



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



VANESSA CAVALLI

“INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE
AGENTES CLAREADORES NAS PROPRIEDADES
FÍSICAS E QUÍMICAS DO ESMALTE E DENTINA”.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Clínica Odontológica –
área de concentração Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giannini

Piracicaba

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C314i	<p>Cavalli, Vanessa. Influência de diferentes formulações de agentes clareadores nas propriedades físicas e químicas do esmalte e dentina. / Vanessa Cavalli. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Marcelo Giannini. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Dentes – Clareamento. 2. Cálcio. 3. Flúor. 4. Dentística. I. Giannini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Influence of different formulations of bleaching agents on enamel and dentin physical and chemical properties

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Tooth bleaching. 2. Calcium. 3. Fluorine. 4. Dentistry

Área de Concentração: Dentística

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Marcelo Giannini, Mônica Campos Serra, Josemeri Hebling Costa, Adriana Bona Matos, Maria Marchi Baron

Data da Defesa: 31-01-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 31 de Janeiro de 2007, considerou a candidata VANESSA CAVALLI aprovada.

Marcelo Gianni

PROF. DR. MARCELO GIANNINI

Mônica Campos Serra

PROFa. DRa. MÔNICA CAMPOS SERRA

Josimer Lebling Costa

PROFa. DRa. JOSIMERLEBLING COSTA

Giselle Marchi Baron

PROFa. DRa. GISELLE MARIA MARCHI BARON

Adriana Bona Matos

PROFa. DRa. ADRIANA BONA MATOS

DEDICATÓRIA

*À Deus,
Pela ajuda e força em todos os momentos de minha vida...*

*Aos meus queridos e amados pais, Sônia e Lorival
Pelo amor, apoio incondicional, dedicação e compreensão...*

*Aos meus queridos e maravilhosos irmãos, Alécio e Marcel e Samira
Sempre presentes, amando, apoiando e me dando forças e para seguir...*

*Ao meu amado Sandro
Pelas alegrias de cada dia, pelo apoio incondicional nos momentos bons e
difíceis. Agradeço a paciência e compreensão durante esta etapa tão
importante de minha vida...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **MARCELO GIANNINI**,

Pelos anos de convívio e aprendizado;

Pelos ensinamentos diários, dedicação e paciência;

Por acreditar e confiar em meu trabalho e na minha pessoa.

À Profa. Dra. **LIDIANY KARLA AZEVÊDO RODRIGUES** e

Profa. Dra. **ADRIANA FRANCO PAES LEME**,

Pela contribuição do início ao fim deste trabalho;

Pelos ensinamentos, seriedade, competência, e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, do Coordenador Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti** e da Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica-Odontológica **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, pela participação desta conceituada instituição no meu crescimento pessoal, científico e profissional, desde a graduação.

Aos amigos, professores da Disciplina de Odontologia Restauradora, **Profa. Dra. Gisele Maria Marchi**, **Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar**, **Prof. Dr. José Roberto Lovadino**, **Prof. Dr. Luis Roberto Marcondes Martins**, **Prof. Dr. Luis Alexandre M.S. Paullillo** e todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP.

À querida **Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano** do Departamento de Odontologia Social, área de Bioestatística, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Arruda Zezzi** e **Prof. Marcel Luiz Brancalion** do Instituto de Química Analítica da UNICAMP, pela imensa ajuda, aprendizado e contribuição durante as análises químicas.

Ao prof. **Dr. Airton Abrahão Martin** e **Prof. Dr. Luiz Eduardo Soares**, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, pela ajuda, contribuição no trabalho e pela oportunidade de trabalharmos com o laser Raman.

À **Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchoa**, pela imensa ajuda e disponibilidade nos laboratórios da Odontopediatria. Aos amigos e funcionários da Odontopediatria, **Marcelo Corrêa Maistro** e **Marcela C. de Souza** pela inestimável ajuda.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury** pela ajuda e orientação em Cariologia, durante o trabalho.

À **Profa. Dra. Patrícia N.R. Pereira**, pela confiança e maravilhosa oportunidade de trabalhar no Dental Research Center, da Universidade da Carolina do Norte (Chapel Hill), durante o Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE). Também agradeço às

peessoas maravilhosas **Geórgia Macedo, Patrícia Miguez e Ricardo Walter**, que fizeram deste estágio, uma experiência inesquecível.

Aos amigos, funcionários da Dentística, **Fernanda, S. Pedro e Mônica** pela inestimável ajuda.

À **Érica Pinho A. Sinhoreti** pela ajuda e atenção em todas as fases administrativas.

Aos grandes amigos **Sandrine Bittencourt, Andrea Cavalcanti, Marcelo Tavares, Cris Franco, Maria Malerba, Marina, Vanessa Gallego, César Arrais, André Reis, Débora Lima, Maria Cecília Tolosa, Maristela Lobo, Ricardo Sigemori, Rodrigo Sversut, Vanessa Bueno, Jansen, André Luís, Cláudia Daroz e Fernanda Voltarelli**.

Aos professores que participaram da banca de qualificação **Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting, Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Profa. Dra. Alessandra Borgers**.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio concedido durante o Doutorado (processo # 03/07900-5).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio concedido durante o Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (processo # 3668-05-3).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,
meus sinceros agradecimentos.

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é pensar que tudo é um milagre”.

Albert Einstein

RESUMO

Parte A: Efeitos dos agentes clareadores no esmalte dentário.

Desde a introdução da técnica de clareamento caseiro utilizando-se peróxido de carbamida (PC) a 10% estudos têm verificado os efeitos do agente clareador na superfície do esmalte humano erupcionado. Evidências demonstram que o peróxido de carbamida é capaz de alterar a composição e morfologia desse substrato. Com o intuito de diminuir os efeitos adversos dos agentes clareadores na superfície do esmalte dental, fluoretos e outros íons têm sido incluídos na formulação do agente clareador. No entanto, poucos estudos foram realizados sobre os efeitos desses agentes contendo aditivos na superfície do esmalte hígido ou com lesões artificiais de cárie. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações na superfície do esmalte hígido ou com lesões de mancha branca após o tratamento com agentes clareadores à base de peróxido de carbamida 10% com ou sem adição de íons fluoreto (F) ou cálcio (Ca). Blocos de esmalte da superfície vestibular e lingual de terceiros molares humanos foram obtidos e preparados para determinação da microdureza de superfície inicial. Após seleção dos espécimes, metade foi submetida à desmineralização para indução de lesão de cárie subsuperficial (mancha branca) do esmalte. Foi realizada nova análise de microdureza de superfície e a determinação da concentração de fosfato na superfície do esmalte através da Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (ERTF), tanto das amostras hípidas quanto das desmineralizadas. Os corpos de prova hípidos e com lesão de cárie subsuperficial foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais (n=10): (PLA) Placebo; (WHI) Whiteness® (10% PC); (OPA) Opalescence F™ (10% PC+0,11% F); (PN) Pola Night F™ (10% PC+ 0,11% F) e agentes clareadores experimentais (F) 10% PC + 0,5% F e (Ca) 10% PC + 0,2% Ca. O tratamento clareador foi realizado durante 6 horas diárias e após cada sessão, os espécimes foram mantidos em solução remineralizante até a próxima aplicação do gel. Os tratamentos clareadores tiveram duração de 12 dias. No 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador, foram realizadas determinações da microdureza de superfície de todos os espécimes e obtidas as soluções de enxágüe para determinação da concentração de cálcio, flúor e fósforo inorgânico por meio dos métodos de espectroscopia de absorção atômica, eletrodo específico e análise colorimétrica, respectivamente. Após os 12 dias de tratamento

clareador, nova determinação de ERTF foi realizada e os espécimes foram preparados para determinação da microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente e microscopia de luz polarizada. Os resultados obtidos indicam que houve diminuição da microdureza do esmalte hígido e com lesão de cárie após o tratamento clareador, sendo que o grupo WHI, sem aditivos, provocou a maior perda mineral da superfície de esmalte hígido e com lesão de cárie subsuperficial. As análises químicas comprovaram a diminuição da concentração de íons da superfície de esmalte devido ao aumento de íons cálcio, flúor e fósforo inorgânico na solução de enxágüe. A microdureza interna e a microscopia de luz polarizada indicaram maior desmineralização para os substratos tratados com o agente WHI. Os agentes contendo altas concentrações de cálcio apresentaram bom desempenho no esmalte hígido, enquanto os agentes contendo altas concentrações de flúor foram importantes para as propriedades químicas do esmalte com lesão de cárie subsuperficial.

Palavras-chave: Esmalte dentário; Lesão inicial de cárie; Clareamento externo; Cálcio; Flúor; Microdureza.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

O objetivo desse estudo foi verificar a influência de quatro agentes para clareamento de dentes não-vitais no substrato dentinário hígido ou pré-condicionado. Incisivos bovinos foram preparados para o tratamento clareador intracoronário. Metade dos elementos dentais foram submetidos internamente ao condicionamento prévio com ácido fosfórico 37% durante 15 segundos. Os incisivos hígidos e pré-condicionados foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais: (C) Controle – sem tratamento clareador; (PH 35%) Peróxido de hidrogênio 35%; (PH 25%) Peróxido de hidrogênio 25%; (PC 35%) Peróxido de carbamida 35% e (PS) Perborato de Sódio e água destilada. Os clareadores foram aplicados em 4 sessões com intervalo de 72 horas entre as aplicações. Entre as aplicações os elementos eram mantidos em recipientes individuais em ambiente com 100% de umidade relativa. O grupo controle não sofreu tratamento clareador e permaneceu em umidade relativa durante o período correspondente ao tratamento clareador. Para a determinação da resistência coesiva e análise morfológica da dentina clareada, imediatamente após o tratamento clareador, foram obtidos espécimes da dentina vestibular interna. De cada bloco foram obtidas fatias de dentina (0,8 mm de espessura). Foi realizada uma constrição na região da dentina interna de cada fatia para redução da região central, produzindo uma área de secção transversal de 0,7 mm². Após 24 horas de imersão em água, os espécimes foram testados através de ensaio de microtração. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados. Blocos adicionais de cada grupo foram preparados para a avaliação da estrutura da dentina intacta ou desmineralizada clareada, através da Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET). Os resultados da primeira parte da pesquisa indicam que a resistência à tração (RT) da dentina intacta e pré-condicionada diminuiu após todos os tratamentos com agentes intracoronários. Foram observadas alterações morfológicas através da análise ultra-estrutural do substrato clareado. Na segunda parte dessa pesquisa, foi determinada a resistência de união (RU) da dentina-compósito após o tratamento clareador. A RU foi determinada imediatamente, 7 dias e 14 dias após o tratamento clareador interno. Após a realização dos tratamentos clareadores intracoronários descritos anteriormente, blocos da dentina interna foram obtidos e

aleatoriamente subdivididos em três grupos: (0) RU imediatamente após tratamento clareador; (7) RU testada após 7 dias do término do tratamento clareador e (14) RU à dentina testada após 14 dias do término do tratamento clareador. Os blocos de dentina eram armazenados em solução remineralizante durante o período de espera e 24 horas antes do teste de microtração, eram removidos da solução e preparados para a microtração. Os blocos foram tratados com sistema adesivo de passo único com condicionamento ácido prévio e um bloco de compósito foi construído na superfície dentinária para o ensaio de microtração. Espécimes de cada grupo foram preparados para a avaliação da nanoinfiltração na dentina intacta ou pré-condicionada clareada, através da MET. Os resultados indicam que houve diminuição da resistência de união da dentina intacta e pré-condicionada tratada com agentes clareadores intracoronários, imediatamente após o tratamento. Decorridos 14 dias do tratamento clareador, a dentina intacta clareada apresentou aumento da resistência de união em todos os grupos, enquanto na dentina pré-condicionada previamente ao tratamento clareador, apenas o grupo tratado com perborato de sódio apresentou aumento de resistência de união semelhante ao controle. A interface adesiva demonstrou nanoinfiltração imediatamente após o tratamento clareador, em todos os grupos observados (dentina intacta e pré-condicionada), sendo que após 14 dias do término do tratamento clareador, foi observado diminuição no padrão de nanoinfiltração desta interface.

Palavras-chave: Dentina; Clareamento Intracoronário; Microtração; Nanoinfiltração.

ABSTRACT

Section A: Effects of bleaching agents on dental enamel

Since the introduction of the nightguard vital bleaching technique using 10% carbamide peroxide (10% CP), reports have evaluated the effects of bleaching agents on human enamel. Evidences show that CP is able to alter the composition and morphology of enamel substrate. In order to reduce the adverse effects produced by these agents on enamel surface, manufactures have added fluoride and other ions in the bleaching agent formulation. However, little is known about the effects of these agents on sound and early caries affected enamel. Therefore, the aim of this study is to evaluate sound and early caries affected enamel 10% CP bleaching with the addition or not of fluoride and calcium ions. Enamel fragments obtained from bucal and lingual third molars surfaces were used and prepared to initial microhardness measurement. After selection of the specimens, half of them were submitted to enamel demineralization in order to produce early caries on this substrate. A new microhardness measurement was performed after enamel demineralization and the phosphate concentration of sound and demineralized enamel was determined by means of Fourier Transformed Raman Spectroscopy (FTRS). Sound and early caries affected enamel were randomly divided into six experimental groups (n=10): (PLA) Placebo; (W) Whiteness (10% PC); (O) Opalescence F (10% PC); (PN) Pola Night F(10% PC) and experimental bleaching agents (F) 10% PC + 0.5% F⁻ e (Ca) 10% PC + 0.2% Ca. Bleaching was carried out during 6 hours a day and after each application, specimens were kept in remineralizing solution until the next bleaching application. Bleaching treatment was performed during 12 days. On the 1st, 6th and 12th days of bleaching, microhardness measurements were performed and the rinsing water was used to determine the concentration of fluoride, calcium and inorganic phosphate by means of ion-selective electrode, atomic absorption spectroscopy and colorimetric analysis, respectively. After 12 days of bleaching, new FTRS analysis was performed and specimens were prepared to cross-sectional microhardness measurement and polarized light microscopy. The results showed that there was a decrease on sound and demineralized enamel microhardnessa after bleaching, specially when enamel was submitted to 10% CP application with no ions-addition in its composition (Whiteness 10%). Chemical analysis indicated that there was a

decrease in the ion concentration of sound and demineralized enamel after bleaching due to an increase in the content of calcium, fluoride and inorganic phosphorus in the rinsing water solution. Cross-sectional microhardness and polarized light microscopy confirmed the demineralization of enamel submitted to 10% CP with no fluoride or calcium addition (Whiteness 10%). High-concentrated calcium bleaching agent controlled demineralization on sound enamel, whereas, high-concentrated fluoride agent was important for the physical properties of early caries affected enamel.

Key words: Dental enamel; Initial caries lesions; Vital bleaching; Calcium; Fluoride; Microhardness.

Section B: Effects of intracoronal bleaching agents on dentin surface

The aim of this study was to verify the influence of four intra-coronal bleaching agents on sound and etched dentin. Bovine incisors were prepared to intracoronal bleaching treatment. Half of them were submitted to previous demineralization with 37% phosphoric acid for 15 seconds. The sound and etched incisors were randomly divided into 5 experimental groups: (C) Control – no bleaching treatment; (PH 35%) hydrogen peroxide 35%; (PH 25%) hydrogen peroxide 25%; (PC 35%) carbamide peroxide 35% e (PS) sodium perborate mixed with distilled water. Bleaching agents were applied to the pulp chamber 4 times with a 72-hour interval among applications. Specimens were kept in individual recipients in humidity during bleaching. Control group was not bleached and remained in relative humidity during bleaching treatment. In order to determine the ultimate strength and structure of bleached intern dentin, immediately after bleaching, dentin fragments were obtained from internal bucal dentin. From each fragment, slices (0,8 mm thick) were obtained. Trimming was performed in the central area of each slice to produce a cross-sectional central area of $0,7\text{mm}^2$. After 24 hours, the ultimate strength of specimens was tested by means of microtensile test. Results were statistically analyzed. Additional fragments were treated and prepared to evaluation of sound and etched bleached dentin, through Transmission Electron Microscopy (TEM). The results of the first part of the study indicated that sound and etched ultimate strength decreased after intracoronal bleaching. Morphological alterations were observed through ultra-structural analysis (TEM). The second part of the research determined the bond strength of resin-dentin after bleaching. Bond strength was determined immediately, 7 and 14 days after intracoronal bleaching. After treatment of the specimens, according to previous descriptions, fragments obtained from bucal dentin were randomly divided into 3 groups: (0) Bond strength immediately after treatment; (7) Bond strength 7 days after bleaching treatment; (14) Bond strength 14 days after bleaching treatment. Specimens were kept in remineralizing solution and 24 hours before testing, they were removed from the solution and prepared to microtensile test. The fragments were restored with one-step total acid conditioning adhesive system and a composite block was build up on dentin surface to microtensile test. Results obtained were statistically analyzed. Additional specimens from each group were

prepared to nanoleakage evaluation of sound and etched bleached dentin, by means of TEM. Bond strength of sound and etched bleached dentin decreased immediately after intracoronal bleaching. After 14 days of bleaching treatment, bond strength of sound bleached dentin increased for all groups, whereas for etched bleached dentin, sodium perborate was the only group with bond strength similar to control group. Sound and etched dentin of all treated and not-treated groups, presented nanoleakage immediately after bleaching. After 14 days, nanoleakage decreased for all groups tested.

Key words: Dentin; Intracoronal bleaching; Microtensile; Nanoleakage.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
PROPOSIÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO 1.....	137
ANEXO 2.....	139

1. INTRODUÇÃO

A alteração de cor do elemento dental apresenta-se como um problema estético que freqüentemente requer ações corretivas. Embora existam métodos restauradores como coroas e facetas, a alteração de cor pode muitas vezes ser tratada com sucesso através de técnicas não-invasivas, de grande eficácia clínica, como o clareamento dental (Leonard, 1998; Cibirka *et al.*, 1999; Giannini *et al.*, 2006).

Para os diversos tipos de alteração de cor do elemento dental, indica-se a técnica clareadora mais adequada. Para o tratamento clareador de dentes vitalizados, o peróxido de carbamida continua o agente clareador mais utilizado (Giannini *et al.*, 2006; Matis *et al.*, 2006; Kugel *et al.*, 2007). Os agentes clareadores para dentes vitalizados são normalmente classificados em três categorias, de acordo com o modo de aplicação e da concentração dos peróxidos. Os agentes clareadores para uso profissional contêm altas concentrações do peróxido de carbamida (35-37%) e do peróxido de hidrogênio (30-40%), enquanto a técnica caseira contém peróxido de carbamida em concentrações que variam de 10 a 22% ou peróxido de hidrogênio até 10% (Sulieman, 2006).

Os agentes oxidantes mais utilizados para o tratamento clareador de dentes desvitalizados são o perborato de sódio ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peróxido de carbamida $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$, ou $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$. Estes dois últimos apresentam concentrações que variam de 30 a 35% (Attin *et al.*, 2003b).

A técnica “walking bleach” baseia-se na utilização do perborato de sódio com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 30-40% (Spasser, 1961; Putter & Jordan, 1989). Entretanto, alguns autores preconizam a utilização de água destilada e deionizada ao invés do peróxido de hidrogênio com o objetivo de minimizar possíveis efeitos adversos na dentina clareada (Rotstein, 1991; Macey-Dare & Williams, 1997). O peróxido de hidrogênio encontra-se disponível em várias concentrações, no entanto as soluções aquosas estabilizadas entre 30 e 35% são as mais utilizadas. O agente possui baixo pH e, quando em contato com os tecidos duros, libera radicais livres e ânions peridroxilas (Cohen & Burns, 2000). Altas concentrações do gel de peróxido de carbamida variando entre 30 a 40% são

utilizadas no clareamento de dentes vitalizados e desvitalizados em consultório, efetuado em 3 a 4 sessões, com duração média de aplicação de uma hora (Cavalli *et al.*, 2004b).

Embora a eficácia dos agentes clareadores para dentes vitalizados e desvitalizados apresente-se bem documentada, o difundido uso das técnicas clareadoras gera preocupação em relação aos efeitos provocados por esses agentes nos substratos clareados (Giannini *et al.*, 2006). Não existe concordância sobre os efeitos do peróxido de carbamida no esmalte, visto que observações realizadas em microscopia eletrônica de varredura mostram alguma ou nenhuma alteração na superfície do esmalte (Oltu & Gürkan, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Quando observadas, as alterações em MEV incluem aumento da porosidade do esmalte clareado, erosão e desmineralização superficial (Shannon *et al.*, 1993; Flaitz & Hicks, 1996; Perdigão *et al.*, 1998; Hegedüs *et al.*, 1999; Akal *et al.*, 2001, Cavalli *et al.*, 2004a). Ainda, as evidências em relação à composição química, propriedades físicas e mecânicas do esmalte humano clareado também mostram resultados contraditórios (Murchinson *et al.*, 1992; Rotstein *et al.*, 1996; Attin *et al.*, 1997; Potocnik *et al.*, 2000; Akal *et al.*, 2001; Cimilli & Pameijer, 2001; Cavalli *et al.*, 2004).

Alguns estudos demonstram que o tratamento clareador com peróxido de carbamida pode resultar em diminuição na concentração de cálcio, fosfato e flúor presentes no esmalte (Perdigão *et al.*, 1998; Potocnik *et al.*, 2000; Burgmaier *et al.*, 2002), aumentando a susceptibilidade do substrato à desmineralização (Flaitz & Hicks, 1996; Al-Qunaian, 2005). Tais constatações tornam-se pertinentes e preocupantes, uma vez que devido à notoriedade das técnicas clareadoras, observa-se em alguns casos a utilização desses agentes em pacientes que apresentam lesões iniciais de cárie, embora pouca informação exista a respeito dos efeitos dos agentes clareadores em superfícies de esmalte previamente desmineralizadas (Basting *et al.*, 2001).

Com o objetivo de minimizar estes efeitos do peróxido de carbamida na superfície do esmalte, determinados agentes clareadores contêm aditivos, como flúor e outros íons. Estando presente no meio oral, na forma iônica, o flúor potencializa a capacidade remineralizante da saliva em até 90%. Visto que a dissolução do esmalte depende da concentração inorgânica do meio salivar e do pH da placa (Thylstrup & Fejerskov, 1995), pressupõe-se que se houverem concentrações suficientes de flúor (F) e

cálcio (Ca) nos agentes clareadores, a perda de cálcio e fosfato do substrato não irá ocorrer mesmo com pH baixo, pois a solução estará supersaturada de íons e o esmalte seria resistente a uma possível desmineralização (Attin *et al.*, 1997; Giannini *et al.*, 2006).

Embora tanto o perborato de sódio como o peróxido de hidrogênio 35% e o peróxido de carbamida 35% sejam eficazes como clareadores intracoronários (Kaneko *et al.*, 2000), estes também provocam conseqüências indesejáveis na estrutura química e biomecânica da dentina (Tittley *et al.*, 1993; Chng *et al.*, 2002).

Vários estudos demonstram que o peróxido de hidrogênio 35% diminui a microdureza do esmalte (Pinto *et al.*, 2004) e que na dentina, este agente provoca maior diminuição na microdureza dentinária que a pasta de perborato de sódio com água (Lewinstein *et al.*, 1994). O peróxido de carbamida 35%, por sua vez, diminui a resistência intrínseca e microdureza do esmalte (Pinto *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005) e dentina (Lewinstein *et al.*, 2004).

Acredita-se que a remoção da *smear layer* do substrato dentinário com o uso de soluções ácidas como o ácido fosfórico 37%, possibilitaria o aumento da permeabilidade desse substrato e conseqüentemente, maior difusão do agente clareador intracoronário (Baratieri *et al.*, 1993). Embora estudos demonstrem não haver vantagens na remoção da *smear layer* e desmineralização superficial (Rotstein, 1991; Horn *et al.*, 1998), clínicos realizam o condicionamento ácido da dentina previamente ao tratamento clareador, com o intuito de melhorar a eficácia do clareamento (Hülsmann, 1993; Attin *et al.*, 2003b). Entretanto, acredita-se que esse procedimento possa alterar as características morfológicas e conseqüentemente diminuir a resistência de união dentina-compósito.

Uma vez que a diminuição da microdureza dos tecidos dentais duros após tratamento clareador implica em sua dissolução e degradação, é possível que os agentes oxidantes modifiquem a estrutura do esmalte e dentina durante e após as técnicas de clareamento de elementos dentais vitalizados e desvitalizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

1. ESMALTE

O esmalte dentário apresenta características singulares que o diferencia dos demais tecidos do corpo humano. Diante de sua peculiaridade, o conhecimento de sua composição, estrutura morfológica e propriedades físicas são fundamentais para a compreensão e interpretação dos resultados referentes a estudos que envolvem este tecido.

1.1 COMPOSIÇÃO

O esmalte, tecido que recobre a coroa dentária, é o mais duro dos tecidos mineralizados do corpo humano, apresentando 96% em peso de conteúdo inorgânico, associado a 4% de água e material orgânico. A porção mineral é representada por fosfato de cálcio cristalino, a apatita, nas formas hidroxí, carbonatada ou fluoretada (Meckel *et al.*, 1965; Stack 1954; Gwinnett, 1992). Os elementos químicos que compõem a base deste tecido são o cálcio e o fosfato (Brudevold *et al.*, 1963). Variações secundárias ocorrem na composição do esmalte, nas quais os elementos químicos, como alumínio, bário, estrôncio, rádio e vanádio também podem ser encontrados (Gwinnett, 1992).

No estágio inicial de formação do tecido (processo de mineralização ou maturação), ocorre a formação de um arcabouço cristalino, constituído de cristalitos. Os cristalitos são cristais com dimensões microscópicas e são embebidos em uma matriz orgânica que corresponde a aproximadamente 1% em volume do esmalte maduro (Crabb, 1959; Frank & Sognaes, 1960; Ronnholm, 1962; Eastoe, 1963).

Durante o processo de mineralização da coroa dentária, os ameloblastos produzem uma grande quantidade de matriz orgânica nas primeiras fases de desenvolvimento. Com o processo de maturação do tecido, a matriz orgânica é gradativamente substituída por material inorgânico (Gwinnett, 1992). Desta forma, um gradiente de mineralização é formado no esmalte maturado e as porções mais externas passam a apresentar um maior grau de mineralização em relação às porções mais internas (Crabb & Darling, 1960).

A água é encontrada em quantidade significativamente maior em relação aos constituintes orgânicos (mais de 4% em volume). Aproximadamente 25% do volume de

água está ligado aos cristalitos, provavelmente associado à matriz orgânica e funciona como meio de hidratação circundando os cristalitos que compõe os prismas de esmalte (Crabb *et al.*, 1963).

1.2 ESTRUTURA MORFOLÓGICA

Estruturalmente, os componentes inorgânicos estão distribuídos em cristais numa organização prismática, com material orgânico e água intermediando esses cristais e os prismas. Os prismas possuem comprimento variando entre 4 a 7 μm , dispostos sequencialmente, tendo seu início na junção amelo-dentinária e terminando quase sempre na porção externa (Gwinnett, 1992).

Os prismas são formados devido à variação na orientação dos cristais de hidroxiapatita. Essa variação da orientação dos cristais de hidroxiapatita ajuda a distribuir as forças mastigatórias que incidem sobre o esmalte, melhorando as propriedades físicas desta estrutura. As fraturas que normalmente ocorrem no esmalte dentário são detidas quando chegam a regiões onde os grupos de prismas se cruzam (De Las Casas *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, os prismas de esmalte são compostos por milhares de unidades sub-microscópicas denominadas cristalitos. Os cristalitos estão dispostos em um padrão tri-dimensional no interior de cada prisma de esmalte (Scott & Wyckoff, 1952). A inclinação média dos cristalitos é de aproximadamente 18° relativos ao longo eixo do prisma, podendo variar entre 0° e 70° . Uma diferença marcante na angulação dos cristalitos é observada no limite entre prismas adjacentes. Esta característica morfológica confere um aumento localizado de espaço e material orgânico na região periférica dos prismas referida como bainha do prisma (Gwinnett, 1966). Tal disposição também viabiliza o dinamismo do esmalte, tornando-o uma estrutura semipermeável (Poole *et al.*, 1961), capaz de realizar trocas de água e minerais, configurando os processos de desmineralização e remineralização, que traduzem a relação dinâmica entre o dente e o meio oral.

A camada aprismática também é constituída de cristalitos. Entretanto, o arranjo ultramicroscópico dos cristalitos difere daquele encontrado na composição dos prismas de esmalte. Uma variação brusca no arranjo dos cristalitos é observada, em que as unidades

inorgânicas estão dispostas paralelamente umas com as outras e perpendiculares à superfície externa. A densidade dos cristalitos também confere um aumento no grau de mineralização observado radiograficamente como uma banda radiopaca (Gwinnett, 1992). A mudança na orientação cristalina entre esmalte prismático e aprismático pode ser explicada com base na alteração da posição dos ameloblastos relativo à sua fonte secretória.

Os ameloblastos trabalham de modo cíclico em que as células passam por estágios ativos de secreção seguidos por períodos de repouso. Este ciclo manifesta-se no tecido através das denominadas linhas incrementais de Retzius. Em cortes longitudinais, as linhas incrementais de Retzius seguem um padrão semelhante a arcos simétricos que se estendem da superfície do esmalte até a junção amelo-dentinária. Ao contrário da denteição decídua, estas linhas são observadas inclusive na porção mais externa na denteição permanente, atingindo a superfície do esmalte. Nesta região, se manifestam como sulcos ondulados relativamente paralelos entre si e transversais ao longo eixo da coroa dentário, recebendo a denominação de periquimácias. Esta estrutura representa o reflexo das linhas de Retzius na superfície do esmalte e são progressivamente eliminadas como resultado da atrição dentária (Sharawy & Yaeger, 1989; Gwinnett, 1992).

Na estrutura micromorfológica do esmalte, podem ser observadas as lamelas de esmalte, que são estruturas delgadas, em folha, que se estendem desde a superfície até a junção amelo-dentinária. Consistem de matéria orgânica, com pouco conteúdo mineral e, por vezes, podem cruzar o limite amelo-dentinário e penetrar na dentina. O limite final das lamelas pode ser observado como estruturas semelhantes à trincas, na superfície do esmalte, que se estendem por distâncias variadas, sendo que a maioria delas apresenta 1 mm de comprimento.

Os tufos de esmalte são assim denominados, pois à luz da microscopia óptica lembram tufos de grama. Projetam-se na junção amelo-dentinária e são formados por prismas de esmalte e substância interprismática hipocalcificada. Os fusos do esmalte, estruturas também observadas no substrato, são extensões dos túbulos dentinários que passam da junção amelo-dentinária para dentro do esmalte. Esta estrutura assemelha-se a um dedo, apresenta um aspecto micromorfológico bastante diferente dos amplos e longos tufos de esmalte (Ten Cate, 1985; Sharawy & Yaeger, 1986; Gwinnett, 1992).

1.3 PROPRIEDADES FÍSICAS

Quanto às propriedades físicas do esmalte, devido ao seu alto conteúdo mineral e características estruturais, pode ser considerado um sólido microporoso composto por cristais firmemente unidos o que lhe dá uma aparência semelhante ao vidro. A translucidez característica do esmalte permite, de acordo com a variação da sua espessura, que o dente apresente a cor da dentina. Embora a união dos cristais seja firme e compacta em nível macroscópico, cada cristal é separado de seu cristal adjacente por finos espaços intercristalinos preenchidos com água ou material orgânico. Estes espaços juntos formam uma fina rede de vias de difusão, que são chamadas de microporos ou poros do esmalte (Thylstrup & Fejerskov, 1995).

Devido ao alto conteúdo inorgânico, a dureza do esmalte, expressa em relação à deformação, varia entre 200 a 500 Knoop (Caldwell *et al.*, 1957). Essa variação ocorre devido aos diferentes planos do esmalte utilizados nos testes de dureza, o que implica na mensuração dos prismas em diferentes orientações.

O esmalte possui um alto módulo de elasticidade e baixa resistência à tração, o que o caracteriza como um material friável (Caldwell *et al.*, 1957; Bowen *et al.*, 1965). Dessa maneira, trincas no esmalte são comumente encontradas clinicamente em dentes íntegros, embora fraturas mais extensas não ocorram, pois o substrato íntegro é amparado pelas propriedades elásticas da dentina adjacente e pela alta resistência à fratura da junção amelo-dentinária (Carvalho *et al.*, 2000).

1.4 DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO.

A desmineralização do esmalte é caracterizada pela perda de minerais do dente, quando o pH do meio torna-se menor que aproximadamente 5,5, sendo que o processo de remineralização, ou a reposição desses minerais, ocorre quando houver neutralização desse pH ácido (Feagin *et al.*, 1980; Featherstone *et al.*, 1983). Em situações de equilíbrio dinâmico (DES=RE), a quantidade de íons perdidos é igual à de íons repostos, portanto, não há predomínio de uma situação.

A dissolução mineral ocorre quando o meio encontra-se subsaturado em relação ao elemento dentário. Essa situação acontece através da produção de ácidos orgânicos e a

subseqüente queda no pH da placa bacteriana. Estudos *in vitro* demonstram claramente que o processo de desmineralização é altamente dependente do grau de saturação da solução desmineralizadora (Moreno & Zahradnik, 1974; Margolis *et al.*, 1985; Gao *et al.*, 1991). Ainda, os resultados de outros estudos *in vitro* demonstraram que a desmineralização do esmalte é também em função do pH (Theuns, 1984a), da concentração de ácido orgânico não-dissociado (Theuns *et al.*, 1984b), assim como, da natureza do ácido orgânico (constante de ionização, K_i) (Gray, 1966; Featherstone & Rodgers, 1981).

Durante a desmineralização, íons hidrogênio são capazes de penetrar nos poros do esmalte, desfazendo ligações moleculares, determinando a liberação de íons minerais do dente, diminuindo o diâmetro dos cristais de hidroxiapatita e, conseqüentemente, alargando os poros. Nesse estágio precoce (ultra-estrutural), o processo poderá ser interrompido se houver reposição dos minerais perdidos, garantindo a ocorrência da remineralização (Larsen & Bruun, 1988).

A aparência da lesão inicial em esmalte, ou seja, a mancha branca opaca é resultante das diferenças nos índices de refração de luz entre a hidroxiapatita (1,62), água (1,33) e ar (1,0). O esmalte, que é um sólido microporoso, em condição de desmineralização torna-se mais poroso, conduzindo a uma alteração na sua propriedade ótica, de tal forma que a luz se dissipa. Este quadro torna-se mais perceptível quando a estrutura dentária é desidratada e os espaços inter cristalinos, que se encontram ampliados, são preenchidos com ar. Isto resulta em uma área com aparência menos translúcida ou opaca, podendo-se concluir que há uma mudança na porosidade do esmalte nessa área, indicando perda mineral ou hipomineralização durante a formação do dente (Fejerskov & Thylstrup, 1988).

2. DENTINA

2.1 COMPOSIÇÃO

A principal função estrutural da dentina é fornecer suporte para o esmalte dentário. Para tal finalidade, a dentina necessita ser ao mesmo tempo um tecido duro, porém com certa elasticidade, sendo que estas propriedades são fornecidas pelo equilíbrio entre os componentes minerais e orgânicos que formam este tecido.

A porção mineral, assim como no esmalte, é formada por cristais de hidroxiapatita compreendendo aproximadamente 50% em volume do tecido. A matriz orgânica constitui aproximadamente 30% em volume da dentina sendo formada principalmente pelo colágeno I. As moléculas do colágeno I possuem a capacidade de se polimerizar para formar fibrilas. Estas fibrilas se agregam para formar uma rede tridimensional sobre a qual se depositam os cristais de hidroxiapatita. Os 20% em volume restante, são constituídos de água e outros fluidos (Mjor & Fejerskov, 1979; Marshall, 1993). Proteínas não-colagenosas e outros componentes orgânicos também estão presentes em menores quantidades (Ten Cate, 1994).

2.2 ESTRUTURA

A principal peculiaridade da dentina que a distingue dos demais tecidos calcificados do organismo é a presença dos canalículos (ou túbulos) dentinários (Marshall *et al.*, 1997). Como sugere o termo, os canalículos são pequenos canais que se estendem perpendicularmente à superfície dentária desde o limite com a polpa até o limite com o esmalte na coroa ou com o cimento na região da raiz. Estes canalículos possuem em seu interior o prolongamento citoplasmático do odontoblasto que é a célula responsável pela síntese da dentina e cujo corpo celular se localiza na periferia da câmara pulpar. Durante a síntese da dentina, os odontoblastos sintetizam inicialmente a matriz protéica, que forma uma camada entre os odontoblastos e a dentina mineralizada. Esta camada é denominada de pré-dentina, que será num futuro próximo mineralizada transformando-se na dentina (Mjor & Fejerskov, 1979; Driessens & Verbeeck, 1990).

Existem basicamente, dois tipos de dentina: a dentina fisiológica e a de reparação. A fisiológica é formada desde o início da odontogênese até o final da vida do indivíduo. A velocidade de formação da dentina fisiológica é de aproximadamente 4 µm/dia durante a odontogênese, que se prolonga até aproximadamente a formação do ápice da raiz. Após este período, a velocidade de formação da dentina diminui progressivamente. Durante o envelhecimento, a luz dos canalículos dentinários vai lentamente diminuindo. Este processo ocorre devido à síntese progressiva da dentina intratubular. A síntese desta

dentina pode levar a oclusão dos canalículos, num processo chamado de esclerose dentinária (Cox *et al.*, 1992).

A dentina reacionária é formada em resposta a um estímulo físico (temperatura) ou químico (toxinas produzidas pelas bactérias da cárie, ou produtos liberados pelos materiais restauradores) na dentina ou polpa. Esta dentina é formada em um ritmo mais acelerado sendo por isso menos calcificada e menos organizada. Os canalículos são tortuosos e freqüentemente observam-se odontoblastos que não conseguiram acompanhar o ritmo de crescimento e são aprisionados na matriz dentinária. A dentina de reparação, também chamada de dentina terciária, é feita numa tentativa de se isolar a polpa do estímulo agressor (Cox *et al.*, 1992). Outra região com características especiais é a junção entre o esmalte e a dentina, chamada de junção amelodentinária. Esta região possui um relevo irregular que aumenta de tamanho na região incisal ou oclusal (onde incidem os impactos da mastigação). Acredita-se que este padrão serve para aumentar a adesão entre o esmalte e a dentina (Ten Cate, 1994).

Assim como no esmalte dentário, existem linhas que marcam variações no ritmo de crescimento da dentina. As linhas incrementais que demarcam o ritmo de crescimento de 5 dias da dentina são chamadas de Von Ebner. Da mesma maneira que o esmalte dentário, as alterações metabólicas, processos patológicos, ingestão de drogas ou medicamentos durante a formação da dentina podem ficar registrados neste tecido sob a forma de linhas que acompanham o contorno das linhas de Von Ebner (Kawasaki, 1975; Pashley, 1989).

2.3 ESTRUTURA E PROPRIEDADES DA DENTINA RELACIONADAS COM A ADESÃO

O tecido dentinário caracteriza-se por ser um substrato hidratado, complexo e vital, no qual a morfologia varia com a localização e sofre alterações com o envelhecimento e com o processo cariioso.

Os túbulos, uma característica distinta e importante da dentina, convergem na câmara pulpar, portanto, a densidade tubular e a orientação variam de acordo com a localidade no tecido. O número de túbulos dentinários é menor na junção amelo-dentinária e maior na superfície pré-dentinária localizada na câmara pulpar. A menor densidade

tubular é encontrada na raiz. O conteúdo dos túbulos inclui os processos odontoblásticos por toda ou parte de sua extensão e fluido tissular (Marshall *et al.*, 1997).

