



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Marianna Sorozini Ferreira de Miranda

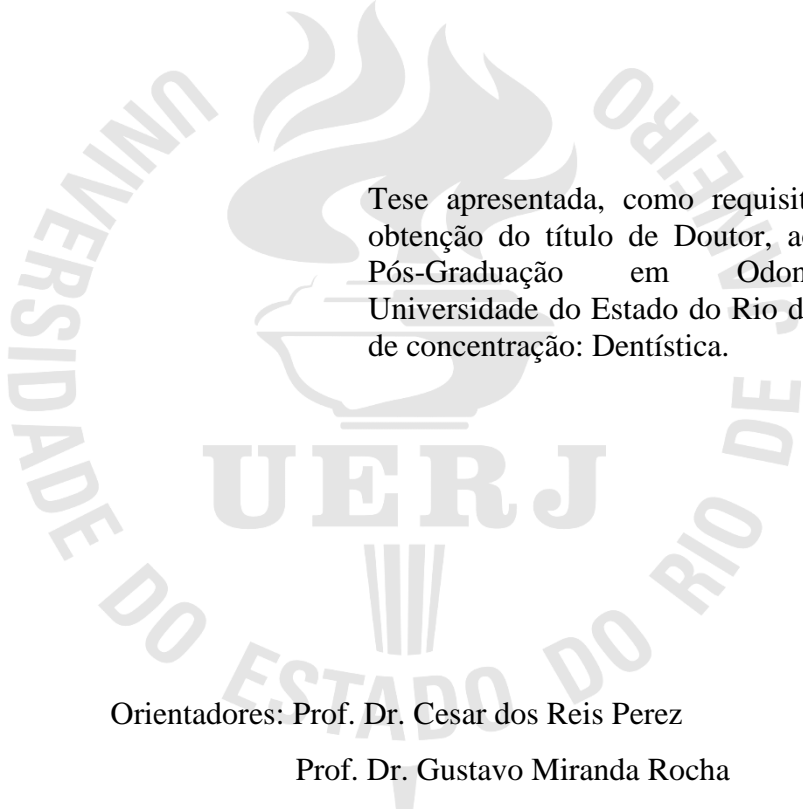
**Efeitos de protocolos excessivos associados a produtos clareadores caseiros
sobre a microestrutura, a composição e as propriedades físicas do esmalte
dentário humano**

Rio de Janeiro

2017

Marianna Sorozini Ferreira de Miranda

Efeitos de protocolos excessivos associados a produtos clareadores caseiros sobre a microestrutura, a composição e as propriedades físicas do esmalte dentário humano



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Dentística.

Orientadores: Prof. Dr. Cesar dos Reis Perez

Prof. Dr. Gustavo Miranda Rocha

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

M672 Miranda, Mariana Sorozini Ferreira de.
Efeitos de regimes clareadores excessivos associados a produtos clareadores caseiros sobre a morfologia, a composição e as propriedades físicas do esmalte dentário humano/ Mariana Sorozini Ferreira de Miranda. – 2017.
125 f.

Orientadores: Cesar dos Reis Perez, Gustavo Miranda Rocha.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Dentes - Clareamento 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Microscopia de força atômica. 4. Esmalte dentário. 5. Análise espectral Raman. 6. Propriedades de superfície. I. Perez, Cesar dos Reis. II. Rocha, Gustavo Miranda. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marianna Sorozini Ferreira de Miranda

Efeitos de protocolos excessivos associados a produtos clareadores caseiros sobre a microestrutura, a composição e as propriedades físicas do esmalte dentário humano

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Dentística.

Aprovada em 18 de dezembro de 2017.

Orientadores:

Prof. Dr. Cesar dos Reis Perez
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Gustavo Miranda da Rocha
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Kátia Regina Hostílio Cervantes Dias
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Marcelino José dos Anjos
Instituto de Física – UERJ

Prof. Dr. Marcelo José Braga Pinhão
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Márcio Antônio Paraizo Borges
Marinha do Brasil

Prof. Dr. Marcos Hahlbohm D'Oliveira Schroeder
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

A Deus, pela intercessão de Maria,

Por ter me dado tudo o que mais precisei no Seu tempo; sempre me proteger, guiar e abençoar pelos caminhos.

A minha avó (*in memoriam*),

Por ser meu maior exemplo de fé, dedicação e amor incondicional; para sempre meu anjo da guarda.

Aos meus pais,

Por serem bons exemplos, me fortalecerem nas dificuldades, apoiarem nas escolhas e serem meu porto-seguro e meus maiores amores.

Aos meus familiares e amigos,

Por sempre me defenderem, impulsionarem e lembrarem que tudo vale mais a pena com eles por perto.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Regina e Waldir, meus maiores amigos! Obrigada por todo suporte durante essa jornada odontológica e de vida. Foram muitas emoções e, sem eles, nunca teria chegado até aqui. Obrigada por toda base, suporte, apoio e por reforçarem sempre meu potencial no caminho. Todas as conquistas são nossas. Vocês são meus exemplos e minha fortaleza.

A minha avó, Vó Norma, que mesmo não estando mais aqui vai ser sempre a pessoa que desejo orgulhar e honrar nos meus passos. Sempre farei todo seu esforço e dedicação por mim terem valido a pena. Minha saudade e minha proteção, onde estiver!

Ao João, por ter sido um parceiro e tanto nesse doutorado e na vida nesses últimos anos! Obrigada por me ajudar a retomar o foco nos momentos em que estava perdida, a enxergar com mais clareza e acima de tudo, a recarregar minhas energias e me blindar. Que venham as próximas metas, uma por uma!

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Cesar dos Reis Perez! Só com quem convive com ele sabe o quanto sua orientação supera o campo acadêmico e atinge a vida daqueles que com ele trabalham. Um exemplo de generosidade, compreensão e retidão. Obrigada por ter me apoiado, confiado e impulsionado em cada batalha nesses anos, mesmo quando duvidava de onde iríamos chegar! Você sempre será um dos mais fortes exemplos de mestre e cirurgião-dentista para mim. Obrigada por sua participação desde o início de minha formação!

Ao também orientador, Prof. Dr. Gustavo Miranda Rocha! Sem ele, esse trabalho não existiria. Seu empenho, sua disposição e sua vasta rede de contatos foram fundamentais para sua execução. Obrigada por ter aberto as portas do Laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ter me introduzido um admirável mundo novo e um grande desafio: a microscopia de força atômica. Foram muitos momentos de difícil aprendizagem, em que você me exigiu dedicação e jogo de cintura, mas aí está o fruto. Obrigada pelas inúmeras oportunidades de crescimento e ampliação do meu leque profissional, pelas oportunidades de divulgar trabalhos e por ter confiado em minha capacidade.

Aos Prof. Drs. Gilberto Weissmüller e Paulo Bisch por terem me recebido no laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e terem entendido minhas dificuldades e limitações. Obrigada pelos aprendizados, oportunidades e parceria firmada. Do mesmo modo, aos colegas de Laboratório Bia, Hill e Daniel que sempre

estiveram dispostos a ajudar e participaram em todos os momentos de construção desses novos conhecimentos e deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Camargo que autorizou a realização de testes no Laboratório de Superfície e Filmes Finos do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em especial para Emanuel Santos Jr. que ajudou na realização dos testes de nanoindentação. Também Amal Eltom que foi sempre solícita e gentil, entendendo meus horários confusos e ajudando muito na finalização dos testes e trabalho escrito.

À equipe Renishaw Brasil na pessoa de Fábio Godoy que possibilitou a realização das avaliações Raman com a disponibilização do equipamento por dois meses no laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. Também agradeço ao Tim Cook pelos conhecimentos divididos acerca da técnica, ajuste do aparelho e processamento das amostras.

Aos Prof. Drs. Hélio Rodrigues Sampaio Filho e Mauro Sayão de Miranda do Programa de Pós Graduação em Dentística, pela dedicação, disponibilidade, atenção e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada pela oportunidade, ajuda e presença durante graduação, Mestrado e Doutorado.

