



CARLOS EDUARDO DOS SANTOS BERTOLDO

**EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL
PROPERTIES OF ENAMEL AFTER APPLICATION
OF DIFFERENT BLEACHING PRODUCTS**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS DO ESMALTE APÓS DIFERENTES
TIPOS DE CLAREAMENTO**

PIRACICABA-SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CARLOS EDUARDO DOS SANTOS BERTOLDO

**EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF
ENAMEL AFTER APPLICATION OF DIFFERENT BLEACHING
PRODUCTS**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO
ESMALTE APÓS DIFERENTES TIPOS DE CLAREAMENTO**

Thesis presented to the Piracicaba School of Dentistry of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Dental Clinic, in the Operative Dentistry area.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica na área de concentração em Dentística.

Orientador: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO LOVADINO

Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida pelo aluno e orientada pelo Prof. Dr. José Roberto Lovadino.

PIRACICABA-SP

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

B462e Bertoldo, Carlos Eduardo dos Santos, 1986-
Evaluation of physicochemical properties of enamel after application of
different bleaching products / Carlos Eduardo dos Santos Bertoldo. – Piracicaba,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador: José Roberto Lovadino.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Esmalte dentário. 2. Clareamento dental. I. Lovadino, José Roberto, 1953-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Avaliação das propriedades físico-químicas do esmalte após
diferentes tipos de clareamento

Palavras-chave em inglês:

Dental enamel

Tooth bleaching

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

José Roberto Lovadino [Orientador]

Anderson Catelan

Renato Herman Sundfeld

Paulo Henrique dos Santos

Luis Roberto Marcondes Martins

Data de defesa: 13-12-2013

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 13 de Dezembro de 2013, considerou o candidato CARLOS EDUARDO DOS SANTOS BERTOLDO aprovado.

Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO LOVADINO

Prof. Dr. ANDERSON CATELAN

Prof. Dr. RENATO HERMAN SUNDFELD

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE DOS SANTOS

Prof. Dr. LUIS ROBERTO MARCONDES MARTINS

RESUMO

A técnica de clareamento dental consiste em aplicar, sobre a superfície do esmalte, um gel que pode apresentar diferentes composições, mas que apresentam como princípio ativo o peróxido de hidrogênio. Há alguns anos, pesquisadores têm adicionado diferentes compostos químicos à composição visando diminuir os efeitos adversos causados pelo clareamento. Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas do esmalte dental após utilização de peróxido de hidrogênio com e sem cálcio e sequente aplicação do flúor neutro ou imersão em saliva artificial. Foram utilizados 40 blocos de esmalte e dentina (25mm²) obtidos de dentes incisivos bovinos que foram divididos em 4 grupos (n=10): G1- peróxido de hidrogênio (PH) a 35% com cálcio (Whiteness HP Blue/FGM) seguido da aplicação de flúor neutro a 2% por 2 minutos, G2 – PH a 35% com cálcio e armazenamento em saliva artificial por 7 dias, G3 - PH a 35% (Whiteness HP Maxx/FGM) seguido da aplicação de flúor neutro a 2% por 2 minutos, e G4 - PH a 35% e armazenamento em saliva artificial por 7 dias. Leituras de microdureza, rugosidade e composição química pela análise em EDS foram realizadas nos tempos: L1 – inicial, L2 - após a realização do clareamento e L3 após aplicação de flúor ou imersão em saliva artificial. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo teste PROC MIXED de medidas repetidas, seguida pelo teste Tukey ($\alpha=5\%$). Em relação a análise física do esmalte, observou-se que os clareadores testados diminuíram a microdureza e aumentaram sua rugosidade superficial de maneira significativa. Em L2, os grupos G1 e G2 apresentaram maiores valores de microdureza em relação a G3 e G4. L3 apresentou maior dureza em relação a L2 para todos os grupos testados. Os grupos com e sem flúor não diferiram estatisticamente entre si para dureza ($p=0,6892$) e rugosidade ($p=0,3169$). Em relação a análise química do substrato para o elemento Cálcio, em L1, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos testados. Em L2, observou-se redução das taxas para os grupos G3 e G4. Em L3 não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Para o elemento Fósforo, não houve diferença entre os grupos em L1 e em L2, entretanto em L3 observou-se aumento da taxa de maneira semelhante entre os grupos. Pode-se concluir que, para ambos os clareadores, a rugosidade superficial

do esmalte aumentou e não se alterou após imersão em saliva ou flúor. Quanto à microdureza, sua redução foi menor para o clareador com cálcio. A aplicação de flúor neutro ou imersão em saliva artificial, após o clareamento, foi eficaz na recuperação dos valores de dureza iniciais, mas foi ineficaz em relação a rugosidade. Conclui-se ainda que o agente clareador com cálcio afetou de forma significativa a concentração de Cálcio do esmalte em comparação ao grupo tratado com agente comum.

PALAVRAS-CHAVE: Esmalte dentário, Clareamento do esmalte.

ABSTRACT

The bleaching technique consists in applying a gel on enamel surface. The gel can have different compositions, but its active ingredient is hydrogen peroxide. A few years ago, researchers have been adding different chemicals components to the composition in order to decrease the adverse effects caused by bleaching. This in vitro study aimed to evaluate the enamels physicochemical properties after using hydrogen peroxide with and without calcium and consequent application of neutral fluoride or immersion in artificial saliva. Forty enamel and dentin blocks (25mm²) obtained from bovine incisors were divided into 4 groups (n = 10): G1 - hydrogen peroxide (HP) 35 % Calcium (Whiteness HP Blue / FGM) followed by application of neutral 2% fluorine (2 minutes), G2 - PH 35% calcium and storage in artificial saliva (7 days) , G3 - PH 35 % (Whiteness HP Maxx / FGM) followed by application of neutral 2% fluorine (2 minutes) and G4 - PH 35% and storage in artificial saliva (7 days). Microhardness, roughness and chemical composition analysis by EDS readings were performed on: L1 – initial; L2 - after bleaching; and L3 - after fluoride application or immersion in artificial saliva. Data were statistically analyzed by PROC MIXED with repeated measures test followed by Tukey test ($\alpha = 5\%$). Regarding physical analysis, it was observed that bleaching decreased hardness and increased surface roughness from all groups. In L2 , G1 and G2 presented higher hardness values compared to G3 and G4 . L3 was presented better results in relation to L2 for all groups. Groups treated with fluorine or artificial saliva didn't differ statistically for hardness ($p = 0.6892$) and roughness ($p = 0.3169$). Regarding the chemical analysis, for Calcium element in L1 , there were no statistical differences between the groups tested. In L2 , there were a reduction in rates for groups G3 and G4. In L3 there were no statistically significant differences between groups. For the Phosphorus element, there were no difference between groups in L1 and L2, but in L3 there were an increase in rate similarly between groups. It can be concluded that for both bleaching agents, the enamel's surface roughness increased and did not change after immersion in saliva or fluoride application. About microhardness, the values reduction was smaller for bleaching with calcium. The neutral fluoride application or immersion in artificial saliva after bleaching was effective in recovery of baseline values,

but was ineffective against the roughness. Bleaching agent with calcium significantly affect the concentration of enamel's calcium compared to group treated with common agent.