Na maior parte de sua extensão, o lúmen tubular é circundado por dentina peritubular altamente mineralizada, contendo principalmente cristais de apatita com pouca matriz orgânica. Os túbulos são separados pela dentina intertubular composta de uma matriz de colágeno tipo I reforçada por apatita. A quantidade da dentina intertubular também varia de acordo com a localização. Os cristais de apatita são muito menores (aproximadamente 5x30x100nm) que a apatita encontrada no esmalte e contém 4-5% de carbonato quando comparado com a hidroxiapatita (Driessens & Verbeeck, 1990; Ten Cate, 1994; Marshall *et al.*, 1997).

Estimativas do tamanho dos túbulos, da espessura da região peritubular e da quantidade de dentina intertubular foram realizadas em vários estudos. Alguns demonstram que na superfície oclusal, a porcentagem de túbulos e os diâmetros dos mesmos variam de 22% e 2,5µm perto da polpa, para 1% e 0,8 µm na junção amelo-dentinária. A área de matriz intertubular varia de 12% na pré-dentina pulpar a 96% próximo à junção amelo-dentinária (Pashley, 1989; Giannini *et al.*, 2001).

Os componentes estruturais e morfológicos variam consideravelmente ao longo do curso dentinário e necessariamente resultarão em variações importantes das propriedades dentinárias como permeabilidade (Tagami *et al.*, 1992), umidade, área superficial disponível para adesão (Nakamichi *et al.*, 1983; Causton, 1984; Suzuki & Finger, 1988; Tagami *et al.*, 1990; Giannini *et al.*, 2001) e dureza (Pashley *et al.*, 1985).

As diferenças marcantes na quantidade e qualidade de cada elemento estrutural da dentina de acordo com a localização no substrato implicam que a adesão ao substrato é dependente da localização. Geralmente, a resistência de união é maior na superfície que na dentina profunda (Pashley *et al.*, 1995; Giannini *et al.*, 2001). Isso se deve à diferença na quantidade de área de dentina intertubular disponível para adesão e na diferença da umidade local. Entretanto, além de considerarmos a importância da localização da adesão no substrato dentinário, deve-se avaliar o mecanismo específico de união de cada agente (Perdigão *et al.*, 2000; Bouillaguet *et al.*, 2001; Wang & Spencer, 2004). Portanto, se a adesão à parede da dentina peritubular é importante, a resistência micro-mecânica deveria

aumentar com a profundidade se a dentina é seca; entretanto, o fluido dentinário pode interferir com alguns métodos de adesão se o agente é hidrofóbico. Inversamente, se a interação com os componentes da dentina intertubular é importante, maior resistência adesiva é esperada na dentina superficial onde a dentina intertubular é o componente estrutural predominante. A umidade intrínseca da dentina aumenta com a profundidade, fator que dificulta uma adequada união. Por outro lado, para alguns sistemas, a adesão úmida tem demonstrado melhores resultados, uma vez que a presença de água pode prevenir a contração da dentina desmineralizada. A desidratação causa colapso das fibrilas colágenas expostas, o que dificulta a penetração do adesivo dentinário (Perdigão & Lopes, 1999; Han *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2004; Carrilho *et al.*, 2005).

A avaliação da resistência adesiva propiciada pelos sistemas adesivos ao substrato dental pode ser realizada utilizando-se dentes humanos ou bovinos. Os túbulos da dentina bovina têm maior diâmetro próximo à junção amelo-dentinária, sendo que o diâmetro diminui nas proximidades da polpa ao contrário do que acontece na dentina humana. No entanto, estas diferenças parecem não justificar uma mudança no comportamento da dentina bovina superficial e profunda em relação à humana, no que se refere à resistência adesiva. Isto pode ser explicado pela proporção da dentina inter e peritubular, com variação na quantidade de fibrilas colágenas disponíveis para hibridização (Bonfim *et al.*, 2000).

3. ALTERAÇÕES DE COR DO ESMALTE E DENTINA

Os dois principais tipos de alteração de cor dental são divididos em alterações de cor extrínseca e intrínseca, os quais são normalmente associados à deposição de corantes no esmalte (extrínseca) ou alterações de cor intrínsecas.

3.1 ALTERAÇÃO DE COR EXTRÍNSECA

A alteração de cor extrínseca ocorre devido ao escurecimento da película adquirida e placa bacteriana. A película é facilmente pigmentada e tende a ser mais afetada nas áreas interproximais e margem gengival uma vez que essas áreas são frequentemente

esquecidas durante a escovação. A descoloração pode ser causada por uma variedade de alimentos e produtos com grande quantidade de corantes como café, chá, fumo e medicamentos, como a clorexidina, e alguns produtos antibacterianos (Kwong *et al.*, 1993). A alteração de cor extrínseca pode também afetar as restaurações em compósitos resinosos. O tratamento das descolorações extrínsecas é realizado através da micro-abrasão com pastas profiláticas ou através de tratamento químico clareador.

3.2 ALTERAÇÃO DE COR INTRÍNSECA

A alteração de cor intrínseca é causada por fatores locais ou sistêmicos os quais produzem mudança de cor da estrutura interna do elemento dentário. Como consequência, as manchas intrínsecas são mais difíceis de serem tratadas e são frequentemente mais severas que as manchas extrínsecas uma vez que todo o elemento ou a dentição é envolvida (Lyons & Ng, 1998).

O fator local mais comum que provoca a descoloração intrínseca é o trauma e subsequente hemorragia pulpar (Hattab *et al.*, 1999). A difusão dos produtos de degradação do sangue, como a bilirrubina e hemoglobina, causa o escurecimento da dentina. A descoloração intrínseca também pode acontecer devido à presença de certos materiais restauradores, como corrosão de produtos do amálgama, descoloração das restaurações de compósitos, sais de prata ou materiais para tratamento endodôntico. A descoloração subsequente ao tratamento endodôntico ocorre, pois ou a abertura coronária não é suficiente para remover os remanescentes pulpares ou porque os seladores, especialmente aqueles contendo sais de prata, foram deixados na região coronária do elemento dentário (Nathoo, 1997).

Os fatores sistêmicos que causam a descoloração intrínseca atuam durante a odontogênese, portanto a descoloração é incorporada no esmalte ou dentina, através da mudança na qualidade ou quantidade desses tecidos, ou através da adição dos pigmentos na estrutura desses substratos (Lyons & Ng, 1998). Manchas de tetraciclina, fluorose e envelhecimento fisiológico, são exemplos de descoloração interna causada por fatores sistêmicos. Algumas condições sistêmicas que resultam em descoloração do elemento, incluem defeitos do esmalte, como hipocalcificação ou hipoplasia, desordens metabólicas

raras como eritroblastose fetal, e desordens congênitas como amelogênese imperfeita (Haywood *et al.*, 1990; Haywood, 1992).

4. TRATAMENTO CLAREADOR DE DENTES VITALIZADOS

A técnica de clareamento mais utilizada em dentes vitalizados com alterações de cor intrínseca ou extrínseca, até 1989, consistia no condicionamento do esmalte com ácido fosfórico 37% seguido do tratamento com o peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂), associado ou não à aplicação de uma fonte de calor (Haywood & Heymann, 1989). Entretanto, a técnica apresentava inconvenientes como a necessidade de várias sessões em consultório, a realização de um cuidadoso isolamento absoluto para proteção dos tecidos moles, e o polimento do esmalte após o tratamento, dadas as alterações causadas pelo condicionamento ácido e pelos subprodutos do peróxido de hidrogênio. Além dos inconvenientes apresentados pela técnica, a aplicação de calor em dentes vitalizados normalmente gera grandes preocupações em relação à vitalidade pulpar do elemento dentário (Zach & Cohen, 1965; Bowles & Ugwuneri, 1987; McEvoy, 1989). Devido aos efeitos adversos e desvantagens fornecidas por essa técnica, diferentes produtos e sistemas de tratamento foram introduzidos.

A técnica noturna ou caseira, introduzida em 1989 por Haywood & Heymann, utiliza-se do peróxido de carbamida 10% como principal agente para o clareamento de dentes vitalizados. Nesta, o paciente utiliza o produto clareador em uma moldeira individual pelo período de 6 a 8 horas (enquanto dorme), durante estimadamente 2 a 6 semanas (Haywood & Heymann, 1989). Atualmente, além dos géis contendo 10% de peróxido de carbamida, concentrações que variam de 15 a 30% estão comercialmente disponíveis (Leonard *et al.*, 1998; Oltu & Gurgan, 2000, Miller, 2002), e são também destinadas ao tratamento clareador caseiro ou noturno, constituindo uma variação da técnica.

O clareamento externo caseiro, o qual a utiliza do peróxido de carbamida 10% que decompõem-se *in situ* em peróxido de hidrogênio e uréia, tornou-se o procedimento estético mais popular e realizado entre os pacientes (Mokhlis *et al.*, 2000) devido à sua eficiência clínica (Haywood & Heymann, 1989; Howard, 1992; Reinhardt *et al.*, 1993;

Croll & Sasa, 1995; Rosenstiel *et al.*, 1996; Tam, 1999; Javaheri & Janis, 2000) e segurança (Haywood, 1992; Li, 1996). As altas concentrações do peróxido, variando entre 30 a 40%, são utilizadas no clareamento de dentes vitalizados em consultório, efetuadas em 3 a 4 sessões, com duração média de uma hora.

Em contato com os tecidos moles ou saliva em temperatura oral, o peróxido de carbamida dissocia-se em peróxido de hidrogênio (o componente ativo) e a uréia. O peróxido é capaz de movimentar-se e infiltrar-se livremente no esmalte e dentina, devido ao seu baixo peso molecular, onde se degrada, liberando oxigênio e água, enquanto a uréia dissocia-se em amônia e dióxido de carbono (Haywood & Heymann, 1991). O mecanismo de ação dos agentes clareadores abrange a habilidade do peróxido de hidrogênio formar radicais livres que interagem com as moléculas orgânicas pigmentadas, decompondo-as em moléculas menores e menos pigmentadas. A alteração no tamanho e pigmentação de moléculas orgânicas após a oxidação produzida pelos radicais livres, altera a absorção de espectro visível pela molécula, de maior para menor comprimento de onda, resultando em compostos “mais claros” (Haywood & Heymann, 1991; Seghi & Denry, 1992; Lyons & Ng, 1998; Sun, 2000).

4.1 INTERAÇÕES ESMALTE VERSUS AGENTES CLAREADORES

Acredita-se que as alterações provocadas pelo agente no substrato clareado são diretamente proporcionais à concentração do peróxido e o tempo de contato do agente na superfície dentário (Bitter & Sanders, 1993). Contudo, análises em MEV demonstram que mesmo os agentes compostos por 10% de peróxido de carbamida, os quais liberam apenas 3% de peróxido de hidrogênio, são capazes de alterar a morfologia do esmalte, provocando dissolução e aumento da porosidade da superfície do substrato (McGuckin *et al.*, 1992; Shannon *et al.*, 1993; Ernst *et al.*, 1996; Josey *et al.*, 1996; Zalkind *et al.*, 1996).

Além de alterações morfológicas, atribui-se ao peróxido de carbamida o aumento da rugosidade do esmalte (McGuckin *et al.*, 1992; Bitter & Sanders, 1993; Josey *et al.*, 1996; Ernst *et al.*, 1996; Zalkind *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 2004a), diminuição da resistência de união aos substratos (McGuckin *et al.*, 1992; Titley *et al.*, 1992; Stokes *et al.*,

1992; Garcia-Godoy *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 1994; Ben-Amar *et al.*, 1995; Perdigão *et al.*, 1998; Cavalli *et al.*, 2001, 2005), e a diminuição da resistência intrínseca do esmalte clareado (Cavalli *et al.*, 2004b; da Silva *et al.*, 2005).

Relatos indicam que não apenas a superfície do esmalte é modificada morfológicamente mediante o tratamento com peróxido de carbamida 10%, mas também a dureza sofre alteração, sendo o peróxido, o responsável pela modificação na composição mineral do substrato (Attin *et al.*, 1997; Akal *et al.*, 2001; Basting *et al.*, 2001; Cimilli & Pameijer, 2001; Rodrigues *et al.*, 2001).

Embora os baixos valores de pH tenham sido apontados como possível causa da redução do conteúdo mineral (Murchinson *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 1994; Bem-Amar *et al.*, 1995; Ernst *et al.*, 1996; Zalkind *et al.*, 1996), atualmente, a maioria dos agentes para uso caseiro ou noturno assumem potencial hidrogeniônico (pH) próximo à neutralidade (Price *et al.*, 2000). Portanto, a perda de substância mineral na superfície clareada pode estar relacionada à composição do agente e aos seus sub-produtos, pois os radicais livres liberados pelo peróxido de hidrogênio são negativamente carregados, instáveis e inespecíficos e podem reagir tanto com as moléculas orgânicas pigmentadas quanto com a matriz do esmalte e dentina (Zalkind *et al.*, 1996; Seghi & Denry, 1992; Perdigão *et al.*, 1998).

Alguns autores quantificaram, através de espectroscopia de energia de dispersão, as concentrações de cálcio e fosfato na superfície do esmalte clareado, pois estes íons são os principais constituintes do esmalte e afetam amplamente o grau de dissolução desse substrato (Moreno & Zahradnik, 1974). Embora controverso, alguns estudos demonstram redução no conteúdo de cálcio e fosfato no esmalte clareado com peróxido de carbamida (Rotstein *et al.*, 1996; Cimilli & Pameijer, 2001).

5. TRATAMENTO CLAREADOR DE DENTES DESVITALIZADOS

Uma descrição inicial do uso do peróxido de hidrogênio foi realizada entre 1884 e 1885 (Harlan, 1884), sendo o superoxol (30% H₂O₂) descrito por Abbot em 1918. Alguns autores propuseram o uso de luz (Rosenthal, 1911; Prinz, 1924), calor (Merrel

1954; Brown 1965) ou corrente elétrica (Kirk, 1889; Westlake, 1895) para acelerar a reação do agente clareador.

A primeira descrição da técnica *walking bleach*, indicava a utilização de uma pasta de perborato de sódio e água, a qual permanecia na câmara pulpar por alguns dias e o acesso da cavidade, selado com um cimento provisório (Salvas, 1938). Após reconsiderações, a água utilizada para a pasta de perborato foi substituída pelo peróxido de hidrogênio 30% (Spasser 1961; Nutting & Poe, 1963) para melhorar a eficácia do agente clareador.

Alguns estudos observaram não haver diferença significativa na eficácia do perborato de sódio misturado à água ou ao peróxido de hidrogênio. A eficácia clareadora do perborato de sódio mono-, tri- ou tetra hidratado combinado à água ou ao peróxido de hidrogênio não é diferente, pois o peróxido de hidrogênio é o produto da decomposição do perborato de sódio com água (Ari & Üngör, 2002). Entretanto, a primeira mistura pode ter efeito clareador mais demorado, necessitando de várias sessões de clareamento (Attin *et al.*, 2003a).

Devido aos possíveis efeitos adversos produzidos pelas altas concentrações de peróxido de hidrogênio no substrato clareado, este agente tem sido substituído pelo peróxido de carbamida, aplicado sem fonte de calor. Os clareadores à base de altas concentrações de peróxido de carbamida (30-37%) são também indicados para o tratamento clareador intracoronário (Cooper *et al.*, 1992).

5.1 INTERAÇÃO DENTINA VERSUS AGENTES CLAREADORES

Embora tanto o perborato de sódio, como o peróxido de hidrogênio 35% e o peróxido de carbamida 35% sejam eficazes como clareadores intracoronários (Kaneko *et al.*, 2000), esses provocam também conseqüências indesejáveis como aumento da permeabilidade dentinária, mudanças na estrutura do substrato, reabsorções radiculares, microinfiltração marginal, diminuição da resistência adesiva dos compósitos resinosos, e alterações na estrutura química e biomecânica da dentina (Madison *et al.*, 1990; Stokes *et al.*, 1992; Titley *et al.*, 1993; Rotstein *et al.*, 1996; Chng *et al.*, 2002).

Os efeitos indesejáveis da técnica walking bleach são atribuídas ao pH do agente clareador. O peróxido de hidrogênio 30% tem valor de pH entre 2 e 3. Quando 10% H₂O₂ é misturado ao perborato de sódio na proporção 2:1 (g/mL) o pH da mistura é alcalino. Se mais 30% de H₂O₂ é incorporado à mistura, ele torna-se ácido (Kehoe, 1987; Rotstein & Friedman, 1991). Quando uma mistura de 2 g de perborato de sódio e 1 mL de 10-30% H₂O₂ ou água são adicionados, inicialmente um pH neutro ou alcalino é obtido. O pH aumenta com a diminuição da concentração de H₂O₂. O maior pH inicial foi observado quando o perborato de sódio foi misturado à água. O aumento do pH é desejável uma vez que a efetividade do H₂O₂ alcalino tamponado é significativamente maior que a do H₂O₂ não tamponado (Frysh *et al.*, 1995).

A microdureza da dentina clareada com peróxido de hidrogênio 30% diminui quando comparado com o clareamento intracoronário utilizando-se a pasta de perborato de sódio e 30% H₂O₂ (Lewinstein *et al.*, 1994). Além do ataque aos componentes inorgânicos da dentina, devido ao pH dos agentes contendo o H₂O₂ a 30%, a desnaturação das fibras colágenas pode acontecer, devido ao mecanismo de ação desses agentes (Ramp *et al.*, 1987; Lado *et al.*, 1993; Rotstein *et al.*, 1992 e 1996). Geralmente, mudanças na composição ou estrutura do elemento dentário correlacionam-se com a concentração de cálcio e fosfato presentes na apatita. Comparações do conteúdo de cálcio-fosfato no esmalte, dentina e cimento após o tratamento com peróxido de hidrogênio a 30% e perborato de sódio e água foram realizadas e os resultados demonstram que enquanto o peróxido de hidrogênio a 30% é capaz de reduzir significativamente a concentração de cálcio-fosfato nos três substratos, o perborato de sódio e água não produziram alterações significantes na composição química dos três substratos dentais (Rotstein *et al.*, 1992 e 1996).

Acredita-se que mudanças na permeabilidade dentinária devido à terapia clareadora intracoronária pode resultar em contaminação bacteriana dentinária. Tal contaminação pode contribuir com a ocorrência de reabsorções externas (Cvek & Lindvall, 1985). Foi verificado que a utilização do peróxido de hidrogênio a 30% aumenta significativamente a concentração de *Streptococcus faecalis* em comparação ao uso do perborato de sódio com água, pois o mesmo devido ao seu baixo pH é capaz de aumentar o

diâmetro dos túbulos dentinários, aumentando assim a permeabilidade e proporcionando a contaminação bacteriana do substrato (Heling *et al.*, 1995).

Estudos demonstram que o H_2O_2 difunde-se através da raiz, e que essa difusão é maior quando da presença de defeitos radiculares no cimento (Rotstein *et al.*, 1991; Koulaouzidou *et al.*, 1996). Especula-se que a difusão do agente provoca um ambiente ácido que estimula a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea (Vaes *et al.*, 1968; Madison & Walton, 1990; Heller *et al.*, 1992), resultando em reabsorção óssea cervical.

Embora poucos estudos comentem sobre a resistência à fratura da dentina clareada, aparentemente, nenhum aumento na friabilidade da dentina pôde ser verificado após o uso do perborato de sódio com peróxido de hidrogênio a 30% (Glockner *et al.*, 1999). Por outro lado, o peróxido de hidrogênio a 30% foi capaz de alterar as propriedades biomecânicas da dentina significativamente mais que o perborato de sódio misturado à água ou ao peróxido de hidrogênio a 30% (Chng *et al.*, 2004).

A utilização de peróxido de carbamida como substituto do peróxido de hidrogênio em altas concentrações tem sido indicada, pois os agentes a base de peróxido de carbamida a 30-40%, possuem pH neutro e liberam peróxido de hidrogênio menos concentrado (aproximadamente 10% de peróxido de hidrogênio), possivelmente, diminuindo os efeitos adversos provocados pelo peróxido de hidrogênio a 30-35% (Vachon *et al.*, 1998; Chng *et al.*, 2004; Lim 2004).

Embora mais seguro que as altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Lim, 2004), o peróxido de carbamida 35% também pode causar alterações no substrato como diminuição na microdureza (Lewinstein *et al.*, 2004; Chng *et al.*, 2004), e conseqüente alteração nas propriedades mecânicas do substrato, dificultando a união à dentina clareada (Spyrides *et al.*, 2000).

6. METODOLOGIA UTILIZADA

Uma ampla variedade de técnicas são utilizadas ou especialmente desenvolvidas para mensurar as alterações que ocorrem nos tecidos dentais após os tratamentos clareadores. Entre essas, encontram-se testes que quantificam as propriedades

físicas dos substratos como dureza, propriedades ópticas ou de densidade, ou testes que determinam a composição química do substrato estudado (Featherstone *et al.*, 1983).

6.1 MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

A dureza determina a capacidade de deformação do substrato dentário mensurado. No esmalte, os valores de dureza correlacionam-se com a resiliência mecânica do esmalte os quais são definidos pela combinação do conteúdo inorgânico cristalino e da matriz orgânica (proteínas e lipídeos) (Featherstone *et al.*, 1983).

Mudanças na microdureza do esmalte podem ser mensuradas tanto em toda a superfície do substrato (na superfície exposta ao tratamento) como no sentido longitudinal. A primeira técnica (Koulourides *et al.*, 1974) tem a vantagem de ser não-destrutiva e viabiliza uma avaliação no mesmo espécime antes e após o tratamento empregado.

Para determinações da microdureza superficial do esmalte, foi demonstrado haver uma correlação linear entre a penetração de indentação e a perda mineral do tecido, a qual foi confirmada através de análises químicas (Arends *et al.*, 1979). Alguns autores, entretanto, questionam a mensuração da microdureza superficial do esmalte após a remineralização, explicando que este teste pode não ser o mais apropriado para evidenciar a reposição mineral na superfície, uma vez que durante a remineralização, um rearranjo e redistribuição mineral possam ocorrer, dificultando a detecção através da microdureza (Arends & Gelhard, 1983).

Embora algumas limitações possam ser atribuídas à mensuração da microdureza superficial, este ensaio mecânico continua como o mais indicado para determinações do conteúdo mineral dos substratos duros, devido à sua correlação linear com o conteúdo mineral destes tecidos (Davidson *et al.*, 1973; Davidson *et al.*, 1974; Koulourides *et al.*, 1974; Purdell-Lewis *et al.*, 1976; Turtola, 1977; Gelhard *et al.*, 1979; Arends *et al.*, 1980; Featherstone *et al.*, 1983).

6.2 MICRODUREZA DO ESMALTE SECCIONADO LONGITUDINALMENTE (MICRODUREZA INTERNA).

Uma das limitações da microdureza de superfície está relacionada à localização das indentações realizadas no substrato dentário. Nesta técnica, as indentações são realizadas na superfície do substrato, portanto, não pode ser utilizada para fornecer detalhes das mudanças da microdureza na subsuperfície nem em diferentes zonas do corpo da lesão (Featherstone *et al.*, 1983).

Dessa maneira, estudos foram realizados para correlacionar a microdureza interna com o conteúdo mineral da subsuperfície do esmalte tratado. Em experimentos utilizando essa técnica, foi observado que a microdureza interna está diretamente relacionada com a concentração de cálcio local no substrato (Davidson *et al.*, 1974). Essa relação foi comprovada através da correlação entre os valores de microdureza interna e mensuração do conteúdo mineral fornecido pela microrradiografia de contato (Featherstone *et al.*, 1983). A microrradiografia fornece uma determinação quantitativa da densidade mineral observada através do raio-X (Featherstone *et al.*, 1983; Mellberg, 1992).

6.3 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

A microscopia de luz polarizada é capaz de evidenciar os estágios mais precoces do processo de desmineralização. É considerada uma técnica altamente simples, precisa e adequada para avaliação das alterações no esmalte frente a diferentes tratamentos, especialmente, da avaliação dos processos cariosos (Silverstone, 1973; Ten Bosch & Angmar-Mansson, 1991; Arends & Ten Bosch, 1992; Gilmour & Edmunds, 1998).

Através da análise do conteúdo mineral em microrradiografias foi constatada a correlação linear entre os valores de refração óptica e o conteúdo mineral calculado. Tal correlação evidencia o conteúdo inorgânico do esmalte. A microscopia de luz polarizada permite a observação de pelo menos 4 zonas pertencentes à lesão de cárie (Moreno & Zahradnik, 1974).

Polarização é utilizada na observação de materiais que sejam birrefringentes (estruturas anisotrópicas, com índices diferentes de refração como músculo, ossos, celulose, fibras, cabelos, cristais, etc.). O microscópio de polarização possui dois

prismas: um polarizador e outro analisador. A luz ao penetrar em estruturas como as citadas se desdobra em duas. O prisma deixa passar uma das vibrações luminosas mas não a outra, de modo que as estruturas que forem isotrópicas serão canceladas e no seu lugar ficará escuro. As estruturas anisotrópicas produzirão um tipo de vibração luminosa que passará e deixará a estrutura brilhante e o restante do material escuro.

6.4 ESPECTROSCOPIAS

Métodos químicos também podem ser utilizados para a determinação do conteúdo mineral dos substratos dentais, em especial, para a mensuração do cálcio e fósforo. Esses métodos podem ser feitos por biópsia do esmalte através da remoção da camada mais superficial do substrato por um ácido ou desgaste mecânico, ou mensurando-se os componentes da solução na quais as amostras foram inseridas.

A concentração de cálcio é geralmente avaliada por espectrometria de emissão atômica, enquanto a concentração de fósforo em solução pode ser avaliada por colorimetria (ou espectrofotometria) (Fiske & Subarrow, 1925) ou através de outros métodos espectrométricos que determinam a concentração de fosfato diretamente na superfície do substrato tratado (Arends & Ten Bosch, 1992).

6.4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (ERTF) é utilizada para a determinação da composição química molecular dos materiais e substratos e para obtenção da informação estrutural através da análise da vibração molecular das moléculas ativas ao laser Raman (Suzuki *et al.*, 1991). Uma das grandes vantagens da ERTF é que, diferentemente da grande maioria de análises químicas, os espécimes não sofrem qualquer tipo de tratamento laboratorial, constituindo assim, uma análise não-destrutiva (Tsuda & Arends, 1993).

A Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (ERTF) envolve a incidência da luz do laser monocromático na amostra analisada. O laser é capaz de excitar as moléculas Raman-ativas, provocando nessas, a migração dos elétrons das órbitas mais externas para as mais próximas ao núcleo atômico. Após excitação dos

elétrons, os mesmos perdem energia e retornam às camadas originais, liberando a energia recebida através de fótons, que são transformados em espectros. Os espectros são matematicamente convertidos através da equação transformada de Fourier e valores de intensidade de vibração molecular são apresentados para as moléculas ativas (Tsuda & Arends, 1993). A vibração molecular proposta para o esmalte é baseado em análises previamente realizadas. O PO_4 (fosfato), molécula Raman-ativa, ligado ao cristal de hidroxiapatita, possui pico a 961cm^{-1} (Xu *et al.*, 1997).

6.4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Espectroscopia de absorção atômica é o método de análise analítica usado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais na amostra analisada. O método consiste em determinar a presença e quantidade de um determinado metal em uma solução qualquer, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta por parte dos elétrons que, ao sofrerem um salto quântico depois de devidamente excitados por uma chama de gás acetileno a 3.000°C , esses devolvem a energia recebida para o meio, voltando assim para a sua camada orbital de origem (Vogel, 1992).

A energia devolvida na forma de um fóton de luz, por sua vez, absorve a radiação ultravioleta emitida pela fonte específica (Cátodo ôco) do elemento químico em questão. Dessa forma, elétrons que estão contidos na solução, e que sofrem também um salto quântico, mas que não pertencem ao mesmo elemento que constitui o cátodo ôco, não serão capazes de causar uma interferência, isso porque absorverão apenas radiação com comprimento de onda referente ao elemento químico do qual fazem parte (Senise, 1983, Vogel, 1992).

6.4.3. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO DE LUZ

A espectrofotometria é o método de análise óptica mais usada nas investigações biológicas e fisico-químicas. O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida da mesma substância (Vogel, 1992).

Todas as substâncias podem absorver energia radiante, mesmo o vidro que parece completamente transparente absorve comprimentos de ondas que pertencem ao espectro visível. A água absorve fortemente na região do infravermelho. A absorção das radiações ultravioletas, visíveis e infravermelhas dependem das estruturas das moléculas, e é característica para cada substância química (Senise, 1983). Quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida: a energia radiante não pode produzir nenhum efeito sem ser absorvida. A cor das substâncias se deve a absorção de certos comprimentos de ondas da luz branca que incide sobre elas, deixando transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de ondas não absorvidos. O instrumento usado na espectroscopia UV/VIS é chamado de espectrofotômetro. Para se obter informação sobre a absorção de uma amostra, ela é inserida no caminho óptico do aparelho. Então, luz UV e/ou visível em um certo comprimento de onda (ou uma faixa de comprimentos de ondas) é passada pela amostra. O espectrofotômetro mede o quanto de luz foi absorvida pela amostra. A intensidade da luz antes de passar pela amostra é simbolizada por I_0 , e a intensidade da luz depois de passar pela amostra é simbolizada por I . A transmitância da amostra é definida pela razão (I / I_0), a qual normalmente é expressa em porcentagem de transmitância (%T). A partir dessa informação, a absorbância de ambos é determinada para esse certo comprimento de onda ou como uma função de uma faixa de comprimentos de onda (van de Hulst, 1996). Apesar das amostras poderem ser sólidas (ou mesmo gasosas) elas usualmente são líquidas. Uma cela transparente (ou seja, que não absorve radiação na faixa de comprimentos de onda usado), comumente chamada de *cubeta*, é enchida com a amostra líquida e inserida no espectrofotômetro. O caminho óptico L pela amostra é então a largura da cubeta. A espectroscopia no ultravioleta requer cubetas especiais feitas de um material que (ao contrário do vidro) não absorva luz UV, como o quartzo (van de Hulst, 1996).

6.5 ELETRODO ÍON –SELETIVO

Para a análise da concentração de flúor, a técnica do eletrodo íon-seletivo é comumente usada nas determinações do íon em soluções (Tenuta *et al* 2005, Paes Leme *et al.*, 2003).

O eletrodo íon-seletivo consiste basicamente em uma pequena câmara, contendo um eletrodo inerte, envolto num eletrólito e que se comunica com a solução externa (que será medida), por uma membrana que permite a passagem apenas do íon que será analisado. Estas membranas podem ser de plástico especial (por exemplo, para medir oxigênio dissolvido ou CO₂), de vidro especial (pH), ou de cristais especiais (cloreto, fluoreto (Abudhaise & Abuomar, 1998).

6.6 MICROTRAÇÃO

Os ensaios mecânicos atualmente utilizados para determinação da resistência de união dos compósitos às estruturas dentais, compreendem basicamente duas formas principais: a resistência à tração e a resistência ao cisalhamento. Embora ambos os testes tenham sua aplicabilidade *in vitro*, clinicamente, a simulação das forças exercidas num dente ou restauração quando em função na cavidade bucal são muito complexas em sua natureza. Observa-se, dessa maneira, que nem o teste de tração nem o de cisalhamento pode realizar uma simulação ideal (Van Noort *et al.*, 1989).

No teste de cisalhamento, uma força gradual é aplicada paralelamente às superfícies aderidas até que ocorra o deslocamento. Entretanto, dependendo dos dispositivos utilizados, este teste pode ser transformado num teste de clivagem ou dobramento (Sudsangiam & Van Noort, 1999).

Um importante aspecto relativo aos testes de resistência adesiva é o modo como ocorre a ruptura do conjunto unido. As rupturas podem ser adesivas (100% localizadas na interface de união), coesivas (100% da fratura em algum dos substratos) ou uma mistura de ambas. Uma vez que a evolução dos materiais e técnicas adesivas permitiu valores de resistência adesiva cada vez maior, os baixos valores obtidos durante o ensaio de cisalhamento são recriminados, devido a ocorrência de um grande percentual de falhas do tipo coesiva em dentina ou resina (Sudsangiam & Van Noort, 1999).

Foi verificado que devido à grande área adesiva ocupada pela resina restauradora, falhas coesivas ocorram devido à presença de defeitos ou de pequenas áreas concentradoras de estresse na interface ou nos substratos envolvidos. Com a aplicação da tensão (cisalhamento ou tração), estas áreas iniciariam a propagação da fratura (Sano *et al.*,

1994; Pashley *et al.*, 1996). Como as tensões não se distribuem de maneira uniforme ao longo do conjunto, os valores obtidos seriam muito baixos em relação à real resistência da interface adesiva (Sudsangiam & Van Noort, 1999).

Com o objetivo de permitir a avaliação da adesão em diferentes regiões da superfície dentinária, um novo tipo de teste foi criado (Pashley *et al.*, 1995), que consiste num teste de microtração, realizado em espécimes com pequenas áreas adesivas (aproximadamente 1mm²).

O ensaio mecânico de microtração permite avaliar a resistência adesiva em regiões do dente afetadas por cáries ou por outras alterações como esclerose ou lesões de erosão. Outra vantagem do teste é a possibilidade de avaliação de regiões alteradas por degradação ou fadiga ao longo do tempo (Reis *et al.*, 2004). Uma das melhores características descritas pelo ensaio de microtração foi o estabelecimento da relação inversamente proporcional entre a resistência à tração e a área adesiva. Uma grande área adesiva permite a incorporação de defeitos do material testado, aumentando a concentração de fadiga nas regiões com defeitos e aumentando a possibilidade de faturas coesivas (Pashley *et al.*, 1995). O ensaio de microtração proposto confirma a teoria de Griffith (Griffith, 1920) postulada para materiais de natureza frável, a qual estabelece que quando materiais uniformes são submetidos à tração, a resistência decresce com o aumento do tamanho do espécime.

Como a área adesiva dos espécimes utilizados nos ensaios de microtração é extremamente reduzida, com menor presença de defeitos e melhor distribuição de fadiga, a maioria das falhas que ocorrem são de natureza adesiva (Sano *et al.*, 1994; Pashley *et al.*, 1995; Shono *et al.*, 1997).

6.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

O microscópio eletrônico é um aparelho com potencial de aumento muito maior que o óptico. Foi inventado em 1932 e vem sendo aperfeiçoado desde então. A diferença básica entre o microscópio óptico e eletrônico é que neste último não é utilizada a luz, mas sim, feixes de elétrons. No microscópio eletrônico não há lentes de cristal e sim bobinas, chamadas de lentes eletromagnéticas. Estas lentes ampliam a imagem gerada pela passagem

do feixe de elétrons no material e a projetam sobre uma tela, onde é formada uma imagem de pontos mais ou menos brilhantes, semelhante à de um televisor em branco e preto. Não é possível observar material vivo neste tipo de microscópio. O material a ser estudado passa por um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em resinas especiais de acordo com o microscópio utilizado, que permitem cortes ultrafinos obtidos através das navalhas de vidro do instrumento conhecido como ultramicrotomo. Para observação dos substratos dentinários, os microscópios eletrônicos mais utilizados são o de varredura ou M.E.V (capaz de produzir imagens de alta ampliação) para a observação de superfícies e o de transmissão, que é usado para a observação de cortes ultrafinos (Perdigão *et al.*, 1999; Van Meerbeek *et al.*, 2000)

6.7.1 MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

O microscópio eletrônico de transmissão é semelhante ao microscópio óptico, apesar de muito maior e invertido. A fonte de iluminação é um filamento ou cátodo que emite elétrons do topo de uma coluna cilíndrica de cerca de 2 metros de altura. Sendo os elétrons espalhados através de colisão com as moléculas de ar, primeiramente o ar tem que ser bombeado para fora da coluna para criar vácuo. Os elétrons são então acelerados a partir do filamento por um ânodo e atravessam um pequeno orifício formando um feixe de elétrons que desce pela coluna. Bobinas magnéticas, colocadas ao longo da coluna, convergem o feixe de elétrons assim como as lentes de vidro convergem a luz em um microscópio óptico. A amostra é colocada no vácuo, através de uma câmara de compressão, na trajetória do feixe de elétrons. Alguns dos elétrons que atravessam a amostra são espalhados pelas estruturas coradas e o restante é convergido para formar uma imagem de forma análoga ao processo de formação de uma imagem no microscópio óptico em uma placa fotográfica ou em uma tela fosforescente. Devido ao fato dos elétrons dispersos se desviarem do feixe, as regiões densas da amostra são destacadas como áreas de fluxo reduzido de elétrons, as quais mostram-se escuras (Williams, 1996; Van Meerbeek *et al.*, 2000).

6.8 NANOINFILTRAÇÃO

A adesão aos tecidos dentários pode ser obtida com a utilização de agentes adesivos que promovem um embricamento micromecânico, em esmalte e dentina (Reis *et al.*, 2004). Embora a adesão ao esmalte dependa da retenção mecânica dos “tags” resinosos à superfície de esmalte condicionada, a adesão à dentina depende da infiltração dos monômeros sintéticos adesivos num substrato biológico rico em colágeno para a formação da camada híbrida (Nakabayashi *et al.*, 1991).

A adesão ao substrato dentinário pode ser obtida a partir do condicionamento ácido que remove completamente a smear layer e desmineraliza a subsuperfície intacta da dentina até uma profundidade de 3 a 6 µm (Perdigão *et al.*, 1996). Entretanto, essa técnica pode ser considerada sensível devido à possibilidade de incompleta infiltração da resina na trama colágena quando a mesma encontra-se excessivamente seca ou úmida (Tay *et al.*, 1996; Ferrari & Tay, 2003). A infiltração incompleta da resina e evidências de separação de fase no adesivo dentinário e seus efeitos adversos na adesão ao longo do tempo, têm sido demonstrado por vários autores (Spencer & Swafford, 1999; Spencer *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2002).

O termo nanoinfiltração foi primeiramente descrito como sendo a impregnação de grãos de nitrato de prata nas porosidades da camada híbrida que não haviam sido propriamente infiltradas pelo adesivo (Sano *et al.*, 1994, 2006). Mais recentemente, um segundo conceito de nanoinfiltração foi descrito na interface dentinária (Li *et al.*, 2000; Tay *et al.*, 2003). A prata foi identificada não apenas nas porosidades da camada híbrida, mas também na camada de adesivo (Tay *et al.*, 2003). Essa nanoinfiltração pode acontecer devido a áreas nas quais a água não foi completamente removida e é uma manifestação do fenômeno “water treeing”. Esse conceito pode explicar a degradação dos polímeros quando aplicados ao substrato dentinário (Li *et al.*, 2000; Tay *et al.*, 2003). A nanoinfiltração revela os defeitos da interface resina-dentina, o qual pode ser o caminho da degradação do material ao longo do tempo (Sano *et al.*, 2006).

3. PROPOSIÇÃO

Os trabalhos apresentados foram divididos em duas partes, de acordo com os substratos analisados. A Parte A, refere-se ao estudo dos agentes clareadores no esmalte humano e foi subdividida em dois estudos que analisam os efeitos desses agentes no tecido hígido e com lesão de cárie subsuperficial. A Parte B refere-se aos efeitos de agentes clareadores para tratamento intracoronário no substrato dentinário bovino hígido e pré-condicionado e apresenta-se subdividida em dois estudos distintos:

Parte A: Efeitos dos agentes clareadores no esmalte dentário.

Avaliar a microdureza de superfície do esmalte, a concentração de cálcio, fósforo inorgânico, fluoreto, pH da solução de enxágüe, a microdureza interna e a morfologia do substrato após o tratamento do esmalte hígido (**Estudo A.1**) ou com lesão de mancha branca (**Estudo A.2**) com agentes clareadores à base de peróxido de carbamida 10% com ou sem flúor e cálcio.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

Estudo B.1: Avaliar a resistência máxima à tração (RMT) da dentina bovina hígida e pré-condicionada e suas características estruturais em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), após o tratamento clareador intracoronário.