A Prof^a. Dr^a. Kátia Hostílio Cervantes Dias! Obrigada pelo exemplo de mulher, professora, tutora e ser humano gentil e diplomático. Sua capacidade sempre me impressionou e sua postura me encanta. Um exemplo de como espero ser para meus alunos. Não há ninguém que não se cativasse pela sua presença e inúmeras realizações. Obrigada por sua presença iniciada na Graduação e por, finalmente, participar de minha defesa e coroar essa conclusão de curso.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Braga Pinhão que acredita e aposta em meu futuro desde a graduação. Espero corresponder suas expectativas. Você é um exemplo de excelência, humildade e um grande mestre. Obrigada por seus conselhos, dicas e oportunidades. É uma honra tê-lo comigo fechando esse ciclo.

Ao Prof. Dr. Marcelino José dos Anjos e ao doutorando Ramon Santos do Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas pelos muitos conhecimentos compartilhados, gentileza e participação em outros trabalhos desenvolvidos.

Aos Profs. Drs. Ivo Côrrea e Marcos Schroeder pela parceria durante o agradável período em que fui professora substituta de Materiais Dentários na UFRJ. Foi uma oportunidade ímpar que sempre carregarei como meu primeiro exercício efetivo da carreira de professora. Obrigada pela confiança, espaço, liberdade e experiências compartilhadas.

Agradeço também ao Prof. Dr. Luiz Carlos Santiago por ter me recebido na disciplina de Prótese Fixa! Aprendi muito com você!

Aos professores do curso de especialização, em especial o Prof. Dr. Hugo de Andrade Filho. Obrigada pelos ensinamentos e exemplo sempre. E também ao Prof. Dr. Antônio Fernando Monnerat por ter aceitado ser avaliador prévio e sempre ser gentil e solícito. Obrigada pelos conselhos tão pertinentes.

A todos os funcionários da FO-UERJ, em especial Denise e Ritinha, sempre muito solícitos e pessoas sensacionais. Também a todo corpo docente, é muito bom ver o quanto todos se preocupam, torcem por nós e se mantêm dispostos a colaborar no crescimento profissional de seus alunos. Por isso, tenho que agradecer a minha casa e meu berço, a FO-UERJ. Devo o que conquistei e o que vier a conquistar a tudo que aqui passei e aprendi. Sinto muito orgulho e gratidão de toda formação superior nessa instituição e da família que aqui encontrei. Sempre lutarei para que a UERJ resista!

Aos amigos de mestrado e doutorado, em especial, os “cesaretos”: Bárbara, André e Amanda. Foi muito bom poder dividir esses anos com vocês, ver as batalhas e conquistas de cada um de nós!

À amiga de especialização, Mestrado, Doutorado, consultório e de vida Bárbara Pessôa! Continuamos firmes e fortes na parceria. Você sempre vai ser uma grande amiga, com quem aprendi e aprendo muito! Obrigada pelo suporte, carinho e torcida!

Aos amigos que a Odontologia me deu, especialmente as mais presentes nessa fase: Liliane Diniz e Ivanise Cardoso, que sempre trazem palavras de incentivo, além do companheirismo fora da Odontologia. É muito bom ter vocês por perto. Já é uma necessidade!

Às amigas de vida e para sempre minhas superpoderosas, Geovanna, Marcella e Paula. Seu apoio, carinho e amizade por todos esses anos que nos conhecemos tornam a vida muito mais agradável, as vitórias mais saborosas e o choro menos doído. Obrigada por se importarem com meus caminhos e terem suportado todas essas loucuras!!

À Instituição de fomento CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos meus primos e todos os familiares que entenderam e perceberam mais do que ninguém minha ausência nos últimos anos. Obrigada pelo carinho.

Por último e mais importante, agradeço a Deus e Maria por iluminarem e abrirem sempre meus caminhos e por terem colocado pessoas tão boas na minha vida! Ainda na certeza de que seria impossível lembrar-me de todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Porque Tu és a minha rocha e a minha fortaleza; assim, por amor do Teu nome, guia-me e encaminha-me.

Salmos 31:3

RESUMO

DE MIRANDA, Marianna Sorozini Ferreira. *Efeitos de protocolos excessivos associados a produtos clareadores caseiros sobre a microestrutura, a composição e as propriedades físicas do esmalte dentário humano*. 2017. 124f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

As técnicas clareadoras são consideradas seguras, simples e não invasivas. Assim, ganharam popularidade entre profissionais e pacientes. No entanto, o livre acesso do gel à estrutura dentária e o contato direto com a superfície do esmalte levantam dúvidas sobre seus reais impactos. Novas preocupações surgiram com os chamados produtos de bancada e a possibilidade de auto-aplicação, inclusive com consumo exagerado e/ou sem orientação e acompanhamento. Sendo assim, buscou-se avaliar, os efeitos de produtos clareadores caseiros sobre microestrutura, rugosidade, composição, nanodureza e módulo de elasticidade do esmalte dentário humano, em protocolos de uso normal ou excessivo. Amostras obtidas de 10 terceiros molares foram divididas em 4 grupos: grupo I – armazenamento em saliva artificial, grupo II – utilização de peróxido de carbamida (PC) 10%, grupo III – utilização de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10%, grupo IV – utilização de tiras clareadoras (H_2O_2 10%). Cada dente forneceu quatro fragmentos de esmalte para cada um dos grupos. Foram realizadas aplicações diárias de acordo com a recomendação dos fabricantes, e foi adotada simulação de escovação duas vezes ao dia com escova elétrica. Todas as amostras foram armazenadas em saliva artificial e passaram por análises antes do início da terapia, após 4 e 8 semanas de intervenção. A escolha por técnicas não-destrutivas permitiu que cada amostra fosse seu próprio controle. Desse modo, a microscopia confocal por varredura a laser e microscopia de força atômica avaliaram alterações na microestrutura da superfície e foram coletados dados de rugosidade (S_a e S_q) para análise estatística. Os espécimes passaram por testes de nanoindentação para avaliação de nanodureza e módulo de elasticidade. Essas informações foram correlacionadas com as alterações de composição por microespectroscopia Raman. O clareamento com PC não apresentou alterações significativas nas amostras de esmalte, seguindo o padrão de comportamento daquelas escovadas e armazenadas em saliva artificial, tendo se mostrado segura. No entanto, os grupos que passaram por intervenção com H_2O_2 (III e IV) apresentaram modificações significativas em suas propriedades após 4 e 8 semanas de utilização. A alteração na superfície com aparência mais exposta foi associada a maior detecção de proteínas após as primeiras 4 semanas de utilização, especialmente para o grupo III. Após 8 semanas, a superfície apareceu mais suave, com perda do padrão prismático e queda no conteúdo orgânico, sugerindo uma perda de camadas superficiais desorganizadas. Do mesmo modo, o aumento dos valores de dureza e módulo de elasticidade para essas amostras pareceu derivar do efeito remineralizador da saliva e do papel positivo das proteínas mais expostas nas propriedades mecânicas permitindo maior deslizamento dos cristais e acomodação frente às cargas. Conclui-se que o uso de géis a base de H_2O_2 deve ser cauteloso, seguindo as recomendações profissionais e que são necessários testes *in situ* e *in vivo* para confirmar as tendências observadas.

Palavras-chave: Clareamento dental. Peróxido de hidrogênio. Microscopia de força atômica.

Esmalte dentário. Análise espectral Raman. Propriedades de superfície.