KEYWORDS: Dental enamel, Tooth bleaching.

SUMÁRIO

Dedicatória	XIII
Agradecimentos Especiais	XV
Agradecimentos	XVII
Epígrafe	XIV
Introdução Geral	1
Capítulo Único: <i>Evaluation of physicochemical properties of enamel after application of different bleaching products.</i>	3
Conclusão	18
Referências	19
Apêndice	22

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **JOAQUIM E CLARICE** que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos escuros com afeto e dedicação para que o trilhasse sem medo e cheio de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante as longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês.

Aos meus irmãos **ALEX E MIRIAN** que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Agradeço os ensinamentos, discussões, partilhas e ajuda. Sem suas experiências de vida, minha caminhada teria sido muito mais dura. Muito obrigado por tudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade da nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.

(Antoine De Saint-Exupéry)

Ao meu orientador, Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO LOVADINO**. Faltam-me palavras para explicar a gratidão, respeito e carinho que sinto por esse pai que ganhei de presente da vida. Mais que um professor, um amigo, alguém em quem confiar, conselheiro e companheiro. Alguém que mesmo distante fisicamente participa ativamente de todas minhas conquistas e me faz buscar sempre o próximo degrau para crescer cada dia mais e alcançar meus objetivos. Meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **FLÁVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR**, que desde o início da minha vida acadêmica esteve presente, participando, ajudando, aconselhando e incentivando o meu crescimento pessoal e profissional. Um amigo com o qual sempre pude contar nos momentos mais decisivos e um porto seguro ao qual recorrer nos momentos de necessidade. Meus mais sinceros agradecimentos.

As pessoas realmente ligadas não precisam de ligação física. Quando se reencontram, mesmo depois de muitos anos afastados, sua amizade é tão forte quanto sempre.

(Deng Ming-Dao)

Aos meus amigos **FLÁVIA ROSA, NATALIA HERNANDES, DAYANE OLIVEIRA, NATHÁLIA DIAS, FLÁVIO ROBERTO, THAIS BUCK, EDUARDO SOUZA JR, MARI MIURA, IGOR CLAES, DANIELA FOLHA, LUCIANA DE PAULA, CLÁUDIA IGUMA, BRUNA BATISTELA, LUCIA TRAZI, MARINA DI FRANCESCANTONIO, KLÉBER SOLER, GIOVANA DELÍCIO, TATIANE FONTES, RENATA CHRISTINA NUNES** e todos os outros amigos presentes na minha vida em qualquer momento. Vocês acrescentam demais no meu ser. Não tenho palavras para expressar meus sentimentos por vocês. Muito obrigado por tudo.

A melhor banca de defesa de doutorado que já existiu: **ANDERSON CATELAN, CÍNTIA PIMENTA DE ARAÚJO e GIULLIANA PANFIGLIO SOARES**, que além de serem meus amigos, são também um exemplo de simplicidade e amizade. São sem dúvida um guia de personalidade e pessoas as quais eu me espelho para ser melhor em tudo que faço. Agradeço muito por terem aceitado participar desse momento tão especial na minha vida e ajudar para minha formação nessa etapa acadêmica. Muito obrigado mesmo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia.

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, Prof. Dr. Márcio de Moraes.

À secretária da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, por toda atenção dispensada.

A Prof. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, por estar sempre disponível em ajudar nas análises estatísticas.

Aos professores da Área de Dentística, Prof. Dr. José Roberto Lovadino, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, Prof. Dra. Gisele Maria Marchi, Prof. Dr. Luis Roberto Marcondes Martins, Prof. Dr. Luis Alexandre Maffei Paulillo, Prof. Dr. Marcelo Giannini e Prof. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima, por todo conhecimento transmitido.

Aos professores Prof. Dr. Mario Alexandre Coelho Sinhoreti, Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins e Prof. Dra. Maria Cecília Caldas Giorgi pelas contribuições e considerações durante o exame de qualificação.

Aos Profs. Renato Herman Sundfeld, Adriano Fonseca de Lima e Paulo Henrique dos Santos pela disponibilidade para ser suplentes da banca durante o exame de Defesa de tese de Doutorado.

Aos amigos de mestrado e doutorado - Boniek, Diogo, Giovana, Eduardo, Mayra, Paulo, Robson, Lúcia, Larissa, Natália, Lívia, Milena, Maria Beatriz e Priscila, pelo incentivo, companheirismo, amizade e bom convívio.

Aos funcionários da Área de Dentística, Sr. Pedro Justino e Mônica Barnabé, sempre dispostos a me ajudar e atender meus pedidos. Obrigado pela amizade, confiança, carinho, respeito e paciência. Sei que posso contar com vocês em todos os momentos!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq , pela concessão de Bolsa durante o mestrado, sem a qual seria impossível a permanência em Piracicaba.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.

(Ayrton Senna)

INTRODUÇÃO GERAL

Alterações de cor dos elementos dentais são tidas como um dos principais problemas estéticos relatados por pacientes. O tratamento clareador apresenta resultados satisfatórios quando bem indicado, além de ser considerado como uma técnica minimamente invasiva (Conceição, 2005).

Os agentes clareadores utilizados apresentam peróxido de hidrogênio ou peróxido de carbamida que, quando em contato com água ou saliva, por exemplo, se decompõe em peróxido de hidrogênio e uréia (Haywood e Heymann, 1989). Segundo, Goldstein e Garber (1996), o peróxido de hidrogênio, agente ativo do clareamento, libera água e radicais livres de oxigênio e, simultaneamente, hidrogênio e peridroxil (radical livre HO_2 – Eletrofílico e instável) em proporções dependentes do pH do meio. Quando o pH do meio é básico, maior quantidade de peridroxil e hidrogênio é formada, levando a oxidação das macromoléculas carbonatadas e coradas, tornando-as menores e descoradas.

Existem diferentes tipos de agentes clareadores, com diferentes tipos de composições, concentrações e indicações. Os agentes clareadores para uso em consultório apresentam 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% (Suliman, 2006), sendo que normalmente são indicados para pacientes resistentes a utilização de moldeiras por longos períodos.

Problemas relacionados à estrutura dentária provenientes da técnica de clareamento como redução da microdureza e aumento da rugosidade foram apresentados por diferentes autores (Shannon et al., 1993; Flaitz & Hicks, 1996). Estudos revelaram o aumento da porosidade do esmalte clareado, erosão e até mesmo desmineralização superficial (Shannon et al., 1993; Flaitz & Hicks, 1996; Perdigão et al., 1998; Hegedüs et al., 1999; Akal et al., 2001; Cavalli et al., 2004). Além disso, surgiram evidências preocupantes em relação à composição química do esmalte após o uso de agentes clareadores de alta concentração (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).