Estudo B.2: Avaliar a resistência de união de um sistema adesivo à dentina hígida e pré-condicionada tratada com agentes clareadores intracoronários, imediatamente, 7 dias e 14 dias após o tratamento. Adicionalmente, a região da união será avaliada através de avaliação de nanoinfiltração, para determinar a integridade da interface dentina-compósito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Parte A: Efeitos dos agentes clareadores no esmalte dentário.

O delineamento experimental do **Estudo A.1**, encontra-se descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Delineamento experimental do **Estudo A.1** (Fatorial complexo tipo Split-Plot).

Fatores em estudo	1.Tratamento	<u>6 Níveis</u> <ul style="list-style-type: none"> • Placebo (PLA) • Whiteness 10% (WHI) (FGM, Joinville, SC, Brasil) • 10% Peróxido de carbamida+ 0,5% Flúor (F) • 10% PC + 0,2% Cálcio (Ca) • Opalescence 10% (OPA) (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) • Pola Night 10% (PN) (SDI Limited, Victoria, Austrália)
	2. Tempo	<u>3 Níveis</u> <ul style="list-style-type: none"> • 1° dia • 6° dia • 12° dia
Unidades experimentais:	Hemi-coroas de terceiros molares humanos erupcionados.	
Variável resposta	<ul style="list-style-type: none"> • Microdureza de superfície do esmalte; • Análise da concentração de fosfato no esmalte; • Análise da concentração de cálcio na solução de enxágüe; • Análise da concentração de flúor na solução de enxágüe; • Análise da concentração de fósforo inorgânico na solução de enxágüe; • Análise do pH da solução de enxágüe; • Microdureza interna; • Microscopia de luz polarizada. 	

1. LIMPEZA E PREPARO DAS AMOSTRAS

O estudo apresentado foi sujeito à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (**Anexo 3**). Foram utilizados 40 terceiros molares humanos, armazenados em timol 0,1%, por não mais que 3 meses. Os dentes foram limpos com curetas periodontais e jato de bicarbonato de sódio, para total remoção de debris.

As raízes dos molares foram removidas através de um corte transversal localizado dois milímetros abaixo da junção amelo-dentinária, realizado com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) (**Fig. 1a**). O disco diamantado dupla face foi também utilizado para a realização de um corte no sentido méso-distal na coroa dos terceiros molares, para a secção da coroa em duas hemi-coroas. Os dentes foram novamente limpos em cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner 14400 – Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e a face interna (dentinária) das hemi-coroas foram fixas em placas de acrílico com cera pegajosa e cola adesiva (Superbond –Loctite, Itapevi, SP, Brasil), sendo que a face vestibular ou lingual permaneceu paralela à base da placa. As placas de acrílico com os dentes fixados foram levados à cortadeira de precisão (Isomet-Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e secções de aproximadamente 4 mm foram realizados na face vestibular ou lingual, nos sentidos méso-distal e cérvico-incisal (**Fig. 1b**). De cada hemi-coroa, foi obtido um bloco com área de $\pm 16 \text{ mm}^2$ (**Fig. 1c**). Os blocos dentais foram removidos da placa de acrílico e o excesso de cera pegajosa e cola, limpos com o auxílio de um instrumento cortante (Paes Leme *et al.*, 2003).



Figura 1: Remoção das raízes dos terceiros molares (**a**); Cortadeira metalográfica utilizada para obtenção dos blocos de esmalte(**b**); blocos obtidos com área aproximada de 16 mm^2 (**c**).

1.1 PLANIFICAÇÃO DA DENTINA

A face vestibular ou lingual de cada amostra foi, por sua vez, posicionada na placa de acrílico com o auxílio de cera pegajosa, e a dentina foi planificada com auxílio de lixa de óxido de alumínio na granulação 600. O espécime teve espessura mínima de 3 mm, determinado por um paquímetro digital. A planificação da dentina permitiu que o esmalte permanecesse perpendicular à penetração realizada pelo diamante KNOOP, durante o ensaio de dureza.

1.2 PLANIFICAÇÃO E POLIMENTO DO ESMALTE

O bloco foi invertido na placa de acrílico e a dentina foi então fixada com cera pegajosa, permanecendo a superfície do esmalte exposta. A superfície de esmalte exposta foi abrasionada com lixas de óxido de alumínio nas granulações # 600, 800, 1000 e 1200, e polida com pastas de diamante de granulações 6 μm , 3 μm , 1 μm e $\frac{1}{4}$ μm , em politriz elétrica (Arotec, Cotia, SP, Brasil), para possibilitar a análise da microdureza de superfície do substrato (**Fig. 2**).

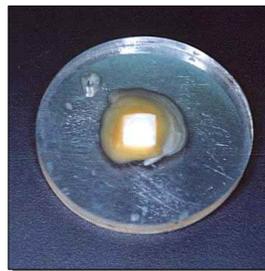


Figura 2: Espécime polido e planificado fixado em disco de acrílico.

2. ANÁLISES PRELIMINARES

2.1 MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE

Os espécimes (80) foram identificadas e fixadas em discos de acrílico com cera pegajosa, sendo que a superfície do esmalte (superfície teste) permaneceu paralela à base do acrílico, viabilizando a realização do ensaio de microdureza. Cada espécime foi isolado com esmalte para unhas (2 camadas), deixando exposta apenas a superfície do esmalte central, polida (**Fig. 3**) (Paes Leme *et al.*, 2003).

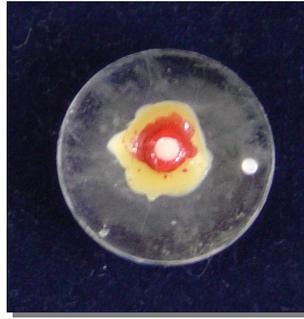


Figura 3: Amostra fixada em placa de acrílico com a região central isolada com esmalte de unha (área exposta = 7 mm²).

A microdureza da superfície foi obtida através de 5 impressões na região central do bloco, com penetrador tipo Knoop (Future Tech-FM-1e, Tokyo, Japan), com carga estática de 25 gramas por 5 segundos e com 100 μm de distância entre elas (Paes Leme *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005) (**Fig. 4**).

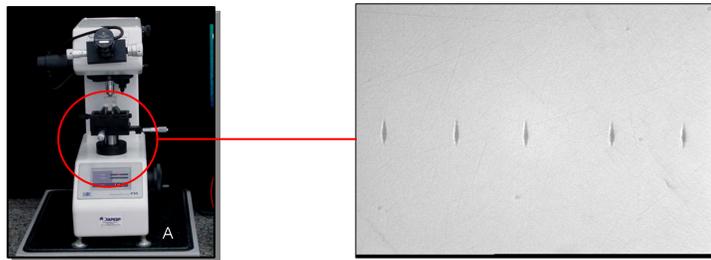


Figura 4: Microdurômetro utilizado para determinação da microdureza de superfície (penetrador tipo Knoop). Visualização das identações iniciais realizadas nas amostras.

Os valores obtidos durante o ensaio de microdureza foram então transformados em KHN (número de dureza Knoop) através da fórmula:

$$\text{KHN} = \frac{14,23 \times 10^3 \times C}{a^2}$$

C = carga estática (em g)
a = comprimento da indentação

Através da determinação da microdureza, foram selecionados 60 blocos de esmalte que possuíam valores de dureza de 422 ± 64 (+ ou - 15% da média geral obtida). Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA – um fator) dos dados obtidos. Uma vez que todos os grupos apresentaram semelhança entre si (p>0,05), os espécimes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais (**Tabela 1**).

Tabela 1: Grupos experimentais e composição dos géis clareadores (n=10).

<i>Géis clareadores</i>	<i>Composição</i>
	<p>Gel placebo (PLA) *: Água destilada, Carbopol 940 e glicerina (C₃H₈O₃).</p>
	<p>Whiteness 10% (WHI) - (FGM) – Peróxido de carbamida 10%, água destilada, carbopol, glicol, íons potássio.</p>
	<p>10%Peróxido de Carbamida + 0,5% de flúor (F) - (FGM)*: Peróxido de carbamida 10%, água destilada, carbopol, glicol, nitrato de potássio e fluoreto de sódio (NaF – Anexo 1).</p>
	<p>10% Peróxido de Carbamida + 0,2% Cálcio (Ca) – (FGM)*: Peróxido de carbamida 10%, glicol, carbopol, água destilada, nitrato de potássio e cloreto de cálcio (Anexo 1)</p>
	<p>Opalescence 10% (OPA)- (Ultradent Products) - Peróxido de carbamida 10%, glicerina, carbopol, água destilada e íons fluoreto (Anexo 1).</p>
	<p>Pola Night 10% (PN)- (SDI) - Peróxido de carbamida 10%, água destilada, íons fluoreto (Anexo 1), estabilizantes e espessantes.</p>

*Agentes clareadores formulados pela indústria FGM Produtos Odontológicos (Joinville, SC). Formulações de acordo com dados fornecidos pelos fabricantes.

Anexo 1: Dosagens das concentrações de cálcio, flúor, fósforo inorgânico e pH dos agentes clareadores.

Os géis clareadores, principalmente aqueles contendo 0,5% F e 0,2% Ca, foram selecionados a partir de estudos prévios (de Oliveira *et al.*, 2005).

2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN COM TRANSFORMADA DE FOURIER INICIAL (ERTF).

Após a microdureza de superfície e seleção dos espécimes, esses foram submetidos à primeira análise em ERTF antes do início do clareamento dental. Cinco elementos de cada grupo foram utilizados para a determinação da concentração de fosfato na superfície do esmalte (RFS 100/S – Bruker Inc., Karlsruhe, Germany). Os espectros obtidos de cada elemento dental antes e após o tratamento clareador foram obtidos com um detector diodo refrigerado por nitrogênio (N₂) líquido. Para vibração das moléculas Raman-ativas, uma fonte de laser Nd:YAG resfriado foi utilizado. A incidência máxima do laser na superfície do espécime foi de 100 mW e a resolução do espectro foi de 4 cm⁻¹. Os dentes foram posicionados no espectrofotômetro, presos à placa de acrílico e a incidência do laser ocorreu na região mais central do espécime. As lentes IR354 coletaram a radiação espalhada até 180° da superfície exposta. Os espectros do ERTF foram obtidos após 100 escaneamentos da superfície exposta. A frequência explorada variou de 300 a 4,000 cm⁻¹ e permitiu a caracterização tanto dos constituintes minerais (hidroxiapatita) quanto dos constituintes orgânicos (colágeno essencial) (Steiner-Oliveira *et al.*, 2006).



Figura 5: Espectroscópio Raman com Transformada de Fourier (a); visualização do compartimento interno do aparelho (b) e das lentes IR354 que coletam a radiação laser (c).

3. TRATAMENTO CLAREADOR

Para o tratamento clareador e coleta da solução de enxágüe, os espécimes foram removidos dos discos de acrílico e posicionados na extremidade de fios de aço inoxidável fixados em recipientes individuais. A face de dentinária que permaneceu em contato com o disco de acrílico foi também vedada com duas camadas de esmalte de unha para que apenas a superfície de esmalte selecionada permanecesse exposta (**Fig. 6b**). O tratamento clareador foi realizado durante 12 dias consecutivos, por 6 horas diárias. A cada aplicação, uma quantidade aproximada de 0,01 g do gel era aplicada na superfície do corpo de prova, cobrindo toda a área exposta do esmalte com o agente clareador (**Fig 6a**).

Durante o clareamento, os espécimes eram armazenados em estufa a 37° C, em umidade relativa. Decorridas as 6 horas de tratamento, a superfície era abundantemente lavada com água destilada e deionizada (**Fig. 6b**) (com exceção do 1°, 6° e 12° dia de tratamento clareador) e os espécimes eram novamente armazenados em recipientes contendo 22 mL de solução remineralizante (Shinkai *et al.*, 2001) em estufa, até a próxima aplicação do clareador (**Fig. 6c**).

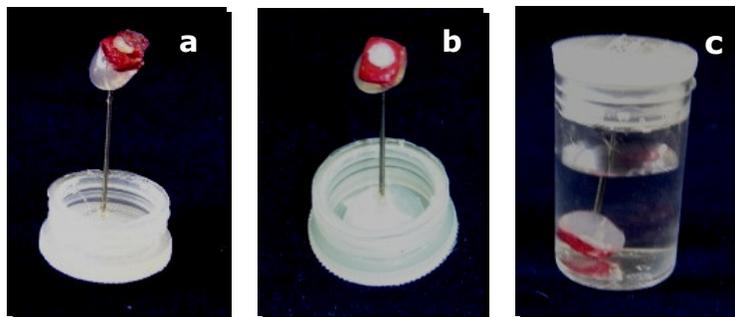


Figura 6: Gel clareador cobrindo a superfície exposta do esmalte (**a**); Espécime após lavagem abundante (**b**) e imersão em solução remineralizante (**c**).

4. COLETA DA SOLUÇÃO DE ENXÁGÜE

No 1°, 6° e 12° dias de clareamento, a solução de enxágüe obtida da superfície de esmalte foi coletada para análise da concentração de cálcio (Ca^{+2}), fluoreto (F⁻), fósforo inorgânico (Pi) e pH através dos métodos de espectroscopia de absorção atômica, íon-eletrodo seletivo, colorimetria (Pi), e medidor de pH respectivamente.

Especialmente nesses dias (1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador), os géis eram individualmente pesados antes do início do clareamento, para que a concentração iônica pudesse ser determinada através da massa do gel clareador (**Fig. 7a e 7b**). Após a mensuração da massa, os corpos de prova permaneceram 6 horas com o gel clareador na superfície.

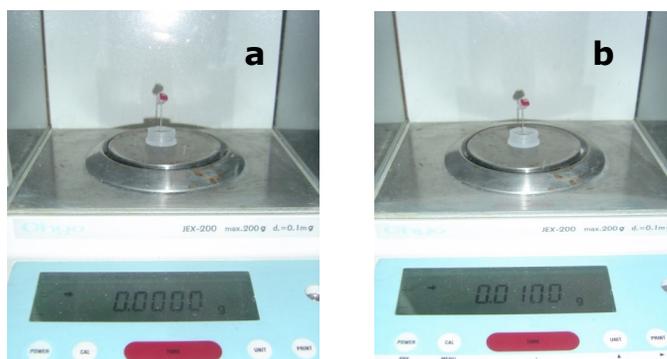


Figura 7: (a) Antes da aplicação do gel na superfície dental e após a aplicação (b), especificamente no 1º, 6º e 12º dias de clareamento.

Após o clareamento, todos os espécimes foram posicionados em seus respectivos recipientes contendo 1 mL de água destilada e deionizada (solução de enxágüe) (**Fig. 8**). Os recipientes fechados foram sonicados em banho de ultrassom durante 1 minuto. A cuba ultrassônica continha 1000 mL de água com as amostras posicionadas na região central do aparelho (Nascentes *et al.*, 2001) (**Fig. 9a,b**) para melhor separação do gel da superfície do esmalte. Após sonicados, os tubos foram agitados em agitador de tubos (AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) durante 30 segundos (**Fig. 10**).



Figura 8: Espécime com gel clareador imerso em 1 ml de água destilada.

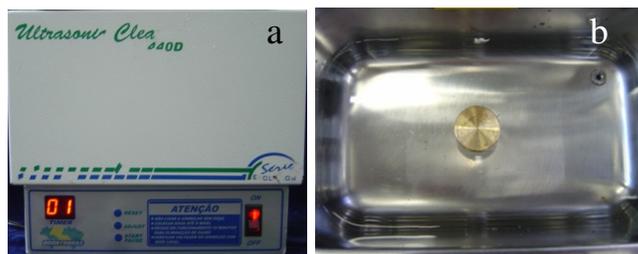


Figura 9: (a) Cubo ultrassônica utilizada; (b) espécime posicionado no centro da cuba.



Figura 10: Agitador de tubos.

Após sonicar e agitar os espécimes, os mesmos foram removidos dos recipientes (contendo 1 mL de água destilada) e recolocados, nos recipientes contendo 22 ml de solução remineralizante (Shinkai *et al.*, 2001) (**Fig. 6c**).

5. ANÁLISES QUÍMICAS DA SOLUÇÃO DE ENXÁGÜE.

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.

A determinação de cálcio foi realizada em espectrofotometria de absorção atômica (Spectra A 50, Varian Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado (2,0 a 8,0 ppm). Para a realização da leitura, utilizou-se o lantânio nas soluções de enxágüe, o qual suprime a interferência de fosfato, por um processo no qual os constituintes de uma amostra são decompostos e convertidos em partículas atômica (Paes Leme *et al.*, 2003, Tenuta *et al.*, 2006)

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR.

A concentração de flúor (F) foi determinada usando-se um eletrodo específico (Orion 96-09, Orion Research Inc., Beverly, MA, EU) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-940, Orion Research Inc., Beverly, MA, EU), previamente calibrado. Para os géis clareadores contendo alta concentração de flúor (0,5%) foi realizada curva de calibração com padrões de 0,5 a 8 ppm F preparados em TISAB II, pH 5,0. Para os géis clareadores contendo baixas concentrações de flúor foi realizada curva de calibração com padrões de 0,01562 a 0,5 ppm F preparados em TISAB III, pH 5,0 (Tenuta *et al.*, 2006).

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO.

A determinação de fósforo inorgânico (Pi) dos géis clareadores foi determinada através do método colorimétrico previamente descrito por Fiske & Subarrow (1925). O carbopol presente amostras foi inicialmente decomposto para evitar-se interferências durante a leitura de fósforo inorgânico. Para a decomposição, a solução de enxágüe foi dispensada em béquers de vidro (5 mL) e acrescentado 500µl de ácido sulfúrico à solução de enxágüe. Os tubos contendo a solução de enxágüe e o ácido foram mantidos por aproximadamente 2 minutos em chapa de aquecimento (50°C). Após total decomposição da

solução de enxágüe (da cor branco leitoso para translúcido), realizou-se a leitura do fósforo inorgânico em espectrofotômetro de absorção de luz (Beckman DU-70, Cambridge Scientific Products, Cambridge, MA, EU), com comprimento de onda calibrado em 660 nm, e padrões de 0,3 a 4,8 µg de fosfato/mL (Tenuta *et al.*, 2006).

5.4 DETERMINAÇÃO DO pH DAS SOLUÇÕES DE ENXÁGÜE.

A determinação do pH das soluções de enxágüe foi realizada imediatamente após o término do tratamento clareador para que não houvesse alteração na solução devido ao armazenamento. Foi utilizado o medidor de pH (Equilam, Diadema, SP, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e pH 7 (Dezotti *et al.*, 2002).

Além da determinação da concentração de cálcio, flúor, fósforo inorgânico e análise do pH das soluções de enxágüe obtidas da superfície do esmalte foi determinada também a concentração desses íons e o pH dos agentes clareadores.

6. ANÁLISES DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE DURANTE E APÓS TRATAMENTO CLAREADOR

6.1 DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE.

Durante os 12 dias de tratamento clareador, a microdureza de superfície foi determinada nos mesmos dias que em foram coletados os géis clareadores da superfície dental (1º, 6º e 12º dias). As determinações de microdureza foram realizadas na região central do espécime a 100 µm das identações previamente realizadas, com carga estática de 25g durante 5 segundos.

6.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN COM TRANSFORMADA DE FOURIER APÓS TRATAMENTO CLAREADOR.

Após o tratamento clareador e realização do ensaio de microdureza final, foi realizada nova leitura da concentração de fosfato presente na superfície do esmalte em Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (ERTF).

7. DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA INTERNA.

Para a realização da microdureza de secção transversa (interna), os espécimes foram seccionados na região central com disco diamantado e as metades obtidas foram incluídas em resina acrílica (**Figura 11**).



Figura 11: Espécimes incluídos em resina acrílica.

A região interna da amostra foi submetida ao acabamento com lixas d'água de granulação # 600, 1000 e 1200 e polimento com pastas de diamante e discos de feltro (1 e $\frac{1}{4}$ μm). Após o polimento, foram realizadas identificações nas profundidades 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μm a partir da superfície do esmalte. A cada profundidade, 3 identificações foram realizadas com distância de 100 μm entre elas. As médias obtidas em dureza Knoop foram transformadas em Delta Z e estatisticamente analisadas (Paes Leme *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2005).

8. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.

Os mesmos espécimes incluídos em resina acrílica utilizados para mensuração da microdureza interna, foram empregados para esta análise. Os discos de acrílico foram seccionados em cortadeira de precisão para obtenção de uma fatia de aproximadamente 2 mm da superfície mais externa da amostra (**Figura 12**).

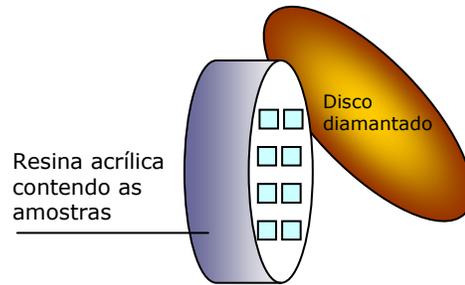


Figura 12: Desenho esquemático do corte dos espécimes para o preparo para a microscopia de luz polarizada.

A fatia de acrílico com as amostras incluídas, foi abrasionada manualmente com lixas d'água de granulação # 600, 1000 e 1200 até a obtenção de fatias com espessura de 100 μm ($\pm 10 \mu\text{m}$) Estas foram observadas em microscópio de luz polarizada, em magnificação de 200x (DMLS, Leica Chatsworth, CA, EU), após imersão do espécime em uma gota de água destilada. Imagens digitais foram preparadas e as profundidades das alterações no conteúdo mineral foram mensuradas em cinco posições com o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics) (Hara *et al.*, 2005).

Parte A: Efeitos dos agentes clareadores no esmalte dentário.

O delineamento experimental do **Estudo A.2**, encontra-se descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Delineamento experimental do **Estudo A.2** (Fatorial complexo tipo Split-Plot).

Fatores em estudo	Tratamentos	<u>6 níveis</u> <ul style="list-style-type: none"> • Placebo (PLA) • Whiteness 10% (WHI) (FGM) • 10% Peróxido de carbamida + 0,5% Flúor (F) • 10% PC + 0,2% Cálcio (Ca) • Opalescence 10% (OPA) (Ultradent) • Pola Night 10% (PN) (SDI)
	Tempo	<u>3 níveis</u> <ul style="list-style-type: none"> • 1º dia • 6º dia • 12º dia
Unidades experimentais:	Hemi-coroas de terceiros molares humanos erupcionados com lesão de cárie subsuperficial.	
Variável resposta	<ul style="list-style-type: none"> • Microdureza de superfície do esmalte; • Análise da concentração de fosfato no esmalte; • Análise da concentração de cálcio na solução de enxágüe; • Análise da concentração de flúor na solução de enxágüe; • Análise da concentração de fósforo inorgânico na solução de enxágüe; • Análise do pH da solução de enxágüe; • Microdureza interna; • Microscopia de luz polarizada. 	

1. LIMPEZA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Para esse estudo também foram utilizados 40 terceiros molares humanos, recém - extraídos e armazenados em timol 0,1%. Os dentes foram limpos e preparados de acordo com a descrição dos itens 1, 1.1 e 1.2 do Estudo 1. As amostras (80) foram preparadas para microdureza inicial de acordo com a descrição do item 2.1 do Estudo 1. Após seleção das amostras com valores de microdureza inicial de superfície entre 422 ± 64 (+ ou - 15% da média geral obtida), as mesmas foram submetidas à desmineralização com solução 0,05 M de ácido acético, 50% saturada com pó de esmalte humano pH 5,0 para formação de lesão inicial de cárie (Paes Leme *et al.*, 2003).

2. PREPARO DA SOLUÇÃO DESMINERALIZANTE

Para o preparo da solução desmineralizante, foi realizado inicialmente os procedimentos para obtenção do pó da coroa dental. Para tal, as coroas dentais foram seccionadas das raízes (**Fig. 13a, b**) e a seguir, foram pulverizadas utilizando-se moinho de tecidos duros (Macroni – Siemens, Piracicaba, SP, Brasil) (**Fig. 14**). As partículas foram fracionadas em um jogo de tamiz (**Fig. 15**), sendo que as partículas de tamanho 0,074 mm a 0,105 mm foram separadas.

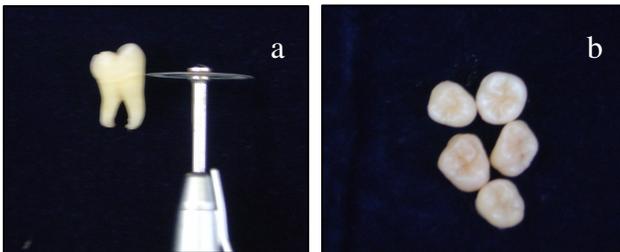


Figura 13 a e b: Separação da coroa da raiz de terceiros molares humanos.



Figura 14: Moinho de tecidos duros para pulverização das coroas dentais.

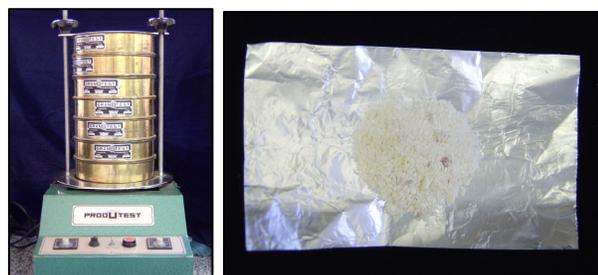


Figura 15: Pó das coroas dentais separadas em jogo de tamiz.

De posse do esmalte-dentina na granulação desejada (**Fig. 16**), o pó foi adicionado a um funil de separação contendo solução de bromofórmio-acetona (92:8), $d = 2,95 \text{ g/mL}$ (**Fig. 17**). O esmalte foi coletado livre dos componentes orgânicos da dentina ($d=2,14 \text{ g/mL}$) (Asgar, 1956) (**Fig. 18**). Os solventes foram eliminados por evaporação em capela sob exaustão e em estufa.



Figura 16: Pó da coroa dental obtido após peneiração.



Figura 17: Funil de separação contendo solução bromofórmio-acetona, para separação do esmalte da dentina.

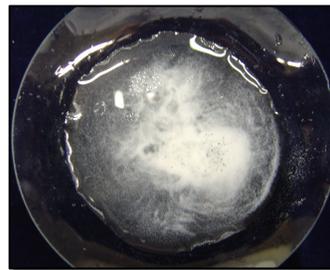


Figura 18: Esmalte coletado do funil de separação.

O pó obtido foi lavado várias vezes com água destilada e deionizada, até obter-se um sobrenadante límpido. Para tanto, este foi armazenado em béquer e foi acrescentado de água destilada e deionizada, até obter-se um sobrenadante límpido sendo a mistura agitada. Após 1 minuto, o sobrenadante estando límpido ou não foi desprezado. Tal procedimento foi realizado o número de vezes necessárias para se obter um sobrenadante completamente límpido.

A seguir, o esmalte foi colocado em estufa a 50^o durante 2 horas para desidratação e posteriormente pesado. Sabendo-se que para o preparo da solução seriam necessários 0,25 g/L, foram preparados 0,5 g de pó de esmalte para o preparo de 2000 mL de solução. Para o preparo de 2000 mL de solução, 100 mL de ácido acético 1 M foram transferidos para um béquer contendo ± 1700 mL de água destilada e deionizada (**Fig. 19**). O pH da solução foi estabilizado (pH=5,0) e o volume foi completado para 2000 mL, em balão volumétrico, acrescentando-se cristais de timol (0,1 g).

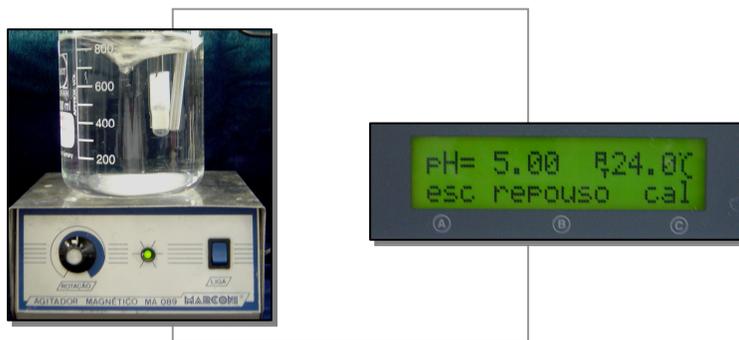


Figura 19: Estabilização do pH da solução.

A solução foi dividida em dois volumes iguais de 1000mL (**Fig. 20**), sendo que em 1 deles, foi acrescentado 0,5g de esmalte em pó (**Fig. 21**). A solução contendo o pó de esmalte foi mantida em estufa a 37^oC durante 96 horas sob agitação para que ocorresse a saturação da solução com o pó do esmalte (**Fig. 22**).

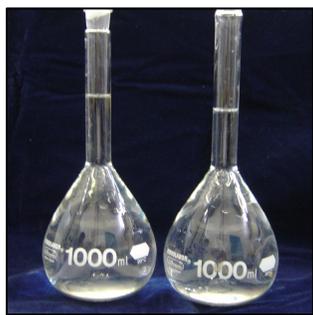


Figura 20: Balões volumétricos contendo 1000 mL de solução desmineralizante.



Figura 21: Acréscimo do pó de esmalte em 1000 mL de solução desmineralizante.

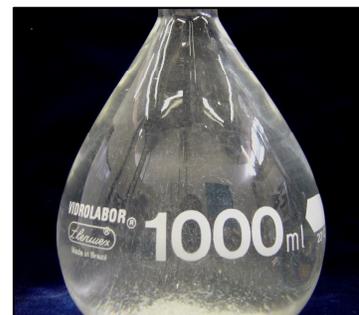




Figura 22: Solução contendo o pó de esmalte em estufa a 37°C durante 96 horas sob agitação.

Decorridas as 96 horas, a solução com pó de esmalte foi filtrada e posteriormente misturada com os outros 1000 mL (que ficaram fora da estufa) (**Fig. 23**). O pH foi novamente conferido (pH 5,0). Após o preparo da solução, foi acrescentado 0,1 ppm flúor (NaF= 0,00044g para 2 000mL).



Figura 23: Solução coada após 96 horas de saturação e mistura dos dois litros de solução. Nova verificação do pH e acréscimo de NaF.

3. INDUÇÃO DE LESÃO ARTIFICIAL DE CÁRIE

A quantidade de solução desmineralizante foi de 2 mL por mm² de esmalte exposto. Uma vez que a área de esmalte exposto era de 7 mm², a quantidade necessária de solução desmineralizadora por amostra foi de 14 mL. As amostras permaneceram imersas em solução desmineralizadora por 24 horas. Após desmineralização, foi

realizada nova mensuração da microdureza de superfície e determinação da concentração de fosfato através da ERTF. As amostras foram divididas em seis grupos experimentais, conforme descritos na **Tabela 1**, do Estudo A.1.

O tratamento clareador foi realizado conforme descritos no item 3 do Estudo A.1. No 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador, foram coletadas as soluções de enxágüe da superfície do esmalte clareado conforme descrição do item 4 do Estudo A.1. Através das soluções de enxágüe, foram determinadas as concentrações de cálcio (item 5.1), flúor (item 5.2), fósforo inorgânico (item 5.3) e pH das soluções (5.4). A microdureza de superfície foi mensurada nesses três tempos (item 6.1) e após o tratamento clareador, nova determinação da concentração de fosfato através da ERTF foi realizada (item 6.2).

Os mesmos procedimentos para determinação da microdureza interna (item 7) e preparo das amostras para microscopia de luz polarizada (item 8) foram realizados para as amostras com lesão inicial de cárie submetidas ao tratamento clareador.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

O delineamento experimental do Estudo B.1 está representado no Quadro 3.

Quadro 3: Delineamento experimental do Estudo B.1.

Fatores em estudo	1. Tratamento clareador intracoronário	<u>5 níveis:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Controle (CO) • Peróxido de hidrogênio 35% (PH 35%) (pH=3,67) • Peróxido de hidrogênio 25% (PH 25%) (pH=4,5) • Peróxido de carbamida 35% (PC) (pH=6,48) • Perborato de sódio + água destilada (PS) (pH=9,8)
	2. Substrato dentinário	<u>2 níveis:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Dentina íntegra (sem tratamento) • Dentina pré-condicionada
Unidades experimentais	Blocos dentinários da parede vestibular de incisivos bovinos	
Variável Resposta	Resistência Máxima à Tração - MPa (RMT) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	

1. PREPARO DOS ESPÉCIMES.

Para a primeira fase do estudo, com incisivos bovinos foram utilizados (**Fig. 24**). Os dentes foram limpos com o auxílio de curetas periodontais e após limpeza, as raízes dos elementos dentais foram removidas com auxílio de discos diamantados dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil). Os elementos dentais foram preparados para o tratamento clareador intra-coronário, através de acesso palatal com auxílio de ponta esférica diamantada (3018 HL – KG Sorensen) (**Fig. 25**). As entradas dos canais foram vedadas com ionômero de vidro convencional (Vidrion R – SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para confecção do tampão cervical, simulando os procedimentos de clareamento intra-coronário (**Fig. 26**).



Figura 24: Incisivos bovinos.



Figura 25: Realização do acesso palatino com ponta diamantada esférica.

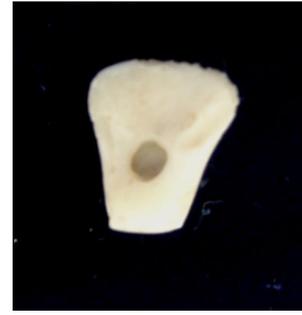


Figura 26: Visualização do acesso palatino.

Metade dos dentes obtidos (50 elementos dentais) tiveram a porção interna coronária em dentina condicionada ou não com ácido fosfórico 37% (Scotch Bond-3M/ESPE, St. Paul, MN, EU – **Fig. 27**) durante 15 segundos (**Fig. 28**) e lavados abundantemente por 15 segundos (**Fig. 29**).



Figura 27: Ácido fosfórico 37%.

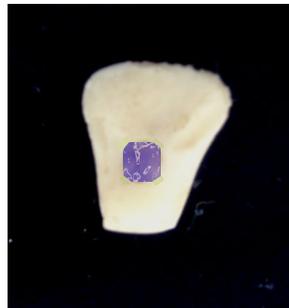


Figura 28: Condicionamento com ácido fosfórico 37%.

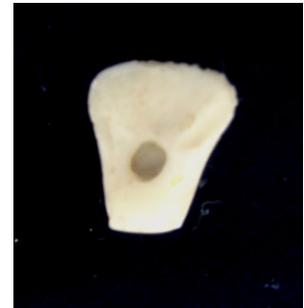


Figura 29: Cavidade palatina com pré-condicionamento.

2. TRATAMENTO CLAREADOR.

Os elementos dentais hígidos e pré-condicionados foram divididos e aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=20):

- **CO:** Sem tratamento clareador;

- **PH 35%:** Tratamento com gel de peróxido de hidrogênio 35%;
- **PH 25%:** Tratamento com gel de peróxido de hidrogênio 25%;
- **PC:** Tratamento com gel de peróxido de carbamida 35%;
- **PS:** Tratamento solução de perborato de sódio (0,01g/0,5mL).

Os agentes clareadores foram manipulados para este estudo (Vitale – Farmácia de Manipulação, Limeira, SP, Brasil).

O grupo controle (**Fig. 30**) não sofreu tratamento clareador e permaneceu em umidade relativa durante o período correspondente ao tratamento clareador dos demais grupos. No interior da câmara pulpar desse grupo foi inserido, algodão umedecido em água destilada. Os elementos dentais do grupo PS (**Fig. 31**) receberam o correspondente agente clareador, após espatulação dos grânulos de perborato com água destilada.

Aproximadamente 0,01g de gel clareador foi aplicado na câmara pulpar dos espécimes dos grupos PH 35%, PH 25% e PC (**Fig. 32**).

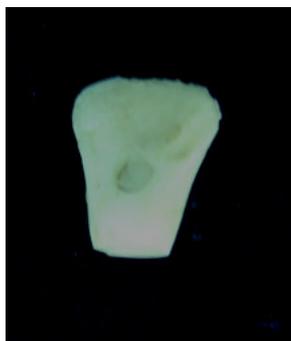


Figura 30: Grupo CO com algodão umedecido em água destilada e deionizada no interior da câmara pulpar.



Figura 31: Perborato de sódio (PS) e água destilada no interior da câmara pulpar.



Figura 32: Inserção de gel clareador no interior da câmara pulpar (PH 35%, PH 25% e PC).

Após a inserção dos agentes clareadores no interior da câmara pulpar, o acesso palatino foi vedado com cimento provisório (Cavit – 3M/ESPE) e os dentes armazenados em recipiente fechado em 100% de umidade. Os tratamentos clareadores foram realizados em 4 sessões com intervalos de 72 horas entre as trocas de materiais clareadores, com

duração total de 12 dias. A cada troca de agente clareador, a cavidade era abundantemente lavada com água destilada e deionizada, uma nova aplicação de clareador era realizada e a cavidade era vedada com o cimento provisório.

3. RESISTÊNCIA COESIVA DA DENTINA CLAREADA.

Vinte e quatro horas após o tratamento clareador, foram obtidos blocos (5mm x 7mm) de dentina da região central dos incisivos bovinos como mostram as **Figuras 33 e 34**.

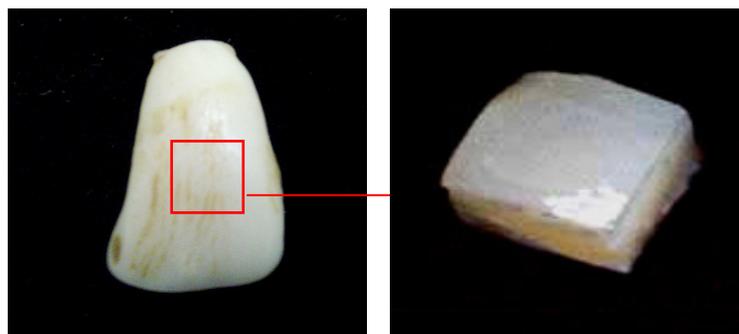


Figura 33 e 34: Obtenção de blocos da região central dos incisivos bovinos.

Os blocos foram serialmente seccionados em cortadeira de precisão (Isomet-Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (**Fig. 35**) obtendo-se fatias de aproximadamente 0,8 mm de espessura (**Fig. 36**). De cada bloco, foram removidos pelo menos 4 fatias. As fatias obtidas (**Fig. 37a**) foram padronizadas, removendo-se o esmalte vestibular através de polimento manual (**Fig. 37b**). Foi realizada a constrição na região da dentina interna (0,7 mm²) de cada fatia (**Fig. 37c**) com ponta diamantada (número 2214, FF, KG Sorensen) de 0,96 mm de diâmetro, montada em uma caneta de alta rotação (Kavo do Brasil, Ind. e Com., Joinville, SC, Brasil) e após 24 horas de imersão em água, os espécimes foram testados em micro-tração (EZ test, Shimadzu Co., Columbia, MD, EU) a 0,5mm/min (**Fig. 38**).



Fig. 35: Cortadeira de precisão utilizada para obtenção das fatias.

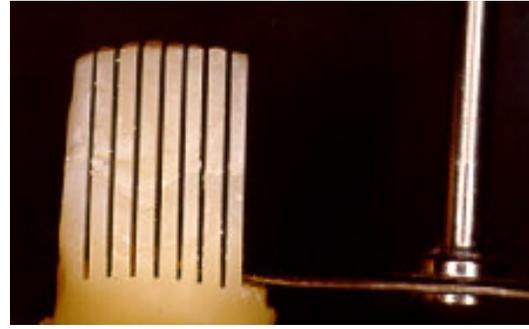


Fig. 36: Bloco seccionado.

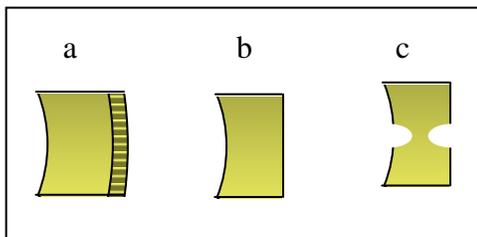


Fig. 37: Desenho esquemático das fatias obtidas (a); Remoção do esmalte (b) e realização de constrição na região da dentina interna clareada (c).