ABSTRACT

DE MIRANDA, Marianna Sorozini Ferreira. *Effects of excessive protocols associated with home bleaching products on the microstructure, composition and physical properties of human tooth enamel*. 2017. 124f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The bleaching techniques are considered safe, simple and non-invasive and thus have gained popularity among professionals and patients. However, the free access of the gel to dental structures and the direct contact with the surface of the enamel, during the whole treatment raises doubts, about its possible impacts. Concerns were also raised about the emergence of so-called over-the-counter products and the possibility of self-application that could lead to excessive consumption and / or lack of guidance and monitoring. The aim of this study was to evaluate the effects of home bleaching products on the microstructure, roughness, composition, nanohardness and elastic modulus of human dental enamel in protocols of normal or excessive use. Samples were obtained from 10 third molars and divided into 4 groups: group I - storage in artificial saliva, group II - treatment with 10% carbamide peroxide, group III - treatment with 10% hydrogen peroxide, group IV - treatment with whitening strips (10% hydrogen peroxide). Each tooth provided four enamel fragments for treatment in each one of the groups. Daily applications were performed according to the manufacturers' recommendations, and a brushing simulation was used twice a day with an electric brush. All samples were stored in artificial saliva at the treatment intervals and were analyzed before the start of therapy, after 4 and 8 weeks of intervention. The choice by non-destructive techniques allowed each sample to be its own control. Qualitative analyzes of microstructure alteration were carried out using confocal laser scanning microscopy and atomic force microscopy. Roughness data (S_a and S_q) were also obtained for statistical analysis. Nanoindentation tests were used to determine changes in the nanohardness and elastic modulus. All of this information was correlated with composition changes by Raman micro-spectroscopy. Carbamide peroxide bleaching showed no significant changes in enamel samples, following the behavior pattern of those brushed and stored in artificial saliva, and therefore considered safe. However, the groups treated with hydrogen peroxide (III and IV) showed significant modifications in their properties after 4 and 8 weeks of treatment. The change in surface with more exposed appearance was associated with greater protein detection after the first month of treatment, especially for group III. After 8 weeks, the surface appeared smoother, with reduction of prismatic pattern and drop in organic content, suggesting a loss of disorganized mineral surface layers. Likewise, the increase in hardness and elastic modulus values for these samples seems to derive from the remineralizing effect of saliva and the positive role of the most exposed proteins in the mechanical properties, allowing greater slip of the crystals and accommodation with the loads. These changes may not reach clinically perceptible patterns but reinforce the importance of dentists' supervision and monitoring, since *in-vivo* the patient may be exposed to other challenges that may worsen the impacts. It is concluded that the use of hydrogen peroxide gels in bleaching therapies should be under professional supervision and that *in situ* and *in vivo* tests are required to confirm the observed trends.

Keywords: Tooth whitening. Hydrogen peroxide. Atomic force microscopy. Dental enamel. Raman. Surface properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Exemplo de dente utilizado.....	57
Figura 2 –	Obtenção dos fragmentos de esmalte.....	58
Figura 3 –	Fragmento de esmalte fixado para leituras.....	58
Figura 4 –	Desenho esquemático do teste de indentação e de riscamento.....	61
Figura 5 –	Nanoindentador G200 Agilent.....	61
Figura 6 –	Aparelho de CLSM Zeiss modelo LSM 700.....	62
Figura 7 –	Exemplo de imagem por CLSM da marcação em cruz realizada nas amostras.....	63
Figura 8 –	Aparelho de AFM Dimension Icon.....	63
Figura 9 –	Exemplo de imagem da câmera com dispositivo de carga acoplada (CCD) do equipamento de AFM.....	64
Figura 10 –	Imagem representativa do cantiléver RTESPA utilizado.....	65
Figura 11 –	Interface do programa NanoScope Analysis.....	65
Figura 12 –	Figura esquematizada de uma unidade detectora de AFM.....	66
Figura 13 –	Posição do cantiléver durante a aproximação com amostra.....	66
Figura 14 –	Aparelho de Raman inVia Qontor.....	67
Figura 15 –	Exemplo destacado da região de um prisma selecionado para leitura com auxílio de câmera CCD no equipamento Raman.....	68
Figura 16 –	Formato em desenho esquemático da ponta Berkovich.....	70
Figura 17 –	Desenho esquemático do ensaio de nanoindentação.....	71
Figura 18 –	Exemplo das curvas obtidas em que os dados para os cálculos são extraídos da curva de descarregamento.....	71
Figura 19 –	Grupo I (controle).....	73
Figura 20 –	Grupo II (PC 10%).....	73
Figura 21 –	Grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	74
Figura 22 –	Grupo IV (tiras clareadoras).....	74
Figura 23 –	Grupo I (controle).....	76
Figura 24 –	Grupo II (PC 10%).....	76
Figura 25 –	Grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	76
Figura 26 –	Grupo IV (tiras clareadoras).....	77

Figura 27 – Evolução dos prismas.....	78
Figura 28 – Espectro PO ₄ e carbonato inicial.....	82
Figura 29 – Espectro PO ₄ e carbonato após 8 semanas do grupo I (controle).....	83
Figura 30 – Espectro PO ₄ e carbonato após 4 semanas do grupo II (PC 10%).....	83
Figura 31 – Espectro PO ₄ e carbonato após 8 semanas do grupo II (PC 10%).....	83
Figura 32 – Espectro PO ₄ e carbonato após 4 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	84
Figura 33 – Espectro PO ₄ e carbonato após 8 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	84
Figura 34 – Espectro PO ₄ e carbonato após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)...	84
Figura 35 – Espectro PO ₄ e carbonato após 8 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)...	85
Figura 36 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> inicial.....	86
Figura 37 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 8 semanas do grupo I (controle).....	86
Figura 38 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 4 semanas do grupo II (PC 10%).....	86
Figura 39 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 8 semanas do grupo II (PC 10%).....	87
Figura 40 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 4 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%)..	87
Figura 41 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 8 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%)..	87
Figura 42 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras).....	88
Figura 43 – Espectro amida I e C-H <i>bending</i> após 8 semanas do grupo IV (tiras clareadoras).....	88
Figura 44 – Espectro C-H <i>stretching</i> inicial.....	89
Figura 45 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 8 semanas do grupo I (controle).....	89
Figura 46 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 4 semanas do grupo II (PC 10%).....	89
Figura 47 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 8 semanas do grupo II (PC 10%).....	90
Figura 48 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 4 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	90
Figura 49 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 8 semanas do grupo III (H ₂ O ₂ 10%).....	90
Figura 50 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras).....	91
Figura 51 – Espectro C-H <i>stretching</i> após 8 semanas do grupo IV(tiras clareadoras).....	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro Sa.....	80
Gráfico 2 –	Média dos valores de rugosidade (Sa) dos grupos e sua evolução durante o tratamento.....	80
Gráfico 3 –	Média dos valores de rugosidade (Sq) dos grupos e sua evolução durante o tratamento.....	81
Gráfico 4 –	Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro Sq.....	82
Gráfico 5 –	Média dos valores de módulo de elasticidade (GPa) durante o tratamento para todos os grupos.....	92
Gráfico 6 –	Distribuição linear das médias: parâmetro módulo de elasticidade.....	93
Gráfico 7 –	Média dos valores de nanodureza (GPa) durante o tratamento para todos os grupos.....	93
Gráfico 8 –	Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro nanodureza.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	3 dimensões
A	Área
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ADA	<i>American Dental Association</i>
ADF	<i>Association Dentaire Française</i>
AFM	Microscopia de força atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR-FTIR	Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CLSM	Microscopia confocal por varredura a laser
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
CPP-ACP	Fosfopeptídeos de caseína estabilizado pelo fosfato de cálcio amorfo
ΔE	Varição total de cor
E	Módulo de Young
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão de energia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE-SEM	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
FO-UERJ	Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FT	Resistência à fratura
FTIR	Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier
H	Dureza
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAp	Hidroxiapatita
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank

HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução
IADR	<i>International Academy of Dental Research</i>
JCE	Junção cimento-esmalte
L	Luminosidade
LIF	Fluorescência induzida por laser
n	Número de amostras
<i>p</i>	Nível de significância
P	Carga
PC	Peróxido de carbamida
PEMM	Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais
pH	Potencial de hidrogênio
Ra	Rugosidade média linear
rpm	rotações por minuto
Rq	Rugosidade média quadrática linear
RX	Raios X
Sa	Rugosidade média da superfície
Sq	Média quadrática da rugosidade da superfície
TC	Tomografia computadorizada
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<i>v</i>	Razão de Poisson
z	Altura

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Varição
°	Graus
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
=	Igual
+	Mais
±	Mais ou menos
x	Vezes
/	Por
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
&	E
µg	Microgramas
µm	Micrômetros
µN	Micronewntons
γ	Gama
C	Carbono
Ca	Cálcio
C – H	Ligações carbono-hidrogênio
Cl	Cloro
cL	Centilitros
Cm	Centímetros
cm ⁻¹	Unidade utilizada para comprimento de onda
Cu	Cobre
eV	Eletrovolts
F	Flúor
g	Gramas
GPa	Gigapascal
h	Horas
H	Hidrogênio

Hz	Hertz
K	Potássio
KBr	Brometo de potássio
kV	Quilovolts
m	Metros
M	Mol
Mg	Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mN	MiliNewtons
ms	Milissegundos
mW	MiliWatts
N	Newton
N	Nitrogênio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
nN	NanoNewtons
O	Oxigênio
P	Fósforo
PO ₄	Fosfato
s	Segundos
S	Enxofre
Sr	Estrôncio
™	<i>Trade Mark</i>
Zn	Zinco

