DE CÁRIE DENTÁRIA**

As lesões artificiais de cárie foram induzidas pela imersão dos 40 fragmentos em 30 ml de solução tampão de ácido láctico 50 mM, pH 5, durante 6 dias a 37°C (figura 5) (Abufarwa et al., 2018; Cardoso et al., 2014; Jo et al., 2014).

Os alguns dos fatores que contribuíram para a seleção da exposição ácida foram os seguintes: o *streptococcus mutans* é considerado o microrganismo mais cariogénico e prevalente no biofilme oral devido ao facto de produzir elevados níveis de ácido láctico resultantes da metabolização de hidratos de carbono (Abou Neel et al., 2016; Al Harbi et al., 2020; Orrego et al., 2017). Aliás, esta bactéria notabiliza-se por conter uma proteína responsável pela aderência à superfície dentária que tolera níveis de pH entre 4,5 e 5. Deste modo, foi considerado relevante clinicamente o uso da solução de ácido láctico de pH 5, tendo em conta o facto de ter sido utilizado em investigações precedentes (Orrego et al., 2017).



Figura 5 - Soluções utilizadas neste trabalho. I: Solução mãe de saliva artificial 1,25x concentrada sem catiões com pH 7 | II: Solução de ácido láctico 50 mM com pH 5

## II.8. SOLUÇÕES REMINERALIZANTES

### II.8.1. SALIVA ARTIFICIAL COM CaCl<sub>2</sub>

Com o objetivo de verificar o efeito na microdureza de superfície de esmalte da incorporação de ião zinco na hidroxiapatite, preparou-se soluções onde varia a presença ou não deste oligoelemento, sendo utilizadas soluções com o ião cálcio para o controlo

positivo. Para a aplicação no grupo C, realizou-se uma solução mãe de saliva artificial 1.25x concentrada e, a 24 ml desta, realizou-se a diluição com o recurso a 6 ml de solução aquosa  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5x concentrada mantendo a  $37^\circ\text{C}$ . A solução final continha  $64,08 \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (sulfito de sódio nano-hidratado),  $6,84 \text{ mM}$   $\text{NaCl}_2$  (cloreto de cálcio),  $5,36 \text{ mM}$   $\text{KCl}$  (cloreto de potássio),  $2,112 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado),  $16,65 \text{ mM}$  Ureia,  $2,88 \text{ mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (hidrogenofosfato de sódio di-hidratado) e  $5,4 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ . (Cardoso et al., 2016; Urban et al., 2009)

## II.8.2. SOLUÇÃO DE SALIVA ARTIFICIAL COM $\text{ZnCl}_2$

A solução de saliva artificial possuindo o metal divalente zinco foi utilizada no grupo D. Esta solução foi preparada com 24 ml da solução mãe e 6 ml de cloreto de zinco anidro a 98% a uma temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$ . A solução final contém  $64,08 \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (sulfito de sódio nano-hidratado),  $6,84 \text{ mM}$   $\text{NaCl}_2$  (cloreto de cálcio),  $5,36 \text{ mM}$   $\text{KCl}$  (cloreto de potássio),  $2,112 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado),  $16,65 \text{ mM}$  Ureia,  $2,88 \text{ mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (hidrogenofosfato de sódio di-hidratado) e  $5,4 \text{ mM}$   $\text{ZnCl}_2$  (Cardoso et al., 2016; Urban et al., 2009).

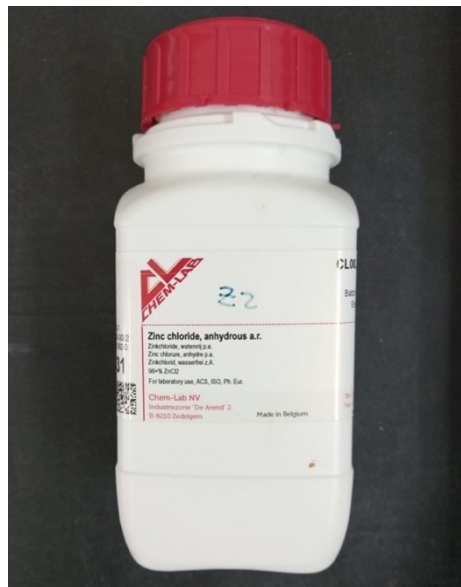


Figura 6 - Cloreto de zinco anidro (98%) utilizado na preparação da solução de saliva artificial contendo  $\text{Zn}^{2+}$  do grupo D; Fornecedor Chem-Lab NV

## II.9. ANÁLISE DE MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

A microdureza superficial foi medida recorrendo ao teste de Vickers (HSV-30®, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão), posicionando a superfície da amostra perpendicularmente ao longo eixo do indentador de diamante Vickers (Arafa, 2017). Este exerce uma pressão de 50mN durante 15s (Baumann et al., 2017). Foram realizadas 5 indentações em cada espécimen e considerado o valor médio (pentaplicados) na análise estatística dos resultados de cada grupo (Caneppele et al., 2012; Cassiano et al., 2017). De forma a minimizar quaisquer erros de medição, as indentações foram realizadas pelo mesmo examinador e com prévia calibração da máquina (Arafa, 2017; Mohd Said et al., 2017).