Fig. 38: Equipamento utilizado para o ensaio de microtração.

4. ANÁLISE ULTRA-MORFOLÓGICA DA DENTINA CLAREADA.

Dois blocos de dentina foram preparados para a avaliação da estrutura da dentina intacta ou desmineralizada, através da Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET). Para fixação do substrato dentinário, os espécimes foram tratados com solução Karnovsky, pós-fixados com tetróxido de ósmio, desidratados em série ascendente de álcool etílico (30 a 100%) e imersos em resina epóxica. Os espécimes embebidos em resina epóxica foram seccionados em fatias ultra-finas (60 nm de espessura) utilizando uma faca de diamante acoplado ao ultra-micrótomo (MT-2C, RMC, Flórida). Os espécimes foram coletados em grades de cobre (“*grids*”), corados com corante PTA para melhor observação das fibrilas colágenas, e observados em microscópio eletrônico de transmissão (EM900 - Zeiss, Monique, Alemanha). As imagens apresentaram magnificações variando de 5600 e 19500x.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

O delineamento experimental do Estudo B.2 está representado no Quadro 4.

Quadro 4: Delineamento experimental do **Estudo B.2.**

Fatores em estudo	1. Clareamento intracoronário	<u>5 níveis:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Controle • Peróxido de hidrogênio 35% • Peróxido de hidrogênio 25% • Peróxido de carbamida 35% • Perborato de sódio
	2. Substrato dentinário	<u>2 níveis:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Dentina hígida • Dentina pré-condicionada
	3. Tempo	<u>3 níveis:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Imediatamente • 7 dias • 14 dias
Unidades experimentais	Blocos dentinários da parede vestibular de incisivos bovinos	
Variável resposta	Resistência Máxima a Tração - MPa (RMT) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	

1. PREPARO DOS ESPÉCIMES.

Para este estudo, cento e cinquenta incisivos bovinos foram utilizados e preparados para o tratamento clareador intracoronário. Metade dos elementos foram submetidos ao condicionamento ácido prévio com ácido fosfórico 37% (Item 1, Estudo B.2). Os incisivos bovinos intactos e pré-condicionados foram divididos aleatoriamente em 5 grupos clareadores (de acordo com Item 2, Estudo B.2, n=30).

2. RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA APÓS O TRATAMENTO CLAREADOR.

Após o tratamento clareador, os elementos dentais foram mantidos em solução remineralizante (Shinkai *et al.*, 2001), a qual era trocada a cada 3 dias de armazenamento. O acesso palatal permaneceu selado com cimento provisório. Os elementos foram divididos em três grupos experimentais, correspondentes aos tempos em que se realizaria o ensaio de microtração após o tratamento clareador (n=10):

- **Tempo 0:** resistência de união imediatamente após tratamento clareador;
- **Tempo 7:** resistência de união à dentina após 7 dias do término do tratamento clareador;
- **Tempo 14:** resistência de união à dentina após 14 dias do término do tratamento clareador.

Para o ensaio de microtração, blocos de dentina da parede vestibular interna dos incisivos bovinos (**Fig. 39**) foram obtidos. A dentina interna foi tratada com sistema adesivo de passo único (Single Bond – 3M/ESPE) com condicionamento ácido prévio (**Fig. 40**) e um bloco de compósito foi construído na superfície dentinária (Z-250 – 3M/ESPE), de acordo com as especificações do fabricante (**Fig. 41**), 24 horas antes de cada teste de microtração. Os espécimes foram fixados em placas de acrílico e seccionados em cortadeira de precisão (0,8 mm de espessura) (**Fig. 42**). De cada bloco, 4 fatias foram obtidas. Foi realizada uma constricção na região central da interface dentina-compósito da fatia (0,7 mm²) (**Fig. 43**). Após 24 horas de imersão em água, os espécimes foram testados em microtração (0,5mm/min) (**Fig. 44**). Para os tempos 7 e 14 dias, os espécimes permaneceram imersos em solução remineralizante (Shinkai *et al.*, 2001), até o ensaio de microtração.



Figura 39: Bloco obtido da região central do incisivo.



Figura 40: Adesivo e compósito resinoso utilizados.



Figura 41: Bloco de resina construído na superfície dentinária interna.

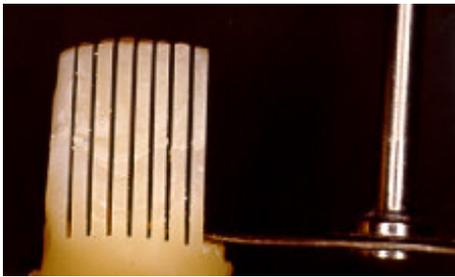


Figura 42: Secção do bloco de dentina e compósito resinoso.

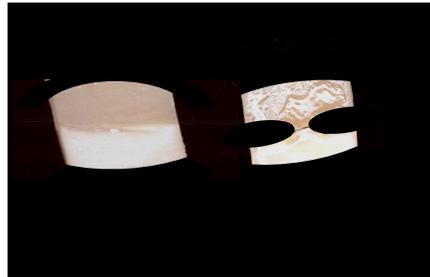


Figura 43: Obtenção das fatias e constrição na região da interface dentina-compósito.



Figura 44: Ensaio de microtração.

3. NANOINFILTRAÇÃO DA DENTINA APÓS TRATAMENTO CLAREADOR.

Dois espécimes adicionais de cada grupo foram preparados para a análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), para análise da nanoinfiltração na interface de união com nitrato de prata. Tais espécimes foram submetidos a todos os tratamentos descritos até o ensaio de microtração. Os espécimes clareados e restaurados receberam a aplicação de duas camadas de esmalte de unha até 1 mm ao redor da região adesiva.

Para re-hidratar os espécimes, os mesmos foram imersos em água destilada por 10 minutos antes da imersão em solução fixadora por 24 horas. Nitrato de prata amoniacal foi preparado de acordo com o protocolo previamente descrito (Tay *et al.*, 2002, Reis *et al.*, 2004). Os espécimes foram imersos em nitrato de prata amoniacal, na ausência de luminosidade por 24 horas, abundantemente lavados em água destilada, imersos em solução reveladora fotográfica por 8 horas e expostos à luz fluorescente para reduzir os íons de prata em grânulos de prata metálicos nas porosidades ao longo da interface de união.

Para a observação em MET os espécimes foram fixados como descrito no item 4 do estudo B.1. Após obtenção das fatias ultra-finas em micrótomo, os espécimes não foram corados e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900), com aumentos de 5600 a 19500 vezes.

5. RESULTADOS

Estudo A.1

Microdureza de superfície do esmalte clareado

Os resultados obtidos de microdureza de superfície do esmalte no Estudo A.1, foram estatisticamente analisados através do programa BioStat 3.0, com o teste de Kruskal-Wallis e Friedman ($p < 0,05$). Os valores medianos e os valores mínimo e máximo obtidos (amplitude) estão listados na **Tabela 2** e representados no **Gráfico 1**.

Tabela 2: Valores microdureza de superfície em KHN (mediana, amplitude) no 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador para o esmalte hígido (n=10):

Clareadores	1º Dia			6º Dia			12º Dia		
PLA	423,0	(331-488)	Aa	332,8	(315-356)	ABb	423,0	(327-488)	Aa
WHI	413,0	(395-454)	Aa	302,4	(252-395)	Bb	227,1	(54-308)	Bb
F	416,0	(359-470)	Aa	317,0	(229-370)	Bb	356,3	(274-380)	ABb
Ca	421,9	(395-488)	Aa	420,1	(343-457)	Aa	453,8	(375-495)	Aa
OPA	430,6	(362-547)	Aa	326,7	(229-412)	Bb	387,5	(304-474)	Aab
PN	423,0	(317-488)	Aa	328,7	(236-387)	Ba	346,5	(171-432)	ABb

Letras maiúsculas correspondem às diferenças entre os grupos em cada tempo e devem ser lidas na vertical; letras minúsculas correspondem às diferenças em cada grupo nos diferentes tempos e devem ser lidas na horizontal.

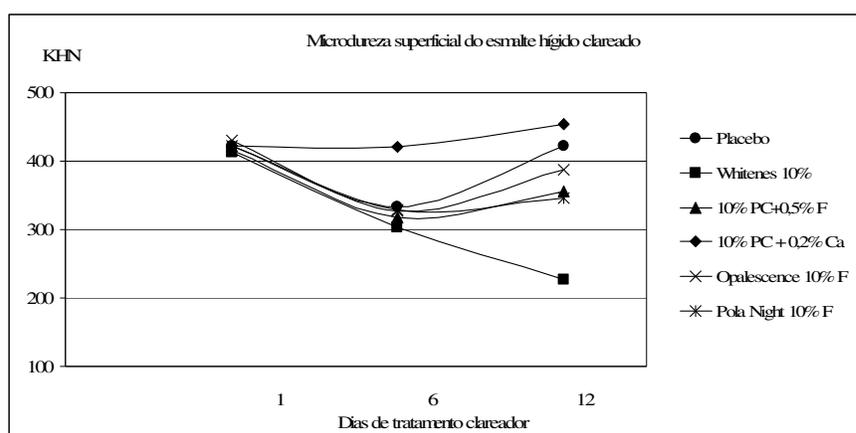


Gráfico 1: Valores medianos obtidos de microdureza de superfície durante tratamento clareador do esmalte intacto.

Os resultados obtidos (**Tabela 2, Gráfico 1**) demonstram que inicialmente (1º dia), todos os grupos apresentaram valores de dureza iguais ($p>0,05$). Ao 6º dia de clareamento, o esmalte tratado com (Ca) apresentou o maior valor de microdureza Knoop, sendo estatisticamente semelhante ao grupo PLA ($p>0,05$), porém diferente dos demais grupos clareados ($p<0,05$). Ao final do tratamento clareador (12 º dia), o grupo WHI apresentou acentuada diminuição na microdureza de superfície, embora não diferiu estatisticamente dos grupos F e PN. Durante o tratamento clareador, o grupo WHI, F e PN apresentaram diminuição significativa dos valores de microdureza quando observados no 1º e 12º dias de tratamento clareador ($p<0,05$).

Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (ERTF).

A ERTF foi realizada antes do tratamento clareador e após o mesmo. Nesta, foram obtidos os valores de absorção das moléculas de fosfato associadas ao cálcio da hidroxiapatita, localizadas na banda 961 cm^{-1} nos gráficos de ERTF. Os resultados obtidos da intensidade de absorção foram estatisticamente analisados (Kruskal-Wallis - para análise de diferenças entre os grupos - e Wilcoxon - para comparação entre antes e após o tratamento clareador), com o programa estatístico BioStat 3.0 (**Tabela 3, Gráficos 2 e 3**).

Tabela 3: Valores de intensidade de absorção de fosfato obtidos (mediana, amplitude) antes e após o tratamento clareador do esmalte hígido (n=5):

<i>Clareadores</i>	<i>Antes do tratamento</i>			<i>Após tratamento</i>		
PLA	0,094	(0,08-0,11)	Aa	0,055	(0,04-0,07)	Bb
WHI	0,105	(0,08-0,13)	Aa	0,049	(0,04-0,06)	Bb
F	0,093	(0,08-0,13)	Aa	0,057	(0,04-0,09)	Bb
Ca	0,109	(0,09-0,13)	Aa	0,111	(0,09-0,18)	Aa
OPA	0,111	(0,08-0,12)	Aa	0,053	(0,04-0,08)	Bb
PN	0,102	(0,07-0,12)	Aa	0,051	(0,05-0,06)	Bb

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

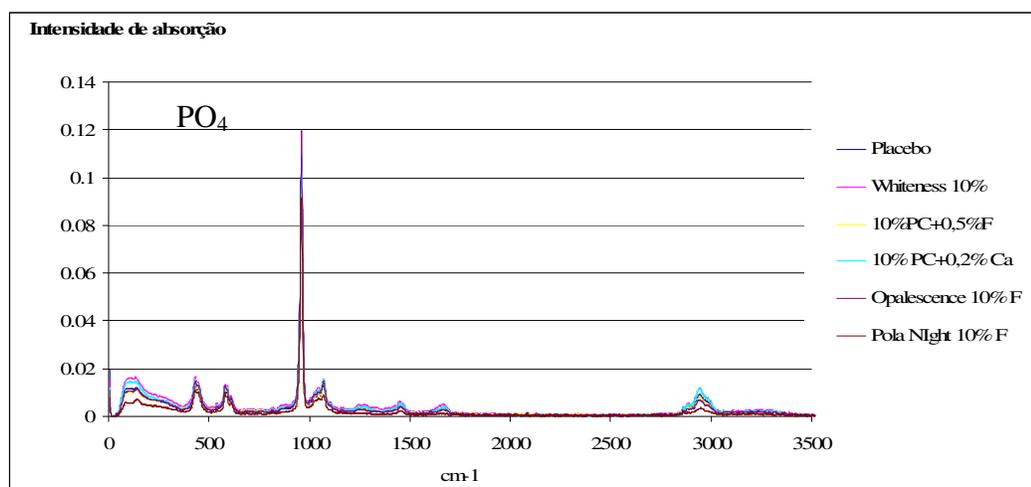


Gráfico 2: ERTF do esmalte hígido antes do tratamento clareador. O pico localizado na banda 961 cm^{-1} corresponde à absorção de moléculas de fosfato.

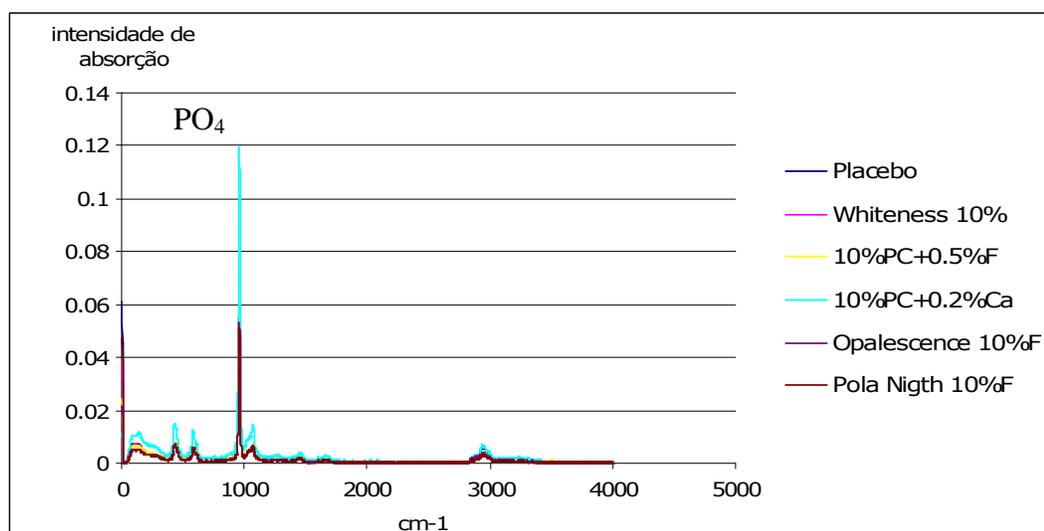


Gráfico 3: ERTF do esmalte hígido após o tratamento clareador.

Os resultados (**Tabela 3, Gráficos 2 e 3**) indicam que inicialmente (*baseline*), todos os grupos possuíam a mesma concentração de fosfato na superfície do esmalte hígido ($p>0,05$). Após o tratamento clareador, o esmalte hígido tratado com o agente Ca manteve a concentração de fosfato, e foi diferente dos demais grupos clareados. Os grupos PLA, WHI, F, OPA e PN apresentaram concentração de fosfato

semelhante entre si ao final do tratamento clareador ($p>0,05$), mas esta concentração diminuiu após o tratamento, quando comparada com os valores iniciais.

Determinação de cálcio presente na solução de enxágüe.

Após a determinação da concentração de íons cálcio nas soluções de enxágüe, os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para análise entre os grupos em cada tempo (1º, 6º e 12º dias) e Friedman (para comparação dos grupos em cada tempo), com o programa BioStat 3.0 (**Tabela 4, Gráfico 4**). A coluna Ca géis corresponde à concentração de cálcio encontrada nos agentes clareadores. Os valores de cálcio apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração da concentração de cálcio do agente clareador e a concentração de cálcio obtido durante a leitura em espectroscopia (**Anexo 1**).

Tabela 4: Valores em ppm de cálcio presente nos géis clareadores (média, desvio padrão) e na solução de enxágüe do esmalte hígido (mediana, amplitude) no 1º, 6º e 12º dias de tratamento (n=10):

<i>Agentes</i>	<i>Ca géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	36,0 (2)	104,8	(78-183)	ABa	63,8	(49-85)	Ba	153,3	(78-215)	ABb
WHI	24,0 (2)	77,7	(45-138)	Ba	52,9	(35-77)	Ba	96,8	(69-163)	Bb
F	17,0 (1)	74,5	(37-108)	Bab	41,0	(21-107)	Ba	82,0	(57-108)	Bb
Ca	2114,0 (19)	292,2	(224-402)	Aa	249,5	(192-314)	Aa	327,5	(262-373)	Aa
OPA	62,0 (5)	70,3	(44-172)	Ba	67,2	(36-132)	Ba	69,4	(56-183)	Ba
PN	43,0 (3)	64,3	(40-92)	Ba	51,5	(20-78)	Ba	96,9	(61-147)	Bb

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

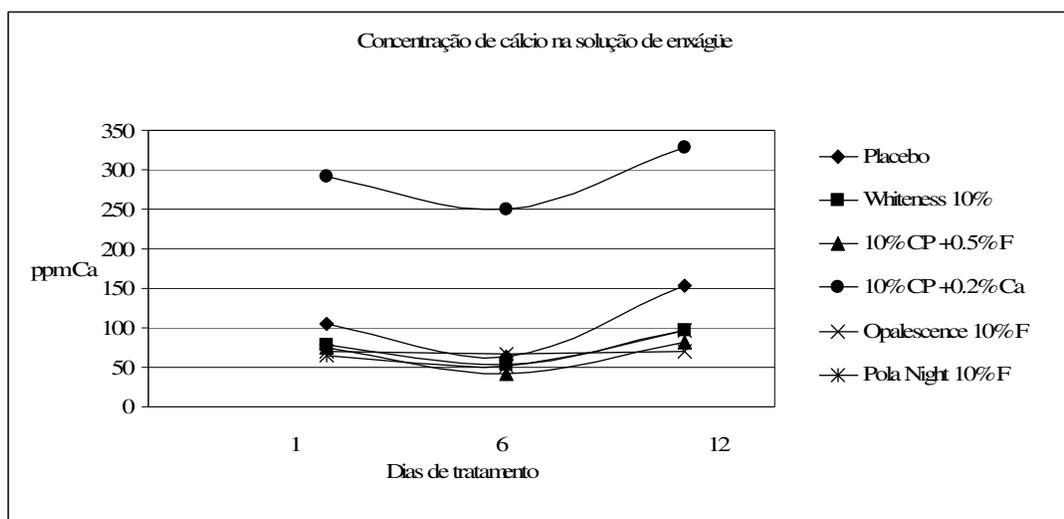


Gráfico 4: Concentração de cálcio (ppm) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte hígido.

Os resultados demonstram (**Tabela 4, Gráfico 4**) que no primeiro dia de determinação da concentração de cálcio na solução de enxágüe, o grupo tratado com Ca apresentou a maior concentração do íon em solução, mas não foi diferente estatisticamente do grupo PLA. No 6º dia de tratamento clareador, o grupo tratado com o agente Ca apresentou a maior concentração de cálcio na solução de enxágüe e foi diferente dos demais grupos experimentais. Ao final do tratamento clareador, o agente Ca apresentou a maior concentração de cálcio na solução, mas foi estatisticamente semelhante ao grupo PLA. Este, por sua vez, no 12º dia de tratamento, apresentou concentração de cálcio em solução semelhante aos demais grupos clareados ($p > 0,05$). Os grupos PLA, WHI e PN apresentaram aumento significativo na concentração de cálcio ao final do tratamento clareador ($p < 0,05$).

Determinação de flúor presente na solução de enxágüe.

A concentração de íons fluoreto presente nas soluções de enxágüe foram estatisticamente analisadas através do teste estatístico Kruskal-Wallis e Friedman

($p < 0,05$) (**Tabela 5, Gráfico 5**), com o programa BioStat 3.0. A coluna F géis corresponde à concentração de fluoreto encontrada nos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração da concentração de fluoretos do agente clareador e a concentração de fluoreto obtido durante a leitura em íon eletrodo seletivo (**Anexo 1**).

Tabela 5: Valores em ppm de flúor presentes nos géis clareadores (média, desvio padrão) e na solução de enxágüe (mediana, amplitude) da superfície do esmalte hígido:

<i>Agentes</i>	<i>F géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	1,2 (0,4)	3,0	(2-7)	Ba	4,5	(2-14)	Ba	2,6	(1-8)	Ba
WHI	1,4 (0,42)	3,8	(3-5)	Ba	3,6	(2-5)	Ba	4,6	(1-8)	Bb
F	2287,2 (194,6)	472,4	(320-686)	Aa	831,1	(489-1016)	Aab	998,2	(429-1217)	Ab
Ca	24,5 (0,2)	27,1	(21-36)	Ba	15,9	(1-22)	Bb	36,9	(23-51)	Ba
OPA	1129 (17,7)	187,7	(74-272)	Aa	233,1	(30-532)	Aab	281,3	(186-374)	Ab
PN	977,3 (47,7)	460,8	(368-539)	Aa	555,6	(395-599)	Aa	631,3	(488-707)	Ab

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

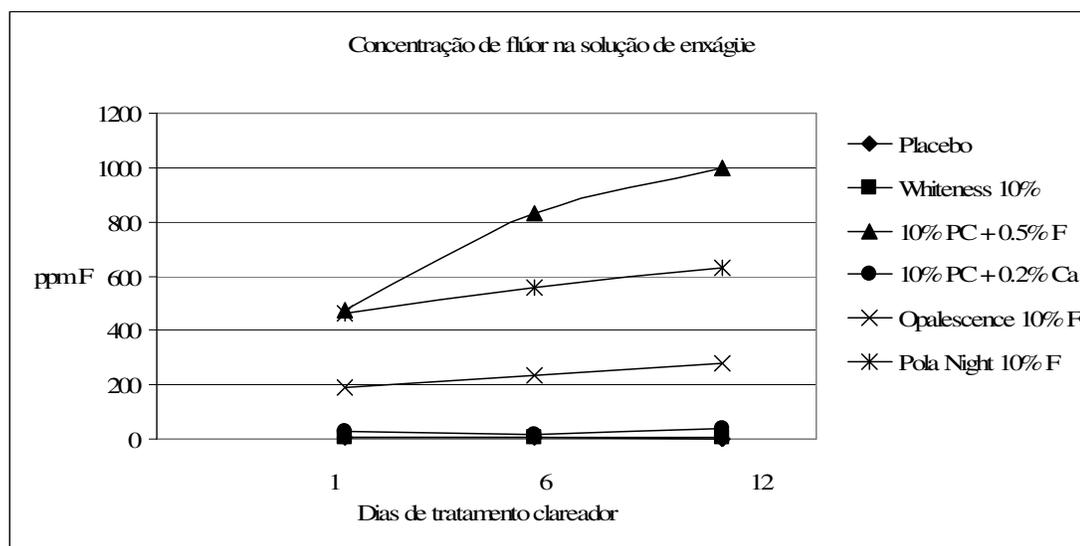


Gráfico 5: Concentração de íons flúor (ppm) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte hígido.

A concentração de íons flúor na solução de enxágüe dos géis clareadores contendo alta concentração do íon (F, OPA, PN) foi significativamente maior que a dos géis clareadores sem ou com baixa concentração de fluoreto, no 1º, 6º e 12º dias de coleta da solução de enxágüe (**Tabela 5, Gráfico 5**). Os grupos PLA, WHI e Ca, que apresentavam baixa concentração de fluoreto, foram semelhantes nas três análises realizadas ($p>0,05$). Os grupos WHI, F e OPA e PN apresentaram concentração de fluoreto em solução significativamente maior no 12º dia e tratamento clareador, quando comparados ao 1º dia e coleta de solução.

Determinação de fósforo inorgânico presente na solução de enxágüe.

A concentração de fósforo inorgânico presente nas soluções de enxágüe foram estatisticamente analisados através do teste estatístico Kruskal-Wallis e Friedman ($p<0,05$) (**Tabela 6, Gráfico 6**), com o programa BioStat 3.0. A coluna Pi géis corresponde à concentração de fósforo inorgânico encontrada nos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração da concentração de Pi do agente clareador e a concentração de Pi obtido em espectrofotometria (**Anexo 1**).

Tabela 6: Valores de fósforo inorgânico ($\mu\text{g/mL}$) nos géis clareadores (média, desvio padrão) e na solução de enxágüe (mediana, amplitude) no 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador para a superfície de esmalte hígido.

<i>Agentes</i>	<i>Pi géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	0,016 (0,003)	0,015	(0,01-0,02)	Aa	0,018	(0,01-0,02)	Aa	0,017	(0,01-0,04)	Aa
WHI	0,024 (0,007)	0,062	(0,05-0,09)	Ca	0,068	(0,04-0,12)	Ca	0,081	(0,07-0,12)	Cb
F	0,025 (0,01)	0,041	(0,01-0,06)	Ba	0,044	(0,02-0,07)	Ba	0,066	(0,01-0,13)	Cb
Ca	0,013 (0,008)	0,017	(0,01-0,03)	Aa	0,020	(0,01-0,04)	Aa	0,024	(0,02-0,07)	Ab
OPA	0,037 (0,013)	0,046	(0,01-0,09)	Ba	0,041	(0,03-0,09)	Ba	0,047	(0,03-0,08)	Ba
PN	0,049 (0,019)	0,037	(0,02-0,05)	Ba	0,033	(0,01-0,07)	Ba	0,042	(0,02-0,06)	Ba

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

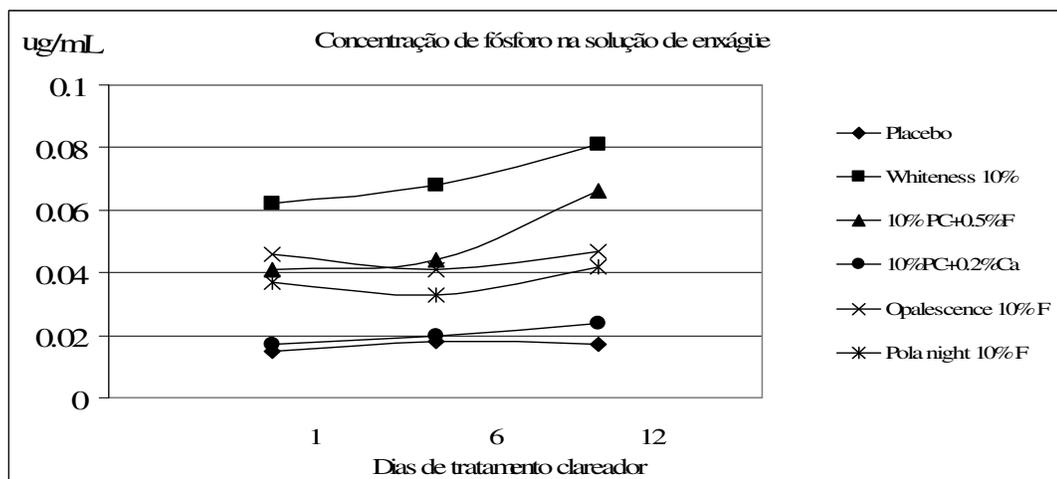


Gráfico 6: Concentração de fósforo inorgânico ($\mu\text{g/mL}$) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte hígido.

No 1º dia de coleta da solução de enxágüe (**Tabela 6, Gráfico 6**), o esmalte clareador com o agente PLA e Ca apresentaram as menores concentrações de fósforo inorgânico em solução (P_i), porém estas foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$). Os agentes F, OPA, PN apresentaram valores intermediários de perda de fósforo na solução, foram semelhantes entre si e diferentes do PLA, Ca e do WHI que apresentou a maior concentração de P_i na solução. Os mesmos resultados foram encontrados ao 6º dia de clareamento. Ao final do clareamento (12º dia), o grupo tratado com agente PLA e Ca apresentaram as menores concentrações de fosfato em solução, seguidos dos grupos OPA e PN. Os grupos F e WHI apresentaram a maior concentração de P_i na solução ao final do tratamento clareador. Os grupos PLA, OPA e PN apresentaram concentração de P_i no 12º dia de clareamento semelhante ao 1º dia ($p>0,05$), enquanto os demais grupos foram diferentes ao final do clareamento, quando comparados ao 1º dia de clareamento ($p<0,05$).

Determinação do pH da solução de enxágüe.

Os valores de pH da solução de enxágüe foram estatisticamente analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis e Friedman ($p<0,05$) (**Tabela 7, Gráfico 7**), com o

programa BioStat 3.0. A coluna pH géis corresponde ao valor de pH dos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração do valor do pH do agente clareador e do pH obtido na solução de enxágüe (**Anexo 1**).

Tabela 7: Valores de pH dos géis clareadores (média, desvio padrão) e da solução de enxágüe (mediana, amplitude) no 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador para a superfície de esmalte hígido e pH dos agentes clareadores:

<i>Agentes</i>	<i>pH géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	6,75 (0,05)	6,70	(6,4-6,9)	ABa	6,70	(6,4-6,9)	ABa	6,90	(6,8-7,0)	ABb
WHI	6,7 (0,06)	6,65	(6,3-6,7)	Ba	6,65	(6,3-6,7)	Ba	6,80	(6,6-6,9)	ABb
F	6,8 (0,05)	6,70	(6,6-6,9)	ABa	6,70	(6,6-6,9)	ABa	6,70	(6,6-6,9)	Ba
Ca	6,9 (0,08)	6,40	(6,4-6,7)	Ba	6,40	(6,4-6,7)	Ba	6,40	(6,4-6,7)	Ba
OPA	7,04 (0,06)	7,20	(7,2-7,3)	Aa	7,20	(7,2-7,3)	Aa	7,20	(7,1-7,3)	Aa
PN	6,87 (0,05)	6,50	(6,2-6,5)	Ba	6,50	(6,2-6,5)	Ba	6,50	(6,2-6,5)	Ba

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

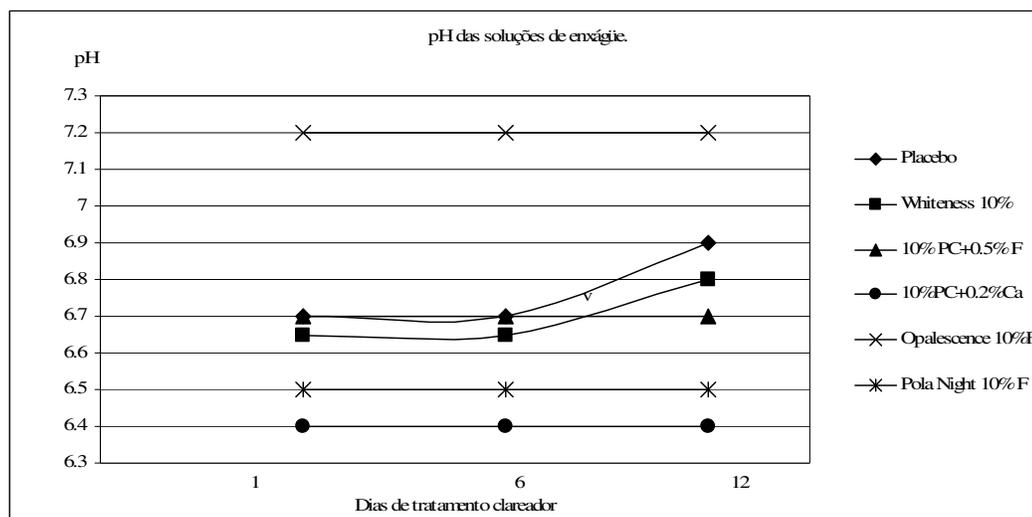


Gráfico 7: pH das soluções de enxágüe (1º, 6º e 12º dias de tratamento) obtidos da superfície de esmalte hígido.

O pH das soluções de enxágüe para o esmalte hígido (**Tabela 7, Gráfico 7**) indicam que a solução de enxágüe do 1º e 6º dia de tratamento apresentou exatamente o mesmo pH para todos os grupos ($p>0,05$). O agente OPA apresentou o maior no 1º e 6º dias de clareamento, sendo este, estatisticamente semelhante ao pH da solução do PLA e F e diferente dos grupos WHI, Ca e PN. No 12º dia de tratamento, o grupo OPA manteve-se com o maior pH, semelhante aos grupos PLA e WHI. Os grupos F, Ca e PN foram semelhantes entre si e diferentes do grupo OPA. O pH das soluções de enxágüe dos agentes contendo PLA e WHI foram estatisticamente maiores ao final do tratamento clareador, quando comparadas ao 1º dia de clareamento ($p<0,05$).

Microscopia de Luz Polarizada

Os resultados médios obtidos após mensuração da extensão da lesão (μm) nas imagens em microscopia de luz polarizada foram estatisticamente analisados através da Análise de variância e Tukey ($p<0,05$) (**Tabela 8**), com o programa SAS.

Tabela 8: Resultados médios obtidos da profundidade de desmineralização (μm , Média e DP) observado nas amostras de microscopia de luz polarizada.

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Resultados</i>
PLA	6,57	(1,6)	A
WHI	39,19	(3,6)	D
F	15,09	(3,0)	B
Ca	12,75	(2,6)	B
OPA	23,72	(5,0)	C
PN	24,16	(5,1)	C

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os grupos.

A **Tabela 8** demonstra que a superfície do esmalte hígido tratado com o agente PLA (**Fig. 1**) apresentou a menor profundidade de desmineralização entre os grupos ($p<0,05$). A superfície do esmalte tratada com o agente clareador WHI (**Fig. 2**) apresentou a maior profundidade de lesão quando comparados a todos os agentes clareadores utilizados ($p<0,05$), seguido dos agentes clareadores comerciais contendo flúor (OPA e PN) (**Fig. 5 e**

6, respectivamente). Os agentes clareadores contendo íon fluoreto (F, **Fig. 3**) e cálcio (Ca, **Fig. 4**) não apresentaram diferenças significantes entre si, mas mostraram profundidade de desmineralização inferior aos agentes comerciais ($p < 0,05$).



Figura 1: Placebo

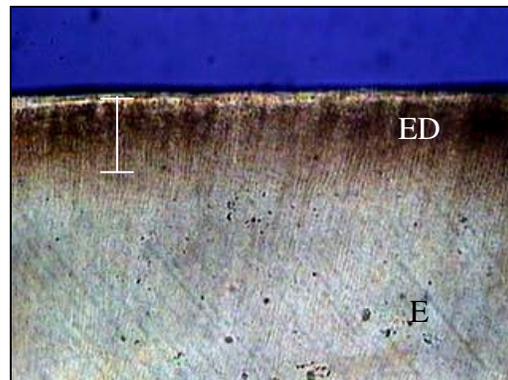


Figura 2: Whiteness 10%

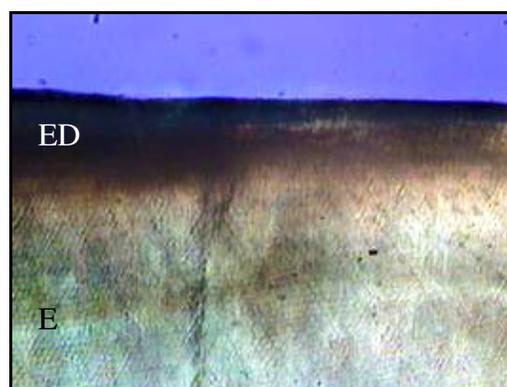


Figura 3: 10% PC + 0,5% F

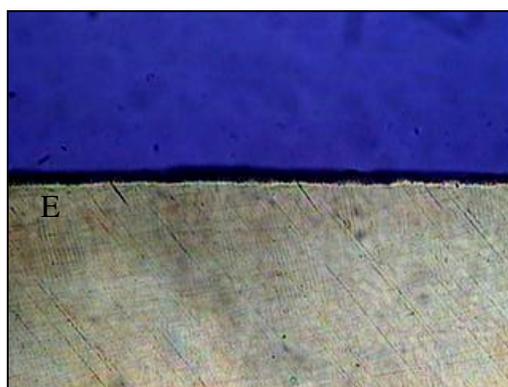


Figura 4: 10% PC + 0,2% Ca

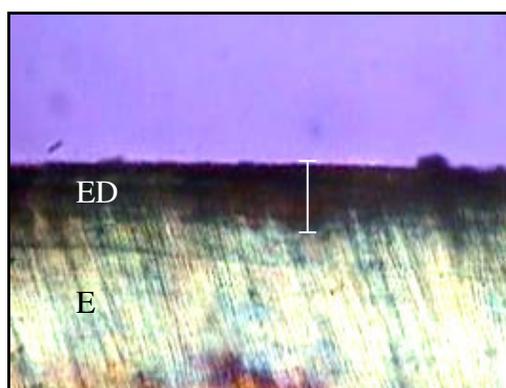


Figura 5: Opalescence 10% F

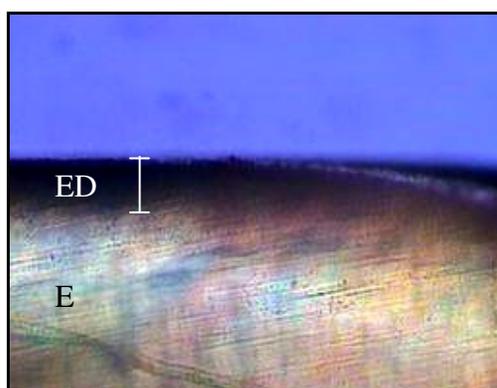


Figura 6: Pola Night 10% F

┌- Profundidade da lesão E – esmalte hígido ED – esmalte desmineralizado

Microdureza Interna

A profundidade de desmineralização das amostras foi analisada através da microdureza do esmalte de secção longitudinal (microdureza interna). Os valores em dureza obtidos foram calculados e o Delta Z obtido foi estatisticamente analisado através do teste de ANOVA (um fator) e Fisher ($p < 0,05$), com o programa StatView. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Média de desmineralização interna obtida após ensaio de microdureza longitudinal (Delta Z).

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Resultados</i>
PLA	565,3	(359,9)	A
WHI	1311,6	(507,5)	B
F	965,0	(584,9)	AB
Ca	583,2	(483,3)	A
OPA	991,8	(627,4)	AB
PN	707,4	(476,1)	A

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os grupos.

Os resultados demonstrados na **Tabela 9** indicam que a maior área de desmineralização foi provocada pelo tratamento clareador WHI, embora não existam diferenças entre este grupo e a profundidade de desmineralização do esmalte tratado com os agentes F e OPA. Estes últimos foram semelhantes aos grupos PLA, Ca e PN ($p > 0,05$). O esmalte tratado com o agente WHI apresentou diferenças significantes em relação ao esmalte tratado com o agente PLA, Ca e PN.