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1	Organização estrutural do esmalte humano e uso de AFM para avaliações estruturais	21
1.2	Composição do esmalte humano e uso de espectroscopia Raman para avaliações de conteúdo orgânico e inorgânico	25
1.3	Propriedades mecânicas dos tecidos dentários e uso de testes de nanoindentação	28
1.4	Avaliações de agentes clareadores na literatura	31
2	PROPOSIÇÃO	56
3	METODOLOGIA	57
3.1	Obtenção e preparo das amostras	57
3.2	Marcação das amostras	60
3.3	Análise por CLSM	62
3.4	Análise por AFM	63
3.5	Análise por microespectroscopia Raman	67
3.6	Análise por nanoindentação	69
3.7	Análise estatística	72
4	RESULTADOS	73
4.1	Análise qualitativa das imagens através de CLSM	73
4.2	Análise qualitativa das imagens através de AFM	75
4.3	Análise de rugosidade através de AFM	79
4.4	Análise de composição através de microespectroscopia Raman	82
4.5	Análise de módulo de elasticidade e nanodureza através de nanoindentação	91
5	DISCUSSÃO	96
	CONCLUSÃO	117
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO – Aprovação do comitê de ética em pesquisa	123

INTRODUÇÃO

O clareamento dental consiste em um dos procedimentos mais buscados e realizados nos consultórios odontológicos. Sua popularidade está ligada ao fato de gerar resultados estético, sendo pouco invasivo, sem desgaste previsto da estrutura dentária, atingindo melhora visível de vitalidade e jovialidade. Além disso, consiste atualmente em uma importante etapa prévia de intervenções estéticas maiores que requeiram reabilitações e, para melhor desempenho, a homogeneização das cores dos substratos (POLYDOROU et al., 2017).

Existem inúmeros géis clareadores à disposição de profissionais e pacientes. Tais produtos se dividem conforme a categoria de intervenção a que são destinados. Os procedimentos clareadores são divididos naqueles de consultório, o caseiro supervisionado e os chamados produtos de bancada. Além da maneira de aplicação, os géis variam em concentração e tempo de aplicação (AZER et al., 2009; ALQATAHNI, 2014; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016).

A técnica clareadora caseira foi introduzida por Haywood e Heymann em 1989 (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; HEGEDÜS et al., 1999; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010) e desde então, ganhou bastante popularidade e tem a grande aceitação dos pacientes pela baixa incidência de efeitos colaterais e desconforto, além da simplicidade de execução. Inúmeros trabalhos provaram sua eficácia e segurança clínicas de modo que a utilização de géis clareadores a base de peróxido de carbamida (PC) a 10% é recomendada pela American Dental Association (ADA) como padrão-ouro (HENN-DONASSOLLO et al., 2016; KWON et al., 2015; SERRAGLIO et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). Ainda assim, surgiram no mercado géis com maiores concentrações de PC e outros a base de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na apresentação de seringas e que também se encaixam nessa categoria e visam intervenções com menores tempos de aplicação e melhores resultados.

A técnica caseira supervisionada pressupõe o acompanhamento e orientação de um profissional, além da confecção de moldeiras adaptadas e individualizadas à arcada de cada paciente (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; HEGEDÜS et al., 1999; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). O exame clínico prévio do cirurgião-dentista para resolução de problemas, com recuperação de forma e função, assim como esclarecimentos quanto ao prognóstico e limitações do caso do paciente são fundamentais para o sucesso da terapia. Ainda assim, visando a eliminação da etapa de

consulta a um profissional, a autonomia do paciente e a redução de custos, a indústria iniciou o lançamento, a partir dos anos 2000, de inúmeros produtos classificados como clareadores de bancada (“*over-the-counter*”) (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; LEONARD et al., 2005; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SERRAGLIO et al., 2016). Apresentam concentrações maiores de H_2O_2 (de 6,5 a 10%) e diferentes formas de aplicação como dentífricos, colutórios, pincéis e as famosas tiras clareadoras. Algumas dessas apresentações apresentam potencial clareador, porém mais riscos de efeitos deletérios ao paciente não-orientado. Do mesmo modo, a negligência da importância do acompanhamento de um profissional para diagnóstico e prognóstico do procedimento pode ser desastroso (DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; EIMAR et al., 2012; LEONARD et al., 2005; MAIA et al., 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) contribuiu para o controle das terapias clareadoras caseiras e proibiu, em 2013, a venda de géis clareadores com concentrações de H_2O_2 maiores que 3% sem a prescrição de um cirurgião-dentista. Ainda assim, o acesso costuma ser fácil em lojas de venda de material odontológico assim como na internet. Desse modo, há uma constante preocupação com o possível abuso dos pacientes, realizando os procedimentos por tempos maiores que os recomendados, em protocolos excessivos (EIMAR et al., 2012; LEONARD et al., 2005; MAIA et al., 2008; POLYDOROU et al., 2017; SOROZINI et al., 2017). Os potenciais efeitos descritos e investigados na literatura para os tecidos dentários duros, em especial no esmalte em direto contato com o gel poderiam ser ainda mais pronunciados, assim como efeitos nos tecidos moles desprotegidos, além de impacto nos níveis de sensibilidade dentinária.

O modo de ação sugerido dos géis clareadores consiste na ação oxidante dos radicais livres de oxigênio que surgem da decomposição do H_2O_2 , produto clareador de todos os géis, mesmo aqueles a base de peróxido de carbamida (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; EIMAR et al., 2012; ELFALLAH et al., 2015; GOO et al., 2004). Esse oxigênio reativo é capaz de penetrar na estrutura dentária facilmente em função de seu baixo peso molecular. Sua ação clareadora ainda não é totalmente esclarecida, mas a maioria dos autores defende o efeito nos pigmentos orgânicos presentes em dentina, clivando-os de modo a produzir compostos menores com menos impacto no padrão de reflexão da cor (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; EIMAR et al., 2012; GOO et al., 2004; HEGEDÜS et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2011; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; SERRAGLIO et al., 2016; YU et al., 2015). A capacidade oxidativa marcante do gel em matéria orgânica não é seletiva, portanto, muitos autores defendem os possíveis efeitos colaterais na composição da própria estrutura

dentária e não somente sob os pigmentos. Do mesmo modo, muitos autores descrevem efeitos em matriz inorgânica, em função da ação dos clareadores e da possibilidade de desmineralização especialmente do esmalte dentário humano em função do contato direto com o gel, em especial aqueles de pH ácido (CAREY, 2014; FINKE, JANDT e PARKER, 2000; ; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; POLYDOROU et al., 2017; SA et al., 2012; ZANTNER, 2007).

Os tecidos dentais duros (esmalte, dentina e cemento) são basicamente formados de cristais de hidroxiapatita (HAp), proteínas, além de outros elementos químicos em baixa concentração (BISWAS, DEY e MUKHOPADHYAY, 2012; ELFALLAH et al., 2015; NANCI, 2008; SA et al., 2012;). No esmalte dentário a matriz orgânica (basicamente amelogenina e enamulina) apresenta-se em baixa concentração (em torno de 4%) como resquícios do processo da amelogênese. Ainda assim, autores descrevem sua importância para manutenção da integridade do arranjo estrutural do esmalte humano (GE et al., 2005; NANCI, 2008). Nesse tecido, os cristais de hidroxiapatita se reúnem na forma de prismas, também chamados de bastões com aproximadamente 5 a 7 micrômetros (μm). A matéria orgânica residual se concentra na região entre os bastões, em sua periferia e ajudando no arcabouço do padrão apresentado (GE et al., 2005; NANCI, 2008). Assim, alterações na composição orgânica e inorgânica do esmalte seriam capazes de trazer efeitos diretos na sua ultra-estrutura, com impactos na sua rugosidade, integridade estrutural e propriedades mecânicas como nano e microdureza (ELFALLAH et al., 2015; TANAKA et al., 2010). Apesar de inúmeras evidências, a inconsistência de resultados e variabilidade do desenho dos estudos traz dificuldades na determinação do real efeito dos agentes clareadores e de sua segurança para os dentes dos pacientes (ALQATAHNI, 2014; BORGES et al., 2016; CAREY, 2014; ÖZKAN et al., 2013; POLYDOROU et al., 2017; SOROZINI et al., 2017).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais efeitos de géis clareadores caseiros representados pelo PC 10% e H_2O_2 10% e de produtos de bancada, através das tiras clareadoras, no esmalte dentário humano (H_2O_2 10%) em protocolos recomendados pelos profissionais ou considerados em excesso, quatro e oito semanas, respectivamente. Para uma avaliação completa do impacto dos produtos na estrutura foram utilizadas as técnicas de microscopia confocal por varredura a laser (CLSM), microscopia de força atômica (AFM), microespectroscopia Raman e nanoindentação, de modo a avaliar a real segurança dos géis e o perigo do seu abuso por pacientes sem orientação.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Organização estrutural do esmalte humano e uso de AFM para avaliações estruturais