Estudos demonstraram que o tratamento clareador com peróxido de carbamida pode resultar em diminuição na concentração de cálcio e fosfato 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). Sabendo-se que todos os pacientes são susceptíveis a cárie e outros tipos de desmineralização do esmalte devido a ingestão de bebidas ácidas ou ainda ácidos endógenos, tais constatações tornam-se pertinentes e preocupantes, visto que a técnica de clareamento tem sido muito utilizada, embora pouca informação exista a respeito dos efeitos dos agentes clareadores em superfícies de esmalte previamente desmineralizadas (Basting et al., 2001).

Em 1993, Shannon et al. comprovaram o aumento da porosidade causada pelos agentes clareadores com peróxido de carbamida em altas e baixas concentrações, entretanto, mínima alteração na microdureza do esmalte foi relatada. Todavia, a diminuição da dureza do esmalte tratado com peróxido de carbamida a 10% e 16% foi demonstrada, e análises ultra-morfológicas apontaram perda de cálcio e fosfato da superfície clareada (Pinheiro Jr. et al., 1996; Lopes et al., 2000; McCracken & Haywood, 1996; Ruse et al., 1990).

Com o objetivo de minimizar estes efeitos, foram introduzidos no mercado agentes clareadores com aditivos como flúor ou cálcio que, por estarem em solução supersaturada de íons, impediriam a dissolução do esmalte em meio ao agente clareador (Attin et al., 1997; Giannini et al., 2006).

Sabe-se que o principal produto responsável pela ação anticariogênica de agentes tópicos de F é o fluoreto de cálcio ("CaF²") (Ogaard, 2001) e que a sua formação depende da disponibilidade de cálcio e flúor presentes no meio bucal. Logo, o flúor não é o único elemento químico favorável para promover a remineralização, sendo este efeito dependente da disponibilidade de cálcio e fosfato no local da lesão (Kardos et al., 1999) ou na saliva (Schemehorn, 1999a).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a dureza, rugosidade e concentração de elementos químicos no esmalte antes e após a realização de clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, com e sem cálcio, bem como a utilização de agentes remineralizadores após o clareamento, para que, dessa forma, possa se verificar a real necessidade de utilização deste elemento químico em associação ao tratamento clareador.

CAPITULO ÚNICO

Evaluation of physicochemical properties of enamel after application of different bleaching products.

ABSTRACT

This in vitro study had the objective to evaluate the physicochemical properties of enamel after using bleaching agents containing Calcium and sequent application of neutral fluoride or immersion in artificial saliva. Forty enamel blocks (25mm²) obtained from bovine incisors were divided into 4 groups (n = 10): G1- 35% Hydrogen Peroxide (HP) with calcium followed by application of 2% neutral fluoride for 2 minutes, G2 - PH 35% with calcium and storage in artificial saliva for 7 days, G3 - 35% PH followed by application of 2% neutral fluoride for 2 minutes, and G4 - PH 35% and storing in artificial saliva for 7 days. Microhardness, roughness and chemical composition analysis by EDS were performed on times: L1 – initial; L2 - after bleaching; and L3 after fluoride application or 7 days immersion in artificial saliva. Data were statistically analyzed by PROC MIXED for repeated measures followed by Tukey test ($\alpha = 5\%$). Regarding the physical analysis of enamel, it was observed that the bleaching decreased the microhardness and increased surface roughness in a significant way. In L2, G1 and G2 presented higher microhardness compared to G3 and G4, respectively. L3 presented higher hardness relative to L2 for all groups tested. The groups with and without fluoride did not differ statistically for hardness ($p = 0.6892$) and roughness ($p = 0.3169$). Regarding the chemical analysis of the substrate for Calcium in L1, there were no statistical differences between the groups tested. In L2, there was a reduction in rates for groups G3 and G4. In L3 there were no statistically significant differences between groups. For Phosphorus, there was no difference between groups in L1 and L2, in L3 however it was observed increase in a manner equivalent between groups. It can be concluded that both bleaching agents, can increase enamel surface roughness. Regarding microhardness, its reduction was smaller for bleaching with calcium, and fluoride application or immersion in artificial saliva, after bleaching, was effective in the recovery of baseline values.

KEYWORDS

Dental enamel, enamel bleaching.

INTRODUCTION

One of the great esthetic problems in dentistry is tooth discoloration. It has many complex etiologic factors that are usually classified as being intrinsic or extrinsic^{1,2}. Today, patients can have tooth bleaching done in two ways: either in-office or at home bleaching.

Manufacturers have introduced many different bleaching agents' concentrations and methods with the premise of "improving" the whitening effect³. As a consequence, there was a significant increase of the variety of in-office tooth bleaching products available in the market, which usually uses high hydrogen (15 to 40%) or carbamide (30 to 37%) peroxide concentrations combined or not with a supplementary light source (i.e. laser, LED, halogen lamp or plasma arc)^{4,5}.

In-office vital tooth bleaching has been used for many years in dentistry. Most tooth bleaching procedures are safe and well-accepted for the treatment of this esthetic problem, as they do not require any reduction in tooth structure^{6,7}.

Bleaching occurs due to the decomposition of peroxide into free radicals, which subsequently react with the large pigment molecules, transforming them into smaller, less pigment molecules and so the hydrogen peroxide (HP) oxidizes a wide variety of organic compounds^{8,9}.

Problems related to tooth structure from the technique as reducing hardness and increased roughness are presented by some authors, but there is disagreement about these effects. Studies have shown increased porosity bleached enamel, demineralization, and even erosion surface^{10,11,12,13,14,15}. Also, evidence regarding the chemical composition, physical and mechanical properties of human enamel bleached also show contradictory results^{14,15,16,17,18,19,20}.

Aiming to minimize these effects, different bleaching agents containing additives such as fluoride or calcium, being in supersaturated solution of ions, were launched on market, and would prevent the dissolution of enamel amid the bleaching agent^{18,21}.

Considering the peroxide concentration and the composition of bleaching agents as the main factors that can affect the enamel's ultrastructure, the aim of the present study was to evaluate the effects of two agents used in tooth bleaching treatments, and different ways of remineralization methods. The null hypothesis for this study was that there were no difference between the common agent with only hydrogen peroxide and agent containing

calcium, and for the remineralization methods, there were no difference between fluorine and artificial saliva for chemical composition of enamel.