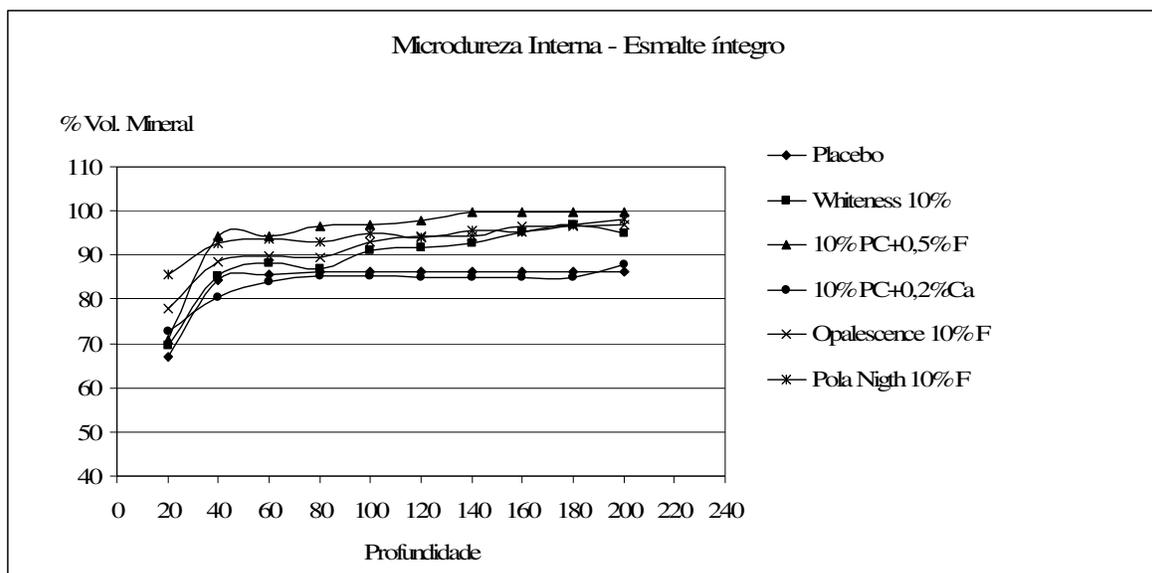


Gráfico 8: Porcentagem de volume mineral em função da profundidade (μm) mensurada através de microdureza longitudinal.

O **Gráfico 8** demonstra a porcentagem de volume mineral obtida em função da profundidade do esmalte tratado com os diferentes agentes clareadores e com o placebo. Embora todos os grupos apresentem menor porcentagem de volume mineral na superfície do esmalte tratado, esse valor aumenta com a profundidade de leitura e estabiliza-se a partir de 60 μm de profundidade, indicando que os tratamentos clareadores afetaram apenas a superfície e subsuperfície do esmalte.

Estudo A.2

Microdureza da superfície do esmalte com lesão de cárie e clareado.

Os resultados obtidos através da determinação da microdureza de superfície do esmalte no Estudo 2, foram estatisticamente analisados através do teste de Kruskal-Wallis e Friedman ($p < 0.05$) (Tabela 10, Gráfico 9), com o programa BioStat 3.0.

Tabela 10: Valores medianos de microdureza de superfície (mediana em KHN, amplitude) no 1º, 6º e 12º dias de tratamento clareador para a superfície de esmalte com lesão inicial de cárie (n=10):

<i>Agentes</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	83,0	(55-123)	Aa	92,5	(46-107)	Aab	95,4	(67-120)	Ab
WHI	67,5	(49-120)	Aa	45,6	(17-129)	Aab	47,2	(23-99)	Bb
F	65,5	(24-105)	Aab	55,1	(22-113)	Ab	66,8	(33-127)	Aa
Ca	76,6	(35-362)	Aa	48,6	(33-105)	Aa	66,5	(26-99)	Aa
OPA	75,9	(27-107)	Aa	75,1	(31-139)	Aa	69,8	(37-125)	Aa
PN	71,9	(40-103)	Aa	77,0	(19-103)	Aa	75,2	(22-131)	Aa

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

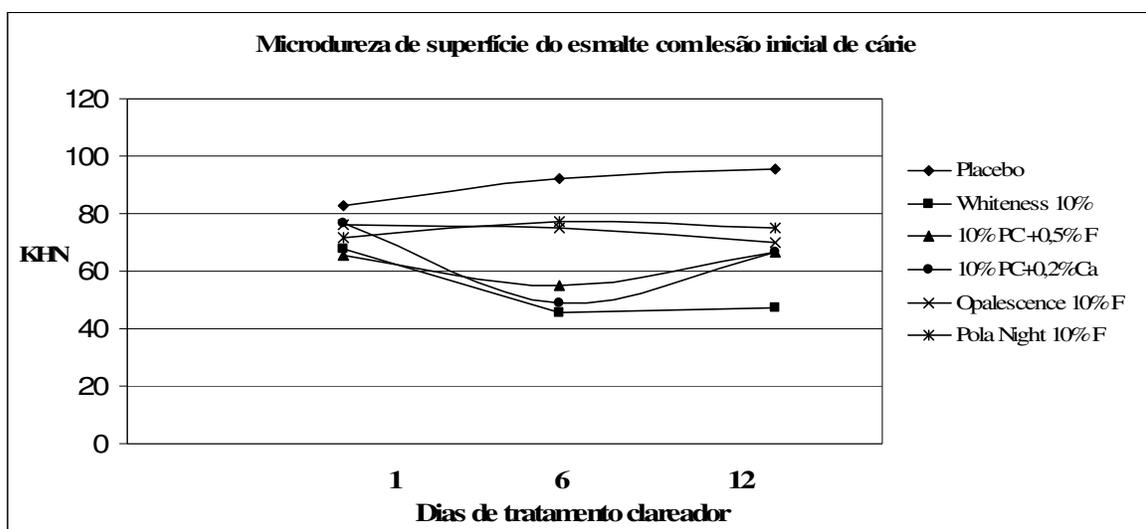


Gráfico 9: Valores medianos obtidos de microdureza de superfície durante tratamento clareador do esmalte com lesão de cárie.

Os resultados obtidos (**Tabela 10, Gráfico 9**) demonstram que no 1º e 6º dias de tratamento clareador, a microdureza Knoop do esmalte com lesão inicial de cárie foi igual para todos os grupos tratados ($p>0,05$). No 12º dia de tratamento clareador, o esmalte tratado com o agente clareador WHI, sem adição de flúor ou cálcio, demonstrou perda significativa dos valores de dureza. O esmalte com lesão inicial de cárie tratado com o agente PLA apresentou, ao final do tratamento clareador, maior microdureza do esmalte em relação ao 1º dia de clareamento ($p<0,05$). Já o agente WHI provocou diminuição significativa dos valores de microdureza ao término do tratamento clareador, quando comparado ao 1º dia de clareamento ($p<0,05$).

Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (ERTF).

A ERTF foi realizada antes do tratamento clareador e após o mesmo. A intensidade de absorção do fosfato, localizado na banda 961 cm^{-1} foi estatisticamente analisada. Os resultados obtidos foram analisados (Kruskal-Wallis - para análise de diferenças entre os grupos - e Wilcoxon - para comparação entre antes e após o tratamento clareador) (**Tabela 11, Gráficos 10 e 11**), com o programa BioStat 3.0.

Tabela 11: Valores medianos de intensidade de absorção de fosfato obtidos (intensidade de absorção, amplitude) antes e após o tratamento clareador do esmalte com lesão inicial de cárie (n=5):

<i>Agentes</i>	<i>Antes do tratamento</i>			<i>Após tratamento</i>		
PLA	0,091	(0,07-0,1)	Aa	0,049	(0,04-0,05)	Bb
WHI	0,086	(0,07-0,1)	Aa	0,049	(0,04-0,07)	Bb
F	0,096	(0,07-0,1)	Aa	0,094	(0,06-0,1)	Aa
Ca	0,079	(0,07-0,1)	Aa	0,049	(0,02-0,05)	Bb
OPA	0,092	(0,08-0,1)	Aa	0,065	(0,06-0,07)	ABb
PN	0,091	(0,07-0,09)	Aa	0,081	(0,07-0,1)	Aa

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

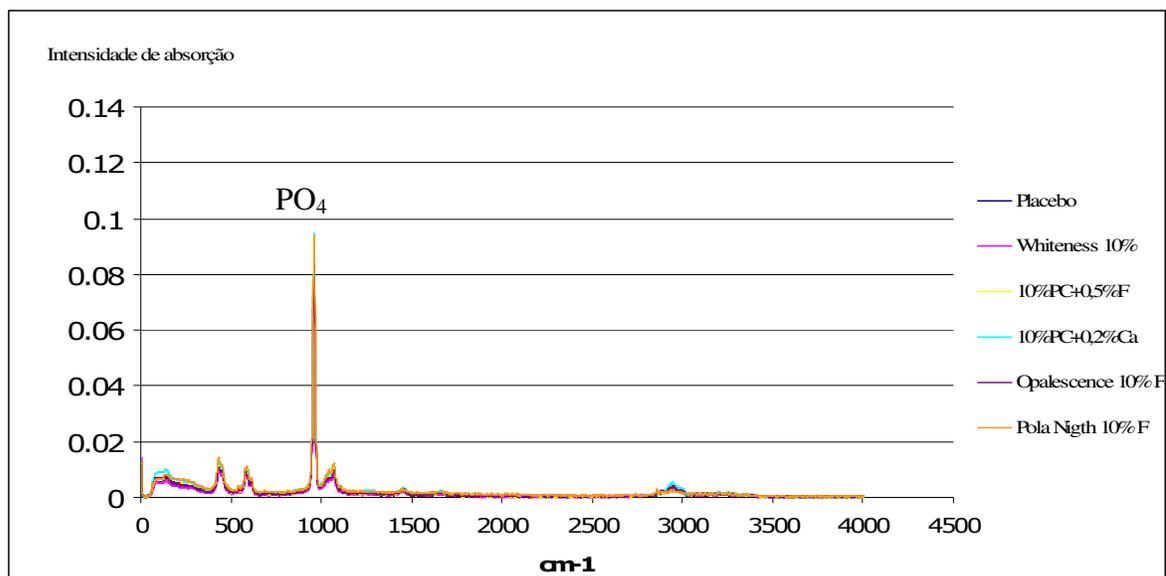


Gráfico 10: ERTF do esmalte com lesão inicial de cárie antes do tratamento clareador.

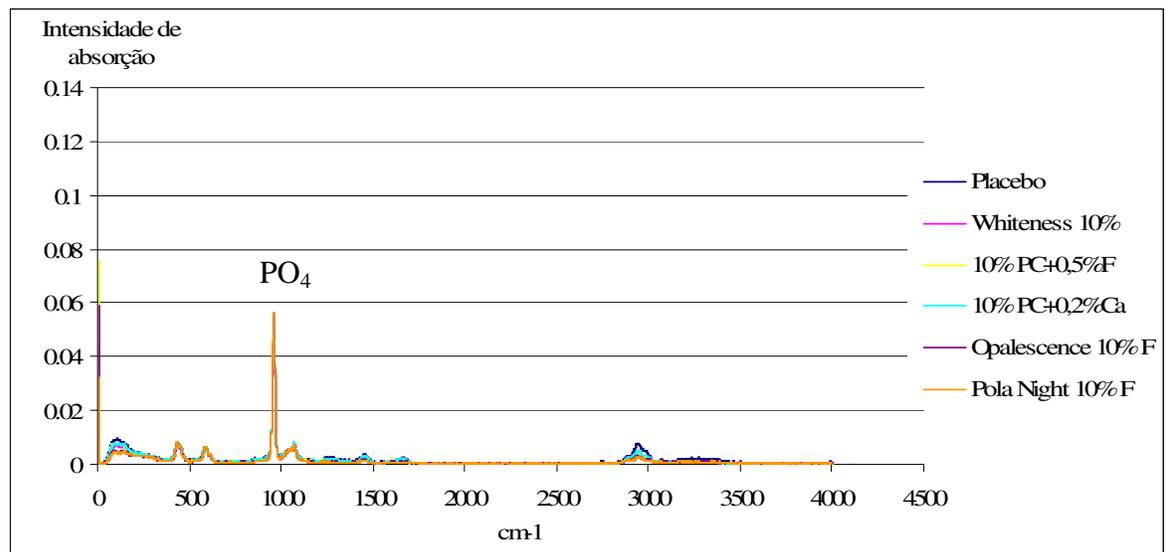


Gráfico 11: ERTF do esmalte com lesão inicial de cárie após o tratamento clareador.

Os resultados da ERTF (**Tabela 11, Gráficos 10 e 11**) indicam que inicialmente (antes do clareamento) todos os espécimes apresentaram concentração de fosfato semelhante ($p > 0,05$). Após o tratamento clareador, o esmalte com lesão inicial de

cárie, tratado com os agentes F e PN apresentaram a maior concentração de fosfato na superfície do esmalte, não sendo diferentes do grupo OPA. O esmalte tratado com os géis PLA, WHI e Ca apresentou concentração de fosfato estatisticamente diferente dos grupos F e PN. Os espécimes tratados com os géis PLA, WHI, Ca e OPA apresentaram concentração de fosfato na superfície do esmalte significativamente menor após o tratamento clareador ($p < 0,05$)

Determinação de cálcio presente na solução de enxágüe.

Após a determinação da concentração de cálcio nas soluções de enxágüe, os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para análise entre os grupos em cada tempo (1º, 6º e 12º dias) e Friedman (para comparação dos grupos em cada tempo) (**Tabela 12, Gráfico 12**). A coluna Ca géis corresponde à concentração de cálcio encontrada nos agentes clareadores. Os valores de cálcio apresentados na solução de enxágüe são resultados da subtração da concentração de cálcio do agente clareador e a concentração de cálcio obtido durante a leitura em espectroscopia (**Anexo 1**).

Tabela 12: Valores em ppm de cálcio presentes nos géis clareadores (média, desvio padrão) e na solução de enxágüe (mediana, amplitude) para a superfície de esmalte com lesão inicial de cárie (n=10):

<i>Agentes</i>	<i>Ca géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	36 (2)	101,5	(48-208)	Aa	73,9	(35-196)	Aa	119,8	(69-179)	ABa
WHI	24 (2)	105,5	(67-167)	Aa	72,1	(38-167)	ABa	110,7	(48-189)	ABa
F	17 (1)	93,1	(70-175)	Aa	65,8	(27-91)	Aa	76,8	(38-167)	Aa
Ca	2114 (19)	308,4	(246-366)	Ba	223,7	(113-289)	Bb	210,7	(118-313)	Bb
OPA	62 (5)	75,4	(42-145)	Aa	48,6	(26-87)	Ab	118,3	(62-226)	ABa
PN	43 (3)	86,1	(41-149)	Aa	60,0	(41-80)	Ab	137,9	(93-217)	ABa

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

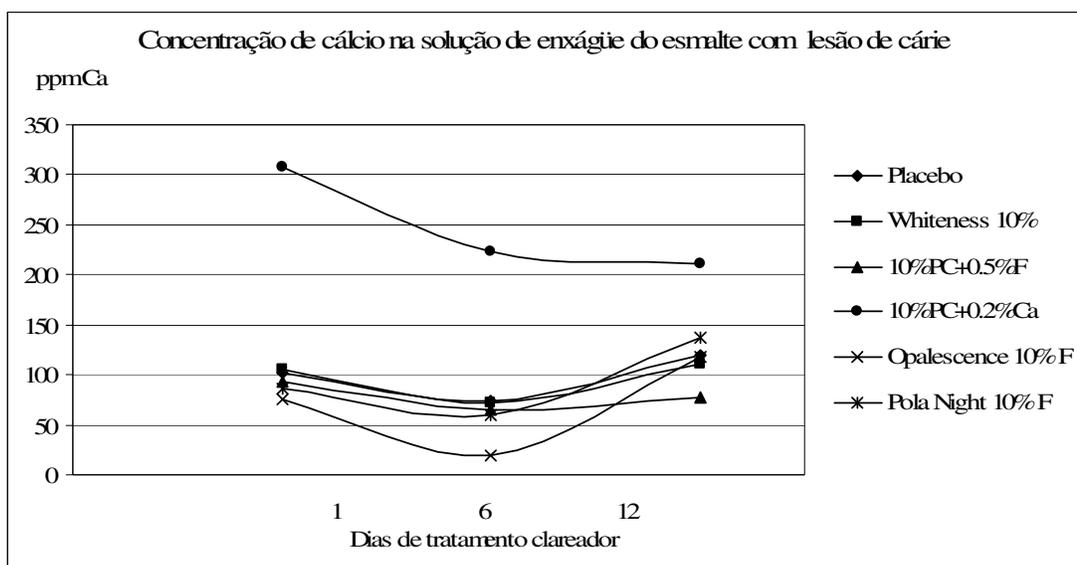


Gráfico 12: Concentração de cálcio (ppm) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte com lesão inicial de cárie.

A concentração de cálcio na solução de enxágüe dos espécimes com lesão inicial de cárie (**Tabela 12, Gráfico 12**) no 1º dia de clareamento, foi maior para o esmalte tratado com o agente Ca ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). No 6º dia de clareamento o grupo tratado com o agente WHI foi semelhante ao grupo Ca, mas não apresentou diferenças em relação dos demais grupos. Ao 12º dia de tratamento clareador, a concentração de cálcio presente na solução de enxágüe foi menor para o grupo tratado com F que diferiu estatisticamente da concentração de cálcio presente nas soluções do grupo Ca ($p < 0,05$), o qual apresentou o maior conteúdo de cálcio em solução. A concentração de cálcio presente na solução de enxágüe das amostras do grupo Ca diminuiu estatisticamente ao final do tratamento clareador (12º dia). Não houve diferenças entre a concentração de cálcio no 1º e 12º dias de clareamento para os demais grupos experimentais.

Determinação de flúor na solução de enxágüe.

A concentração de flúor presente nas soluções de enxágüe foi analisada através do teste Kruskal-Wallis e Friedman ($p < 0,05$) (Tabela 13, Gráfico 13), com o programa BioStat 3.0. A coluna F géis corresponde à concentração de fluoreto encontrada nos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração da concentração de fluoretos do agente clareador e da dosagem deste em solução (Anexo 1).

Tabela 13: Valores medianos de flúor presentes nos géis clareadores e na solução de enxágüe (ppm F, DP) da superfície de esmalte com lesão inicial de cárie (n=10):

Agentes	F géis	1º Dia			6º Dia			12º Dia		
PLA	1,2 (0,4)	2,9	(1-4)	Aa	3,1	(1-5)	Aa	3,2	(1-6)	Aa
WHI	1,4 (0,4)	30,9	(22-38)	Aa	19,6	(6-32)	Ab	25,3	(14-42)	Aab
F	2287(195)	909	(451-1249)	Ba	896,7	(518-1415)	Ba	955,9	(698-1250)	Ba
Ca	24,5 (0,2)	13,9	(10-24)	Aa	15,1	(11-20)	Aa	14,4	(13-18)	Aa
OPA	1129 (18)	291,3	(127-560)	Ba	278,8	(147-503)	Ba	298,1	(167-394)	Ba
PN	977,3 (48)	615,4	(552-648)	Bab	559,9	(468-622)	Bb	704	(571-731)	Ba

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

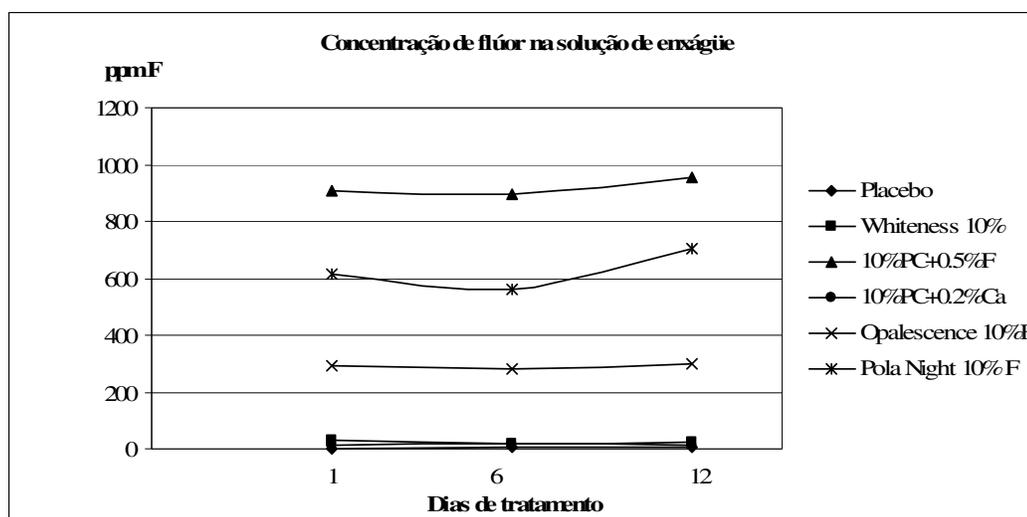


Gráfico 13: Concentração de flúor (ppm) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte com lesão inicial de cárie.

No 1º, 6º e 12º dias de clareamento, as concentrações de fluoreto nas soluções de enxágüe do esmalte com lesão inicial de cárie tratado com os agentes F, OPA, PN foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) que os grupos tratados com PLA, WHI e Ca, devido às altas concentrações de fluoreto nos três primeiros agentes (**Tabela 13, Gráfico 13**) (**Anexo 1**). Embora exista uma tendência de aumento da concentração de flúor na solução de enxágüe ao final do clareamento, não houve diferenças significantes entre o 1º e 12º dia de análise da solução de enxágüe para nenhum grupo analisado.

Determinação de fósforo inorgânico presente na solução de enxágüe.

A concentração de fósforo inorgânico presente nas soluções de enxágüe foram estatisticamente analisados através do teste estatístico Kruskal-Wallis e Friedman ($p < 0,05$) (**Tabela 14, Gráfico 14**), com o programa BioStat 3.0. A coluna Pi géis corresponde à concentração de fósforo inorgânico encontrada nos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração da concentração de Pi do agente clareador e a concentração de Pi obtido em espectrofotometria (**Anexo 1**).

Tabela 14: Valores de fósforo inorgânico ($\mu\text{g/mL}$) presente nos géis clareadores (média, desvio padrão) e na solução de enxágüe (mediana, amplitude) da superfície de esmalte com lesão inicial de cárie ($n=10$):

<i>Agentes</i>	<i>Pi géis</i>	<i>1º Dia</i>			<i>6º Dia</i>			<i>12º Dia</i>		
PLA	0,02 (0,003)	0,03	(0,01-0,06)	Aa	0,03	(0,01-0,06)	Aa	0,03	(0,01-0,05)	Aa
WHI	0,02 (0,01)	0,12	(0,12-0,3)	Ba	0,12	(0,1-0,3)	Ba	0,23	(0,1-0,4)	Ba
F	0,02 (0,01)	0,03	(0,01-0,04)	Aa	0,04	(0,01-0,08)	Aab	0,07	(0,06-0,12)	Ab
Ca	0,01 (0,01)	0,03	(0,003-0,04)	Aa	0,03	(0,01-0,2)	ABab	0,1	(0,07-0,2)	Bb
OPA	0,04 (0,01)	0,03	(0,01-0,09)	Aa	0,03	(0,01-0,2)	Aab	0,1	(0,07-0,2)	Bb
PN	0,05 (0,02)	0,03	(0,01-0,05)	Aa	0,01	(0,01-0,04)	Aa	0,03	(0,02-0,08)	Aa

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

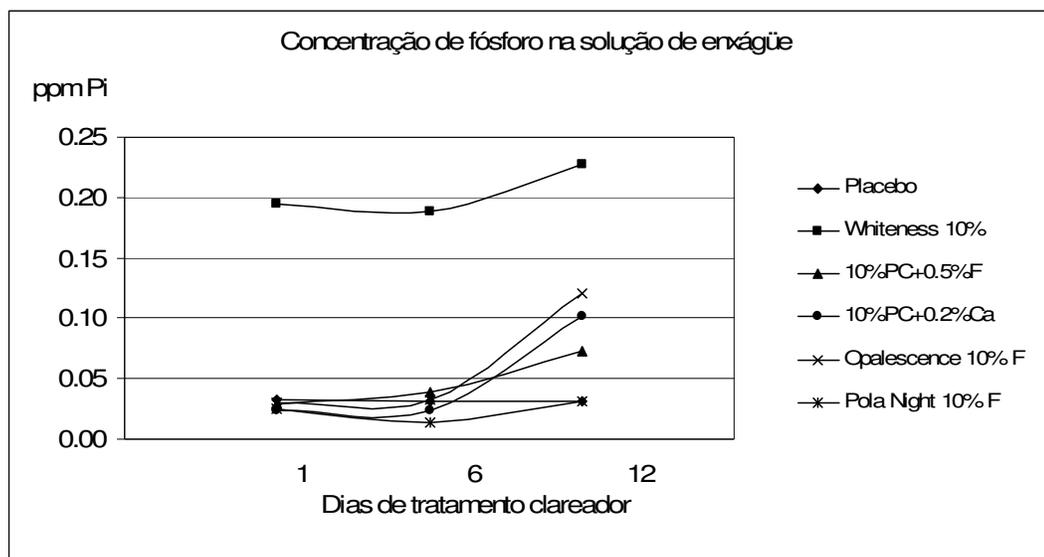


Gráfico 14: Concentração de fósforo inorgânico (Pi -ppm) presente nas soluções de enxágüe da superfície do esmalte com lesão inicial de cárie.

A concentração de Pi encontrado na solução de enxágüe do esmalte com lesão inicial de cárie (**Tabela 14, Gráfico 14**), no 1º dia de tratamento foi significativamente maior para o grupo tratado com WHI. No 6º dia de tratamento clareador a concentração de Pi do grupo WHI foi semelhante ao grupo Ca ($p>0,05$), e ao 12º dia de tratamento clareador, a concentração de Pi do WHI e Ca foi semelhante ao grupo tratado com OPA. Ao final do tratamento clareador (12º dia), a concentração de Pi na solução de enxágüe aumentou significativamente para os grupos tratados com os agentes F, Ca e Opalescence 10%F.

Determinação do pH da solução de enxágüe.

Os valores de pH da solução de enxágüe foram estatisticamente analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis e Friedman ($p<0,05$) (**Tabela 15, Gráfico 15**), com o programa BioStat 3.0. A coluna pH géis corresponde ao valor de pH dos agentes clareadores. Os valores apresentados na solução de enxágüe (colunas 1º, 6º e 12º dias) são resultados da subtração do valor do pH do agente clareador e do pH obtido na solução de enxágüe (**Anexo 1**).

Tabela 15: Valores de pH dos géis clareadores (média, desvio padrão) e da solução de enxágüe (mediana, amplitude) da superfície de esmalte com lesão inicial de cárie (n=10):

Agentes	pH géis	1º Dia			6º Dia			12º Dia		
PLA	6,7 (0,05)	6,70	(6,6-6,9)	ABa	6,70	(6,6-6,9)	ABa	6,90	(6,8-7,1)	Bb
WHI	6,7 (0,06)	6,65	(6,4-6,6)	Ba	6,65	(6,4-6,6)	Ba	6,80	(6,5-6,8)	Bb
F	6,8 (0,05)	6,70	(6,6-6,8)	ABa	6,70	(6,6-6,8)	ABa	6,70	(6,6-6,8)	Ba
Ca	6,9 (0,08)	6,40	(6,3-6,5)	Ba	6,40	(6,3-6,5)	Ba	6,40	(6,3-6,5)	Ca
OPA	7,0 (0,06)	7,20	(6,9 -7,3)	Aa	7,20	(6,9 -7,3)	Aa	7,20	(6,9 -7,3)	Aa
PN	6,9 (0,05)	6,50	(6,2-6,5)	Ba	6,50	(6,2-6,5)	Ba	6,50	(6,2-6,5)	BCa

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

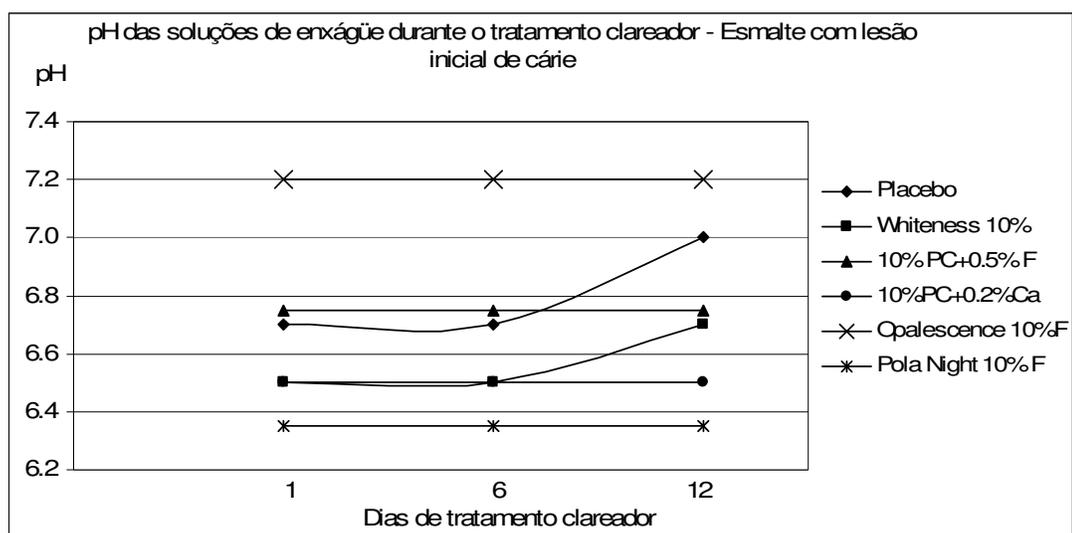


Gráfico 15: pH das soluções de enxágüe (1º, 6º e 12º dias de tratamento) obtidos da superfície de esmalte com lesão inicial de cárie.

Os valores de pH da solução de enxágüe das amostras clareadas com lesão inicial de cárie (**Tabela 15**, **Gráfico 15**) indicam que no 1º e 6º dia de tratamento clareador, a solução de enxágüe obtida grupo tratado com OPA apresentou o maior valor de pH, embora este não tenha diferido estatisticamente dos grupos PLA e F. No 12º dia de tratamento clareador, o grupo OPA apresentou o maior valor de pH da solução de enxágüe e foi diferente dos demais grupos experimentais. O grupo tratado com Ca

apresentou o menor valor de pH, embora não tenha sido diferente do grupo PN. Os grupos PLA e WHI foram os únicos a apresentar aumento significativo nos valores de pH da solução de enxágüe entre o 1º e 12º dia de análise das soluções.

Microscopia de Luz Polarizada

Os resultados médios obtidos após medição da profundidade de desmineralização (μm) nas imagens em microscopia de luz polarizada foram estatisticamente analisados através do teste ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) (**Tabela 16**), com o programa SAS.

Tabela 16: Resultados médios obtidos do comprimento da lesão (μm , Média e DP) observado nas amostras de microscopia de luz polarizada:

<i>Agentes</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Resultados</i>
PLA	31,2	(4,6)	A
WHI	105,5	(22,7)	D
F	48,5	(9,1)	B
Ca	58,9	(4,5)	BC
OPA	65,8	(13,6)	C
PN	61,9	(14,0)	BC

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os grupos.

O comprimento da lesão observado na superfície do esmalte com lesão inicial de cárie tratado com diferentes agentes clareadores indicam que o grupo PLA apresentou a menor lesão entre os grupos ($p < 0,05$) (**Tabela 16**). Entre os grupos clareados, a superfície do esmalte tratada com o agente clareador WHI apresentou o maior comprimento de lesão quando comparados a todos os agentes clareadores utilizados ($p < 0,05$). O grupo tratado com agente clareador contendo fluoreto foi diferente do grupo tratado com o agente comercial OPA, também contendo flúor. O grupo tratado com o agente contendo cálcio não foi diferente do grupo tratado com F, OPA e PN ($p > 0,05$).

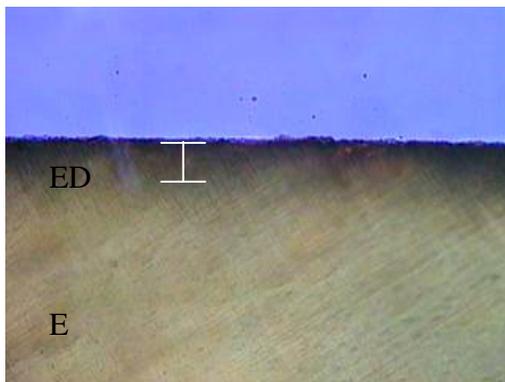


Figura 7: Placebo

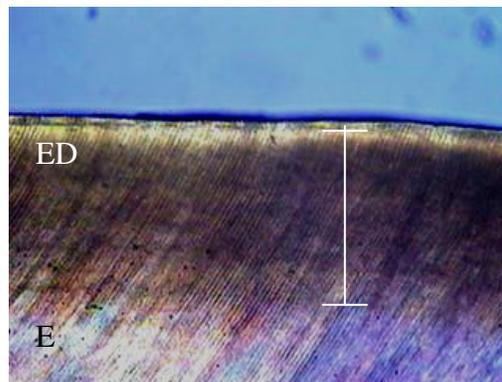


Figura 8: Whiteness 10%

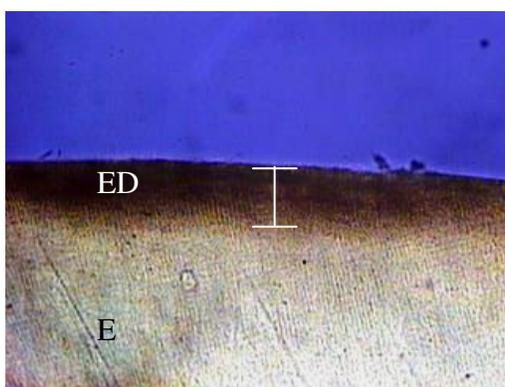


Figura 9: 10% PC + 0,5% F

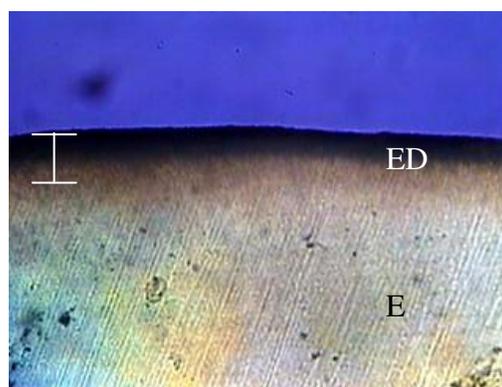


Figura 10: 10% PC + 0,2% Ca

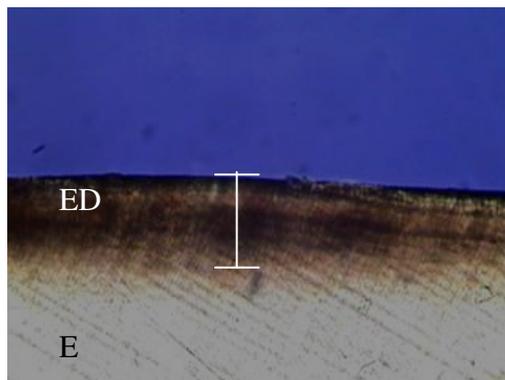


Figura 11: Opalescence 10% F

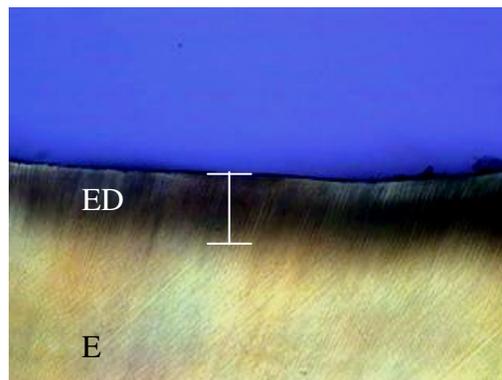


Figura 12: Pola Night 10% F

┃ Profundidade de desmineralização E -esmalte íntegro ED- esmalte desmineralizado

As imagens mais representativas de cada grupo indicam que o esmalte com lesão inicial de cárie apresenta desmineralização superficial independente do tratamento recebido (**Figs. 7 a 12**). Entretanto, observa-se que o grupo clareado com o agente clareador WHI (**Fig. 8**), sem adição de flúor ou cálcio apresenta maior comprimento de lesão de cárie quando comparado aos demais grupos. O grupo PLA (**Fig. 7**), embora apresente desmineralização, a profundidade da mesma é menor que os grupos que foram clareados com agentes contendo peróxido de carbamida 10% (**Figs. 8, 9, 10, 11 e 12**).

Microdureza interna.

A área de desmineralização das amostras com lesão inicial de cárie, submetidos aos tratamentos clareadores foram analisadas através da microdureza interna. Os valores em dureza obtidos foram calculados em porcentagem (%) de volume mineral e Delta Z. Os dados obtidos de Delta Z (área de desmineralização) foram estatisticamente analisados através do teste de ANOVA (um fator) e Fisher ($p < 0,05$), com o programa StatView. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 17**.

Tabela 17: Área de desmineralização interna obtido após ensaio de microdureza longitudinal (Delta Z):

<i>Agentes</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Resultados</i>
PLA	658,3	(191,3)	A
WHI	1571,5	(744,4)	B
F	679,1	(332,4)	A
Ca	975,8	(634,6)	A
OPA	1165,9	(712,2)	AB
PN	935,1	(625,4)	A

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os grupos.

Os resultados obtidos (**Tabela 17**) indicam que a maior área de desmineralização para a superfície do esmalte clareada e previamente desmineralizada foram causados pelo agente WHI, embora este não tenha sido estatisticamente diferente do

agente OPA. O Grupo PLA e o agente experimental contendo flúor (F) apresentaram os menores valores de área desmineralizada (Delta Z). Os agentes clareadores contendo cálcio (Ca) e o PN obtiveram valores intermediários de área desmineralizada após os tratamentos clareadores realizados.

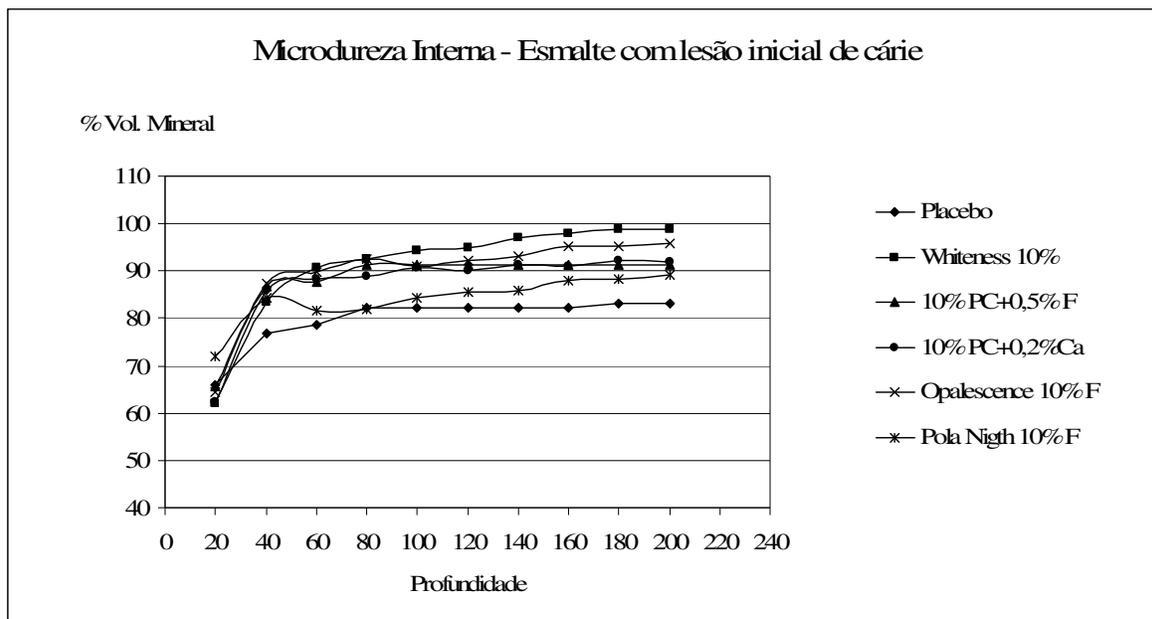


Gráfico 16: Porcentagem de volume mineral em função da profundidade (μm) mensurada através de microdureza longitudinal.

O **Gráfico 16** ilustra a porcentagem de volume mineral obtida em função da profundidade do esmalte tratado com os diferentes agentes clareadores e com o PLA. Embora todos os grupos com lesão inicial de cárie apresentem diminuição na porcentagem de volume mineral na superfície do esmalte (aproximadamente 70% do volume mineral inicial), esse valor aumenta com a profundidade de leitura.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

Estudo B.1

Resistência Coesiva da dentina clareada.