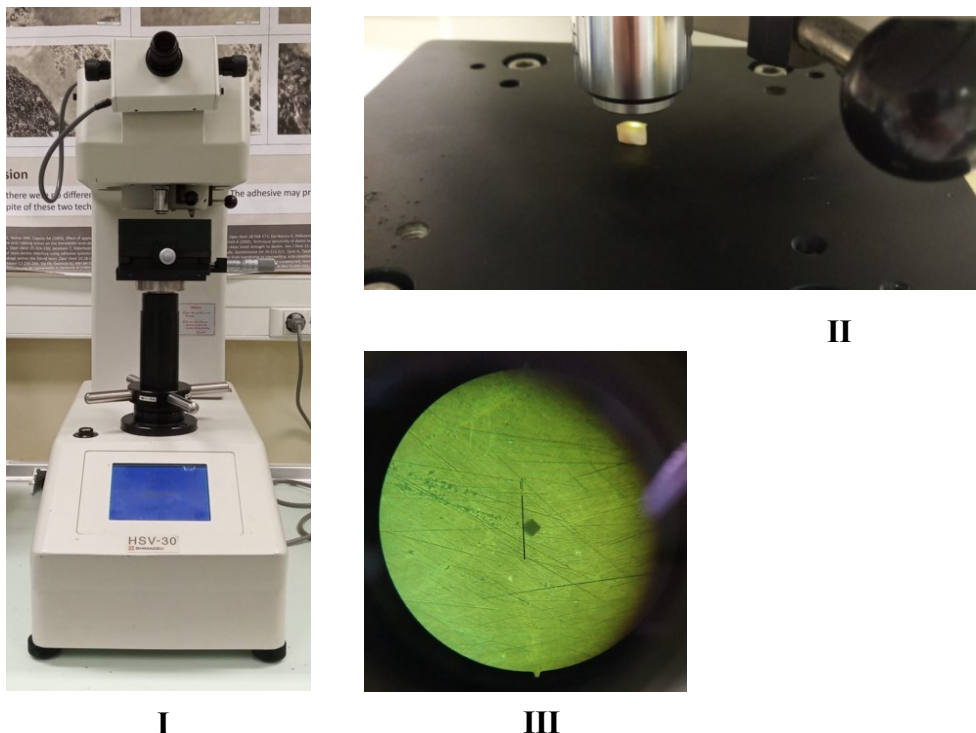


Figura 7 - Análise da microdureza de superfície de Vickers. I: Equipamento HSV-30®, Shimadzu Corporation | II: Observação da indentação | III: Indentação com forma tetrapiramidal

### III. RESULTADOS

Após o procedimento experimental descrito previamente, procedeu-se à análise de cada fragmento recorrendo ao teste de microdureza de Vickers, obtendo resultados em dureza Vickers (HV). Foram executadas 5 indentações com o propósito de alcançar a média de microdureza de cada espécime, sendo assim possível minimizar erros associados a imperfeições de superfície. De forma a examinar a semelhança dos valores obtidos, os 4 grupos, compostos por 10 fragmentos cada, foram analisados por aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator (intervalo de confiança 95%) (software SPSS).

Os resultados da análise descritiva dos valores médios dos 4 grupos de estudo, assinalados de A a D, encontra-se presente na Tabela 1:

Tabela 1 - Valores obtidos na análise descritiva de cada grupo de estudo

Grupos	N	Média	Desvio Padrão	95% Intervalo de confiança de média	
				Limite Inferior	Limite Superior
A	10	518,620	4,4726	515,421	521,819
B	10	320,200	5,7240	316,105	324,295
C	10	500,120	4,1986	497,116	503,124
D	10	409,920	4,6878	406,567	413,273

O grupo de esmalte são, identificado como grupo A, demonstrou um valor de dureza  $518,620 \pm 4,4726$ .

O grupo B, correspondente ao grupo sujeito apenas à desmineralização com solução de ácido láctico, apresentou valores de dureza de  $320,200 \pm 5,7240$ .

O grupo C, correspondente ao grupo submetido à desmineralização, seguido da aplicação de verniz de fluoreto de sódio 5% e posterior imersão em saliva artificial com cloreto de cálcio, obteve uma dureza de  $500,120 \pm 4,1986$ .

Por fim, o grupo D, que corresponde ao grupo sujeito à desmineralização com ácido láctico, seguido da aplicação de verniz de fluoreto de sódio 5% e posterior imersão

em saliva artificial com cloreto de zinco, demonstrou uma dureza média de  $409,920 \pm 4,6878$ .