Farina et al. (1999) usaram AFM para estudar superfícies dentárias de diferentes espécies e comparar o padrão de distribuição de cristais na sua camada mais externa. Dentes humanos, de um roedor (hamster dourado), de um peixe (piranha) e de um molusco com hábitos distintos foram analisados. A disposição, compactação e tamanhos dos cristais foram avaliados. Foram usadas outras técnicas complementares de análise morfológica como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Todos os dentes foram limpos e alguns foram condicionados com soluções ácidas antes das análises. Especificamente, os terceiros molares humanos foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% por mais de uma hora (h), lavados com água destilada e secos. As superfícies sem polimento, ao natural foram montadas para análise. As amostras limpas foram sendo progressivamente condicionadas por ácido fosfórico a 37% por períodos de 10 segundos (s). Foram identificadas áreas de cristais de HAp relacionadas com proteínas remanescentes do esmalte com auxílio de imagens de forças laterais. Observou-se que o esmalte humano tem partículas bem compactadas em sua superfície externa, em torno de 75 nanômetros (nm). Os autores defenderam que o AFM oferece imagens de alto contraste e resolução, sendo uma importante ferramenta para obtenção informações sobre a microestrutura do tecido.

O objetivo de Finke, Jandt e Parker (2000) foi medir os estágios iniciais da perda mineral em superfícies de esmalte com observações qualitativas de mudanças na morfologia usando AFM. Foram analisados terceiros molares inclusos parcialmente cobertos em uma das metades com uma camada de ouro e na outra com parafilme. A diferença de altura entre a camada ácido resistente coberta por ouro e o esmalte erodido foi medida no modo de leitura contato intermitente (Multimode Nanoscope IIIa, Digital Instruments). As amostras foram analisadas antes da dissolução e após a exposição a três bebidas diferentes (água mineral, uma bebida a base de cola definida como pouco agressiva ao dente além de suco de limão e lima), em cinco tempos de exposição diferentes: 15 minutos (min), 30min, 1h, 2h e 3h, com troca dos líquidos a cada 15min. As mudanças na morfologia da superfície foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente com imagens de 50x50µm mostrando tanto o esmalte

nativo como a camada de referência em ouro. As análises iniciais foram subtraídas das imagens após cada intervalo. As imagens resultantes demonstraram diferenças de altura e na topografia superficial do esmalte. A utilização de água levou à menor perda, seguida pela bebida à base de cola e o suco de limão e lima. A quantidade de perda aumentou para todas as bebidas com o tempo. Para a água, um platô na curva de dissolução parece ser alcançado após 1h de exposição, sendo considerado o controle negativo. Após 3h, a bebida à base de cola levou a 1,5 vezes mais perda de material que a água. O suco de limão e lima, por outro lado, causou uma perda média de esmalte 36 vezes maior que a água e 24 vezes maior que a bebida à base de cola. Para água e a bebida à base de cola, em qualquer intervalo a perda máxima foi inferior a 100nm. Houve apenas uma pequena diferença estatisticamente significativa entre a água e a bebida à base de cola após tempos de contato maiores que 2h. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para os intervalos da aplicação de água no esmalte. Houve diferença estatística para o suco de limão e lima em todos os intervalos quando comparados a água e bebida à base de cola. Após a exposição ao limão e à lima, o esmalte não foi dissolvido uniformemente. A maior perda foi observada nas porções aprismáticas. Tais diferenças não foram detectadas para as outras duas bebidas devido ao seu pequeno potencial erosivo. Apesar do pH baixo da bebida à base de cola o seu alto teor de cálcio parece não afetar tanto a superfície. A perda máxima de material ocorreu nas porções aprismáticas perto de periquimácias. Este estudo também demonstrou que o AFM é uma ferramenta adequada para medir os estágios iniciais da desmineralização do esmalte.

Mannheimer (2002) descreve em seu livro o princípio básico das diferentes técnicas de microscopia disponíveis mostraram suas indicações e dando fundamentos para as escolhas nas avaliações de materiais biológicos. Os fundamentos de análises por MEV, MET, CLSM, AFM e outras técnicas são descritos.

Lippert, Parker e Jandt (2004) investigaram o possível processo de recuperação de valores de dureza do esmalte em dois experimentos separados. Foram empregados intervalos de desmineralização e remineralização fisiologicamente relevantes. Além disso, foram avaliadas soluções remineralizantes com propriedades químicas próximas às da saliva humana. Testes de nanoindentação em equipamento com AFM acoplado (Digital Instruments Multimode Nanoscope TM IIIa equipado com um Hysitron TriboScope TM) foram utilizados para avaliação das propriedades nanomecânicas e da ultraestrutura do esmalte polido de primeiros e segundos molares permanentes. Um nanoindentador Berkovich com ponta calibrada realizou dez indentações por espécime com carga única de 5 miliNewtons (mN). As imagens foram realizadas em contato intermitente. As amostras foram desmineralizadas

individualmente em 25 mililitros (mL) de ácido cítrico 0,3% com pH de 3,25. Quarenta amostras foram desmineralizadas por 120s e divididas em oito grupos (n=5). Diferentes intervalos de tempo foram utilizados para remineralização (0,5; 1; 1,5; 2; 3 e 4h, respectivamente) com uma solução de 250mL foi continuamente agitada (150 rotações por minuto - rpm) sobre uma amostra estática. O controle negativo foi realizado com armazenamento em água mineral por 4h (Volvic™, Danone Group, Londres, Reino Unido) e o positivo no grupo que foi apenas desmineralizado. Uma segunda desmineralização de 60s foi realizada em todos os grupos. O experimento 2 foi projetado como um ciclo de desmineralização/remineralização, onde quinze amostras foram divididas em três grupos. Dois grupos foram submetidos a desmineralização alternada (intervalos de 30s) e remineralização (1h) até um tempo total de desmineralização de 150s. Um dos grupos utilizou uma solução remineralizadora, o segundo, água mineral e o terceiro foi somente desmineralizado. Não houve recuperação nos valores de dureza após a remineralização. Uma camada de depósito mineral (cristalitos com orientações aleatórias) pôde ser observada após esse processo, porém não foi demonstrado efeito protetor ao esmalte. A exposição dos espécimes a solução remineralizante ou água gerou uma melhora na resistência a ataques ácidos na continuidade dos ciclos. Após a desmineralização, a estrutura prismática, típica do esmalte, foi revelada em algumas das amostras. O estudo demonstrou que o AFM acoplado à nanoindentação é uma ferramenta interessante para avaliação de processos de desmineralização e remineralização com alta eficiência.

Cui e Ge (2007) investigaram a organização hierárquica da estrutura e as funções do esmalte, relacionadas às características únicas do tecido. O esmalte humano retirado de molares foi analisado usando MEV, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e AFM. Os dentes utilizados foram esterilizados por irradiação gama (γ) e armazenados em timol solução a 4°C. O esmalte foi planificado, polido e limpo em cuba ultrassônica. Para análises em MEV, as amostras foram condicionadas com ácido cítrico por 3min antes das leituras. Para análise de AFM (MI PicoScan – Molecular Imaging Co.), o preparo foi feito com ácido cítrico por 1min e as leituras foram feitas em modo contato. Para o HRTEM (JEOL2010F), o esmalte em pó foi obtido após tratamento com NaOCl por 15min. A combinação e integração de observações microscópicas revelaram a alta complexidade e organização da estrutura de esmalte. Com base nesses observações, foram propostos e descritos sete níveis hierárquicos, cobrindo um intervalo da micro à nanoescala: Nível 1 – cristais de hidroxiapatita; Nível 2 – nanofibrilas minerais; Nível 3 - nanofibrilas se alinham e agregam formando as fibrilas; Nível 4 – fibrilas mais espessas formam as fibras; Nível 5 –

formação dos bastões e região interbastões; Nível 6 – já na microescala, os prismas em conjunto formando bandas de prismas; Nível 7 – diferentes arranjos das bandas de prisma na espessura do esmalte. Esse padrão de organização investigado está supostamente relacionado às funções e aos requisitos físicos do esmalte na cavidade oral.