Os resultados obtidos após o ensaio de microtração, para a resistência máxima à tração da dentina (RMT) foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA, dois fatores) e Teste de Tukey ($p < 0,05$) (**Tabela 15**), através do programa SAS.

Tabela 15: Resultados da média de resistência à tração da dentina (RMT, em MPa) após diferentes tratamentos clareadores (média, desvio padrão):

Agentes clareadores	Integro			Desmineralizado		
	Média	DP	Resultados	Média	DP	Resultados
Controle (CO)	48,3	(8,5)	Aa	38,9	(13,8)	Aa
Perborato de sódio (PS)	34,6	(8,2)	Ba	31,3	(9,3)	ABa
Peróxido de carbamida 35% (PC)	32,9	(8,9)	Ba	28,4	(6,2)	ABa
Peróxido de Hidrogênio 25% (PH 25%)	28,0	(4,6)	Ba	30,0	(7,9)	ABa
Peróxido de Hidrogênio 35% (PH 35%)	26,4	(6,6)	Ba	19,9	(4,6)	Bb

Letras maiúsculas- coluna Letras minúsculas – linhas

A RMT do grupo controle foi estatisticamente maior quando comparado à RMT da dentina sujeita a qualquer outro tratamento clareador. Nenhuma diferença foi encontrada na dentina íntegra clareada, independente do agente clareador utilizado (**Tabela 15**).

A dentina desmineralizada não clareada (controle) apresentou diferença em relação à dentina desmineralizada clareada com PH 35%. A dentina desmineralizada, tratada com PH 35% foi, entretanto, semelhante aos tratamentos realizados com Peróxido de Hidrogênio 25%, Peróxido de carbamida 35% e Perborato de sódio. A RMT da dentina desmineralizada, clareada com PH 35% foi menor que ao da dentina íntegra tratada com o mesmo agente clareador.

Análise ultra-estrutural da dentina clareada intacta.

As imagens obtidas da estrutura dentinária intacta sem o tratamento clareador (CO – **Fig. 13 e 14**) indicam que não houve remoção da estrutura mineral do esmalte, uma

vez que as fibrilas colágenas apresentam-se pouco evidentes na matriz dentinária intertubular. Para os grupos clareados, que permaneceram com a dentina intacta, observa-se que todos os agentes clareadores foram capazes de remover matriz mineral e expor fibrilas colágenas (Fig. 16, 18, 20 e 22)

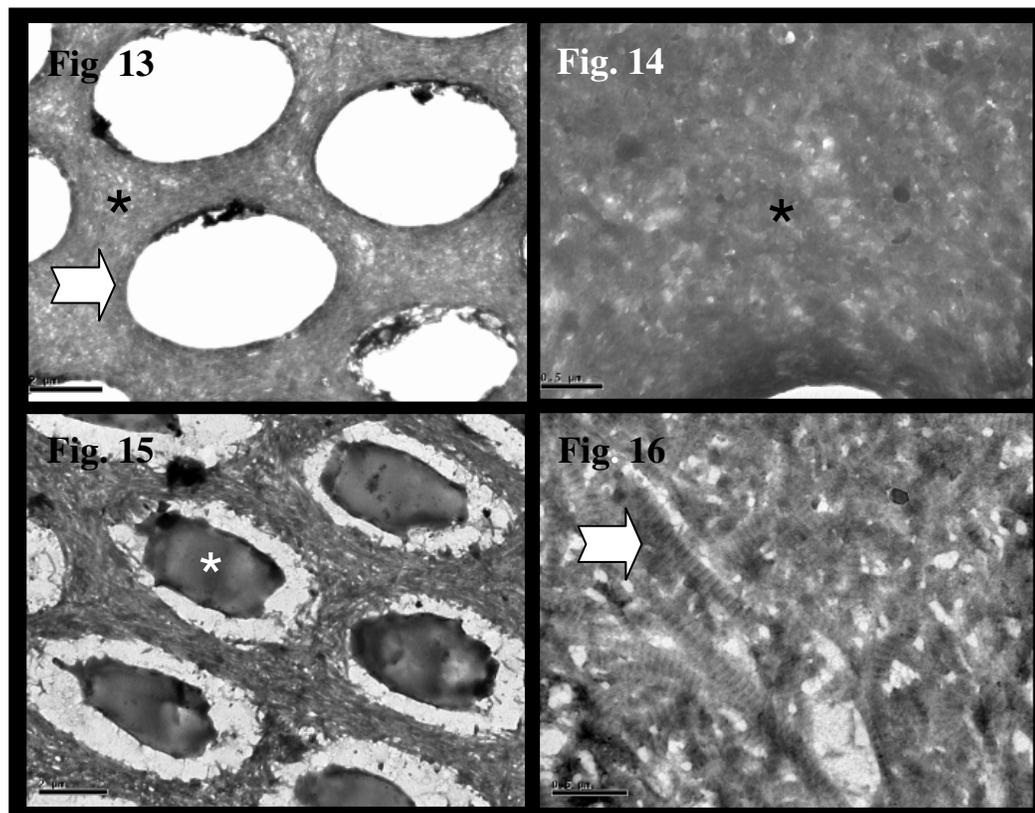


Figura 13: Grupo Controle (5600x). (*) indica a dentina intertubular e (⇨) indica túbulos dentinários sem a presença de prolongamentos odontoblásticos. **Figura 14:** Grupo Controle (19500x). Em maior aumento, observa-se a dentina intertubular compacta, não sendo possível a identificação de fibrilas colágenas (*). **Figura 15:** Grupo PS (5600x). Observa-se a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de túbulos dentinários (*). **Figura 16:** Grupo PS (19500x). Observa-se a exposição de fibrilas colágenas indicando perda mineral da dentina após tratamento clareador (⇨).

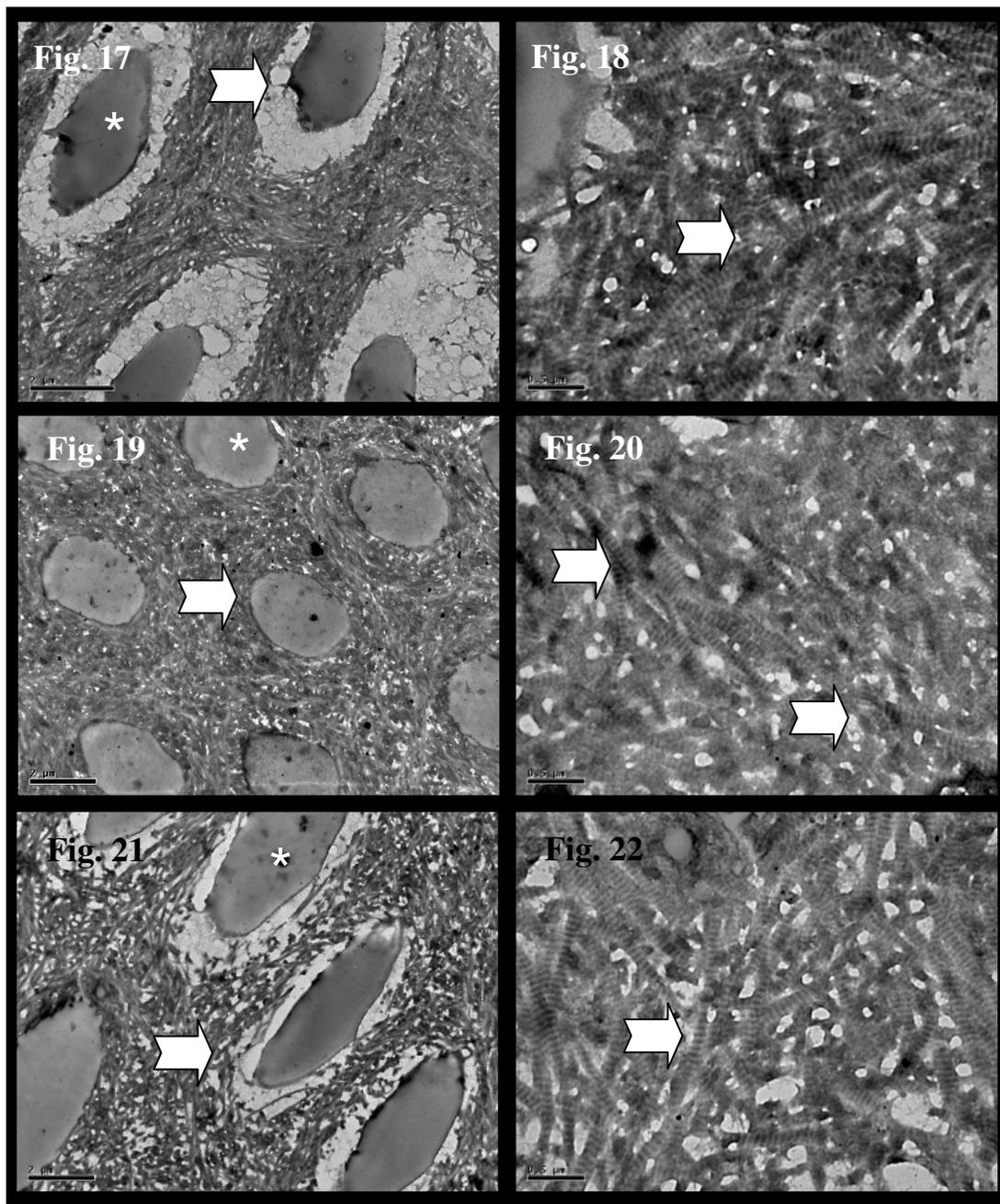


Figura 17: Grupo PC 35% (5600x). (*) indica a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de túbulos dentinários e (⇒) indica a dentina intertubular. **Figura 18:** Grupo PC 35% (19500x). Observa-se a exposição das fibrilas colágenas (⇒). **Figura 19:** Grupo PH 25% (5600x). Observa-se a presença de prolongamentos odontoblásticos nos túbulos dentinários (*) e dentina intertubular desmineralizada (⇒). **Figura 20:** Grupo PH 25% (19500x). Observa-se a exposição de fibrilas colágenas (⇒). **Figura 21:** Grupo PH 35% (5600x). (*) indica a dentina intertubular e (⇒) indica túbulos dentinários com a presença de prolongamentos odontoblásticos. **Figura 22:** Grupo PH 35% (19500x). Após o tratamento clareador, observa-se a exposição de fibrilas (⇒).

Análise ultra-estrutural da dentina clareada desmineralizada.

Quando a dentina sofre desmineralização (Fig. 23 e 24), as fibrilas tornam-se evidentes, demonstrando que o condicionamento ácido prévio foi capaz de remover parte do conteúdo mineral inter e intratubular. A dentina desmineralizada e clareada apresenta também a fibrila colágena desprovida de matriz inorgânica (Fig. 26, 28, 30 e 32)

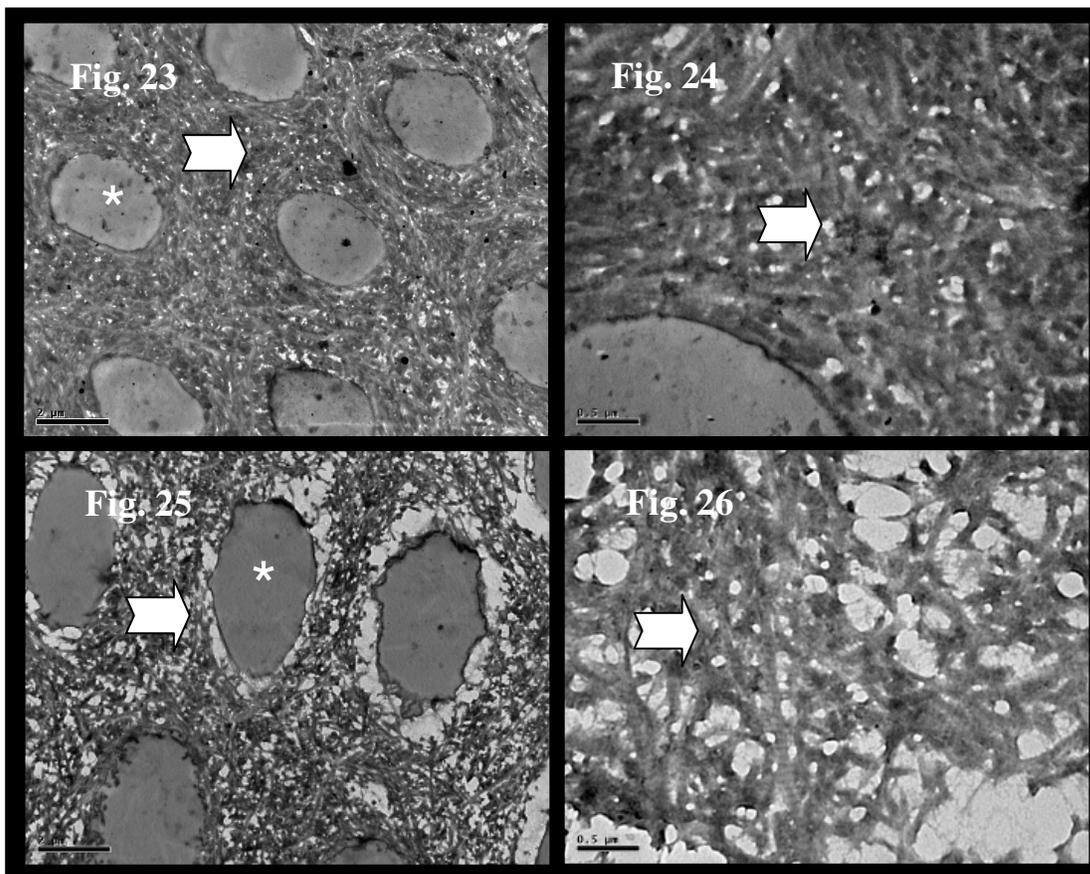


Figura 23: Grupo Controle (5600x). (*) indica a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de túbulos dentinários e (⇒) indica a dentina intertubular. **Figura 24:** Grupo Controle (19500x). Observa-se a dentina intertubular com exposição das fibrilas colágenas (⇒). **Figura 25:** Grupo PS (5600x). Observa-se a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de túbulos dentinários (*) e dentina intertubular desmineralizada (⇒). **Figura 26:** Grupo PS (19500x). Observa-se a exposição de fibrilas colágenas (⇒).

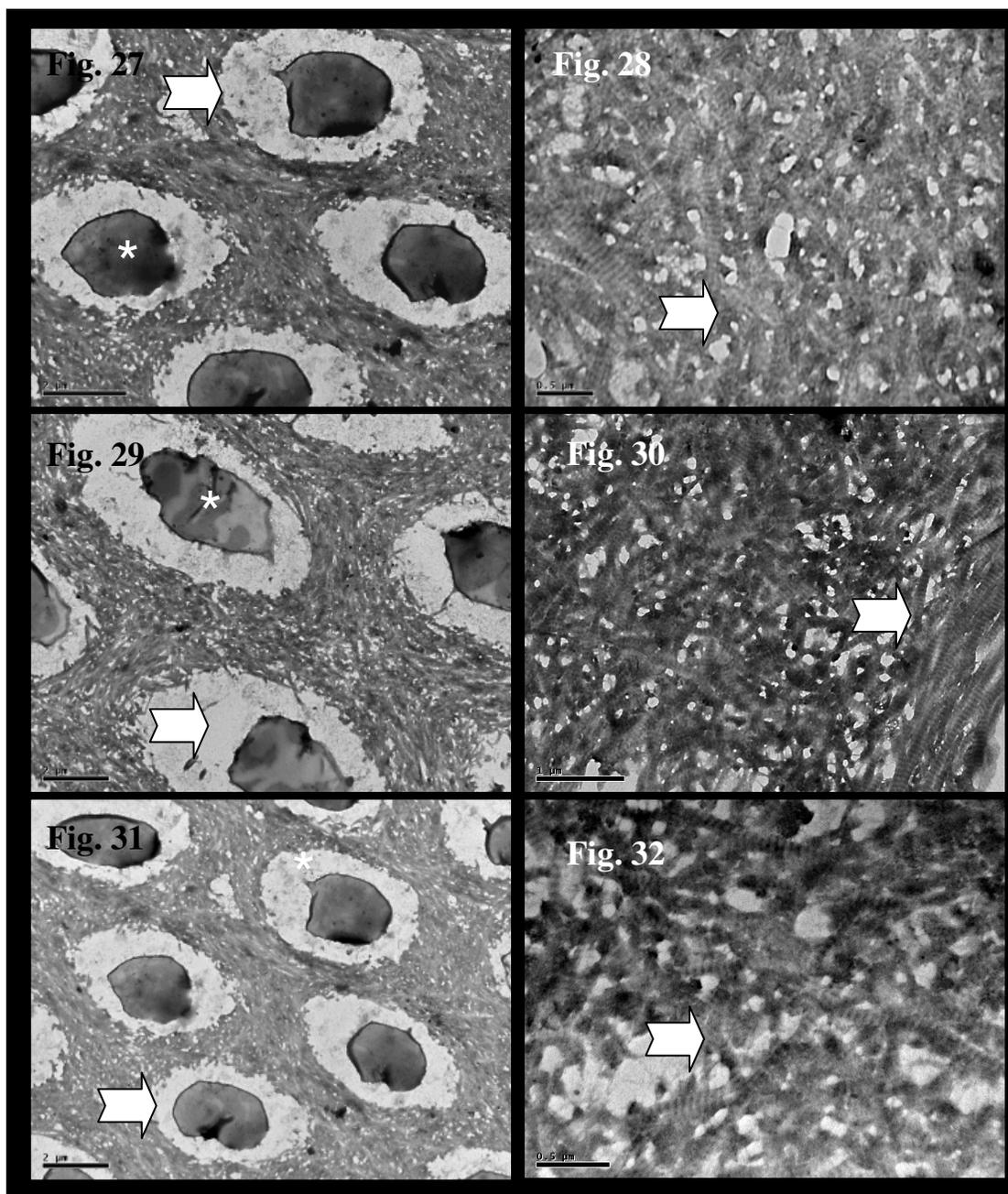


Figura 27: Grupo PC 35% (5600x). (*) indica a presença de odontoblastos no interior de túbulos dentinários e (↔) indica a dentina intertubular. **Figura 28:** Grupo PC 35% (19500x). Observa-se a dentina intertubular com exposição das fibrilas colágenas (↔). **Figura 29:** Grupo PH 25% (5600x). Observa-se a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de túbulos dentinários (*) e dentina intertubular desmineralizada (↔). **Figura 30:** Grupo PH 25% (19500x). Observa-se a exposição de fibrilas colágenas (↔). **Figura 31:** Grupo PH 25%. A (↔) indica a presença de prolongamento odontoblásticos no interior do túbulo dentinário. **Figura 32:** A (↔) indica a exposição da fibrila colágena na matriz dentinária.

Estudo B.2

Resistência de união e análise morfológica da dentina clareada.

Resistência de união da dentina clareada hígida.

Os resultados obtidos após o ensaio de microtração, para a resistência de união da dentina hígida (RU) foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA, dois fatores) e Teste de Dunnet ($p < 0,05$) (**Tabela 16**), através do programa SAS.

Tabela 16: Resultados da média de resistência de união à dentina (RU) após diferentes tratamentos clareadores (média, desvio padrão):

Agentes	Imediatamente			7 dias			14 dias		
	Média	DP	Resultados	Média	DP	Resultados	Média	DP	Resultados
CO	35,6	(3,6)	Aa	32,7	(13,7)	ABa	37,2	(14,3)	Aa
PS	22,3	(4,8)	Ba	30,0	(7,2)	Ab	36,0	(6,7)	Ac
PC	26,8	(8,6)	Ba	25,5	(9,8)	ABa	30,4	(10,9)	Ab
PH 25%	21,6	(4,4)	Ba	26,1	(9,1)	ABa	28,5	(5,9)	Ab
PH 35%	25,3	(9,9)	Ba	24,3	(5,9)	Ba	31,0	(5,4)	Ab

Letras maiúsculas – colunas Letras minúsculas – linhas

A resistência de união da dentina não-clareada hígida (grupo CO) foi estatisticamente maior que a da dentina clareada, independente do tratamento clareador recebido (**Tabela 16**). Após 7 dias de clareamento, a resistência de união do grupo tratado com PH 35% foi estatisticamente diferente do grupo tratado com perborato de sódio, no entanto, semelhante aos demais grupos clareados. Após 14 dias de clareamento, não houve diferenças entre os grupos clareados e não-clareados ($p > 0,05$). A resistência de união dos espécimes clareados aumentou após 14 dias de tratamento clareador.

Resistência de união da dentina clareada pré-condicionada.

Os resultados obtidos após o ensaio de microtração de resistência de união da dentina pré-condicionada com ácido fosfórico 37% (RU), foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA, dois fatores) e Teste de Dunnet ($p < 0,05$) (**Tabela 17**).

Tabela 17: Resultados da resistência de união dentinária (RU) da dentina pré-condicionada após diferentes tratamentos clareadores (média, desvio padrão):

Agentes	Imediatamente			7 dias			14 dias		
CO	29,7	(3,5)	Aa	24,8	(3,7)	Ab	32,5	(5,0)	Aa
PS	22,6	(7,7)	Ba	23,0	(7,0)	Aa	28,7	(5,8)	Ab
PC	21,5	(8,3)	Ba	22,5	(6,3)	Ba	27,7	(4,3)	Bb
PH 25%	26,7	(6,8)	Ba	27,6	(4,6)	Ba	25,7	(3,3)	Ba
PH 35%	26,8	(7,0)	Ba	21,3	(5,7)	Ba	25,7	(5,3)	Ba

Letras maiúsculas- colunas Letras minúsculas- linhas

Imediatamente após o tratamento clareador da dentina pré-condicionada, o grupo controle apresentou os maiores valores de resistência de união quando comparado aos demais grupos clareados (**Tabela 17**). Após 7 e 14 dias de tratamento clareador, a dentina pré-condicionada tratada com o agente clareador PS apresentou resistência de união semelhante ao do controle. Os demais grupos clareados (PC, PH 25%, PH 35%) foram estatisticamente diferentes do grupo controle e PS, mas semelhantes entre si. Apenas o grupo tratado com PS e PC apresentaram aumento significativo da resistência de união da dentina após 14 dias de tratamento clareador, em relação à resistência imediatamente após o tratamento clareador.

Nanoinfiltração na dentina clareada.

As imagens de MET demonstram que inicialmente, todos os grupos clareados com substrato intacto ou desmineralizado apresentaram nanoinfiltração na camada híbrida (impregnação de nitrato de prata, indicado pelas setas brancas e pretas) (**Fig. 33-37 e 48-52**). Com o tempo (7 e 14 dias), a concentração de nitrato de prata diminuiu, mas não foi totalmente eliminada. O grupo controle (**Fig. 43 e 58**) apresentou impregnação mais branda

nos 7º e 14º dias após o tratamento clareador, tanto para a dentina íntegra, quanto pré-condicionada. O grupo PS com dentina hígida (**Fig. 34**), apresentou impregnação de nitrato de prata imediatamente após o tratamento clareador, mas 7 dias após este tratamento, a nanoinfiltração pareceu diminuir (**Fig. 39**), embora no 14º dia, nota-se prata na camada híbrida (**Fig. 44**). A dentina pré-condicionada, tratada com PS apresenta um comportamento semelhante (**Fig. 49**), embora não se note nitrato no 7º (**Fig. 54**) e 14 dias após o tratamento clareador (**Fig. 59**).

A dentina íntegra e pré-condicionada tratada com os agentes PC, PH 25% e PH 35% apresentam comportamento semelhante após o tratamento clareador. Imediatamente, ocorre impregnação da camada híbrida de todos os grupos. No 7º (**Fig. 40, 41, 42**) e 14º (**Fig. 45, 46, 47**) dias após o tratamento, existe diminuição considerável de concentração de nitrato na camada híbrida dos agentes tratados com PC (**Fig. 40, 45**), mas os grupos PH 25% (**Fig. 41, 46**) e PH 35% (**Fig. 42, 47**) ainda apresentam um padrão de nanoinfiltração.

Dentina hígida: Imediatamente após clareamento

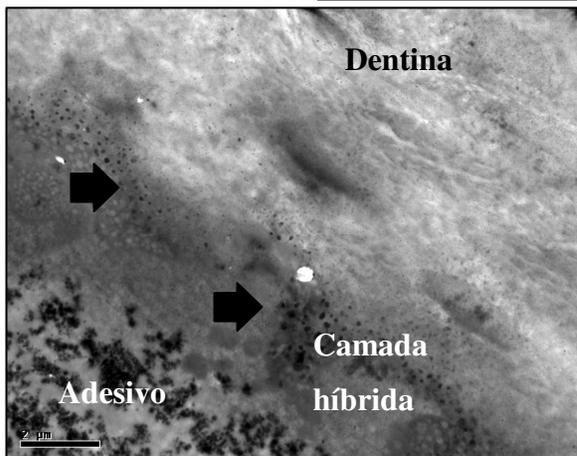


Figura 33: CO (11500x)



Figura 34: PS (15000x)

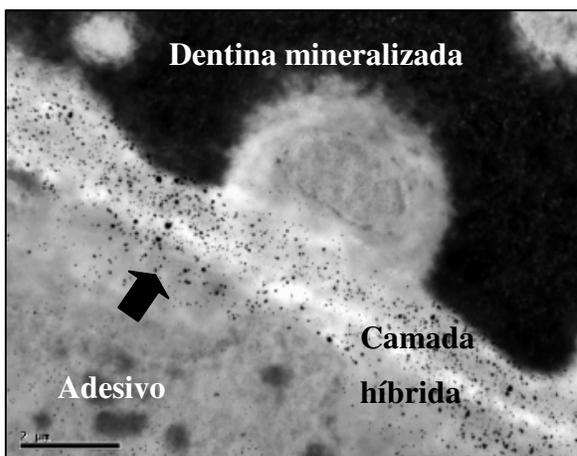


Figura 35: PC (11500x)

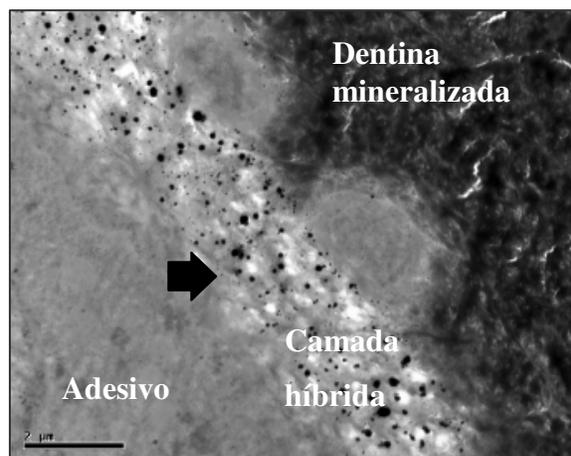


Figura 36: PH 25% (15000x)

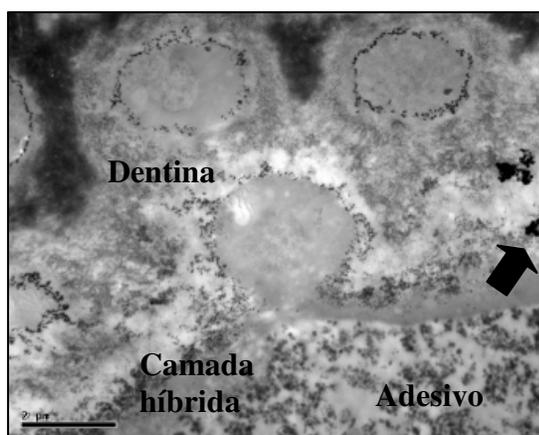


Figura 37: PH 35% (8800x)

➡ Nitrato de prata.

Dentina hígida: 7 días após clareamento

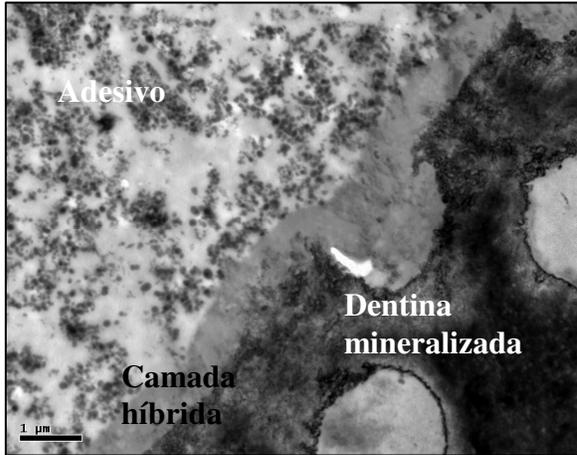


Figura 38: CO (11500x)

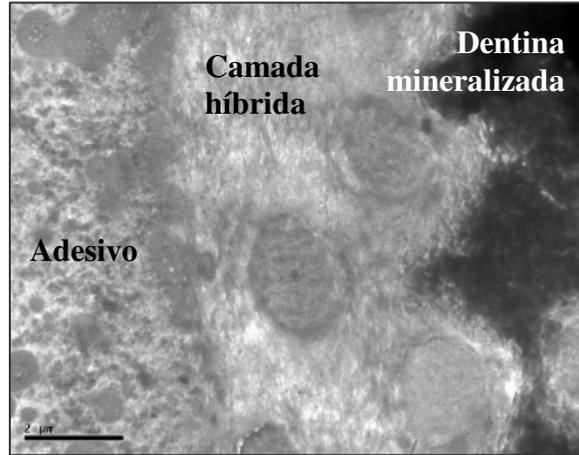


Figura 39: PS (15000x)

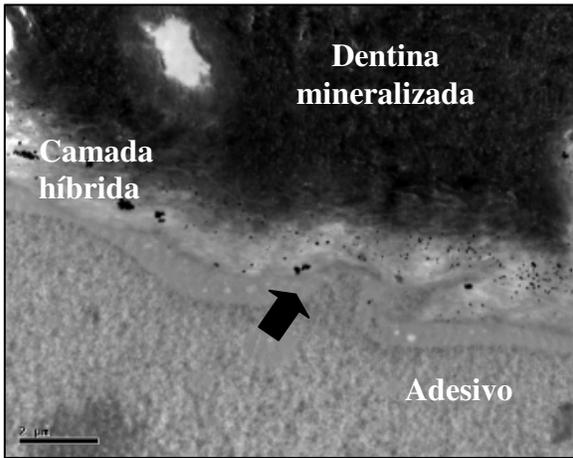


Figura 40: PC (5600x)

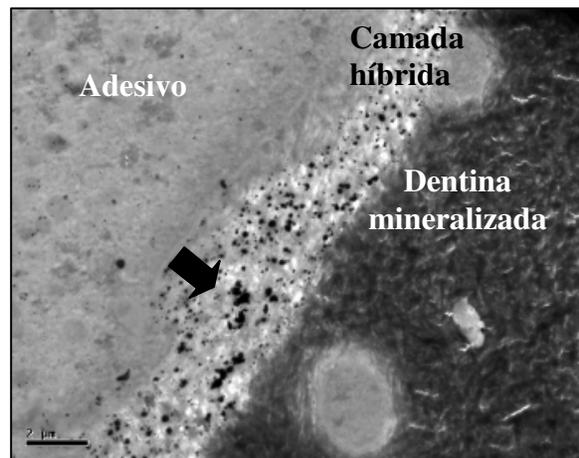


Figura 41: PH 25% (8800x)

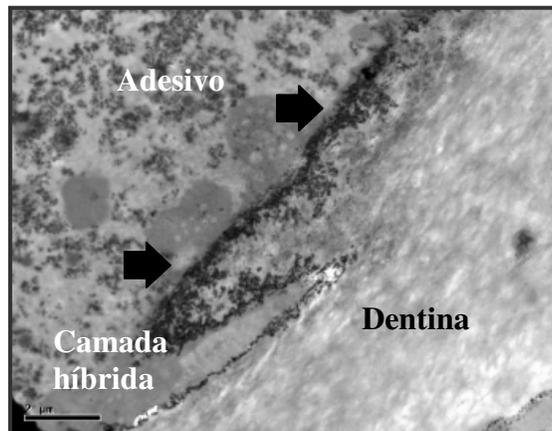


Figura 42: PH 35% (5600x)

➡ Nitrato de prata.

Dentina hígida: 14 días após clareamento

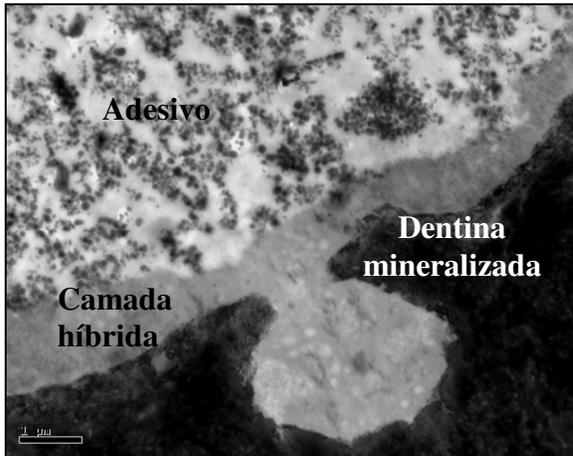


Figura 43: CO (11500x)

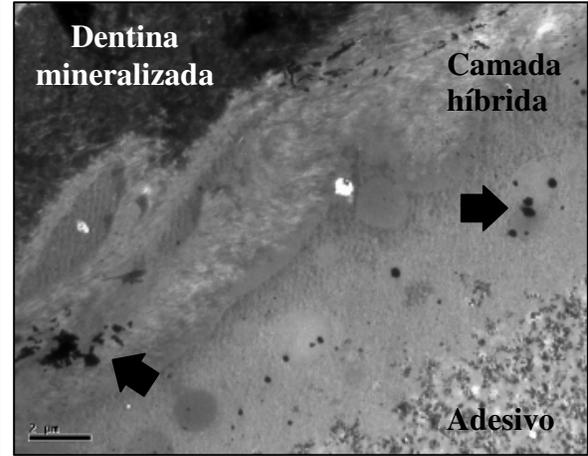


Figura 44: PS (15000x)

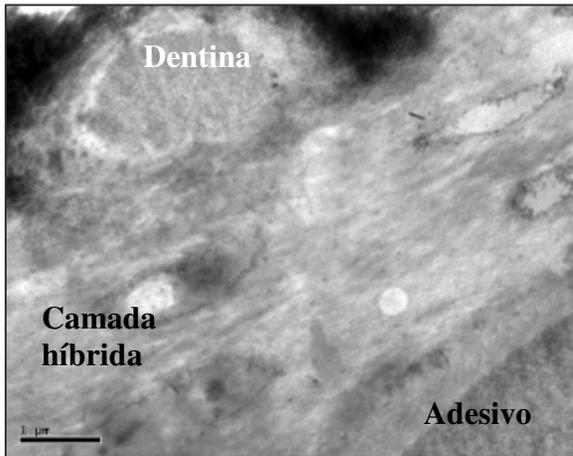


Figura 45: PC (19500x)

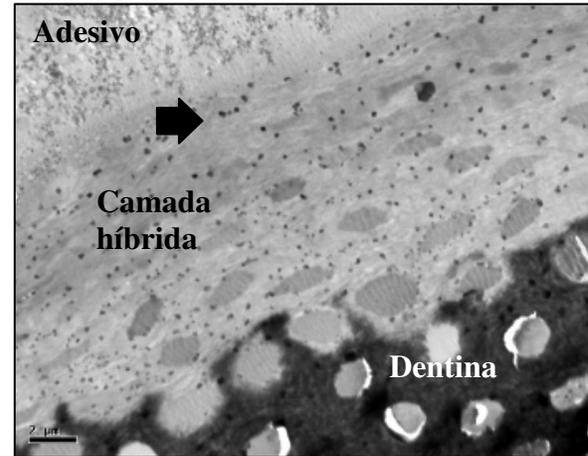


Figura 46: PH 25% (11500x)

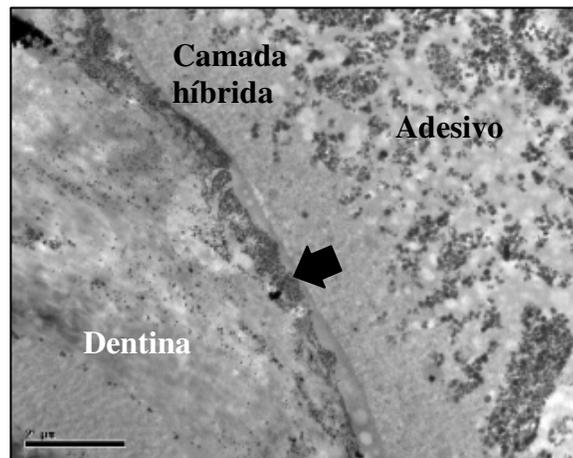


Figura 47: PH 35% (11500x)

➡ Nitrato de prata.

Dentina pré-condicionada: Imediatamente após clareamento

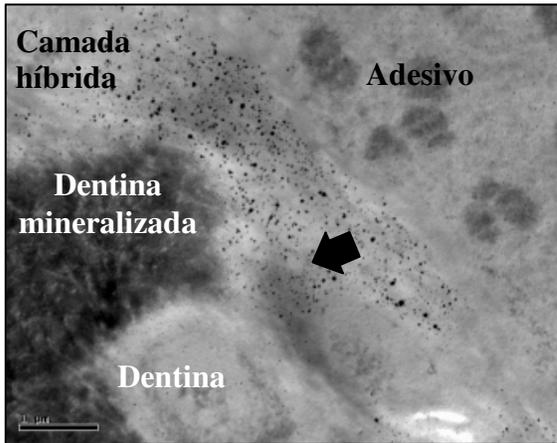


Figura 48: CO (15000x)

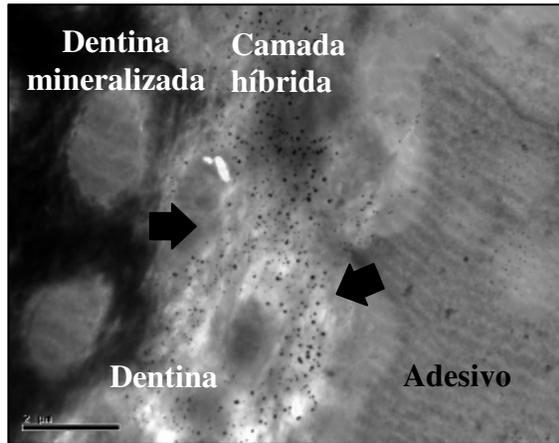


Figura 49: PS (15000x)

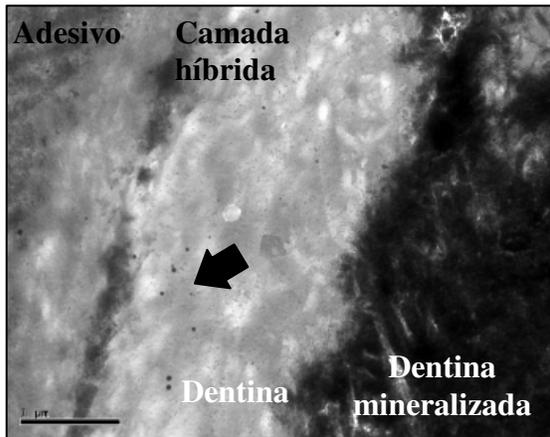


Figura 50: PC (19500x)

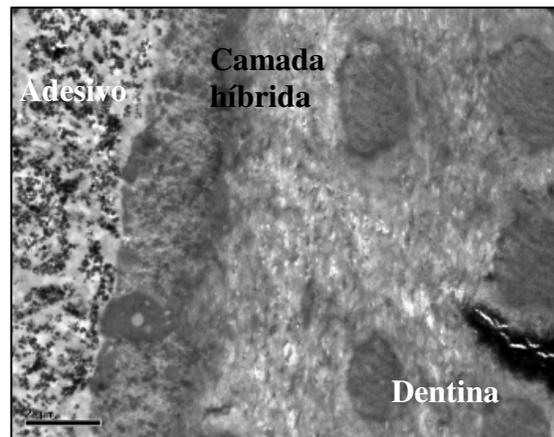


Figura 51: PH 25% (15000x)

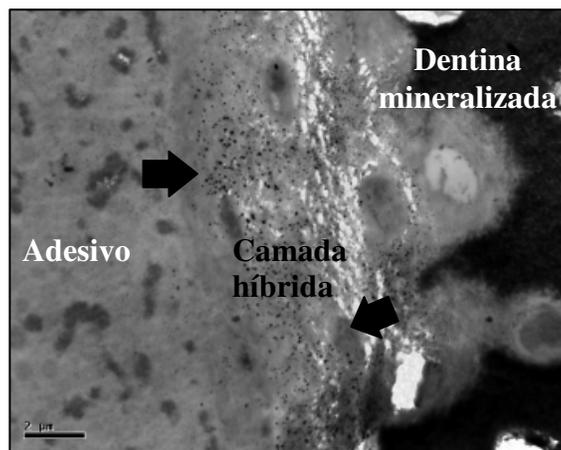


Figura 52: PH 35% (8800x)

➡ Nitrato de prata.