De modo a demonstrar as diferenças entre as médias dos 4 grupos de estudo, realizou-se um gráfico comparativo que se encontra exposto na figura 7.

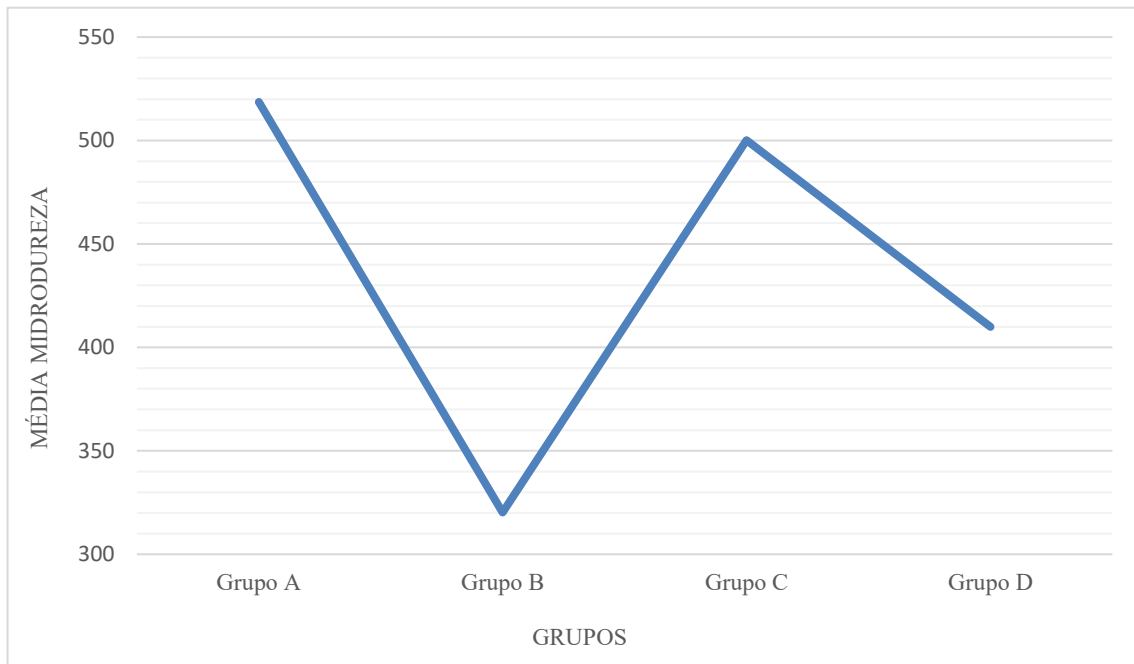


Figura 8 - Gráfico comparativo das médias de dureza de superfície dos diferentes grupos

A aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator depende de requisitos como a independência e normalidade das amostras assim como a homogeneidade das variâncias. A realização de 40 fragmentos e a sua distribuição aleatória pelos diferentes grupos de estudo garantiu a independência da amostra. Devido à pequena dimensão de cada grupo, recorreu-se à aplicação do teste de Shapiro-Wilk para a determinação da normalidade da amostra. Para um nível de confiança definido por 95%, os resultados demonstraram que todos os grupos são normais com valores de significância superior a 0,05 ( $p > 0,05$ ) como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos com a aplicação do teste de normalidade Shapiro-Wilk

	Grupos	Shapiro - Wilk		
		Estatística	N	Significância
Microdureza	A	0,909	10	0,271
	B	0,956	10	0,735
	C	0,936	10	0,510
	D	0,925	10	0,401

Por fim, para o emprego do teste paramétrico ANOVA, é necessário verificar a homogeneidade das variâncias dos diferentes grupos. Para tal, recorreu-se ao teste de Levene alcançando os resultados expostos na Tabela 3. Uma vez que a significância obtida é superior a 0,05 ( $p > 0,05$ ), concluímos que as variâncias das amostras são homogêneas.

Tabela 3 - Resultados obtidos com a aplicação do teste de homogeneidade de variâncias de Levene ( $gl1 = n^\circ$  de grupos-1;  $gl2 = n^\circ$  de espécimes- $n^\circ$  de grupos)

Estatística de Levene	gl1	gl2	Significância
0,178	3	36	0,911

Após garantidos os pressupostos, aplicou-se o teste ANOVA a um fator para analisar se as médias dos grupos diferem significativamente entre si. Foram estabelecidas as seguintes hipóteses:

$H_0$ : as médias dos grupos não diferem estatisticamente

$H_A$ : as médias dos grupos diferem estatisticamente

Tabela 4 – Resultados obtidos pela aplicação do teste ANOVA a um fator (one-way ANOVA)

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Significância
Entre grupos	250213,403	3	83404,468	3611,677	0,001
Nos grupos	831,348	36	23,093		
total	251044,751	39			

De acordo com a Tabela 4, adquirida pela realização do teste ANOVA a um fator, obteve-se o valor de estatística F de 3611,677 e um valor de significância de 0,001 ( $F(3,36)=83404,468, p<0,001$ ). Tendo em conta o valor  $p$  obtido, rejeitou-se a hipótese nula mencionada anteriormente, aceitando  $H_A$ . Conclui-se que existem diferenças significativas na microdureza entre todos os grupos A-D.