Nanci (2008) abordou em seu livro diferentes aspectos relacionados à composição, organização estrutural, processo de formação do esmalte, relacionando-os às propriedades e ao comportamento em função do tecido. Para isso, utilizaram de diferentes técnicas de análises de morfologia e composição. Foi realizada a comparação do esmalte humano ao de diferentes espécies para definição de características inclusive por similaridade entre os tecidos.

Loyola-Rodriguez et al. (2010) compararam a rugosidade da superfície do esmalte através dos parâmetros: rugosidade média da superfície (S_a) e média quadrática da rugosidade da superfície (S_q). Além disso, o perfil de profundidade absoluta (altura média do pico-vale) também foi avaliado. AFM foi utilizado (Nanosurf Easy Scan 2, SPM Electronics) para varredura antes e após o condicionamento com quatro diferentes marcas de ácido fosfórico (Etch-37, Scotchbond Etching Gel, Total Etch e Ultra-Etch). Foram preparadas 160 amostras de esmalte de 40 pré-molares superiores. Os dentes foram cortados de modo a obter quatro amostras de 3 milímetros (mm) de largura. As amostras foram incluídas, mas o esmalte não foi planificado. As imagens de AFM foram realizadas no modo contato. Os ácidos foram utilizados por 15s e as amostras foram lavadas com água durante 60s e secas com ar. Os valores iniciais de rugosidade não apresentaram diferença estatística. Os padrões de rugosidade aumentaram após o condicionamento, havendo diferença estatística para todos os produtos na comparação dos valores iniciais e finais. Do mesmo modo, o perfil de profundidade das amostras aumentou após o procedimento. Etch-37 e Scotchbond Etching Gel e Total Etch apresentaram perfis mais altos após o condicionamento ($> 2,0\mu\text{m}$); apenas Ultra-Etch apresentou valores $< 2,0\mu\text{m}$. Os géis Etch-37 e Scotchbond Etching Gel apresentaram os maiores aumentos nos parâmetros avaliados. A comparação dos materiais mostrou que houve diferença entre Ultra-Etch quando comparado ao Etch-37 e Scotchbond Etching Gel. Além disso, houve diferença de perfis quando o Etch-37 e o Total Etch foram comparados. AFM foi uma ferramenta útil para estudar alterações topográficas estruturais no esmalte após corrosão do ácido fosfórico.

Weissmüller, Rocha, Moncores (2011) resumiram, de forma direta, as técnicas disponíveis de microscopia de varredura por sonda, com ênfase no AFM. Foram descritos os fundamentos e princípios para obtenção de imagens com o conhecimento de como o aparelho

funciona. Do mesmo modo, é possível conhecer as vantagens e desvantagens dessa família. Pôde-se observar que o AFM apresenta inúmeras possibilidades de análises além da morfologia das superfícies. Do mesmo modo, sua aplicabilidade e versatilidade nas ciências biológicas puderam ser introduzidas.

1.2 Composição do esmalte humano e uso de espectroscopia Raman para avaliações de conteúdo orgânico e inorgânico

Schulze et al. (2004) buscaram determinar se as junções dentárias calcificadas (junção amelo-dentinária e junção cimento-dentina) nos dentes humanos apresentam diferenças de composição em comparação com os tecidos calcificados adjacentes. As posições e intensidades de fosfato (PO_4) e de ligações carbono-hidrogênio (C-H; componente orgânico) foram determinados a partir de microespectroscopia Raman (Jobin Yvon, Horiba). Do mesmo modo, as relações entre $\text{PO}_4/\text{C-H}$ e entre fosfato/carbonato também foram analisadas. Os picos foram medidos em passos de $1\mu\text{m}$ ao longo de uma linha de $100\mu\text{m}$ na junção. Foram utilizados tecidos obtidos de terceiros molares, planificados e polidos para facilitar as avaliações. Todos espectros foram obtidos com um tempo de aquisição de 600s para banda de fosfato (960cm^{-1}) e para o *stretching* de C-H (2937cm^{-1}). Este último foi escolhido como indicador de conteúdo orgânico porque a luminescência na faixa de 2900cm^{-1} é menor do que em outros locais de banda orgânica (1660 , 1442 e 1200cm^{-1}). A razão entre $\text{PO}_4/\text{C-H}$ apresentou uma diferença de 2,8 para cimento e 94,2 para esmalte. Já a razão entre fosfato/carbonato variou de 7,1 na dentina para 19,6 para esmalte. As análises de alta resolução revelaram que a banda para PO_4 estavam na mesma posição para todas as regiões avaliadas (959cm^{-1}). Para o modo de *stretching* de C-H houve uma mudança de $4,6\text{cm}^{-1}$ no esmalte, dentina e junção amelo-dentinária. Isso ocorre, pois, o colágeno da dentina e as proteínas não colágenas do esmalte se manifestam em vibrações distintas. A largura média da junção amelo-dentinária foi de $7,6\pm 2,8\mu\text{m}$ utilizando a banda PO_4 e $8,6\pm 3,6\mu\text{m}$ modo de *stretching* de C-H. Em toda a junção amelo-dentinária, o conteúdo mineral diminuiu no caminho do esmalte para dentina enquanto o componente orgânico aumentava. As avaliações de largura na junção cimento-dentina não foram possíveis porque a diferença de composição entre o cimento e a dentina é pequena.

Eimar et al. (2012) buscaram investigar se a ação dos procedimentos clareadores ocorre desproteinizando, desmineralizando ou oxidando os tecidos dentários, buscando quais os componentes químicos afetados no processo. Sessenta dentes humanos (incisivos e caninos superiores) foram divididos em seis grupos (n=10). Os grupos 1, 2, 3 e 4 foram tratados durante 4 dias (trocas diárias) com as seguintes soluções: desproteinizante - 1mol (M) de hidróxido de sódio (NaOH) com pH 13,3 para remoção de conteúdo orgânico, desmineralizante 0,5M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para descalcificação do conteúdo mineral, oxidante (H₂O₂ 30%) e água destilada (controle), respectivamente. Os grupos 5 e 6 foram pré-tratados com soluções desproteinizante ou desmineralizante, respectivamente, antes da aplicação de solução oxidante por 4 dias. As mudanças nas proporções elementares do esmalte, índice de cristalinidade e parâmetros de cor foram examinados por meio de espectroscopia por dispersão em energia (EDS) acoplado ao MEV, espectroscopia Raman e espectrofotometria de cor. A análise de EDS (Oxford INCA 300, Berkshire) foi feita a 15 quilovolts (kV) com tamanho focal de 5nm, uma distância de trabalho de 15mm e tempo de contagem de 300s. A concentração dos elementos C, Cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O), assim como as razões C/Ca, C/P, O/C e Ca/P, foram calculadas. Para o índice de cristalinidade foi usado um equipamento Raman (Senterra, Bruker) equipado com laser de diodo de 785nm (de potência de 50 miliWatts - mW) acoplado a um microscópio óptico. A máquina foi configurada em uma resolução de 3-5cm⁻¹ e três diferentes pontos da amostra foram avaliados por um tempo de 20s e duas co-adições. O índice de cristalinidade foi calculado com base na largura da banda ν_1 de PO₄ na metade de sua intensidade. As alterações de cor foram medidas com o aparelho EasyShade (Vita Zahnfabrik). A aplicação de componente clareador não resultou em alterações significativas no conteúdo relativo orgânico e inorgânico do esmalte, mas aumentou o teor relativo de oxigênio, indicando uma reação de oxidação para os autores. A desproteinização dentária aumentou o brilho em $4,8 \pm 2,7^0$, enquanto a desmineralização resultou em redução de $8,5 \pm 5,6^0$, e a oxidação induziu um aumento de $19,9 \pm 6,5^0$. A oxidação de dentes desproteinizados não influenciou os parâmetros de cor, mas a oxidação dos dentes desmineralizados resultou em aumento no brilho de $10,7 \pm 5,8^0$. Os autores concluíram que o H₂O₂ não induz modificações significativas no conteúdo orgânico e inorgânico do esmalte, mas sim clareia os dentes pela oxidação de sua matriz orgânica. Novos estudos são necessários para verificar se esse mesmo comportamento é alcançado nas proteínas presentes em maior quantidade em dentina com impacto na coloração final do dente.