Dentina pré-condicionada: 7 dias após clareamento

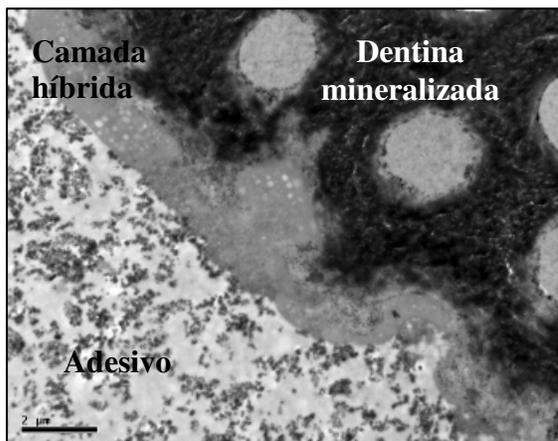


Figura 53: CO (11500x)

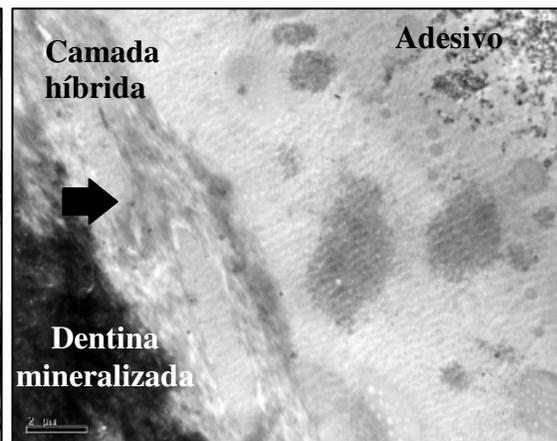


Figura 54: PS (15000x)

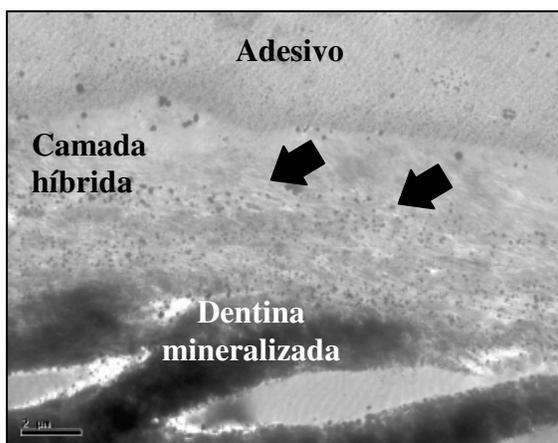


Figura 55: PC (19500x)

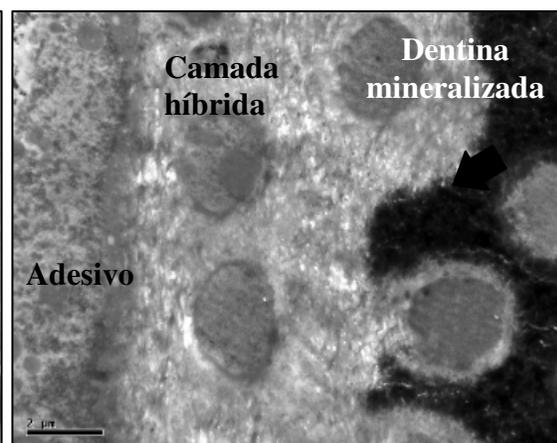


Figura 56: PH 25% (19500x)

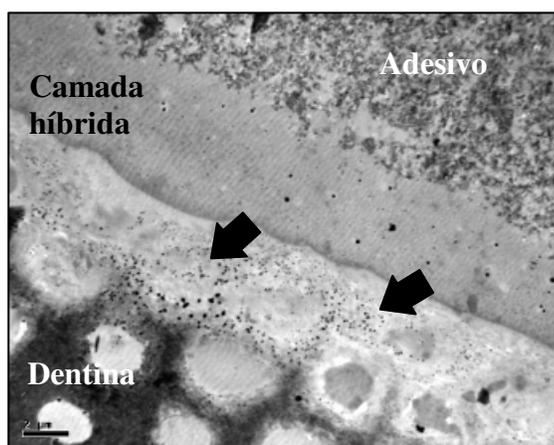


Figura 57: PH 35% (15000x)

➡ Nitrato de prata.

Dentina pré-condicionada: 14 dias após clareamento

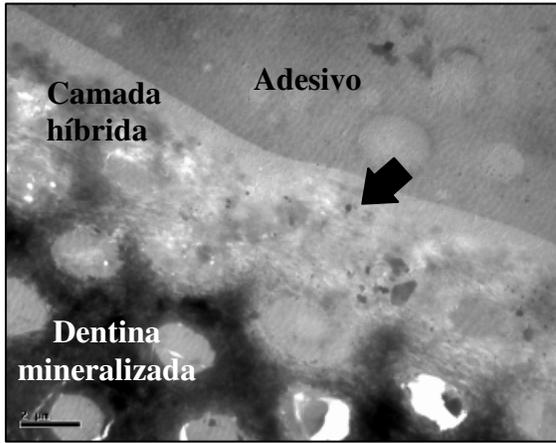


Figura 58: CO (19500x)

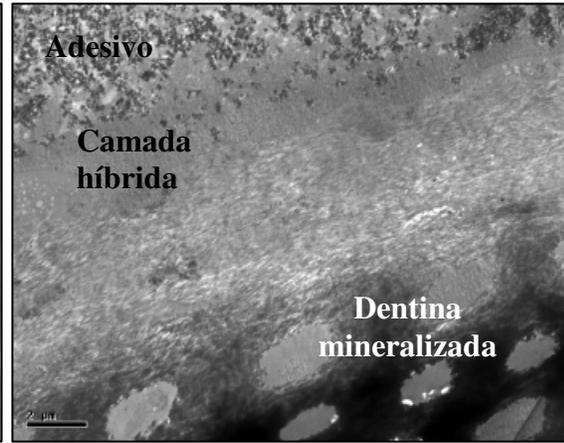


Figura 59: PS (19500x)

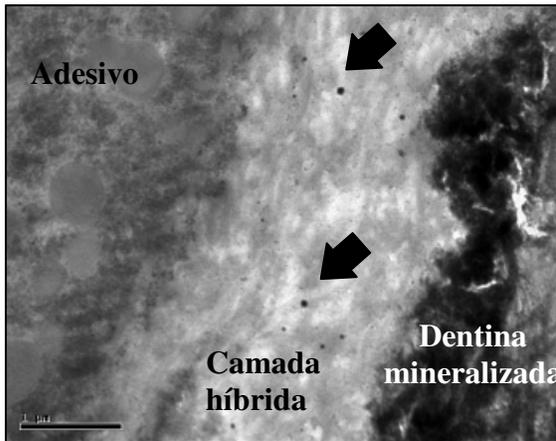


Figura 60: PC (19500x)

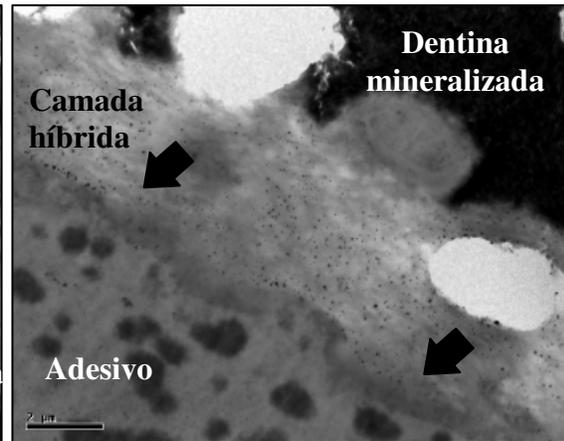


Figura 61: PH 25% (19500x)

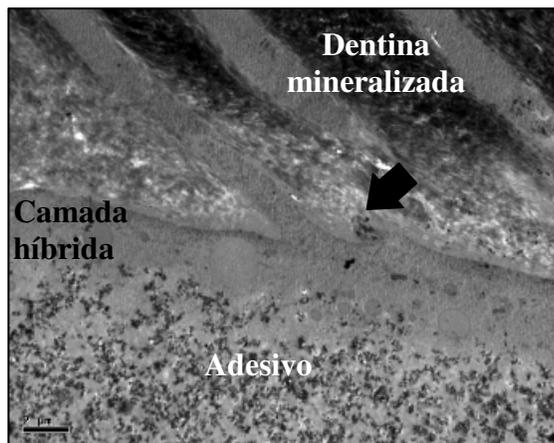


Figura 62: PH 35% (15000x)

➡ Nitrato de prata.

6. DISCUSSÃO

Estudo A.1

No passado, o clareamento de dentes vitais era freqüentemente realizado em consultório com a utilização de agentes oxidantes em altas concentrações, associados ao condicionamento ácido prévio da superfície do esmalte e à aplicação de uma fonte de calor e com o objetivo de acelerar a reação do agente (Smith & McInnes, 1942; Arens *et al.*, 1972; Corcoran & Zillich, 1974). Os agentes clareadores mais utilizados então, eram soluções de peróxido de hidrogênio (30-35%), com baixo pH, que promoviam alterações significativas na superfície de esmalte clareado (McGuckin *et al.*, 1992) bem como redução da concentração de cálcio e fosfato (Ca/P) desse substrato (Rotstein *et al.*, 1996).

A técnica clareadora caseira ou noturna, utilizando baixas concentrações de peróxido de carbamida (10-22%) ou peróxido de hidrogênio (5,0-10%), tornou-se rapidamente conhecida devido à sua eficácia, praticidade e principalmente, segurança em relação às antigas técnicas clareadoras de consultório (Li, 1996, Haywood, 1992, Kelleher & Roe, 1999). Entretanto, mesmo para as baixas concentrações de peróxido de carbamida, vários estudos reportam diminuição nos valores de microdureza de superfície (Murchison, *et al.*, 1992, Smidt, Weller, Roman & Gedalia, 1998, Basting *et al.*, 2001), aumento da rugosidade do esmalte (McGuckin *et al.*, 1992; Bitter & Sanders, 1993; Josey *et al.*, 1996; Ernst *et al.*, 1996; Zalkind *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 2004a), diminuição da resistência do substrato (Cavalli *et al.*, 2004b), alterações morfológicas do esmalte clareado (Bitter, 1992; Bitter & Sanders, 1993; Ernst *et al.*, 1996; Josey *et al.*, 1996; Zalkind *et al.*, 1996) e diminuição da resistência de união de sistemas adesivos ao substrato (Titley, *et al.*, 1992; Stokes *et al.* 1992; McGuckin *et al.*, 1992; Garcia-Godoy *et al.*, 1993; Miles *et al.* 1994; Perdigão *et al.* 1998; Cavalli *et al.*, 2001)

Alguns autores observaram que a aplicação de peróxido de carbamida a 10% pode diminuir da concentração de cálcio, fosfato e flúor no esmalte clareado (Perdigão *et al.*, 1998; Potocnik *et al.*, 2000; Burgmaier *et al.*, 2002). Com o intuito de reverter tal situação muitos agentes clareadores comerciais contêm íons como flúor, que visam minimizar não apenas a possível sensibilidade resultante da terapia clareadora (Leonard *et*

al., 1998), como potencializar a remineralização da superfície do substrato clareado (Attin *et al.*, 1997, 2006). Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a eficácia de agentes comerciais e experimentais contendo aditivos na manutenção das propriedades físicas e químicas do esmalte humano clareado.

Os resultados obtidos antes, durante e ao término do tratamento clareador, indicam que em todos os grupos houve, inicialmente, diminuição dos valores de microdureza. O grupo tratado com o agente Whiteness 10%, sem aditivos, demonstrou diminuição progressiva de dureza durante todo o tratamento clareador e nenhuma indicação de remineralização da superfície tratada. O grupo placebo, embora tenha apresentado diminuição da microdureza no sexto dia de tratamento clareador, ao final do mesmo, apresentou o mesmo valor de dureza inicial. Tal comportamento pode ser atribuído à possível remineralização da superfície devido ao contato com a solução remineralizante, na qual as amostras permaneceram imersas durante os intervalos do tratamento clareador (Rodrigues *et al.*, 2001). A alta porcentagem de perda mineral das amostras tratadas com o agente Whiteness 10% (aproximadamente 45%) pode indicar a incapacidade da solução remineralizante em reverter a perda mineral estabelecida, dependendo do grau de desmineralização da superfície. O agente contendo 10% de peróxido de carbamida associado a 0,2% Ca (2114 ppm) apresentou o melhor desempenho entre os agentes clareadores, uma vez que os valores de microdureza permaneceram inalterados.

A ERTF identificou a concentração de fosfato associado à hidroxiapatita do esmalte antes e após o tratamento clareador. Os resultados obtidos confirmam o bom desempenho do gel clareador contendo alta concentração de cálcio, pois as amostras tratadas com este agente apresentaram e mantiveram alta concentração de fosfato na superfície clareada. A manutenção da concentração de fosfato indica que houve pouca ou nenhuma desmineralização na região do esmalte testada.

O esmalte tratado com o agente 10%PC +0,2% Ca, apresentou ao final do tratamento a maior concentração deste íon na solução (327 ppm), devido à alta concentração de cálcio presente no gel clareador (2114 ppm). No entanto, observa-se que apenas uma pequena concentração de cálcio encontra-se em solução quando comparada com a concentração real do íon no agente clareador. É possível que o cálcio presente no gel

clareador tenha sofrido desposição na superfície do esmalte clareador. Os grupos Placebo, Whiteness 10% e Pola Night 10%F apresentaram aumento significativo na concentração de cálcio ao 12º dia de tratamento clareador, embora estes agentes apresentassem baixas concentrações de cálcio (36, 24 e 43 ppm, respectivamente). Uma vez que a solução de enxágüe ao final do tratamento clareador possuía maiores concentrações do íon (153, 96 e 96 ppm, respectivamente), especula-se que cálcio tenha sido perdido da superfície do esmalte dental.

Estudos prévios demonstram que a incorporação de cálcio a soluções ácidas pode diminuir a perda mineral do esmalte em até 50% (Hughes *et al.*, 2000). Embora os agentes clareadores possuam pH próximo à neutralidade (Price *et al.*, 2000), é possível que durante o tratamento clareador a superfície do esmalte torne-se menos saturada em relação ao agente utilizado. Dessa maneira, um equilíbrio iônico ocorre (Moreno & Zahradnik, 1974; Theuns *et al.*, 1984a; Margolis *et al.*, 1985; Gao *et al.*, 1991), promovendo a deposição de cálcio (e possivelmente outros íons) na superfície do esmalte subsaturado.

Os agentes clareadores contendo altas concentrações de flúor, o 10% PC + 0,5% F, Opalescence 10% F e Pola Night 10% F (2287, 1129 e 977 ppm do íon, respectivamente) apresentaram altas concentrações do íon na solução de enxágüe. Os resultados indicam que grande parte dessa concentração iônica foi incorporada à superfície do esmalte, pois a concentração total de flúor presente no agente clareador não foi encontrado na solução de enxágüe. A concentração de flúor na solução de enxágüe do grupo tratado com o Whiteness 10% aumentou significativamente ao término do tratamento clareador, indicando perda do íon da superfície clareada. Visto que a diminuição da concentração de fluoreto na superfície do esmalte clareado com peróxido de carbamida a 10%, sem flúor, foi observada em outros estudos (Burgmaier *et al.*, 2002), a adição do fluoreto ao peróxido de carbamida 10% é indicada, pois a saturação do clareador com o íon pode reduzir a desmineralização do esmalte clareado (Attin *et al.*, 1997; Gladwell *et al.*, 2006).

Os grupos tratados com Whiteness 10%, 0,5%F e 0,2% Ca apresentaram, aumento significativo da concentração de fósforo na solução de enxágüe ao final do tratamento clareador quando comparado ao primeiro dia de tratamento. O esmalte tratado

com Whiteness 10% e 0,5%F apresentaram a maior concentração de fósforo inorgânico em solução ao final do tratamento, indicando possível perda mineral, uma vez que a concentração de fósforo nos agentes clareadores era bastante baixa. Embora tenha existido diferenças entre os grupos, os valores obtidos de concentração de Pi foram bastante baixos, próximo ao limite de detecção da curva de calibração, no método colorimétrico. Para confirmação da perda de fósforo dessas superfícies, a incorporação deste nos agentes clareadores seria necessária para que os valores de Pi fossem expressivos e para que fosse possível a comparação entre a concentração real dos agentes clareadores e a concentração obtida na solução de enxágüe.

O pH dos agentes clareadores pode estar intimamente relacionado com a perda mineral da superfície clareada, pois quando o valor do pH do biofilme é inferior a 5,5, por um determinado período, inicia-se o processo de desmineralização do esmalte (Driessens *et al.*, 1986). Entretanto, o pH das soluções de enxágüe e dos agentes foi medido durante o tratamento, e os resultados indicam que o pH manteve-se sempre próximo à neutralidade, de acordo com a indicação dos fabricantes e de outros autores (Price *et al.*, 2000). Dessa forma, as baixas concentrações de peróxido de carbamida utilizadas neste estudo não podem ser apontadas como causadas da dissolução do esmalte.

Atualmente, acredita-se que a desmineralização do esmalte durante o tratamento clareador possa ser atribuído aos componentes coadjuvantes dos clareadores (Basting *et al.*, 2005) e ao mecanismo de oxidação dos peróxidos (Seghi & Denry, 1992). Durante a oxidação do peróxido, existe a formação de radicais livres que atua de forma inespecífica, e que são capazes de degradar tanto a matriz inorgânica como orgânica do substrato clareado (Seghi & Denry, 1992). Entre os componentes dos agentes clareadores que podem causar alterações na superfície do esmalte, encontra-se a uréia, que, embora promova efeitos benéficos como aumento do pH do agente clareador (Haywood & Heymann, 1989; Haywood *et al.*, 1991), tem a habilidade de desnaturar proteínas. Ainda, foi observado que o carbopol associado à glicerina é capaz de diminuir a microdureza do esmalte clareado (Basting *et al.* 2005). Os efeitos desses componentes associados com as propriedades oxidativas dos peróxidos pode causar a degradação do esmalte (Arends *et al.*, 1984; Cavalli *et al.*, 2004b).

A alteração do esmalte vista em microscopia de luz polarizada foi similar ao observado por outros autores (Flaitz & Hicks, 1996). A degradação da matriz orgânica pelos radicais livres gerados pelos agentes clareadores pode resultar em perda substancial das proteínas do esmalte, com perda concomitante de cristais minerais que permanecem associados a essas proteínas. No presente estudo, a profundidade de desmineralização foi maior com o agente clareador que não possuía íons em sua composição (Whiteness 10%).

A microdureza longitudinal confirmou as observações da microscopia de luz polarizada onde o grupo com peróxido de carbamida, sem aditivos (Whiteness 10%), apresentou a maior área de desmineralização interna do esmalte. Entretanto, a partir da observação da porcentagem de volume mineral interna, nota-se que todos os agentes, demonstram comportamento semelhante, pois a maior desmineralização ocorre na superfície do esmalte até aproximadamente 60 μm de profundidade. A partir dessa profundidade, ocorre aumento da porcentagem de volume mineral, mostrando nenhum efeito do agente clareador em grandes profundidades. A partir dessas observações, constata-se que morfológicamente, o agente clareador provoca dissolução mineral da superfície e subsuperfície do esmalte (Cimilli & Pameijer, 2001; Akal *et al.*, 2001; Basting *et al.*, 2001), até determinada profundidade. Constata-se também que para a superfície do esmalte íntegro, a incorporação de aditivos como o íon fluoreto e cálcio podem inibir a área de desmineralização causada pelo peróxido de carbamida a 10%.

Estudo A.2

Um importante efeito adverso causado pelos agentes clareadores é sua capacidade de diminuir a microdureza do esmalte (Ernst *et al.*, 1996; Josey *et al.*, 1996; Attin *et al.*, 1997). Attin e colaboradores (1997) demonstraram que a perda mineral pode ser revertida com a aplicação de soluções remineralizantes após o tratamento clareador, pois supõe-se que os efeitos causados pelos agentes possam ser reparados através da incorporação de componentes salivares como o cálcio e o fosfato (Attin *et al.*, 1997). Dessa forma, é possível que a perda mineral da superfície do esmalte clareado possa ser controlada através de agentes clareadores que contenham aditivos ou através de terapias adicionais que revertam a perda de íons da superfície do esmalte clareado.

Embora tenha-se notado significativa perda mineral na superfície do esmalte clareado (Rodrigues *et al.*, 2001, 2005, Basting *et al.*, 2001, 2003) , pouco se sabe a respeito dos efeitos desses agentes no esmalte com lesão inicial de cárie (Gladwell *et al.*, 2006). Ainda que pareça improvável, devido à popularidade da técnica clareadora, é altamente possível que o tratamento clareador seja indicado para pacientes que possuam lesões iniciais de cárie (mancha branca).

A superfície do esmalte com lesão inicial de cárie tratada com peróxido de carbamida 10%, sem aditivos (Whiteness 10%), apresentou a maior diminuição nos valores de microdureza ao término do tratamento. O esmalte tratado com o agente placebo foi o único que demonstrou aumento significativo nos valores de dureza. Embora este não contenha aditivos ou o componente ativo do gel clareador, sua remineralização pode ser devido ao contato com a solução remineralizante (Amaechi & Higham, 2001). Os grupos contendo aditivos (flúor e cálcio) foram capazes de manter os valores de dureza ao longo do tratamento clareador. É possível que a simples adição de íons ajude a contornar alguns problemas relacionados às técnicas de clareamento dental.

A ERTF demonstra que a maior concentração de fosfato após o clareamento foi encontrada nos grupos contendo o flúor como aditivo, embora o agente Opalescence 10%F tenha apresentado concentração de fosfato semelhante aos grupos sem o flúor. Esse ensaio também demonstrou que houve diminuição da concentração de fosfato após o tratamento com o agente placebo. Embora a solução remineralizante tenha se mostrado eficaz na

remineralização da superfície tratada com o agente placebo como demonstra o ensaio de microdureza de superfície, é possível que a leitura em ERTF tenha ocorrido em região perda mineral, uma vez que a cárie caracteriza-se por ser pontual. Ainda, é possível que a total remineralização da superfície tratada com o agente placebo não tenha ocorrido devido à presença do carbopol. Basting e colaboradores (2005) relataram que o carbopol, o espessante dos géis clareadores, é capaz de diminuir a microdureza do esmalte. O carbopol é um ácido poliacrílico, que apesar de ter um pH neutro, em meio aquoso se dissocia e passa a apresentar um pH de aproximadamente 3,0 (Noveon Pharmaceutical, 2005).

Os agentes clareadores contendo altas concentrações de flúor possuíram as maiores concentrações do íon na solução de enxágüe, embora nota-se que uma pequena parcela do total deste íon pode ter sido incorporada à superfície, devido à diferença da concentração inicial do gel clareador (2287, 1129 e 977 ppm F para os géis F, OPA e PN, respectivamente) e concentração na solução de enxágüe ao término do clareamento (955, 298 e 704 ppm F, respectivamente). Ao final do tratamento clareador, nota-se que mesmo para os agentes que não continham o íon, a solução de enxágüe apresenta certa quantidade do mesmo, indicando que o fluoreto pode ter sido perdido da superfície tratada com agentes clareadores.

A adição de flúor à composição dos agentes clareadores pode ser explicada através dos achados de Attin e colaboradores (1997, 2006) que demonstram que o tratamento prévio do esmalte com peróxidos aumenta o potencial do substrato em acumular fluoretos provenientes de aplicações tópicas. Como o esmalte com lesão inicial de cárie possui alta reatividade, e o fluoreto possui grande habilidade de difundir-se nas áreas mais profundas das lesões cariosas (Paes Leme *et al.*, 2003), espera-se que a associação do íon ao agente clareador diminua a susceptibilidade do esmalte clareado à perda mineral. Embora a alta frequência de aplicação associado às baixas concentrações de agentes fluoretados são considerados mais eficientes na prevenção de lesões cariosas (Featherstone *et al.*, 1982; Featherstone *et al.*, 1986; Wefel, 1990), em situações de alto risco de cárie, como a proposta por este estudo, indica-se a aplicação de altas concentrações de fluoretos (Ogarrd *et al.*, 1991; Ganss *et al.*, 2001; Buchala *et al.*, 2002; Paes Leme *et al.*, 2003).

Vários enxagatórios bucais são compostos por agentes que visam minimizar a desmineralização do esmalte, como por exemplo, fluoretos, fosfato de cálcio, e principalmente, os sais de cálcio e fosfato (Tanaka & Kadoma, 2000). O cálcio e fosfato são os principais constituintes do esmalte e são enormemente afetados pelo grau de dissolução do esmalte frente ao ataque ácido (Moreno & Zaharadnik, 1974). Estes dois constituintes são frequentemente encontrados em soluções formuladas para reduzir a desmineralização do esmalte (Tanaka & Kadoma, 2000). Dessa maneira, era esperado que altas concentrações de cálcio inibissem a progressão da desmineralização em superfície de esmalte com lesão inicial de cárie submetida ao tratamento clareador. Embora nenhum agente clareador possuísse fosfato em sua concentração, a mensuração do mesmo na solução de enxágüe forneceria informação relacionada à perda mineral do esmalte desmineralizado clareado.

A concentração de cálcio presente na solução de enxágüe das amostras tratadas com o agente contendo altas concentrações de cálcio indicam que houve diminuição da concentração de cálcio na solução no 6º dia de tratamento clareador e esta concentração manteve-se até o 12º dia. Tal diminuição pode ser explicada pela superfície de esmalte subsaturada em relação ao agente clareador. Nos outros grupos, não houve diferenças na concentração de cálcio durante o tratamento clareador, com exceção do grupo Opalescence 10%F e Pola Night 10%F que apresentou diminuição da concentração de cálcio no 6º dia de tratamento e aumento da concentração em solução ao 12º dia de tratamento. A concentração de cálcio na solução de enxágüe dos grupos que possuíam apenas pequena quantidade do íon indica a possível perda deste íon da superfície clareada.

A concentração de Pi na solução de enxágüe do 1º dia de tratamento clareador foi maior para o esmalte tratado com Whiteness 10%. No 6º dia de tratamento, a concentração foi semelhante ao grupo 0,2%Ca e no 12º dia de tratamento, semelhante também ao 0,5% F. Durante o tratamento, o esmalte tratado com 0,2%Ca e 0,5%F e Opalescence 10%F apresentaram aumento significativo da concentração de fósforo inorgânico na solução de enxágüe. Visto, mais uma vez, que os agentes possuíam baixas concentrações de fósforo em sua formulação, a concentração do mesmo em solução indica

que para estes grupos, a superfície do esmalte com lesão inicial de cárie perde mineral durante o tratamento clareador.

O pH das soluções de enxágüe para o esmalte cariado foi pouco alterado, mantendo-se praticamente neutro. Não houve diminuição dos valores de pH para nenhum grupo, possivelmente devido a presença da uréia na composição dos agentes. Embora o pH destes esteja relacionado com a dissolução do esmalte, o grau de saturação dos agentes clareadores pode ser mais importante na determinação da progressão da lesão de cárie que o pH (Tanaka & Kadoma, 2000). Assim, como observado, a falta de íons na composição de determinados agentes clareadores pode ser o fator determinante na desmineralização da superfície do esmalte.

As imagens obtidas e a profundidade da desmineralização demonstrados na microscopia de luz polarizada indicam claramente a formação da lesão de cárie nas amostras clareadas. Embora o grupo placebo tenha apresentado a menor extensão de lesão, apresenta considerável profundidade devido à desmineralização prévia do esmalte. Uma vez que este grupo foi apenas submetido à solução remineralizante, é provável que a lesão provocada inicialmente não tenha se desenvolvido durante o tratamento clareador, como também não regrediu, mantendo-se estável (**Figura 7**). Uma vez mais, o gel contendo o peróxido de carbamida sem aditivos (Whiteness 10%) apresentou a maior extensão de lesão de cárie. Neste caso, é possível que a lesão inicial tenha sido exacerbada pela reação do agente clareador, pois do contrário, este agente comportar-se-ia como o grupo placebo. Os agentes clareadores contendo aditivos (seja Ca ou F) apresentaram valores intermediários de lesão, sem diferença entre eles (com exceção do grupo Opalescence 10%F que difere do grupo 0,5%F), mas diferentes do grupo Placebo e do grupo Whiteness 10%.

Os valores de microdureza longitudinal demonstram que a maior área desmineralizada pode ser atribuída ao agente Whiteness 10%, embora este não tenha se mostrado diferente do grupo Opalescence 10%F. O grupo placebo e os demais grupos apresentaram valores semelhantes de Delta Z. A porcentagem de volume mineral da superfície de esmalte desmineralizado indica uma diminuição em até 40% do volume mineral original na região mais superficial do esmalte (20 μm). Na profundidade de 60 μm ocorre aumento da porcentagem de volume mineral o qual se mantém até 200 μm de

profundidade. Tais resultados indicam que os tratamentos clareadores afetaram a superfície e subsuperfície do esmalte.

Os agentes clareadores contendo aditivos (Ca e F) obtiveram melhor desempenho nas análises realizadas em relação ao agente sem aditivos (Whiteness 10%). A baixa concentração de íons flúor e cálcio no agente Whiteness 10%, associado à capacidade de desnaturação de proteínas pela uréia (Goldberg *et al.*, 1983; Arends *et al.*, 1984), ação do carbopol e aos efeitos oxidantes do peróxido de carbamida 10% (Seghi & Denry, 1992; Basting *et al.*, 2005) podem evidenciar porque este agente clareador resulta em maior perda mineral do esmalte desmineralizado.

Estudo B.1

O tratamento clareador intracoronário é comumente realizado em dentes escurecidos tratados endodonticamente através da técnica “*walking bleach*”, na qual o material clareador, normalmente o perborato de sódio associado à água ou ao peróxido de hidrogênio, é inserido no interior da câmara pulpar e selado com restauração provisória por alguns dias (Nutting & Poe, 1963; Chng *et al.*, 2004). Como alternativa, o peróxido de carbamida 35% e baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (25%) têm sido utilizadas na técnica *walking bleach*, com o objetivo de clarear a estrutura dental, sem comprometer a integridade do substrato clareado.

A resistência intrínseca da dentina intracoronária, sem condicionamento ácido prévio ou clareador, apresentou a maior resistência à tração quando comparada à dentina clareada com os demais agentes intracoronários (PS, PC, PH 25%, PH 35%), os quais não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A análise ultra-estrutural da dentina intacta clareada demonstra que o grupo CO (controle - sem tratamento clareador) (**Resultados - Figuras 13 e 14**), apresentou padrão normal de tecido dentinário hígido. As características observadas nesta estrutura indicam que a malha orgânica permanece associada e envolta pelo conteúdo inorgânico do substrato. Observa-se ainda, que a morfologia da dentina intracoronária do grupo CO apresenta-se compacta quando comparada à estrutura da dentina clareada dos demais grupos. A dentina hígida tratada com o PS, PC, PH 25% e PH 35% (**Resultados – Figuras 15 a 22**), apresenta-se desmineralizada, uma vez que nesses grupos, as fibrilas colágenas são facilmente observadas, mesmo que nenhum outro tratamento, além do clareador, tenha sido realizado nesta superfície. A desmineralização e exposição das fibrilas colágenas destes grupos indicam que o tratamento clareador removeu parte do conteúdo mineral que normalmente circunda e envolve a matriz orgânica da dentina intertubular. A causa desta desmineralização pode ser atribuída ao baixo pH dos agentes PH 25% e PH 35% (pH 4,5 e 3,67 respectivamente), embora os agentes PS associado à água e o PC possuam pH 10 e 6,5 respectivamente (Frysh *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2000).

Se o baixo pH não é a causa para a alteração da morfologia e diminuição da resistência intrínseca da dentina intracoronária clareada, é possível que os mesmos fatores que causam a alteração na superfície do esmalte possam induzir alterações na superfície dentinária. A reação química do peróxido é baseada em sua habilidade de gerar radicais livres, altamente reativos. Por serem não-específicos e extremamente instáveis, os subprodutos da decomposição dos géis clareadores podem potencialmente reagir não apenas com as cadeias orgânicas carbônicas, mas com moléculas orgânicas até que a estabilidade da oxidação seja alcançada (Seghi & Denry, 1992).

Componentes dos agentes clareadores podem também estar associados aos efeitos adversos destes agentes na superfície do substrato. A presença do carbopol, material que proporciona a viscosidade ao gel clareador, pode ser capaz de diminuir a microdureza do esmalte e dentina durante o tratamento com peróxido de carbamida a 10% (Basting *et al.*, 2005). Outros estudos indicam que alguns agentes possuem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 7,3), o qual tem a habilidade de desmineralizar a dentina (Hülsmann *et al.*, 2002).

Alguns autores (Baratieri *et al.*, 1993; Hülsmann, 1993; Beer, 1995) indicam o condicionamento ácido prévio do substrato dentinário com o uso de soluções como o ácido fosfórico 37%, para remoção da *smear layer* e melhora dos efeitos dos agentes clareadores. A remoção da lama dentinária supostamente possibilitaria o aumento da permeabilidade da dentina e maior difusão do agente clareador intracoronário. No presente estudo, a remoção da *smear layer* e a desmineralização da parede interna intracoronária demonstrou que a resistência intrínseca do grupo CO – sem clareamento, manteve-se igual à dentina sem condicionamento ácido prévio, mas apresentou resistência semelhante aos grupos clareados (PS, PC, PH 25%), com exceção da dentina pré-condicionada e tratada com PH 35% (**Resultados – Tabela 15**). Comparando-se a dentina intacta e a sem *smear layer*, observa-se que somente houve diminuição dos valores de resistência no substrato tratado com PH 35%. Supõem-se que a associação de dois tratamentos agressivos no substrato dentinário (condicionamento com ácido fosfórico 37% e o clareamento utilizando-se o PH 35%), sejam os causadores dos menores valores de resistência do substrato.

A análise ultra-estrutural da dentina pré-condicionada previamente ao tratamento clareador, indica que mesmo o grupo controle, o qual não foi clareado, apresenta maior exposição de fibrilas colágenas quando observado em aumento de 19500x. Esta exposição indica claramente o efeito do condicionamento ácido prévio. Nas amostras clareadas, o efeito do ácido fosfórico 37% pode ser confundido com as alterações provocadas pelos agentes clareadores, uma vez que a análise da dentina intacta clareada indica que os agentes também foram capazes de remover a matriz inorgânica intertubular.

A dentina intacta e pré-condicionada e posteriormente clareada com o agente PH 35%, apresentou os menores valores de resistência intrínseca entre os grupos. Ainda, a análise ultra-estrutural deste substrato indica remoção de conteúdo inorgânico e conseqüente alteração morfológica da dentina. Embora efetivo em clarear a estrutura dental, a utilização de altas concentrações de peróxido de hidrogênio 35%, têm sido associado à complicações como reabsorção radicular cervical (Madson & Walton, 1990; Heithersay *et al.*, 1994), aumento da permeabilidade dentinária (Heling *et al.*, 1995), alterações na estrutura química dentina (Rotstein *et al.*, 1996) e mudanças nas propriedades bioquímicas do substrato (Chng *et al.*, 2002).

Estudos laboratoriais demonstram que o PH 35% é capaz de difundir através da raiz, especialmente quando há defeitos radiculares do cimento radicular (Rotstein *et al.*, 1991; Koulaouzidou *et al.*, 1996) e estudos em animais confirmam a relação destes agentes com a reabsorção radicular externa (Madison & Walton, 1990; Heller *et al.*, 1992). Especula-se que a difusão do peróxido de hidrogênio, proveniente de tratamento intracoronário, na região cervical radicular promova um ambiente ácido que é propício para a atividade osteoclástica e reabsorção óssea (Vaes, 1968), resultado em reabsorção radicular externa. Devido a essas complicações, recomenda-se a substituição do peróxido de hidrogênio durante a terapia intracoronária (Liebenberg, 1997; Vachon *et al.*, 1998) por agentes como o peróxido de carbamida (PC) ou pelo perborato de sódio (PS), devido à menor concentração de peróxido e eficácia comprovada no clareamento dental (Attin *et al.*, 2003).

Embora os resultados obtidos com o condicionamento ácido prévio da dentina para remoção da *smear layer* comprometeram apenas o grupo tratado com PH 35%, este

procedimento torna-se desnecessário, devido ao baixo peso molecular e conseqüente facilidade pela qual estes agentes clareadores difundem-se pela estrutura de esmalte e dentina (Haywood & Heymann, 1989; Haywood *et al.*, 1991; Cavalli *et al.*, 2001, 2003 e 2004).

Estudo B.2

Além de indesejáveis alterações morfológicas (Heling *et al.*, 1995, Rotstein *et al.*, 1996, Chng *et al.*, 2002), a utilização de agentes clareadores intracoronários como o peróxido de hidrogênio, perborato de sódio e peróxido de carbamida, está associada ao aumento da permeabilidade dentinária, mudanças da composição química do substrato, aumento da microinfiltração e redução da resistência de união de compósitos resinosos à estrutura dentinária (Stokes *et al.*, 1992, Titley *et al.*, 1993, Chng *et al.*, 2002).

Subseqüente ao tratamento intracoronário, as cavidades endodônticas precisam ser restauradas com compósito resinoso. Idealmente, não apenas a margem em esmalte, mas toda a câmara pulpar deve ser selada. A aquisição de boa adesão do compósito resinoso às paredes intracoronárias clareadas, minimizará a microinfiltração marginal ao longo do tempo e diminuirá a descoloração das margens da restauração (Timpawat *et al.*, 2005). Qualquer alteração nas propriedades da dentina após o tratamento clareador causa impacto na efetividade da adesão dentinária (Torneck *et al.*, 1990).

Devido às específicas propriedades da dentina, a adesão ainda não alcançou características desejáveis (Perdigão *et al.*, 2000). Os adesivos resinosos aderem mais fortemente à dentina superficial, apresentando progressivamente menor resistência de união à dentina profunda. Isso é devido à diferença na quantidade de dentina intertubular disponível para adesão e na diferença da umidade local. As paredes dentinárias que compõem a câmara intrapulpar constituem a dentina mais profunda, tornando-a o substrato com as mais difíceis características de união (Tagami *et al.*, 1990).

Além de dificuldades regionais do substrato, vários relatos indicam que a adesão pode ser comprometida imediatamente após o tratamento clareador, devido à presença de oxigênio e outros subprodutos dos agentes clareadores que interferem no processo de adesão e que permanecem aprisionados no interior dos túbulos dentinários por um período de até 2 semanas após o tratamento clareador (Timpawat *et al.*, 2005). Ainda, as alterações provocadas pelos agentes clareadores na morfologia do substrato dentinário podem causar diminuição da resistência de união do substrato clareado (Perdigão *et al.*, 1998; Cavalli *et al.*, 2004b).