METHODS AND MATERIALS

Forty bovine incisive teeth were used, which were cleaned and disinfected with thymol (Dinâmica, Piracicaba, São Paulo, Brazil) and submitted to an initial polishing with pumice (SS White LTDA; Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and water. After separating the coronary portion by means of a double-face diamond disc (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda.; Barueri, SP, Brazil), enamel blocks of 25 mm² were obtained using a precision saw (Isomet 1000; Buehler, Illinois, USA) and a high-concentration diamond disc (4" × 012 × 1/2, Buehler, Illinois, USA). The fragments were planned using silicon carbide emery-cloth of increasing granulation (#400, #600 and #1200) and surface polishing with felts (TOP, RAM, and SUPRA) (Arotec, Cotia; SP, Brazil) associated with a diamond paste of decreasing granulation (1, 1/2 and 1/4 µm), greased with a specific oil (Arotec, Cotia; SP, Brazil). The samples were then washed for 15 min in an ultrasonic tub (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) in order to remove any rubbish present on the enamel surface^[15]. The specimens were stored in distilled water at 37°C till the beginning of experiment.

Then the samples were divided into four groups (n=10) as described in table 1.

Table 1: Groups separation (n=10)

	Group	Type of Bleaching agent and procedure
With Ca	G1	Whiteness HP Blue 35% + Fluorine 2%
With Ca	G2	Whiteness HP Blue 35% + Artificial Saliva 7 days
Without Ca	G3	Whiteness HP Maxx 35% + Fluorine 2%
Without Ca	G4	Whiteness HP Maxx 35% + Artificial Saliva 7 days

The samples were initially submitted to surface roughness and Knoop microhardness analysis. For roughness test, three readings were made as initial readings (L1) of roughness, which were made by means of a roughness tester (Ra pattern, cut off = 0,8mm) (Mitutoyo,

Surftest 211; São Paulo, Brazil), at the second time (L2 – after bleaching), and at the third time (L3 – after application of 2% fluorine or immersion in artificial saliva per 7 days). For the microhardness test, indentations were made on the enamel surface using a Knoop indenter with a static load of 25g for 5 seconds with a microhardness tester (HMV-2000 Shimadzu, Tokyo, Japan). Five indentations were made in the central region of each specimen at three times: before bleaching (L1), after bleaching (L2), and after 7 days of immersion in artificial saliva or fluorine application (L3).

After initial readings, samples were randomly separated and receive the different bleaching agents:

Groups 1 and 2 (n = 10 per group) - Application of 35% hydrogen peroxide with calcium (Whiteness HP Blue / FGM Dental Products Ltda., Joinville, Brazil) with 1mm thickness for 40 minutes, according manufacturer's instructions and washing with distilled deionized water.

Group 3 and 4 (n = 10 per group) - Application of 35% hydrogen peroxide (Whiteness HP MAXX / FGM Dental Products Ltda., Joinville, Brazil): 3 applications with 1mm thickness for 15 minutes, according manufacturer instructions interspersed by washing with distilled deionized water.

For Groups 1 and 3, after the final washing, the specimens were submitted to 2 minutes of neutral 2% fluorine application (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.; Maringá, PR, Brazil) and storage in distilled water until readings.

For the Groups 2 and 4, after final washing, they were submitted to 7 days of immersion in artificial saliva, under daily exchanges. The artificial saliva's composition is presented in table 2:

Table 2: Artificial saliva's composition.

Material	Manufacturer	Lot	Composition
Artificial Saliva	Proderma (Piracicaba, SP, Brazil)	100807	Sodium chloride (0.674g), magnesium chloride hexahydrate (0.041g), calciumchloride dihydrate (0.274g), Methylparaben (1.500g), Propilparaben (0.200g), saccharin (1.0g), distilled water (1000,0mL), pH 6,9

To determine the chemical composition of specimen's enamel, 4 samples from each group and other 4 samples used as a control group (G5) were dehydrate, placed in a metal stub under aluminum tape (3M Adhesives, Ltd., USA), subjected to vacuum in a sputter (Balzers- SCD 050 sputter coter, Germany), wich was formed in the plasma, and a thin layer of vaporized carbon (Carbon Yarn Part. No. YRN001-0001, Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) was deposited on each sample. Then, stubs containing the specimens were placed under a scanning electron microscope (JEOLJSM 5600LV, Tokyo, Japan). Increases of 75x were made to obtain areas to calculate the elements rates.

STATISTICAL ANALYSIS

The data obtained were submitted to statistical analysis with PROC MIXED for repeated measures followed by Tukey test. Control group was compared with the other groups by the Dunnett test taking into consideration the time of evaluation. The significance level was 5%.

After exploratory from EDS data of Calcium and Phosphorus, "2 way" ANOVA analysis was applied. The significance level was 5%.

RESULTS

Roughness:

There were increasing in roughness values after bleaching. Fluoride application or immersion in artificial saliva did not affect this result statistically. There was no statistical difference between fluoride and saliva or between the bleaching agents for roughness ($p = 0.3169$) as show in table 3.

Table 3: Mean (standard deviation) roughness (Ra).

Treatment	Time	Bleaching Agents	
		HP Blue	HP Maxx
Fluor	L1 – Initial	0.33 (0.04) Ab	0.34 (0.03) Ab
	L2 - After Bleaching	0.39 (0.06) Aa	0.45 (0.07) Aa
	L3 - After Fluorine	0.39 (0.02) Aa	0.44 (0.04) Aa
Saliva	L1 – Initial	0.33 (0.07) Ab	0.34 (0.08) Ab
	L2 - After Bleaching	0.39 (0.06) Aa	0.41 (0.04) Aa
	L3 - After Saliva	0.40 (0.02) Aa	0.41 (0.06) Aa

Means followed by different letters (uppercase horizontally and lowercase vertically letters comparing time within the groups with and without Calcium) differ ($p \leq 0.05$). Differs from the initial time ($p \leq 0.05$). There was no significant difference between the groups with and without fluoride ($p = 0.3169$).

Microhardness:

Both kind of bleaching agents significantly decreased enamel microhardness. Only after the bleaching, the agent with calcium showed higher hardness differing statistically from bleaching without calcium. The fluorine and saliva increased enamel hardness on all experimental conditions. There was no statistical difference between fluoride and saliva for hardness ($p = 0.6892$), as show in table 4.

Table 4: Mean (standard deviation) hardness (KHN).

Treatment	Time	Bleaching Agents	
		HP Blue	HP Maxx
Fluor	L1 – Initial	444.4 (35.3)Ab	442.0 (27.4)Ab
	L2 - After Bleaching	371.9 (21.1)Ac	346.4 (31.1)Bc
	L3 - After Fluorine	475.3 (27.3)Aa	473.0 (34.4)Aa
Saliva	L1 – Initial	448.9 (22.2)Ab	448.2 (34.5)Ab
	L2 - After Bleaching	366.8 (15.1)Ac	347.0 (39.5)Bc
	L3 - After Saliva	478.2 (34.6)Aa	480.2 (48.5)Aa

Means followed by different letters (uppercase horizontally and lowercase vertically letters comparing time within the groups with and without Calcium) differs from the initial time ($p \leq 0.05$). There was no significant difference between the groups with fluoride application or immersion in artificial saliva ($p = 0.6892$).