Seguidamente, realizou-se uma análise mais rigorosa dos grupos de estudo de pequenas dimensões recorrendo ao teste de Bonferroni.

Tabela 5 - Resultados obtidos pela aplicação do teste Bonferroni (teste *post-hoc*)

	Grupos	Significância (p-value)
Grupo A	Grupo B	0,000
	Grupo C	0,000
	Grupo D	0,000
Grupo B	Grupo A	0,000
	Grupo C	0,000
	Grupo D	0,000
Grupo C	Grupo A	0,000
	Grupo B	0,000
	Grupo D	0,000
Grupo D	Grupo A	0,000
	Grupo B	0,000
	Grupo C	0,000

Este teste de comparação múltipla de médias averiguou a existência ou inexistência de diferenças significativas entre os valores médios dos pares de grupos presentes neste procedimento experimental. Considerando um intervalo de confiança de 95%, o resultado do teste *post-hoc* foi um valor de  $p$  inferior a 0,05 para todos os grupos (tabela 5), indicando que existem diferenças significativas para todos os pares de grupos.

Atendendo aos valores da análise descritiva, concluímos que o maior valor de dureza de superfície foi obtido no grupo A (esmalte são), seguido do grupo C (saliva artificial com cloreto de cálcio), pelo grupo D (saliva artificial com cloreto de zinco) e, por fim, pelo grupo B (somente desmineralizado).



## IV. DISCUSSÃO

A integridade do esmalte dentário na cavidade oral é influenciada pelo processo dinâmico que abrange períodos intercalados de desmineralização e de remineralização (Al Harbi et al., 2020; Arifa et al., 2019; Naik et al., 2019; Sombir Singh et al., 2016; Veiga et al., 2016). Quando os períodos de desmineralização são predominantes, ocorre uma redução do conteúdo mineral e surge uma lesão cariosa (Arifa et al., 2019; Pitts et al., 2017). Numa fase inicial, a lesão de cárie poderá ser revertida através de agentes remineralizantes (Peres et al., 2019).

A remineralização corresponde ao procedimento de reparação onde os íons cálcio e fosfato são depositados nas áreas desmineralizadas da estrutura dentária (Arifa et al., 2019; PHilip, 2019). A presença de certos íons no meio, como por exemplo o flúor, auxilia o processo de remineralização de lesões de cárie incipientes (Mohd Said et al., 2017; Rahman et al., 2019). A avaliação de alterações de conteúdo mineral causadas por processos de desmineralização e remineralização do esmalte dentário pode ser realizada recorrendo à análise de microdureza de superfície (Arafa, 2017).

Neste estudo, o objetivo correspondia à avaliação da capacidade remineralizante do íon zinco. Para tal, após a desmineralização artificial dos espécimes com ácido láctico, realizou-se a análise quantitativa de microdureza da superfície através da técnica de Vickers. Os valores de dureza do grupo A, correspondente ao esmalte são, apresenta uma dureza média de  $518,620 \pm 4,4726$  HV, corroborante com outros estudos publicados (Baumann et al., 2016, 2017). Os fragmentos de esmalte do grupo B foram somente expostos à desmineralização artificial, sendo por isso considerados grupo controlo negativo do presente estudo. Como expectável, a microdureza de superfície deste grupo alcançou os valores mais baixos de toda a investigação devido à perda de densidade mineral (Mohd Said et al., 2017). Os resultados do grupo B foram  $320,200 \pm 5,7240$  HV. A comparação entre os valores de microdureza médios do grupo A e B sugere ter ocorrido desmineralização e consequente diminuição de microdureza de superfície.

Após a indução da desmineralização com ácido láctico, foi aplicado verniz de fluoreto de sódio a 5% (Profluorid® Varnish) nas amostras dos grupos C e D. A utilização deste verniz aprovisiona o esmalte dentário de flúor, conduzindo à modificação do cristal de hidroxiapatite para fluorapatite. Neste trabalho recorreremos à fluorapatite de forma a eliminar a dependência da disponibilidade de íons hidroxilo livres observada na

hidroxiapatite, não existindo necessidade de manipular o pH. A escolha desta metodologia baseou-se também no seu êxito em diversos trabalhos anteriores (Abufarwa et al., 2018; Molaasadolah, 2017; Shahmoradi et al., 2017).