A resistência à união da dentina intacta tratada com diferentes agentes clareadores (PH 35%, PH 25%, PC e PS) e restaurada com adesivo de condicionamento ácido, indicam que 24 horas após o tratamento clareador, houve diminuição da resistência de união por tração da dentina clareada para todos os grupos clareados, com exceção do grupo controle que apresentou os maiores valores de resistência adesiva entre os grupos.

Após 7 dias do clareamento intracoronário, todos os grupos apresentaram resistência de união semelhantes, com exceção do grupo PH 35% e o grupo PS, que foram diferentes entre si. Após 14 dias do término do tratamento clareador, todos os grupos foram iguais. Enquanto o grupo CO não apresentou diferenças de resistência de união imediatamente, 7 e 14 dias após o tratamento clareador, a resistência de união de todos os outros grupos aumentou após 14 dias de tratamento clareador quando comparados com a resistência obtida imediatamente após o tratamento. É possível que a solução remineralizante, na qual os elementos dentais permanecem antes do preparo para o ensaio de microtração, possa melhorar a resistência da dentina clareada devido à remineralização causada por esta solução (Amaechi & Higham, 2001), pois a desmineralização pode interferir na qualidade de adesão da dentina (Sano *et al.*, 1994). Alguns autores também relatam que o contato com a solução possa remover o oxigênio residual o qual interfere no processo adesivo (Torneck *et al.*, 1990; Titley *et al.*, 1993.).

A ultra-morfologia e nanoinfiltração da dentina intacta indicam que imediatamente após o tratamento clareador, a dentina apresenta-se com considerável deposição de nitrato de prata em todos os grupos clareados e não-clareado (controle). Após 7 dias de tratamento clareador, a concentração diminui, embora a infiltração da prata se faça presente no topo e interior da camada híbrida. Após 14 dias de tratamento clareador, a nanoinfiltração diminui, embora ainda seja notada nos grupos clareados com PH 25% e PH 35%. Embora as análises das imagens sejam apenas qualitativas, elas podem relacionar-se com os resultados obtidos de resistência de união do substrato dentinário clareado.

A dentina com condicionamento ácido prévio ao tratamento clareador apresentou, imediatamente após o clareamento, resultados semelhantes de resistência de união aos observados para a dentina intacta; o grupo controle obteve os melhores valores, enquanto os grupos clareados apresentaram menores valores de união, embora não haja

diferenças entre os mesmos. Aos 7 e 14 dias de tratamento clareador, apenas o PS foi semelhante ao grupo controle. Após 14 dias do término do clareamento, o grupo PC e PS apresentaram aumento da resistência de união em relação à obtida imediatamente após o término do mesmo. O melhor desempenho do perborato de sódio na dentina com condicionamento ácido prévio pode ser explicado pela menor agressividade deste agente, associado ao seu pH alcalino e menor liberação de peridroxila durante a oxidação da dentina clareada (Chng *et al.*, 2004).

Vários fatores podem estar associados com os efeitos adversos dos peróxidos na resistência de união. Entre eles, encontra-se habilidade dos peróxidos liberarem radicais hidroxil, capaz de penetrar e permanecer na dentina, inibindo o processo de polimerização (Titley *et al.*, 1993). Ainda, a composição dos agentes clareadores e o pH de alguns peróxidos, causa alterações morfológicas capazes de interferirem no processo adesivo (Rotstein & Friedman, 1991, Lewinstein *et al.*, 1994, Rotstein *et al.*, 1996, Chng *et al.*, 2002).

A análise ultra-morfológica e a nanoinfiltração da dentina com condicionamento ácido prévio apresentaram resultados semelhantes à dentina intacta: imediatamente após o tratamento clareador, observa-se inclusive para o grupo controle aumento qualitativamente significativo de nitrato de prata na camada híbrida. Após 7 e 14 dias, a concentração de nitrato diminui, permanecendo ligeiramente mais evidente nos grupos com menores valores de pH (PH 25% e 35%). O condicionamento ácido prévio ao tratamento clareador, não apresentou diferenças de deposição de nitrato de prata em relação ao grupo sem tratamento ácido prévio. Supõem-se que a razão para que não haja diferenças entre os dois substratos (dentina intacta e desmineralizada) é que após o tratamento clareador, foi realizado a restauração da dentina clareada através da técnica de condicionamento ácido total. Dessa forma, ambos os substratos são submetidos ao ataque ácido, com a diferença que a dentina desmineralizada previamente ao tratamento clareador, recebe um condicionamento ácido extra (15 segundos a mais). Embora, não haja diferença entre os tipos de dentina, a desmineralização prévia do substrato é desnecessária.

Sugere-se que a dentina tratada com diferentes agentes clareadores seja apenas restaurada 14 dias após o término do clareamento. Esse período seria suficiente para a

remoção total de possíveis subprodutos confinados no substrato que inibem o processo adesivo (Spyrides *et al.*, 2000) e retorno de componente inorgânicos pela difusão salivar, que podem ser perdidos durante o processo oxidativo. É aconselhável ainda, visto a nanoinfiltração da interface adesiva do substrato tratado com PH 25% e PH 35%, que estes agentes sejam utilizados com cautela durante o tratamento clareador intracoronário.

7. CONCLUSÃO

Após análise dos resultados obtidos e dentro das limitações dos estudos propostos, pode-se concluir:

Parte A: Efeitos dos agentes clareadores no esmalte dentário.

Estudo A.1. O tratamento clareador realizado com o peróxido de carbamida a 10% sem a adição de flúor e cálcio, reduziu a microdureza e promoveu maior profundidade de desmineralização do esmalte intacto. As análises químicas indicam que a adição de flúor e cálcio podem ser capazes de controlar a perda mineral do esmalte clareado.

Estudo A.2. O tratamento clareador realizado com o peróxido de carbamida a 10% sem a adição de flúor e cálcio, reduziu a microdureza do esmalte com lesão de mancha branca e promoveu a maior extensão de desmineralização. As análises químicas indicam que a adição de flúor e cálcio pode manter o conteúdo mineral do esmalte com lesão de cárie.

Parte B: Efeitos de agentes clareadores intracoronários na superfície dentinária.

Estudo B.1. A resistência coesiva da dentina hígida diminuiu após o tratamento com os diferentes agentes intracoronários. O peróxido de hidrogênio a 35% diminuiu significativamente a resistência da dentina pré-condicionada, possivelmente devido às alterações morfológicas, as quais foram constatadas através da análise ultra-estrutural do substrato clareado (MET).

Estudo B.2. Houve diminuição da resistência de união da interface dentina hígida e pré-condicionada tratada com agentes clareadores intracoronários, imediatamente após o tratamento, entretanto, após 14 dias, a dentina hígida apresentou aumento da resistência de união em todos os grupos. Na dentina pré-condicionada, após

14 dias do tratamento clareador, apenas o perborato de sódio apresentou aumento de resistência de união semelhante ao controle. Houve nanoinfiltração na dentina hígida e pré-condicionada imediatamente após o tratamento clareador, sendo que após 14 dias, foi observado diminuição no padrão da nanoinfiltração nas interfaces de união.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abudhaise, BA, Abuomar NI. Fluoride. 1998; (31): 137.
- Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. *J Clin Pediatr Dent.* 2001;25(4):293-6.
- Al-Qunaian TA. The effect of whitening agents on caries susceptibility of human enamel. *Oper Dent.* 2005; 30(2): 265-70.
- Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent.* 2001; 29(5): 371-6.
- Arends J, Gelhard T. Enamel remineralization in vivo. In Featherstone JD, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983; 17(5): 385-91.
- Arends J, Jongebloed WL, Goldberg M, Schuthof J. Interaction of urea and human enamel. *Caries Res.* 1984; 18: 16-24.
- Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res.* 1980;14(4):190-5.
- Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res.* 1979; 13(5):290-7.
- Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992; (71): 924-8.
- Arens DE, Rich JJ, Healey HJ. A practical method of bleaching tetracycline-stained teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;34(5):812-7.
- Ari H, Ungor M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronal bleaching of discoloured teeth. *Int Endod J.* 2002;35(5): 433-6.
- Asgar K. Chemical analysis of human teeth. *J Dent Res.* 1956; 35(5): 742-748.
- Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(4):282-6.
- Attin T, Manolakis A, Buchalla W, Hannig C(a). Influence of tea on intrinsic colour of previously bleached enamel. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(5): 488-94.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Comittee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos

Attin T, Paqué F, Ajam F, Lennon A.M (b). Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. *Int Endo J.* 2003; 36: 313-329.

Attin T, Albrecht K, Becker K, Hannig C, Wiegand A. Influence of carbamide peroxide on enamel fluoride uptake. *J Dent.* 2006 Oct;34(9):668-75.

Baratieri LN, Monteiro Júnior S, Andrada MAC, Vieira LCC. Clareamento dental. São Paulo: Santos. 1993 89-136

Barghi N, Godwin JM. Reducing the adverse effect of bleaching on composite-enamel bond. *J Eshet Dent.* 1994; 6(4): 157-161.

Basting RT, Rodrigues JR AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and demineralized enamel and dentin in situ. *Oper Dent,* 2001; 26(6): 531-539.

Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134(10): 1335-42.

Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Oper Dent.* 2005;30(5):608-16.

Ben-Amar A, Liberman R, Gorfil C, Bernstein Y. Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. *Am J Dent.* 1995;8(1):29-32.

Bitter NC, Sanders JL. The effect of four bleaching agents on the enamel surface: a scanning electron microscopic study. *Quintessence Int.* 1993; 24(11): 817-824.

Bitter NC. A scanning electron microscopy study of the effect of bleaching agents on enamel: preliminary report. *J Prosthet Dent.* 1992;67(6):852-5.

Bonfim MDC, *et al.* Estudo micromorfológico comparativo das dentinas: humana e bovina. *Pesq Odontol Bras.* 2000; 14:32.

Bouillaguet S, Gysi P, Wataha JC, Ciucchi B, Cattani M, Godin C *et al.* Bond strength of composite to dentin using conventional, one-step, and self-etching adhesive systems. *J Dent.* 2001; 29(1): 55-61.

Bowen RL. Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues. I. Method of determining bond strength. *J Dent Res.* 1965; 44: 690-5.

Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987 Aug;13(8):375-7.

Brown G. Factors influencing successful bleaching of discolored root-filled tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; (20): 238-44.

Brudevold F, Savory A, Gardner De, Spinelli M, Speirs R. A study of acidulated fluoride solutions. I. In vitro effects on enamel. *Arch Oral Biol.* 1963; (8):167-77.

Buchala W, Attin T, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Fluoride uptake, retention and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions *in situ*. *J Dent Res.* 2002; 81(5): 329-333.

Burgmaier GM, Schulze IM, Attin T. Fluoride uptake and development of artificial erosions in bleached and fluoridated enamel *in vitro*. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(9): 799-804.

Caldwell RC, Muntz ML, Gilmore RW, Pigman W. Microhardness studies of intact surface enamel. *J Dent Res.* 1957; 36(5): 732-8.

Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater.* 2005; 21(3): 232-41.

Carvalho RM, Santiago SL, Fernandes CA, Suh BI, Pashley DH. Effects of prism orientation on tensile strength of enamel. *J Adhes Dent.* 2000;2(4): 251-7.

Carvalho RM, Tay FR, Giannini M, Pashley DH. Effects of pre- and post-bonding hydration on bond strength to dentin. *J Adhes Dent.* 2004; 6(1): 13-7.

Causton BE. Improved bonding of composite restorative to dentine. A study in vitro of the use of a commercial halogenated phosphate ester. *Br Dent J.* 1984;156(3):93-5.

Cavalli V, Reis AF, Giannini M, Ambrosano GM. The effect of elapsed time following bleaching on enamel bond strength of resin composite. *Oper Dent.* 2001; 26(6): 597-602.

Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM (a). High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(2): 155-159.

Cavalli V, de Carvalho RM, Giannini M. Influence of carbamide peroxide-based bleaching agents on the bond strength of resin-enamel/dentin interfaces. *Pesqui Odontol Bras.* 2005; 19(1): 23-9.

Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM.(b) Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater.* 2004; 20(8): 733-9.

Cibirka RM, Myers M, Downey MC, Nelson SK, Browning WD, Hawkins IK, *et al.* Clinical study of tooth shade lightening from dentist-supervised, patient-applied treatment with two 10% carbamide peroxide gels. *J Esthet Dent.* 1999; 11(6):325-31.

Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent.* 2001; (14):63-66.

Cohen S; Burns RC.- Caminhos da polpa. 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992;18(7): 315-7.

Corcoran JF, Zillich RM. Bleaching of vital tetracycline stained teeth. *J Mich State Dent Assoc.* 1974; 23: 129-131.

Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.* 1992; 23(4): 257-70.

Crabb HS, Darling AI, Carlstrom D, Glas JE, Angmar B. Studies on the ultrastructure of dental enamel. V. The state of water in human enamel. *J Ultrastruct Res.* 1963; 8:24-9.

Crabb HS, Darling AI. The gradient of mineralization in developing enamel. *Arch Oral Biol.* 1960; 2:308-18.

Crabb HS. The pattern of mineralization of human dental enamel. *Proc R Soc Med.* 1959; 52(2):118-22.

Croll TP, Sasa IS. Carbamide peroxide bleaching of teeth with dentinogenesis imperfecta discoloration: report of a case. *Quintessence Int.* 1995;26(10):683-6.

Cvek M, Lindvall AM. External root resorption following bleaching of pulpless teeth with oxygen peroxide. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(2):56-60.

Chng HK, Palamara JE, Messer HH. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on biomechanical properties of human dentin. *J Endod.* 2002; 28(2):62-7

Chng HK, Yap AU, Wattanapayungkul P, Sim CP. Effect of traditional and alternative intracoronal bleaching agents on microhardness of human dentine. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(8): 811-6.

da Silva AP, de Oliveira R, Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, de Carvalho RM. Effect of peroxide-based bleaching agents on enamel ultimate tensile strength. *Oper Dent.* 2005; 30(3): 318-24

Davidson CL, Boom G, Arends J. Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res.* 1973;7(4):349-59.

Davidson CL, Hoekstra IS, Arends J. Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to the calcium content. *Caries Res.* 1974; 8(2): 135-44.

De Las Casas EB, Cornacchia TP, Gouvea PH, Cimini CA Jr. Abfraction and anisotropy--effects of prism orientation on stress distribution. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2003;6(1):65-73.

de Oliveira R, Paes Leme AF, Giannini M. Effect of a carbamide peroxide bleaching gel containing calcium or fluoride on human enamel surface microhardness. *Braz Dent J.* 2005;16(2):103-6.

Dezotti MS, Souza MH Jr, Nishiyama CK. Evaluation of pH variation and cervical dentin permeability in teeth submitted to bleaching treatment. *Pesqui Odontol Bras.* 2002;16(3):263-8.

Driessens F, Verbeeck R. *Biomaterials.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

Eastoe JE. The amino acid composition of proteins from the oral tissues. II. The matrix proteins in dentine and enamel from developing human deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 1963; (52): 633-52.

Ernst CP, Marroquín BB, Willershausen-Zönnchen, B. Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. *Quintessence Int.* 1996; 27(1): 53-56.

Feagin F, Sierra O, Thiradilok S, Jeansonne B. Effects of fluoride in remineralized human surface enamel on dissolution resistance. *J Dent Res.* 1980; 59(6): 1016-21.

Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.* 1981;15(5):377-85.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983; 17(5): 385-91.

Feinman RA. Bleaching. A combination therapy. *CDA J.* 1987; 15(4): 10-3.

Ferrari M, Tay FR. Technique sensitivity in bonding to vital, acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2003; (28):3-8.

Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 1925; (66): 375-80.

Flaitz CM, Hicks MJ. Effects of carbamide peroxide whitening agents on enamel surfaces and caries-like lesion formation: an SEM and polarized light microscopic in vitro study. *ASDC J Dent Child.* 1996; 63(4): 249-56.

Frank RM, Sognaes RF. Electron microscopy of matrix formation and calcification in rat enamel. *Arch Oral Biol.* 1960;1:339-48.

Frysh H, Bowles WH, Baker F, Rivera-Hidalgo F, Guillen G. Effect of pH on hydrogen peroxide bleaching agents. *J Esthet Dent.* 1995;7(3):130-3.

Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001; 35(5): 325-30.

Gao XJ, Elliott JC, Anderson P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization. *J Dent Res.* 1991; 70(10):1332-7.

Garcia-Godoy F, Dodge WW, Donohue M, O'Quinn JA. Composite resin bond strength after enamel bleaching. *Oper Dent.* 1993; 18(4): 144-7.

Gegauff AG, Rosenstiel SF, Langhout KJ, Johnston WM. Evaluating tooth color change from carbamide peroxide gel. *J Am Dent Assoc.* 1993;124(6):65-72.

Gelhard TB, ten Cate JM, Arends J. Rehardening of artificial enamel lesions in vivo. *Caries Res.* 1979;13(2): 80-3.

Giannini M, Carvalho RM, Martins LR, Dias CT, Pashley DH. The influence of tubule density and area of solid dentin on bond strength of two adhesive systems to dentin. *J Adhes Dent.* 2001; 3(4):315-24.

Giannini M, Cavalli V; Paes Leme AF. Effect of carbamide peroxide-based bleaching agents containing fluoride or calcium on tensile strength of human enamel. *Journal of Applied Oral Science.* 2006; (11): 82-87.

Gilmour AS, Edmunds DH, Newcombe RG, Clark MF. An in vitro study into the effect of a bacterial artificial caries system on the enamel adjacent to composite and amalgam restorations. *Caries Res.* 1993; 27(3): 169-75.

Gladwell J, Simmons D, Wright JT. Remineralization potential of a fluoridated carbamide peroxide whitening gel. *J Esthet Restor Dent.* 2006;18(4):206-12.

Glockner K, Hulla H, Ebeleseder K, Stadtler P. Five-year follow-up of internal bleaching. *Braz Dent J.* 1999;10(2):105-10.

Gokay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000;27(5):428-31.

Goldberg M, Arends J, Jongebloed WL, Schuthof J. Interaction of urea and human enamel. *Caries Res.* 1983; 17: 385-391.

Gray JA. Kinetics of enamel dissolution during formation of incipient caries-like lesions. *Arch Oral Biol.* 1966; 11(4): 397-422.

Griffith AA. The phenomenon of rupture and flow in solids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1920.

Gwinnett AJ. Histology of normal enamel. IV. Microradiographic study. *J Dent Res.* 1966; 45(3): 870-3.

Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent.* 1992; (5):10-7.

Han L, Abu-Bakr N, Okamoto A, Iwaku M. WDX study of resin-dentin interface on wet vs. dry dentin. *Dent Mater J.* 2000; 19(3): 317-25.

Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(3):245-50.

Harlan AW. The removal of stains from teeth caused by administration of medical agents and the bleaching of a pulpless tooth. *American Journal of Dental Science.* 1884/1885; (18):521.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Endo K, Oguchi H. The extent to which resin can infiltrate dentin by acetone-based adhesives. *J Dent Res.* 2002; (81): 74-78.

Hattab FN, Qudeimat MA, al-Rimawi HS: Dental discoloration: an overview. *J Esthet Dent* 1999; 11(6): 291-310.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989; (20): 173-176.

Haywood VB, Leech T, Heymann HO, Crumpler D, Bruggers K. Nightguard vital bleaching: effects on enamel surface texture and diffusion. *Quintessence Int.* 1990; 21(10): 801-4.

Haywood VB. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int.* 1992; 23(7): 471-88.

Hegedus C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent.* 1999; 27(7): 509-15.

Heithersay GS, Dahlstrom SW, Marin PD. Incidence of invasive cervical resorption in bleached root-filled teeth. *Aust Dent J*. 1994; 39(2): 82-7.

Heling I, Parson A, Rotstein I. Effect of bleaching agents on dentin permeability to *Streptococcus faecalis*. *J Endod*. 1995;21(11):540-2.

Heller D, Skriber J, Lin LM. Effect of intracoronal bleaching on external cervical root resorption. *J Endod*. 1992;18(4):145-8.

Horn DJ, Hicks L, Bulan-Brady J. Effect of smear layer removal on bleaching of human teeth *in vitro*. *J Endod*. 1998; (24): 791-5.

Hughes J. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, *in vitro*. *J Dent*. 2000; 28(2): 147-152.

Hülsmann M. *Endodontie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1993.

Javaheri DS, Janis JN. The efficacy of reservoirs in bleaching trays. *Oper Dent*. 2000; 25(3):149-51.

Josey AL. The effect of a vital bleaching technique on enamel surface morphology and the bonding of composite resin to enamel. *J Oral Rehabil*. 1996; 23(4):244-250.

Kaneko J, Inoue S, Kawakami S, Sano H. Bleaching effect of sodium percarbonate on discolored pulpless teeth *in vitro*. *J Endod*. 2000; 26(1):25-8.

Kawasaki K. On the configuration of incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labelling. *J Anat*. 1975; (119): 61-6.

Kehoe JC. pH reversal following *in vitro* bleaching of pulpless teeth. *J Endod*. 1987; 13(1):6-9.

Kelleher M G D, Roe F J C. The safety-in-use of 10% carbamide peroxide (Opalescence) for bleaching teeth under the supervision of a dentist. *Brit Dent J*. 1999; 28(4): 167-171.

Kirk EC. The chemical bleaching of teeth. *Dental Cosmos*. 1889; (31): 273-83.

Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Beltes P, Lyroudia K, Papadopoulos C. Role of cemento enamel junction on the radicular penetration of 30% hydrogen peroxide during intracoronal bleaching *in vitro*. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(3) :146-50.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol*. 1974; 3(4):185-96.

Kugel G, Petkevis J, Gurgan S, Doherty E. Separate whitening effects on enamel and dentin after fourteen days. *J Endod*. 2007; 33(1):34-7..

Kwong K, Mohammed S, McMillan MD, Stokes AN. Evaluation of a 10 percent carbamide peroxide gel vital bleaching agent. *N Z Dent J.* 1993; 89(395): 18-22.

Lado EA, Stanley HR, Weismann MI. Cervical resorption in bleached teeth. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.* 1983; (55): 78-80.

Larsen M.J., Bruun C. Esmalte/saliva: reações químicas inorgânicas. In: Thylstrup A; Fejerskov, O. *Tratado de cariologia.* Trad. E Cord. Sérgio Weyne. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988: 293-322.

Leonard Jr. RH, Haywood VB, Phillips C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1997; 28(8): 527-34.

Leonard Jr. RH. Efficacy, longevity, side effects, and patient perceptions of nightguard vital bleaching. *Compend Contin Educ Dent.* 1998; 19 (8): 766-770.

Leonard RH Jr, Austin SM, Haywood VB, Bentley CD. Change in pH of plaque and 10% carbamide peroxide solution during nightguard vital bleaching treatment. *Quintessence Int.* 1994; 25(12): 819-23.

Leonard RH Jr, Eagle JC, Garland GE, Matthews KP, Rudd AL, Phillips C. Nightguard vital bleaching and its effect on enamel surface morphology. *J Esthet Restor Dent.* 2001;13(2):132-9.

Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. *J Prosthet Dent.* 2004; 92(4):337-42.

Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A, Rotstein I. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. *J Endod.* 1994; 20(2): 61-3

Li H, Burrow MF, Tyas MJ. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2000; (16): 48-56.

Liebenberg WH. Intracoronar lightening of discolored pulpless teeth: a modified walking bleach technique. *Quintessence Int.* 1997; 28(12):n771-7.

Lim KC. Considerations in intracoronar bleaching. *Aust Endod J.* 2004; 30(2):69-73.

Lyons K, Ng B. Nightguard vital bleaching: a review and clinical study. *N Z Dent J.* 1998; 94(417): 100-3.

Macey-Dare LV, Williams B. Bleaching of a discoloured non-vital tooth: use of a sodium perborate/water paste as the bleaching agent. *Int J Paediatr Dent.* 1997; 7(1): 35-8.

Madison S, Walton R. Cervical root resorption following bleaching of endodontically treated teeth. *J Endod.* 1990; 16(12): 570-4.

Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ. Importance of high pKA acids in cariogenic potential of plaque. *J Dent Res.* 1985; 64(5): 786-92.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25(6): 441-58.

Marshall GW Jr. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 1993; 24(9):606-17.

Matis BA, Wang Y, Eckert GJ, Cochran MA, Jiang T. Extended bleaching of tetracycline-stained teeth: a 5-year study. *Oper Dent.* 2006; 31(6):643-51.

McEvoy SA. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. II. Current techniques and their clinical application. *Quintessence Int.* 1989; 20(6): 379-84.

McGuckin RS, Babin JF, Meyer BJ. Alterations in human enamel surface morphology following vital bleaching. *J Prosthet Dent.* 1992; (68): 754-760.

Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1965; 10(5): 775-83

Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992; (71): 913-9.

Merrel JH. Bleaching of discoloured pulpless tooth. *Journal of the Canadian Dental Association.* 1954; (20):380.

Miles PG, Pontier JP, Bahiraei D, Close J. The effect of carbamide peroxide bleach on the tensile bond strength of ceramic brackets: an in vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;106(4):371-5.

Miller MB. Power bleaching-does it work or is it marketing hype? *Pract Proced Aesthet Dent.* 2002; 14(8): 636.

Mjor IA, Fejerskov O. *Histology of the human tooth.* Copenhagen: Munksgaard. 1979.

Mokhlis GR, Matis BA, Cochran MA, Eckert GJ. A clinical evaluation of carbamide peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use. *J Am Dent Assoc.* 2000; 131(9): 1269-77.

Moreno HC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization *in vitro.* *J Dent Res.* 1974; (53): 226-235.

Murchinson DR, Charlton DG, Moore BK. Carbamide peroxide bleaching: Effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent*. 1992; (17):181-185.

Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent*. 1991; 3(4):133-8.

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res*. 1983; 62(10): 1076-81.

Nascentes CC, Korn M, Sousa CS, Arruda MAZ Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. - *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2001;

Nathoo SA: The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. *J Am Dent Assoc* 1997; 128 Suppl: 6S-10S.

Noveon Pharmaceutical. Carbopol ® Polymers In Pharmaceutical. Disponível em: URL: <http://www.pharma.noveoninc.com/products.carbopol.asp> (2005).

Nutting EB, Poe GS. Chemical bleaching of discolored endodontically treated teeth. *Dent Clin North Am*. 1967:655-62.

Ogaard B, Rolla G, Dijkman T, Ruben J, Arends J. Effect of fluoride mouthrinsing on caries lesion development in shark enamel: an in situ caries model study. *Scand J Dent Res*. 1991; 99(5): 372-7.

Oltu Ü, Gürkan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. *J Oral Rehabil*. 2000; 27(4):332-340.

Paes Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent*. 2003; 16(2): 91-5.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. 1985; 1(5): 176-9.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate-a review. *Scanning Microsc*. 1989;3(1): 161-176.

Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater*. 1995; 11(2):117-25.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7(2):104-33.

- Perdigao J, Francci C, Swift EJ Jr, Ambrose WW, Lopes M. Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *Am J Dent.* 1998; 11(6): 291-301.
- Perdigão J, Lopes M. Dentin bonding--state of the art. *Compend Contin Educ Dent.* 1999;20(12):1151-8.
- Perdigão J, Thompson JY, Toledano M, Osorio R. An ultra-morphological characterization of collagen-depleted etched dentin. *Am J Dent.* 1999;12(5):250-5.
- Perdigão J, Frankenberger R, Rosa BT, Breschi L. New trends in dentin/enamel adhesion. *Am J Dent.* 2000; 13: 25D-30D
- Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The influence of cross-sectional shape and surface area on the microtensile bond test. *Dent Mater.* 1998; 14(3):212-21.
- Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Pesqui Odontol Bras.* 2004;18(4):306-11.
- Poole DF, Brooks AW. The arrangement of crystallites in enamel prisms. *Arch Oral Biol.* 1961; (5)14-26.
- Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *J Endod.* 2000; 26(4): 203-6.
- Price RBT, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of Tooth-Whitening Products. *J Can Dent Assoc.* 2000; 66:421-6.
- Prinz H. Recent improvements in tooth bleaching. A clinical syllabus. *Dental Cosmos.* 1924; (66): 558-60.
- Purdell-Lewis DJ, Groeneveld A, Arends J. Hardness tests on sound enamel and artificially demineralized white spot lesions. *Caries Res.* 1976;10(3):201-15.
- Putter H, Jordan RE. The "walking" bleach technique. *J Esthet Dent.* 1989;1(6):191-3.
- Ramp WK, Arnold RR, Russel JE, Yancey JM. Hydrogen peroxide inhibits glucose metabolism and collagen synthesis in bone. *J Periodontology.* 1987; (58) 340-4.
- Reinhardt JW, Eivins SE, Swift EJ Jr, Denehy GE. A clinical study of nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1993;24(6):379-84.
- Reis AF, Arrais CA, Novaes PD, Carvalho RM, De Goes MF, Giannini M. Ultramorphological analysis of resin-dentin interfaces produced with water-based single-

step and two-step adhesives: nanoleakage expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 71(1):90-8.

Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Junior AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *Am J Dent.* 2001;14(2):67-71.

Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater.* 2005;21(11):1059-67.

Ronnholm E. The amelogenesis of human teeth as revealed by electron microscopy. II. The development of the enamel crystallites. *J Ultrastruct Res.* 1962; 6: 249-303.

Rosenstiel SF, Gegauff AG, Johnston WM. Randomized clinical trial of the efficacy and safety of a home bleaching procedure. *Quintessence Int.* 1996;27(6):413-24.

Rosenthal P. The combined use of ultra-violet rays and hydrogen dioxide for bleaching teeth. *Dental Cosmos.* 1911; (53): 246-7.

Rotstein I. In vitro determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentin and cementum during bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;72(5):602-6.

Rotstein I, Lehr Z, Gedalia I. Effect of bleaching agents on inorganic components of human dentin and cementum. *J Endod.* 1992; 18(6): 290-3.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod.* 1996;22(1):23-5.

Salvas CJ. Perborate as a bleaching agent. *J Am Dent Assoc.* 1938; (25): 324.

Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res.* 1994; 73(6):1205-11.

Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res.* 2006; 85(1):11-4.

Scott DB, Wyckoff RW. The study of enamel by electron microscopy. *J Am Dent Assoc.* 1952; 44(4): 377-85.

Seghi RR, Denry I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. *J Dent Res.* 1992; (71):1340-1344.

Senise P. *Química Nova.* Sociedade Brasileira de Química, São Paulo. 1983; (6)112.

Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int.* 1993;24(1):39-44.

Sharawy M, Yaeger J. *Orban's Oral Histology and Embryology*, 10th ed., ed. Bhaskar, 1986.

Shinkai RS, Cury AA, Cury JA. In vitro evaluation of secondary caries development in enamel and root dentin around luted metallic restoration. *Oper Dent.* 2001;26(1):52-9.

Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev.* 1973; (3): 100-60.

Smidt A, Weller D, Roman I, Gedalia I. Effect of bleaching agents on microhardness and surface morphology of tooth enamel. *Am J Dent.* 1981 (11): 83-85.

Smith VH, McInnes JW. Methods of Removing Brown Stains from Mottled Teeth. *J Am Dent Assoc.* 1942.

Spasser HF. A simple bleaching technique using sodium perborate. *N Y State Dent J.* 1961; (27): 332 -4.

Spasser, 1961. A Simple bleaching technique using sodium perborate. *New York State Dental Journal*, 27, 332-34.

Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int.* 1999; (30): 501-507.

Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res.* 2000; (79): 1458-1463.

Spyrides GM, Perdigo J, Pagani C, Araujo MA, Spyrides SM. Effect of whitening agents on dentin bonding. *J Esthet Dent.* 2000;12(5):264-70.

Stack MV. Organic constituents of enamel. *J Am Dent Assoc.* 1954;48(3):297-306.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zezell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. *Dent Mater J.* 2006;25(3):455-62.

Stokes AN, Hood JA, Dhariwal D, Patel K. Effect of peroxide bleaches on resin-enamel bonds. *Quintessence Int.* 1992;23(11):769-71.

Sudsangiam S, Van Noort R. Do dentin bond strength tests serve a useful purpose? *J Adhes Dent.* 1999; 1(1): 57-67.

- Sulieman M. An overview of bleaching techniques: 2. Night guard vital bleaching and non-vital bleaching. *SADJ*. 2006; 61(8):352, 354.
- Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dent Clin Nor Am*. 2000; (44): 831-850.
- Suzuki M, Kato H, Wakumoto S. Vibrational analysis by Raman spectroscopy of the interface between dental adhesive resin and dentin. *J Dent Res*. 1991; 70(7): 1092-7.
- Suzuki T, Finger WJ. Dentin adhesives: site of dentin vs. bonding of composite resins. *Dent Mater*. 1988 Dec;4(6):379-83. No abstract available.
- Tagami J, Tao L, Pashley DH. Correlation among dentin depth, permeability, and bond strength of adhesive resins. *Dent Mater*. 1990; 6(1): 45-50.
- Tagami J, Hosoda H, Burrow MF, Nakajima M. Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc*. 1992; 88 (1):149-54.
- Tam L. The safety of home bleaching techniques. *J Can Dent Assoc*. 1999;65(8):453-5.
- Tam LE, Lim M, Khanna S. Effect of direct peroxide bleach application to bovine dentin on flexural strength and modulus in vitro. *J Dent*. 2005; 33(6):451-8.
- Tanaka M, Kadoma Y. Comparative reduction of enamel demineralization by calcium and phosphate in vitro. *Caries Res*. 2000; 34(3): 241-5.
- Tay FR, Gwinett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: An optical, micromorphological study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent*. 1996; (9): 43-48.
- Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, *et al*. Aging affects two models of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res*. 2003; (82): 537-541.
- Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral caries lesions. *J Dent Res*. 1991; 70(1): 2-14.
- Ten Cate AR. *Histologia bucal: Desenvolvimento, estrutura e função*. Guanabara Koogan, 1985.
- Ten Cate JM. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 125-33.
- Tenuta LM, Ribeiro CC, Goncalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, *et al*. The short-term in situ model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. *J Dent*. 2005;33(6): 491-7.

Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. *J Dent Res.* 2006;85(9):834-8.

Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A(b). The effect of undissociated acetic-acid concentration of buffer solutions on artificial caries-like lesion formation in human tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(10): 759-63.

Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A.(a) Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 1984;18(1):7-11.

Thylstrup A, Fejerskov O. *Tratado de cariologia.* Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica Ltda: 117-154, 1995.

Timpawat S, Nipattamanon C, Kijssamanmith K, Messer HH. Effect of bleaching agents on bonding to pulp chamber dentine. *Int Endod J.* 2005; 38(4): 211-7.

Titley KC, Torneck CD, Ruse ND, Krmec D. Adhesion of a resin composite to bleached and unbleached human enamel. *J Endod.* 1993;19(3):112-5.

Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A. Adhesion of light-cured composite resin to bleached and unbleached bovine dentin. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(3):97-103.

Tsuda H, Arends J. Raman spectra of human dental calculus. *J Dent Res.* 1993; 72(12):1609-13.

Turtola LO. Enamel microhardness and fluoride uptake underneath fermenting and non-fermenting artificial plaque. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(6): 373-9.

Vachon C, Vanek P, Friedman S. Internal bleaching with 10% carbamide peroxide in vitro. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998 ;10(9): 1145-8.

Vachon C, Vanek P, Friedman S. Internal bleaching with 10% carbamide peroxide in vitro. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998;10(9):1145-8.

Vaes G. On the mechanisms of bone resorption. The action of parathyroid hormone on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes and on the extracellular release of acid by bone cells. *J Cell Biol.* 1968;39(3):676-97.

Van de Hulst HC, Graaff R. Aspects of similarity in tissue optics with strong forward scattering. *Phys Med Biol.* 1996; 41(11): 2519-31.

Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, *et al.* Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent.* 2000; 13(Spec No): 3D-18D.

Van Noort R, Noroozi S, Howard IC, Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent*. 1989; 12(2):61-7.

Vogel, A.I. Em *Analítica Química Quantitativa*; 5^aed., LTC: Rio de Janeiro, 1992, p. 690.

Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: Walton RE. Editor. *Principles and Practice of Endodontics*. Philadelphia: WB Saunders. 1996; (2): 385-400.

Wang Y, Spencer P. Effect of acid etching time and technique on interfacial characteristics of the adhesive-dentin bond using differential staining. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(3): 293-9.

Wefel JS. Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models. *J Dent Res*. 1990; (69):626-33

Westlake A. Bleaching teeth by electricity. *American Journal of Dental Science*. 1895; (29): 101.

Williams DB, Carter CB. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. Plenum Press, New York, 1996.

Xu J, Stangel I, Butler IS, Gilson DF. An FT-Raman spectroscopic investigation of dentin and collagen surfaces modified by 2-hydroxyethylmethacrylate. *J Dent Res*. 1997;76(1):596-601.

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 19(4):515-530.

Zalkind M, Arwaz JR, Goldman A, Rotstein I. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12(2):82-8.

Anexo 1

Determinação da concentração iônica dos agentes clareadores utilizados

A metodologia para determinação da concentração de cálcio, flúor, fósforo inorgânico e pH, foi a mesma descrita para obtenção da solução de enxágüe das amostras, no entanto, os géis clareadores não permaneceram em contato com a superfície do esmalte.

O gel clareador foi pesado, diluído em 1 ml de água destilada e deionizada, submetido ao banho de ultrassom e à agitação em agitador de tubos. Após homogeneizar as amostras, estas foram submetidas às análises de espectroscopia de absorção atômica, eletrodo íon-seletivo, espectrofotometria de absorção de luz e medidor de pH, para a determinação da concentração de cálcio, flúor, fósforo inorgânico e pH, respectivamente.

1. Concentração de cálcio (ppm) presente nos géis clareadores (n=10)

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Placebo	36	2
Whiteness 10%	24	2
10% PC + Flúor 0,5%	17	1
10% PC + Cálcio 0,2%	2114	19
Opalescence 10% F	62	5
Pola Night 10% F	43	3

2. Concentração de flúor (ppm) presente nos géis clareadores (n=10)

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Placebo	1,26	0,38
Whiteness 10%	1,41	0,42
10% PC +0,5% F	2287,2	194,6
10%PC+0,2%Ca	24,50	0,28
Opalescence 10% F	1129,0	17,7
Pola Night 10% F	977,3	47,7

3. Concentração de fósforo inorgânico ($\mu\text{g/mL}$) presente nos géis clareadores (n=10)

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Placebo	0,016	0,003
Whiteness 10%	0,024	0,007
10% PC +0,5% F	0,025	0,011
10%PC+0,2%Ca	0,013	0,008
Opalescence 10% F	0,037	0,013
Pola Night 10% F	0,049	0,019

4. Valor do pH dos agentes clareadores (n=10)

<i>Agentes clareadores</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Placebo	6,75	0,05
Whiteness 10%	6,70	0,06
10% PC +0,5% F	6,80	0,05
10%PC+0,2%Ca	6,90	0,08
Opalescence 10% F	7,04	0,06
Pola Night 10% F	6,87	0,05



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CERTIFICADO

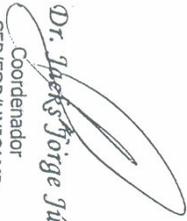


Certificamos que o Projeto de pesquisa "Estudo dos efeitos de agentes clareadores com diferentes formulações, na superfície do esmalte dental intacto ou afetado por cárie incipiente", protocolo CEP nº **047/2004**, dos Pesquisadores **Vanessa Cavalli** e **Marcelo Giannini**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - MS e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UNICAMP.

We certify that the research project "Evaluation of the effects of bleaching agents with different composition on sound and caries affected dental enamel", register number **047/2004** of **Vanessa Cavalli** and **Marcelo Giannini**, is in agreement with the recommendations of 196/96 Resolution of the National Health Committee - Brazilian Health Department and was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas - UNICAMP.

Piracicaba - SP, Brazil, July 15 2004


 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP


 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Anexo 2