Energy Dispersive Spectroscopy (EDS):

PHOSPHORUS

It was observed that there was no significant difference between the groups bleached with calcium or common ($p = 0.2577$). The interaction between the experimental groups and the control group (G5) was not significant ($p = 0.3976$). It is observed that the rate of phosphorus stay the same initially and after bleaching, but after fluor application or 7 days of immersion in artificial saliva the rate was higher, as shown in Table 5.

Table 5: Mean $\pm$ standard deviation of Phosphorus rate.

Group	Reading		
	L1	L2	L3
G1	28.08 $\pm$ 0.55 Ab	28.45 $\pm$ 0.29 Ab	28.75 $\pm$ 0.17 Aa
G2	28.34 $\pm$ 0.41 Ab	28.21 $\pm$ 0.35 Ab	28.55 $\pm$ 0.23 Aa
G3	28.52 $\pm$ 0.32 Ab	28.41 $\pm$ 0.34 Ab	29.02 $\pm$ 0.45 Aa
G4	28.43 $\pm$ 0.41 Ab	28.28 $\pm$ 0.45 Ab	28.88 $\pm$ 0.36 Aa
G5	28.59 $\pm$ 0.46 Aa	28.37 $\pm$ 0.26 Aa	28.54 $\pm$ 0.39 Aa

Means followed by different letters (uppercase vertical and lowercase horizontal letters) differ ($p \leq 0.05$).

CALCIUM

It was observed that there was significant difference between the groups bleached with calcium and common ($p = 0.0122$). The interaction between the experimental groups and the control group (G5) was not significant ($p = 0.4922$). It can be observed that the rates of calcium varied only in the group treated with common bleaching after the completion of treatment, but the rates returned to normal levels after 7 days of immersion in artificial saliva or fluorine application, as shown in Table 6.

Table 6: Mean $\pm$ standard deviation of Calcium rate.

Group	Reading		
	L1	L2	L3
G1	71.01 $\pm$ 0.45 Aa	71.64 $\pm$ 0.33 Aa	71.18 $\pm$ 0.27 Aa
G2	71.13 $\pm$ 0.21 Aa	71.70 $\pm$ 0.29 Aa	71.23 $\pm$ 0.43 Aa
G3	71.20 $\pm$ 0.38 Aa	70.74 $\pm$ 0.43 Ba	71.24 $\pm$ 0.28 Aa
G4	71.18 $\pm$ 0.20 Aa	70.28 $\pm$ 0.21 Ba	71.13 $\pm$ 0.36 Aa
G5	71.10 $\pm$ 0.25 Aa	71.41 $\pm$ 0.18 Aa	71.04 $\pm$ 0.32 Aa

Means followed by different letters (uppercase vertical and lowercase horizontal letters) differ ($p \leq 0.05$).

DISCUSSION

In this study it was found that both bleaching agents tested reduced the microhardness, increased roughness and altered enamel rates of Calcium and Phosphorus. The Calcium rates, however, showed a significant decrease only after use of common bleaching agent. Previous studies have obtained similar results with the use of hydrogen peroxide in high concentrations, confirming the results obtained in this study for surface roughness patterns, indicating that these bleaching substances promoted structural and morphological changes of enamel^{17,19}.

Microhardness tests are sensitive and capable of revealing small changes that occur in the process of demineralization and remineralization of a substrate. Thus, the analysis of enamel microhardness indirectly provides evidence of teeth mineral gain or loss¹⁰. In the present study, the reduction in values obtained with the use of bleaching implies, then, that the observed changes in the enamel must be derived from mineral loss incurred in treatment, even for groups submitted to bleaching with Calcium agent. In fact, other authors have reported a reduction in the concentration of Calcium and Calcium-Phosphate relationship, major inorganic constituents of dental tissues, after dental bleaching^{17,19,22,23,24,25}.

The exact mechanism by which hydrogen peroxide affects the dental tissues is not completely understood, but its deleterious effects, such as demineralization identified in this study may be related to its own mechanism of action. Peroxide is a strong oxidizing agent that possesses the ability to diffuse through the enamel and dentin due to its permeability

and low molecular weight, in addition to having the ability to denature proteins, thereby going a large ionic motion through the dental tissues^{17,26}.

The action of hydrogen peroxide takes place by redox process, where the pigmented macromolecules are oxidized becoming smaller and lighter molecules^{27,28,29}. However, the reaction of peroxides is nonspecific and may also act in dental matrix, affecting the enamel and causing mineral loss^{14,30,11,13,31}.

The pH of the bleaching agent has also been related to the causes of changes in mineral surface of bleached enamel. Rodrigues³² tested different bleaching agentes with different pH and obtained results that suggest that this property may influence mineral loss. Gels acids promote a propitious environment to demineralization. The reduction in the microhardness values observed in this study may be associated with this cause, since the common bleaching gel used present a pH more acid (6,25) than the agent with calcium (8,13)⁴³.

In this context of analysis and understanding the effects caused by bleaching agents to dental tissues, the addition of calcium in the composition of the gels has been identified as an alternative to reduce the adverse consequences. The purpose of these formulations would increase the saturation of the gel with ions, thereby reducing the mineral loss and increasing the resistance of enamel demineralization caused by peroxides²¹.

In an attempt to establish the validity of this hypothesis, Oliveira³² conducted a comparative study and found that, despite the addition of calcium, all bleaching agents affected the microhardness of enamel and that the presence of this element did not prevent mineral loss resulting from the bleaching process. In the present study, as presented, the application of both gels had actually decreased their microhardness values. For group that received the bleaching agent with calcium, however, this decrease was statistically lower when compared to the other group. This result runs counter Oliveira's study and agree to other studies^{21,34,35,36} that suggests the potential benefit of the presence of calcium to tooth enamel exposed to bleaching.

Besides the microhardness analysis, this research also analyzed the concentration of calcium and phosphorus after bleaching and the effect of immersion in artificial saliva or neutral fluoride application dynamics of mineral gain or loss of enamel subjected to the action of peroxides.

After the x-ray microanalysis by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), it was found that the concentration of phosphorus in the enamel did not change after bleaching with both bleaching agents, with no difference between them, but after 7 days of immersion in artificial saliva or fluorine application the ranges increased. This fact may be related by the presence of a remineralizing agent presenting different ions among then phosphorus in a supersaturated way, favoring its precipitation in middle¹⁸.

Considering the comparison of the effect of bleaching agents, there is the conservative action of the bleaching agent with calcium, which caused no loss of this element enamel after application. Cavalli³⁵ also reported better performance of the bleaching agent with calcium compared the concentration of this element in the tooth enamel, which can be explained by the fact that they have neutral pH bleaching agents and make possible the absorption of calcium by the enamel, due to ionic equilibrium occurs for the enamel unsaturation during bleaching compared to the bleaching gel³⁵.