A permuta de iões hidroxilo por iões fluoreto reduz a solubilidade do cristal e aumenta a resistência a um subsequente ataque ácido (Arifa et al., 2019; Philip, 2019). Como mencionado anteriormente, a presença de flúor promove igualmente a incorporação dos iões de cálcio e fosfato na estrutura cristalina, aumentando o crescimento de novos cristais de fluorapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ] (Arifa et al., 2019). Todavia, a formação deste cristal requer a existência de iões cálcio ou de outros metais divalentes para os substituir.

Seguidamente à aplicação de verniz de flúor, o grupo C foi imerso em saliva artificial, a pH 7, contendo iões cálcio de modo a simular o ambiente natural presente na cavidade oral. Este grupo apresentou  $500,120 \pm 4,1986$  HV, o segundo valor mais elevado de todo o estudo, comprovando a hipótese 2 (página 33). Este facto expressa-se pela presença de cálcio, fosfato e flúor, componentes essenciais no processo de remineralização dentária (Naik et al., 2019; Shen et al., 2018). Segundo Ionta et al. (2019), o uso de produtos de higiene oral que contêm cálcio aumenta a retenção e biodisponibilidade do fluoreto na cavidade oral. Por sua vez, este acontecimento ocorre devido à formação do precipitado fluoreto de cálcio nas camadas superficiais do esmalte (Sombir Singh et al., 2016). O aumento de microdureza de superfície pode ser explicado pela incorporação deste precipitado nos locais afetados pela exposição ao ácido láctico, ocorrendo a formação de fluorapatite (Shahmoradi et al., 2017).

O grupo D, exposto a saliva artificial contendo zinco em vez de cálcio, obteve um valor de microdureza de superfície de  $409,920 \pm 4,6878$  HV. Realizando a comparação entre o grupo B (amostras desmineralizadas) e D, observamos um valor superior de microdureza associado ao grupo D, sugerindo que existiu também remineralização neste grupo – confirmação da hipótese 3 (página 33). O ião zinco é um oligoelemento fundamental para o corpo humano, sendo responsável pelo seu crescimento e desenvolvimento (Fatima et al., 2016; Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020). Este ião é essencial para o normal funcionamento de inúmeras proteínas e enzimas, influencia ação osteoclástica e a biomineralização (Fatima et al., 2016; Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020; Rahman et al., 2019). Lynch (2011) e Rahman et al (2019) mencionam nas suas publicações que ocorre uma competição entre o ião zinco e o cálcio por locais comuns de captação. Por sua vez, esta competição indica uma forte possibilidade do zinco

influenciar a remineralização do esmalte dentário, estrutura onde o cálcio é o componente mais abundante (Fatima et al., 2016; Lacruz et al., 2017; Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020; Nasrine R. Mohammed et al., 2015; Nurbaeva et al., 2017; M. U. Pathak et al., 2016; Rahman et al., 2019). Na presença de esmalte desmineralizado, pode ocorrer o preenchimento das lacunas de cálcio na rede da hidroxiapatite pelo zinco, o que se traduz numa remineralização do tecido duro dentário (Matsunaga et al., 2010; Rahman et al., 2019). Quando ocorre a conjugação de flúor e zinco, estes iões atuam de forma sinérgica quer na desmineralização como na remineralização (Lippert, 2012; R.J.M. Lynch et al., 2011; Richard J.M. Lynch, 2011; Richard J.M. Lynch & Duckworth, 2020; N.R. Mohammed et al., 2014).



## **V. CONCLUSÃO**

No presente estudo, dois grupos foram sujeitos a soluções de saliva artificial após a sua desmineralização. Ambos os grupos, nomeadamente C e D, obtiveram resultados superiores aos alcançados pelo grupo que sofreu somente desmineralização (grupo B). Esta divergência é compatível com a remineralização dos grupos em questão. No entanto, nenhum grupo alcançou os valores obtidos no grupo de esmalte são (grupo A).

Quanto à hipótese 1, recorreu-se ao teste ANOVA que demonstrou diferenças significativas nos valores médios de microdureza de superfície do esmalte entre os diversos grupos presentes no estudo, ou seja, esta hipótese não se verificou. As restantes hipóteses foram comprovadas.

Neste estudo, pretendia-se avaliar a microdureza de superfície do esmalte, pela incorporação do catião zinco na hidroxiapatite.

Amplamente estudada, a formação de fluorapatite com cálcio traduz-se num aumento da microdureza de superfície do esmalte. Não obstante, o zinco também demonstrou provas sugestivas de aumento de dureza. Contudo, estão ausentes estudos conclusivos que exibam a incorporação deste ião na estrutura cristalina. São necessárias mais investigações nesta área de forma a esclarecer o papel do zinco na remineralização dentária, se o há, e, caso possua, como atua e qual a sua eficácia neste processo.