Rae et al. (2014) mostraram o quanto a espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa para elucidação de questões relativas a informações qualitativas e semi-quantitativas de sistemas biológicos, baseado nos espécimes químicos presentes nas amostras. São apresentadas as inúmeras aplicabilidade, vantagens e desvantagens assim como novas perspectivas. Essa revisão resume as principais técnicas de Raman relacionadas à biologia. Do mesmo modo, são discutidos os desafios que existem para aplicação global desse recurso.

Teruel et al. (2015) compararam a composição química de dentes humanos com outras espécies de mamíferos que muitas vezes são usados como substituintes em estudos *in vitro*. Fragmentos de dentina e esmalte provenientes de incisivos e molares extraídos com origem humana, bovina, suína e ovina - 100 dentes por espécie - foram triturados até um tamanho final de partícula inferior a 100 μ m. Foi também utilizada HAp em pó como um substrato de controle (Referência #04238, Sigma-Aldrich). As análises de elementos (LECO TRUSPEC CN, LECO) para obtenção da relação carbono / nitrogênio (C/N), a análise termogravimétrica acoplada à espectrometria de massa (modelo TGA/DSC 1 HT, Mettler-Toledo) e a fluorescência de raios X dispersiva por comprimento de onda (Bruker S4 Pioneer, Karlsruhe) foram utilizadas para avaliar a composição das amostras. A análise elementar mostrou haver mais carbono orgânico e N na dentina do que no esmalte. O esmalte humano foi o mais altamente mineralizado, com valores de C/N próximos à HAp. A dentina de origem bovina e o esmalte foram os mais parecidos com os tecidos humanos. O resultado de espectroscopia de massa para todas as espécies mostrou que o esmalte continha menos C e matéria orgânica do que a dentina. A decomposição térmica do esmalte humano mostrou grande semelhança com a hidroxiapatita sintética e grandes diferenças para o esmalte bovino, ovino e suíno. A decomposição térmica mostrou maior semelhança entre a dentina humana e a bovina. Os resultados de fluorescência de raios X (RX) revelaram que a dentina continha quantidades maiores de magnésio (Mg), enxofre (S), estrôncio (Sr) e zinco (Zn) do que o esmalte. O esmalte continha quantidades maiores em proporção de P, Ca, cloro (Cl), cobre (Cu), potássio (K) e a relação Ca / P do que a dentina. O esmalte humano e a dentina continham uma razão Ca / P maior, maiores quantidades de Cl e Cu e menores quantidades de Mg, S e Zn do que as espécies animais. A fração inorgânica variou de 81 a 92% para esmalte, 69-74% para dentina e 96% para HAp padrão, sendo o dente humano o mais mineralizado e o bovino o mais próximo do ser humano, para ambos os tecidos analisados. O esmalte bovino, contudo, apresentou a maior concentração de carbonato. Os autores concluíram, através das análises realizadas, que, ainda assim, os tecidos dentários que apresentaram maiores semelhanças foram os humanos e os bovinos. Desse modo, com base na sua composição química, os dentes

bovinos devem ser a primeira escolha para substitutos dos dentes humanos em pesquisa segundo os autores. Foi ressaltada, contudo, a necessidade de outras avaliações, como de propriedades mecânicas para que se confirme se essa substituição é válida para outros testes. Entretanto, resalta-se que a escolha ideal sempre será usar de amostras da mesma espécie.

1.3 Propriedades mecânicas dos tecidos dentários e o uso de testes de nanoindentação

Oliver e Pharr (2004) fizeram um artigo de atualização do método anteriormente publicado (1992) em que oferecem fórmulas para medição de dureza e módulo de elasticidade em testes de indentação e que se tornou uma referência desde seu surgimento. Mostraram que as técnicas de nanoindentação são amplamente adotadas para caracterização do comportamento mecânico em pequena escala. Desde o desenvolvimento original, o método sofreu inúmeros refinamentos e mudanças em função de melhorias de equipamentos e técnicas, bem como pelos avanços na compreensão da mecânica do contato elástico-plástico. Assim, se tornou mais preciso para detecção de propriedades mecânicas, obtidas diretamente dos valores das cargas aplicadas e do deslocamento alcançado em ciclo de carregamento e descarregamento, sem a necessidade de avaliação de imagens da indentação realizada na amostra. Isso facilitou a determinação de propriedades mecânicas em escalas micro e nanométricas. Os autores também ressaltam que, originalmente, o método foi destinado para aplicação de pontas finas, como Berkovich, sendo atualmente aplicado a outras formas de indentedor, inclusive esferas com adaptações nas fórmulas.

Ge et al. (2005) utilizaram AFM (PicoScan AFM, MI Corp.) combinado com a técnica de nanoindentação (Triboscope, Hysitron) para determinar as propriedades nanomecânicas, especificamente nanodureza e módulo de elasticidade dos prismas e bainhas circundantes no esmalte de terceiros molares maxilares humanos. A região dos testes foi controlada com auxílio do AFM e desse modo, o teste pode atingir exatamente os locais desejados. Os cortes e o polimento das amostras foram realizados buscando prismas o mais vertical possível à superfície. Por outro lado, a seleção da carga máxima evitou penetrações que pudessem sair do tecido testado. Desse modo, a carga máxima final aplicada nos prismas foi de 1000 microNewtons (μN) (velocidade de $200\mu\text{N/s}$) e na região interprismática de $300\mu\text{N}$ (velocidade de $60\mu\text{N/s}$). Foram estudados cinco espécimes de esmalte com trinta nanoindentações em cada. As imagens de AFM foram realizadas em modo contato com

cantiléveres com constante de mola de 0,6N/m. As avaliações das amostras de antes da indentação, após as medições nanomecânicas e após o condicionamento ácido foram realizadas. As características típicas de organização estrutural do esmalte foram observadas, com padrão prismático de arranjo compacto e separação por bainhas orgânicas. O diâmetro padrão detectado foi de 7 μ m. O polimento fez com que as porções orgânicas ficassem 10nm abaixo dos prismas no eixo de altura (z). O condicionamento com ácido cítrico afetou bastante os prismas inorgânicos e expôs mais a matriz orgânica demonstrando espessura entre 800 a 1000nm de extensão. Diferenças evidentes foram reveladas entre os domínios analisados. Os valores de nanodureza e módulo de elasticidade para deslocamentos entre 30-80nm para os prismas foram, respectivamente 4,3 \pm 0,8 gigaPascal (GPa) e 83,4 \pm 7,1GPa. Já para a bainha orgânica estes valores ficaram em 1,1 \pm 0,3GPa e 39,5 \pm 4,1GPa, respectivamente. Os valores obtidos na curva de descarregamento foram diferentes, apresentando o seguinte padrão para os prismas: nanodureza 3,9 \pm 0,5GPa e módulo de elasticidade 77,1 \pm 5,7GPa; e para interprismático: 1,4 \pm 0,4GPa e 41,2 \pm 8,5GPa, respectivamente. Sendo assim, a nanodureza e o módulo de elasticidade da região interprismas se apresentaram, respectivamente, 73,6% e 52,7% inferiores aos prismas. Tais variações foram atribuídas principalmente aos diferentes arranjos de componentes e cristais.