The present study, like others^{24,38,39} have done, by contrast, highlights the remineralizing action of saliva and fluorine to restore microhardness values and rates of calcium (after 7 days of immersion in artificial saliva) enamel. In fact, it is considered that saliva plays an important role in the remineralization of dental tissue by the reaction of calcium ions, phosphate and fluoride ions available with enamel^{37,39}.

Still about the effect of bleaching agents on enamel structure and implications of the presence of calcium in gel, the application of fluoride or saliva immersion in this dynamic, another aspect addressed by this study was the surface roughness. There was an increase in values after gel application, both in the group treated with calcium or without this element. Similar consequences after bleaching were reported by other studies^{40,41,42}.

It was also found that in roughness, unlike what occurred in the microhardness, remineralizing agents have not been able to resume their initial values according with other study⁴¹ but disagreeing with Martin et al.⁴⁰ regarding the effectiveness of fluoride. it can be inferred that the enamel remineralization can occur irregularly, that is, the newly formed hydroxyapatite crystals or the incorporation of different ions such fluoride or calcium lead to obtain a roughness surface with different morphology from initial.. Thus, although it may reduce mineral loss and promote remineralization of enamel after harmful effects caused by the peroxide bleaching gels, the resumption of normal range of tissues is not yet clearly demonstrated.

The null hypothesis for this study was partially accepted cause the common agent reduced the microhardness of enamel in a significantly different way than calcium agent, and the concentration of calcium on enamel differ between the products tested. Besides, the remineralization methods did not differed between themselves, being capable to restore the initial values.

CONCLUSIONS

It can be concluded that the different bleaching agents can alter the physical-chemical composition of enamel, but agents containing calcium can reduce the chemical alterations. It can be also concluded, that saliva and fluor can reduce the negative effects of bleaching., except for roughness.

REFERENCES

1. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent Update* 2005;32:463-464, 466-468, 471.
2. Hafez R, Ahmed D, Yousry M, El-Badrawy W, El-Mowafy O. Effect of In-Office Bleaching on Color and Surface Roughness of Composite Restoratives. *Eur J Dent* 2010;4:118-127.
3. Demarco FF, Meireles SS, Masotti AS. Over-the-counter whitening agents: a concise review. *Braz Oral Res.* 2009;23:64-70.
4. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser: a systematic review. *Dent Mater.* 2007;23:586-96.
5. Matis BA, Cochran MA, Eckert G. Review of the effectiveness of various tooth whitening systems. *Oper Dent.* 2009;34:230-5.
6. 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;106:371-375.

7. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-176.
8. Haywood VB. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int* 1992;23:471-488.
9. Shanon H, Spenser P, Gross K, Tira. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int*. 1993; 24: 39-44.
10. Flaitz C, Hicks MJ. Effects of carbamide peroxide whitening agents on enamel surfaces and caries-like lesion formation: A SEM and polarized light microscopic in vitro study. *J Dent Child*. 1996; 63(4):249-256.
11. Perdigão J, Franci 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.
12. Hegedüs C, Bistley T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent*. 1991; 27(7):509-515.
13. 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):293-296.
14. Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater*.2004; 20(8): 733-739.
15. Murchinson DF, Charlton DG, Moore BK. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent*. 1992; 17(5):181-185.
16. Roststein I, Dankner E, Golman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod*. 1996;22(1):23-5.

17. Attin T, Kielbassa AM, Schawaneberg M, Helling E. The effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. J Oral Rehab. 1997; 24(4):282-86.
18. Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. J Endod. 2006; 26(4):203-206.
19. Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. Am J Dent. 2001; 14(2):63-66.
20. Gianinni 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.
21. Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. J Oral Rehabil. 2006; 33(3): 229-233.
22. Scannavino FLF. Efeito do tratamento com gel clareador na relação cálcio-fósforo do esmalte dentário [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual de São Paulo; 2008.
23. Tezel H, Ertas OS, Ozata F, Dalgar H, Korkut ZO. Effect of bleaching agents on calcium loss of the enamel surface. Quintessence Int Apr 2007; 38(4): 339-347.
24. Al- Salehi SK, Wood DJ, Hatton PV. The effect of 24 hour non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness. Journal of Dentistry. 2007; 35(11): 845-850.
25. de Arruda AM ; dos Santos PH, Sundfeld RH, Berger SB, Briso ALF. Effect of Hydrogen Peroxide at 35% on the Morphology of Enamel and Interference in the De-remineralization Process: An *In Situ* Study. Operative Dentistry. 2012; v. 21.
26. Haywood VB. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. Quintessence Int. 1992; 23(7):471 - 488.

27. White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner HJ, Gotz H. Effects of crest whitestrips bleaching on subsurface microhardness and ultrastructure of tooth enamel and coronal dentin. *Am J Dent.* 2004; 17(1); 5-11.
28. Baratieri LN, Monteiro Jr S, Andrada MAC, Vieira LCC. *Clareamento Dental.* São Paulo: Quintessence Books; 1993.
29. Crews KM, Duncan D, Lentz D, Gordy FM, Tolbert B. Effect of bleaching agents on chemical composition of enamel. *Miss Dent Assoc J.* 1997; 53: 20-21.
30. Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A, Rostein I. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. *J Endod.* 1994; 20(2): 61-63.
31. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GMB, Heyman HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dental Materials.* 2005; 21(11): 1059-1067.
32. 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): 103-106.
33. Schemehorn BR, Novak ED. Use of a calcium peroxide whitening agent for remineralization and recalcification of incipient lesions. *J Clin Dent.* 2007; 18:126–130.
34. Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF, Brancalion ML, Arruda MA, Berger SB, Giannini M. Effects of bleaching agents containing fluoride and calcium on human enamel. *Quintessence Int.* Sept 2010; 41(8): e157-65.
35. Borges AB, Samezima LY, Fonseca LP, Yui KCK, Borges ALS, Torres CRG. Influence of Potentially Remineralizing Agents on Bleached Enamel Microhardness. *Operative Dentistry.* 2009; 34(5): 593-597.

36. Borges AB, Yui KCK, D'avila TC, Takahashi CL, Torres CRG, Borges. Influence of Remineralizing Gels on Bleached Enamel Microhardness In Different Time Intervals. *Operative Dentistry*. 2010; 35, (2):180-186.
37. Basting RT, Rodrigues Jr AL, Serra MC. Effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness at different time intervals. *J Am Dent Assoc* 2003; 134(10): 1335-42.
38. Araújo EM, Baratieri LN, Vieira LC, Ritter AV. In situ effect of 10% carbamide peroxide on microhardness of human enamel: Function of time. *J Esthet Restor Dent*. 2003;15(3):166-174.
39. Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralization of eroded lesions by saliva. *J Dent*. 2001; 29:371-376.
40. Martin JM, de Almeida JB, Rosa EA, Soares P, Torno V, Rached RN, Mazur RF. Effect of fluoride therapies on the surface roughness human enamel exposed to bleaching agents. *Quintessence Int* Jan 2010; 41(1): 71-78.
41. Pinto CF, de Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Brazilian Oral Research*. 2004; 18:306-311.
42. Ushigome T, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface – cross-sectional analysis. *Dent Mater J*. 2009; 28: 315-323.
43. Trentino AC, Mondelli RFL, Wang L, Ishikiriama SK, Azevedo LM. Variation of pH bleaching gels and roughness on bovine enamel.. In: 89th. General Session Exhibition of IADR, 40th. Annual Meeting of AADR, 35th. Annual Meeting of CADR. 2011., 2011, San Diego - C.A.. *Journal of Dental Research*, 2011. v. 90.