## VI. 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>

Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization&ndash;remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>

Abufarwa, M., Noureldin, A., Campbell, P. M., & Buschang, P. H. (2018). Comparative study of two chemical protocols for creating white spot lesions: an in vitro fluorecam evaluation. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(1), 376–380. <https://doi.org/10.1111/jicd.12274>

Al Harbi, T. A., El Meligy, O. A. E. S., Al Harbi, S. D., & Al Malik, M. (2020). Effectiveness of topical fluoride on dental caries: a literature review. *Ecronicon Ec Microbiology Ec Microbiology*, 3, 1–9.

Arafa, A. (2017). Synergetic remineralization effectiveness of calcium, phosphate and fluoride based systems in primary teeth. *Pediatric Dental Journal*, 27(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.pdj.2016.12.003>

Arifa, M. K., Ephraim, R., & Rajamani, T. (2019). Recent advances in dental hard tissue remineralization: a review of literature. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 12(2), 139–144. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603>

Batista, G. R., Torres, C. R. G., Sener, B., Attin, T., & Wiegand, A. (2016). Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. *Caries Research*, 50(1), 78–86. <https://doi.org/10.1159/000443188>

Baumann, T., Bereiter, R., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2017). The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Scientific Reports*, 7(1), 12999. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13367-3>

Baumann, T., Kozik, J., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2016). Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Scientific Reports*, 6(1), 34760. <https://doi.org/10.1038/srep34760>

Beniash, E., Stifler, C. A., Sun, C.-Y., Jung, G. S., Qin, Z., Buehler, M. J., & Gilbert, P. U. P. A. (2019). The hidden structure of human enamel. *Nature Communications*, *10*(1), 4383. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12185-7>

Bilbilova, E. Z., Ivkowska, A. S., Georgiev, Z., & Stefanovska, E. (2013). Evaluation of buffer capa city of saliva in caries-free and caries-active children.

Björklund, M., Ouwehand, A. C., & Forssten, S. D. (2011). Improved artificial saliva for studying the cariogenic effect of carbohydrates. *Current Microbiology*, *63*(1), 46–49. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9937-x>

Caneppele, T. M. F., Jeronymo, R. D. I., Di Nicoló, R., Araújo, M. A. M. de, & Soares, L. E. S. (2012). In vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: surface profile analysis and energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry study. *Brazilian Dental Journal*, *23*(4), 373–378. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402012000400011>

Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., Caldana, M. L., Bastos, J. R. M., & Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, *50*, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>

Cardoso, C. A. B., De Castilho, A. R. F., Salomão, P. M. A., Costa, E. N., Magalhães, A. C., & Buzalaf, M. A. R. (2014). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, *42*(11), 1495–1501. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.08.009>

Cassiano, L., Pessan, J., Comar, L., Levy, F., Cardoso, C., Dionisio, A., Manarelli, M., Grizzo, L., Magalhães, A. C., & Buzalaf, M. (2017). Frequency of intake and amount of fluoride in milk for remineralisation of artificial caries on enamel and dentine: Ex vivo/in situ study. *Archives of Oral Biology*, *73*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.005>

Colombo, M., Mirando, M., Rattalino, D., Beltrami, R., Chiesa, M., & Poggio, C. (2017). Remineralizing effect of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion caused by soft drinks: Ultrastructural analysis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *9*(7), e861–e868. <https://doi.org/10.4317/jced.53790>

Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & 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>

Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>

Esteves-Oliveira, M., Santos, N. M., Meyer-Lueckel, H., Wierichs, R. J., & Rodrigues, J. A. (2017). Caries-preventive effect of anti-erosive and nano-hydroxyapatite-containing toothpastes in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 21(1), 291–300. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1789-0>

Fatima, T., Rahim, Z. B. H. A., Lin, C. W., & Qamar, Z. (2016). Zinc: a precious trace element for oral health care? *Journal of the Pakistan Medical Association*, 66(8), 1019–1023.

Hof, W. V., Veerman, E. C. I., Amerongen, A. V. N., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science*, 24, 40–51. <https://doi.org/10.1159/000358783>

Ionta, F. Q., dos Santos, N. M., Mesquita, I. M., Dionísio, E. J., Cruvinel, T., Honório, H. M., & Rios, D. (2019). Is the dentifrice containing calcium silicate, sodium phosphate, and fluoride able to protect enamel against chemical mechanical wear? An in situ/ex vivo study. *Clinical Oral Investigations*, 23(10), 3713–3720. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2792-4>

Jo, S.-Y., Chong, H.-J., Lee, E.-H., Chang, N.-Y., Chae, J.-M., Cho, J.-H., Kim, S.-C., & Kang, K.-H. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *The Korean Journal of Orthodontics*, 44(3), 113. <https://doi.org/10.4041/kjod.2014.44.3.113>

Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>

Laskus, A., & Kolmas, J. (2017). Ionic substitutions in non-apatitic calcium phosphates. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2542. <https://doi.org/10.3390/ijms18122542>

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)

Lippert, F. (2012). Dose-response effects of zinc and fluoride on caries lesion remineralization. *Caries Research*, 46(1), 62–68. <https://doi.org/10.1159/000335573>

Llena, C., Leyda, A. M., & Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP versus fluoride varnish in remineralisation of early caries lesions. A prospective study. *European Journal of Paediatric Dentistry : Official Journal of European Academy 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>

Lynch, R.J.M., Churchley, D., Butler, A., Kearns, S., Thomas, G. V., Badrock, T. C., Cooper, L., & Higham, S. M. (2011). Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious lesions under simulated plaque fluid conditions. *Caries Research*, 45(3), 313–322. <https://doi.org/10.1159/000324804>

Lynch, Richard J.M. (2011). Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature. *International Dental Journal*, 61(SUPPL. 3), 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00049.x>

Lynch, Richard J.M., & Duckworth, R. M. (2020). Chapter 4: microelements: part i: zn, sn, cu, fe and i. In *Monographs in Oral Science* (Vol. 28, pp. 32–47). <https://doi.org/10.1159/000499007>

Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>

Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., & Cenci, M. S. (2017). In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*, 33(8), 661–675. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>

Matsunaga, K., Murata, H., Mizoguchi, T., & Atsushi Nakahira. (2010). Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 6(6), 2289–2293. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.029>

Mendes, F. M., Braga, M. M., Oliveira, L. B., Antunes, J. L. F., Ardenghi, T. M., & Bönecker, M. (2010). Discriminant validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and comparability with World Health Organization criteria in a cross-sectional study. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 38(5), 398–407. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2010.00557.x>

- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2016). When and how to intervene in the caries process. *Operative Dentistry*, 41(S7), S35–S47. <https://doi.org/10.2341/15-022-O>
- Mishra, P., Fareed, N., Battur, H., Khanagar, S., Bhat, M. A., & Palaniswamy, J. (2017). Role of fluoride varnish in preventing early childhood caries: a systematic review. In *Dental Research Journal* (Vol. 14, Issue 3, pp. 169–176). <https://doi.org/10.4103/1735-3327.208766>
- Mohammed, N.R., Mneimne, M., Hill, R. G., Al-Jawad, M., Lynch, R. J. M., & Anderson, P. (2014). Physical chemical effects of zinc on in vitro enamel demineralization. *Journal of Dentistry*, 42(9), 1096–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.014>
- Mohammed, Nasrine R., Lynch, R. J. M., & Anderson, P. (2015). Inhibitory effects of zinc ions on enamel demineralisation kinetics in vitro. *Caries Research*, 49(6), 600–605. <https://doi.org/10.1159/000441014>
- Mohd Said, S. N. B., Ekambaram, M., & Yiu, C. K. Y. (2017). Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 27(3), 163–173. <https://doi.org/10.1111/ipd.12243>
- Molaasadolah, F. (2017). In vitro evaluation of enamel microhardness after application of two types of fluoride varnish. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*, 11(8), ZC64–ZC66. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/30121.10412>
- Naik, S. V, Attiguppe, P., Malik, N., & Ballal, S. (2019). CPP–ACP and Fluoride: A synergism to combat caries. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 12(2), 120–125. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1608>
- Nurbaeva, M. K., Eckstein, M., Feske, S., & Lacruz, R. S. (2017). Ca<sup>2+</sup> transport and signalling in enamel cells. *Journal of Physiology*, 595(10), 3015–3039. <https://doi.org/10.1113/JP272775>
- Orrego, S., Xu, H., & Arola, D. (2017). Degradation in the fatigue crack growth resistance of human dentin by lactic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 73, 716–725. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.065>
- Parkinson, C. R., Burnett, G. R., Creeth, J. E., Lynch, R. J. M., Budhawant, C., Lippert, F., Hara, A. T., & Zero, D. T. (2018). Effect of phytate and zinc ions on fluoride toothpaste efficacy using an in situ caries model. *Journal of Dentistry*, 73, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.013>

Pathak, M. U., Shetty, V., & Kalra, D. (2016). Trace elements and oral health: a systematic review. *Journal of Advanced Oral Research*, 7(2), 12–20. <https://doi.org/10.1177/2229411220160203>

Pathak, S., Roopa, K., Poornima, P., & Neena, I. (2015). White spot lesions: A literature review. *Journal of Pediatric Dentistry*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2321-6646.151839>

Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(9), 730–746. <https://doi.org/10.1111/joor.12664>

Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)

Philip, N. (2019). State of the art enamel remineralization systems: the next frontier in caries management. *Caries Research*, 53(3), 284–295. <https://doi.org/10.1159/000493031>

Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>

Rahman, M. T., Hossain, A., Pin, C. H., & Yahya, N. A. (2019). Zinc and metallothionein in the development and progression of dental caries. *Biological Trace Element Research*, 187(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1369-z>

Rizvi, A., Zafar, M. S., Al-Wasifi, Y., Fareed, W., & Khurshid, Z. (2016). Role of enamel demineralization and remineralization on microtensile bond strength of resin composite. *European Journal of Dentistry*, 10(03), 376–380. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.184167>

Shahmoradi, M., Bertassoni, L. E., Elfallah, H. M., & Swain, M. (2014). Advances in Calcium Phosphate Biomaterials. In B. Ben-Nissan (Ed.), *Livro* (Vol. 2, Issue June 2016, pp. 0–39). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0>

Shahmoradi, M., Hunter, N., & Swain, M. (2017). Efficacy of fluoride varnishes with added calcium phosphate in the protection of the structural and mechanical

properties of enamel. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/7834905>

Shen, P., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., Stanton, D. P., Fernando, J. R., & Reynolds, E. C. (2018). Importance of bioavailable calcium in fluoride dentifrices for enamel remineralization. *Journal of Dentistry*, 78(June), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.005>

Singh, Shikha, Sharma, A., Sood, P. B., Sood, A., Zaidi, I., & Sinha, A. (2015). Saliva as a prediction tool for dental caries: an in vivo study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(2), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.05.001>

Singh, Sombir, 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>

Skucha-Nowak, M., Gibas, M., Tanasiewicz, M., Twardawa, H., & Szklarski, T. (2015). Natural and controlled demineralization for study purposes in minimally invasive dentistry. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(5), 891–898. <https://doi.org/10.17219/acem/28903>

Tahir, L., & Nazir, R. (2018). Dental caries, etiology, and remedy through natural resources. In *Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75937>

Tao, S., Zhu, Y., Yuan, H., Tao, S., Cheng, Y., Li, J., & He, L. (2018). Efficacy of fluorides and CPP-ACP vs fluorides monotherapy on early caries lesions: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 13(4), e0196660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196660>

Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>

Valente, M. T., Moffa, E. B., Crosara, K. T. B., Xiao, Y., De Oliveira, T. M., Machado, M. A. de A. M., & Siqueira, W. L. (2018). Acquired enamel pellicle engineered peptides: effects on hydroxyapatite crystal growth. *Scientific Reports*, 8(1), 3766. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21854-4>

Veiga, N., Aires, D., Pereira, M., Vaz, A., Rama, L., Silva, M., Pereira, F., Vidal, B., Plaza, J., & Bexiga, F. (2016). *Dental caries : a review*. 2(5), 2–4.

Wang, X., Mihailova, B., Klocke, A., Heidrich, S., & Bismayer, U. (2011). Effect of artificial saliva on the apatite structure of eroded enamel. *International Journal of Spectroscopy*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/236496>

Wang, Y. L., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Lin, C. H., & Lin, C. P. (2019). Strontium ion can significantly decrease enamel demineralization and prevent the enamel surface hardness loss in acidic environment. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(1P1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.01.001>

Warreth, A., Abuhijleh, E., Almaghribi, M. A., Mahwal, G., & Ashawish, A. (2019). Tooth surface loss: a review of literature. *The Saudi Dental Journal*, 32(2), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.09.004>

West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42, S2–S11. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4)

WHO. (2017). Sugars and dental caries. *Journal of Public Health Dentistry*, 4(1), 7–7. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.1944.tb00729.x>

Wierichs, R. J., Zelck, H., Doerfer, C. E., Appel, P., Paris, S., Esteves-Oliveira, M., & Meyer-Lueckel, H. (2017). Effects of dentifrices differing in fluoride compounds on artificial enamel caries lesions in vitro. *Odontology*, 105(1), 36–45. <https://doi.org/10.1007/s10266-016-0233-x>

Yadav, K., & Prakash, S. (2016). A review of dental caries. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, August, 73–80. <https://doi.org/10.15272/ajbps.v6i53.773>

Young, D. A., Nový, B. B., Zeller, G. G., Hale, R., Hart, T. C., Truelove, E. L., Ekstrand, K. R., Featherstone, J. D. B., Fontana, M., Ismail, A., Kuehne, J., Longbottom, C., Pitts, N., Sarrett, D. C., Wright, T., Mark, A. M., Beltran-Aguilar, E., & Tran, C. (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>

Zaharia, A., Plescan, V. G., Atkinson, I., Mocioiu, O. C., Cantaragiu, A., & Musat, V. (2017). Remineralization of natural tooth enamel in artificial saliva environment. *Revista de Chimie*, 68(3), 510–514. <https://doi.org/10.37358/RC.17.3.5490>

Zaytsev, D. (2016). Mechanical properties of human enamel under compression: On the feature of calculations. *Materials Science and Engineering C*, 62, 518–523.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.016>