CONCLUSÃO

Pode concluir-se que os diferentes agentes de clareadores podem alterar a composição físico-química do esmalte, mas os agentes que contêm cálcio podem reduzir as alterações químicas. Conclui-se ainda, que a imersão em saliva artificial e aplicação de flúor podem reduzir os efeitos deletérios do clareamento exceto para a rugosidade.

REFERÊNCIAS

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):293-296.

Al-Qunaian TA. The effect of whitening agents on caries susceptibility of human enamel. *Oper Dent.* 2005; 30(2): 265-70.

Attin T, Kielbassa AM, Schawannenber M, Helling E. The effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehab.* 1997; 24(4):282-86.

Basting RT, Rodrigues Jr AL, Serra MC. Effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness at different time intervals. *J Am Dent Assoc. Chicago,* 2003, no prelo.

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.

Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater.* 2004; 20(8): 733-739.

Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent.* 2001; 14(2):63-66.

Conceição, E.N. O potencial dos compósitos diretos em dentes anteriores. In: *Restaurações estéticas - Compósitos, cerâmicas e implantes.* Ed. Artmed, 2005, p. 145 -173.

Flaitz C, Hicks MJ. Effects of carbamide peroxide whitening agents on enamel surfaces and caries-like lesion formation: A SEM and polarized light microscopic in vitro study. *J Dent Child.* 1996; 63(4):249-256.

Gianinni 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.

Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence Books; 1996.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. March,1989; 20(3): 173-176.

Hegedüs C, Bistley T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent*. 1991; 27(7):509-515.

Kardos, S, Shi B, Sipos T. The in vitro demineralization potential of a sodium fluoride, calcium and phosphate ion-containing dentifrice under various experimental conditions. *J Clin Dent*. 1999; 10: 22-25.

Lopes GC, et al.Efeito dos agentes clareadores caseiros na dureza do esmalte. *Pesq Odont Bras* 2000; 14: 119 (B093).

McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10% carbamide peroxide. *J Dent*. 1996; 24: 395-398.

Murchinson DF, Charlton DG, Moore BK. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent*. 1992; 17(5):181-185.

Oogard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res*. 2001; 35: 40-44.

Park HJ, et al. Changes in bovine enamel after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. *Dent Mater J*. 2004; 23(4): 517-521..

Perdigão J, Franci 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.

Pinheiro Jr EC, et al. In vitro action of various carbamide peroxide bleaching agents on the microhardness of human enamel. *Braz Dent J*. 1996; 7: 75-9.

Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *J Endod*. 2006; 26(4):203-206.

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

Ruse ND, et al. Preliminary surface analyses of etched, bleached and normal bovine enamel. *J Dent Res*. 1990; 69: 1610-1613.

Scannavino FLF. Efeito do tratamento com gel clareador na relação cálcio-fósforo do esmalte dentário [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual de São Paulo; 2008.

Schemehorn BR, Orban BS, Wood GD, Fischer GM. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent*. 1999a; 10: 13-16.

Shanon H, Spenser P, Gross K, Tira. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int*. 1993; 24: 39-44.

Suliman M. An overview of bleaching techniques: 2. Night guard vital bleaching and nonvital bleaching. *SADJ*. 2006; 61(8):352, 354.

APÊNDICE

1. METODOLOGIA ILUSTRADA

1.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As unidades experimentais foram 40 blocos de esmalte bovino. Os fatores em estudo foram os agentes clareadores Whiteness HP Blue 35% (FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil) e Whiteness HP MAXX 35% (FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil) o sistema de remineralização Flúor neutro 2% (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.; Maringá, PR, Brasil) e Saliva artificial (Prodherma – Piracicaba, São Paulo Brazil). As variáveis de resposta foram a dureza Knoop pelo teste de microdureza, a rugosidade superficial pelo teste de rugosimetria perfilométrica e a composição química do esmalte por microanálise de raios-x por Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS).

A forma de designar o tratamento as unidades experimentais foi realizada por processo aleatório, através de sorteio.

1.2. CONFEÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Foram utilizados 40 dentes incisivos bovinos (Fig. 1A), que após a coleta, foram armazenados em solução aquosa de timol a 0,1% (Dinâmica, Piracicaba, São Paulo, Brasil), tamponado. Foram então manualmente removidos os debris com lamina de bisturi e polidos com taças de borracha e pasta de pedra-pomes (SS White LTDA; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água. Após este procedimento, os dentes foram armazenados em água destilada ate o momento de sua utilização.

Após separar a porção coronária da radicular (Fig. 1B) com auxílio de um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda., Barueri, SP, Brasil), blocos de esmalte de 25 mm² (Fig. C) foram obtidas utilizando cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Illinois , EUA) (Fig. 2A) e um disco diamantado de alta concentração (4 "× 012 × 1/2, Buehler, Illinois, EUA) (Fig. 2B).



Fig. 1A



Fig. 1B

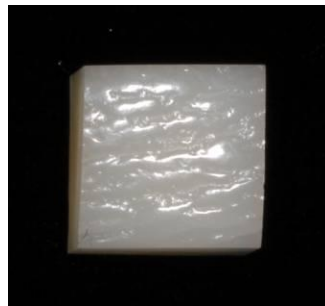


Fig. 1C

Fig. 1. Obtenção do bloco de esmalte. 1A- Dentes incisivos bovinos; 1B- Porção coronária;
1C – Bloco de esmalte 25mm².



Fig. 2A

Fig. 2B

Fig. 2. A- Cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Illinois , EUA); B - Disco diamantado de alta concentração (4 "× 012 × 1/2, Buehler, Illinois, EUA).

Os fragmentos foram planificados com lixas de carbeto de silício de granulação crescente (#400, #600 e #1200) (Fig. 3A e 3B), e tiveram a superfície de esmalte polida com feltros (TOP, RAM e SUPRA) (Arotec, Cotia; SP, Brasil), associados a pastas diamantadas metalográficas de granulação decrescente (1 and 1/4 μm), juntamente com o lubrificante específico (Arotec, Cotia; SP, Brasil) (Fig. 4).



Fig. 3A

Fig. 3B

Fig. 3A- Amostra fixada em stub de acrílico; Fig. 3B- Planificação da amostra com lixas de carbeto de silício de granulação decrescente (#400, #600 e #1200).



Fig. 4A

Fig. 4B

Fig. 4C

Fig. 4A- Discos de feltro para polimento com (TOP, RAM e SUPRA - Arotec, Cotia; SP, Brasil) associado a pastas diamantadas metalográficas Fig. 4B) de granulação decrescente (1 and $\frac{1}{4}$ μ m) lubrificadas com lubrificante vermelho para metalografia (Arotec, Cotia; SP, Brazil) e polimento manual (Fig. 4C).

Entre cada etapa de planificação e polimento, bem como no final do preparo, as amostras foram lavadas com água destilada em cuba ultrassônica (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para que fossem removidos quaisquer debris presentes na superfície de esmalte.

1.3. SEPARAÇÃO DOS GRUPOS

As amostras foram divididas em quatro grupos (G1, G2, G3 e G4, n=10) como descrito na tabela 1.

Tabela 2: Divisão dos grupos (n=10)

Grupo	Tratamento
G1	Whiteness HP Blue 35% + Fluor 2%
G2	Whiteness HP Blue 35% + Saliva Artificial 7 dias
G3	Whiteness HP Maxx 35% + Fluor 2%
G4	Whiteness HP Maxx 35% + Saliva Artificial 7 dias

1.4. MENSURAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

As amostras foram submetidas a leituras de rugosidade superficial com auxílio de um rugosímetro perfilômetro (Mitutoyo, Surftest 211; São Paulo, Brasil) (Fig. 5), com o qual foram realizadas três mensurações equidistantes para cada leitura (L1, L2 E L3), da qual obteve-se a média aritmética.



Fig. 5. Rugosímetro perfilômetro (Mitutoyo, Surftest 211; São Paulo, Brasil)

1.5. MENSURAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL KNOOP

As amostras foram submetidas a leituras de microdureza superficial com auxílio de um microdurômetro (HMV-2000 Shimadzu, Tokyo, Japão) (Fig. 6A), com carga estática de 25g por 5s, com o qual foram realizadas cinco edentações na região central da superfície da amostra com distância de 100 μ m (Fig. 6B) entre cada edentação, em 3 diferentes tempos: inicial (L1), após tratamento superficial (L2), após imersão em saliva artificial por 7 dias ou aplicação tópica de flúor neutro 2% por 2 minutos (L3).



Fig. 6A



Fig. 6B

Fig. 6. A- Microdurômetro (HVM-2000 Shimadzu, Tokyo, Japão); B - Edentações na região central da superfície da amostra com distância de 100 μ m.

1.6. PROCEDIMENTO CLAREADOR

Os procedimentos clareadores foram realizados da seguinte forma:

Grupos 1 E 2 (n=10 por grupo) - Aplicação de peróxido de hidrogênio a 35% com cálcio (Whiteness HP Blue/FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil) em camada de 1mm de espessura por 40 minutos, segundo instruções do fabricante, lavagem, armazenagem em solução de água destilada deionizada a 37°C (Fig. 7 A e B).



Fig. 7A



Fig. 7B

Fig. 7 A e B. Aplicação do peróxido de hidrogênio a 35% com cálcio (Whiteness HP Blue/FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil).

Para os grupos 3 e 4 (n=10 por grupo) - Aplicação de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP MAXX/FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil) : 3 aplicações com 1mm de espessura por 15 minutos, segundo instruções do fabricante, intercalados por lavagem com água destilada deionizada, lavagem final e armazenagem em solução de água destilada deionizada a 37°C (Fig. 8).



Fig. 8A

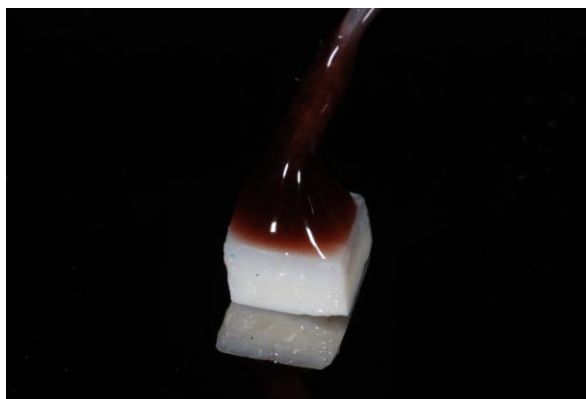


Fig. 8B

Fig. 8. Aplicação de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP MAXX/FGM Produtos odontológicos Ltda.; Joinville, SC, Brasil)

1.7. PROCEDIMENTO REMINERALIZADOR

Após os procedimentos clareadores as amostras dos grupos G1 e G3 foram submetidas a aplicação tópica de flúor neutro 2% (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.; Maringá, PR, Brazil) pelo período de 2 minutos (Fig. 9). Em seguida as amostras foram lavadas pelo período de 15 minutos em cuba ultrassônica.



Fig. 9A

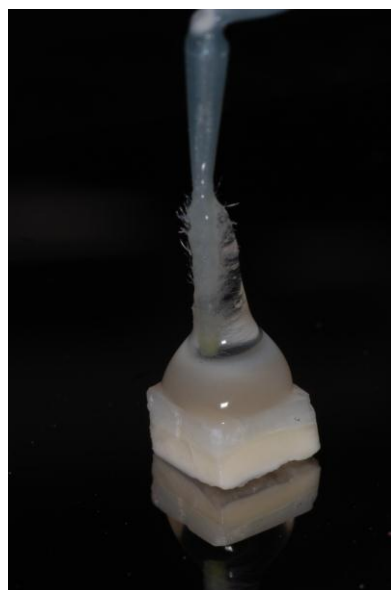


Fig. 9B

Fig. 9. Aplicação tópica de gel de fluoreto de sódio neutro a 2% (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.; Maringá, PR, Brasil).

As amostras dos grupos G2 e G4 foram submetidas a imersão em saliva artificial manipulada (Prodherma – Piracicaba, São Paulo Brazil) pelo período de 7 dias (Fig. 10), sob regime de troca diária da solução. Em seguida as amostras foram lavadas pelo período de 15 minutos em cuba ultrassônica.



Fig.10. Amostra armazenada em saliva artificial.

1.8. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA POR ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA - EDS

As amostras foram preparadas para a leitura em microscópio eletrônico de varredura (JEOL.JSM 5600LV, Tokyo, Japão) (Fig. 11A). Após a desidratação lenta em recipiente com sílica gel durante três dias a 40°C, os corpos de prova foram recobertos com uma camada de carbono vaporizado (Fig. 11BC) de uma corda de carbono (Carbon Yarn Part. No. YRN001-0001, Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) (Fig. 11C), em metalizador (Denton Vacuum - Desc II, Moorestown, NJ, USA) (Fig. 11D).



Fig. 11A



Fig. 11B



Fig. 11C



Fig. 11D

Fig. 11. A - Microscópio eletrônico de varredura; B – Amostras recobertas com carbono; C – Corda de carbono; D – Metalizador.