Oyen (2006) usou um modelo com uma série de deformações plásticas e elásticas para obtenção de parâmetros de dureza, elasticidade e plasticidade através de testes de nanoindentação. Foi realizada a comparação entre os materiais compósitos mineralizados (esmalte, dentina e osso trabecular e cortical) e materiais homogêneos (sílica, alumínio) A resistência à deformação plástica foi calculada a partir de valores típicos de módulo de elasticidade e dureza. Para a sílica, o comportamento é predominantemente elástico, enquanto o metal apresenta deformação plástica. Para osso e dentina, que apresentam composições semelhantes, a deformação plástica é ligeiramente dominante. Já o esmalte apresenta um leve domínio da deformação elástica. Estes dados demonstram a natureza dos compostos mineralizados como materiais com respostas intermediárias aos materiais de comparação como vidro e metal, que têm deformações mais extremas. A autora relata que a resistência à deformação plástica em tecidos mineralizados pode ser uma função direta do módulo de elasticidade nos tecidos. A inclusão de avaliações diretas da deformação plástica em diferentes testes pode trazer informações valiosas sobre alterações ultra-estruturais de tecidos compósitos frente a cargas.

He e Swain (2007) investigaram a influência da microestrutura do esmalte e especificamente o papel do componente proteico mesmo em menores concentrações nas

deformações induzidas por contato. Eles assumiram que as proteínas são responsáveis pela relação tensão-deformação não-linear. Os valores de tensão mais baixos em função do contato induzem deformações inelásticas e resultam em perda de energia dependente da geometria do indentador. Um modelo simples demonstrou que a tensão de cisalhamento na camada de proteína é dezesseis vezes maior do que a tensão de contato, sendo o local onde a maior parte da deformação é dissipada. Para verificar o modelo, vários testes de nanoindentação, incluindo determinação de escoamento e perda de energia foram realizados. Testes de escoamento (*creep*) foram realizados com um indentador Berkovich com manutenção na carga máxima (250mN) e na carga mínima (5mN) por 900s mostraram escoamento e recuperação consideráveis. Além disso, foram utilizados indentadores esféricos e pontiagudos para comparar a perda de energia do esmalte e da HAp. As pequenas regiões de deformação por contato apresentam absorção de energia muito maior do que HAp. Em todos os casos, a perda de energia com indentador Berkovich foi substancialmente maior do que os valores de tensão por contato com os esféricos. Com as informações adquiridas os autores desenvolveram um modelo simples para relacionar a microestrutura do esmalte com os mecanismos de deformação por contato. Dentro da área de contato da indentação, as finas camadas de proteína entre os cristais de HAp apresentam maior deformação por cisalhamento, sendo dezesseis vezes maior que a deformação pelo contato. Este modelo pode ser usado para explicar a resposta inelástica, excelente comportamento antifadiga, e grandes capacidades de absorção de energia do esmalte do esmalte. Nessas condições, os autores defendem que todas essas características estariam relacionadas à fina camada de proteína entre cristais.

Biswas, Dey e Mukhopadhyay (2012) estudaram o efeito da taxa de carga nas propriedades mecânicas (nanodureza e módulo de Young) do esmalte humano empregando a técnica de nanoindentação. Além disso, foi estudada a física da deformação em escala micro e nanométrica. Os experimentos foram realizados com um nanoindentador (Fischerscope H100-XYp; Fischer) equipado com uma ponta Berkovich de diamante (raio = 150nm) sobre esmalte planificado e polido de pré-molar recém-extraído. Foi utilizada uma carga constante de $10^5 \mu\text{N}$ com variação no tempo de carregamento entre 0,4 a 100s. Não houve intervalo de espera na carga máxima, sendo obtidos vários carregamentos na faixa de 1×10^3 - $0,3 \times 10^6 \mu\text{N}$. A dureza e o módulo de Young foram avaliados pelo método Oliver e Pharr. A morfologia da indentação foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM, Supra VP35 Carl Zeiss, Alemanha). Os autores observaram aumento de 8% na nanodureza do esmalte humano com o incremento na taxa de carga de 1000 para $250000 \mu\text{Ns}^{-1}$. Do mesmo

modo, a energia plástica usada na nanoindentação aumentou seguindo a taxa de carregamento. No entanto, o módulo de Young se demonstrou independente dessa relação. Os autores defendem que a dependência da nanodureza está ligada ao comportamento da matriz orgânica. As proteínas apresentariam uma característica de desdobramento e curvatura em função da aplicação de cargas progressivamente maiores. Isso gera uma acomodação local da tensão e um comportamento cisalhante entre os cristais de HAp e a matriz de proteínas que compõem a microestrutura. Desse modo, surgiria a característica de um nanocompósito no esmalte.

1.4 Avaliações de agentes clareadores na literatura

Haywood e Heymann (1989) descreveram pela primeira vez na literatura a técnica clareadora caseira. Os autores sugeriram que o uso do peróxido de carbamida a 10% em moldeiras individuais de polietileno deveria ser o procedimento de escolha para dentes vitais com alterações cromáticas. Além disso, preconizaram seu uso noturno.

Hegedüs et al. (1999) avaliaram o efeito de três agentes clareadores: Opalescence (PC 10%, Ultradent), Nite White (PC 10% Discus Dental Inc.) e uma solução de H₂O₂ 30% em superfícies de esmalte usando AFM. Foram utilizados 15 incisivos humanos (dez maxilares e cinco mandibulares) divididos aleatoriamente em três grupos (n=5). A superfície vestibular de cada dente foi avaliada antes e depois das utilizações. Cada gel foi aplicado por um total de 28h (em aplicações individuais de 4h). Foram observadas alterações de superfície após todos os procedimentos. Após as imagens iniciais, os espécimes foram limpos com NaOCl 5,25% durante 1min sem procedimentos adicionais buscando a preservação da estrutura original. Cinco áreas de cada amostra foram avaliadas e cada espécime foi usado como seu próprio controle. Foram realizadas imagens em duas dimensões: 20x20µm e 10x10µm. Sulcos presentes na superfície do esmalte antes do procedimento tornaram-se mais profundos após o clareamento. Para as amostras tratadas com Opalescence, os sulcos se apresentaram com bases mais irregulares, profundidade de 30-120nm e largura variando de 100 a 750nm. As amostras tratadas com NiteWhite não apresentaram sulcos tão evidentes, mas sim uma morfologia mais irregular. Os sulcos tiveram profundidade de 20-80nm e extensão de 100 a 300nm. A aplicação de H₂O₂ a 30% apresentou diferenças quando comparadas ao controle e com os demais grupos. A superfície se apresentou mais suave, no entanto com sulcos mais profundos que nos demais grupos, denotando modificações mais severas. A profundidade

ficou entre 90 e 350nm e a largura variou de 1 a 1,5 μ m. Os autores concluíram que os produtos usados foram capazes de causar alterações na superfície do esmalte e levantaram a hipótese de que os peróxidos afetariam a fase orgânica do tecido, com possível impacto na sua estrutura interna.

Goo et al. (2004) estudaram o efeito de PC 10% (Opalescence, Ultradent Products) na cor através do espaço de cores da Comissão Internacional de l'Éclairage (CIEL*a*b* - espectrofotômetro UV-VIS-NIR, CARY 5G), composição através de espectroscopia Raman (IFS120HR/FRA106, Bruker) e perda mineral através de microanálise com ponta de elétrons equipado com espectrômetro dispersivo de ondas. O clareamento foi realizado em pré-molares humanos com superfícies planificadas e polidas por 14 dias contando com 6h de aplicação e 18h de armazenamento em água destilada. Uma área de 5mm foi exposta aos procedimentos e após o preparo, os espécimes foram lavados por 5min em ultrassom. Foram testados três grupos: controle, armazenamento em água destilada e clareamento com armazenamento em água destilada. As soluções de água destilada foram trocadas a cada três dias. As análises de Raman utilizaram um intervalo de 50cm⁻¹ a 3500cm⁻¹. Houve alteração de cor, linear com o tempo, nas amostras clareadas. Além disso, foram detectadas pequenas reduções no pico 1068cm⁻¹ quando comparado ao pico 430cm⁻¹ tanto nos dentes clareados quanto nos armazenados em água destilada, que, portanto, não apresentaram diferenças entre si. Em ambos os grupos, foi detectada uma queda no conteúdo mineral total que passou de 90,39 para 86,01. Do mesmo modo, a razão Ca/P caiu de 2,10 para 2,07 em dentes clareados. Os autores concluíram que o material clareador testado é seguro pois não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Justino, Tames e Demarco (2004) avaliaram os potenciais efeitos adversos de PC 10% (Whiteness, FGM) no esmalte humano testado com protocolos *in vitro* e *in situ*. Foram avaliadas a microdureza Vickers, a perda de cálcio através de e a morfologia de superfície. Foram utilizados vinte e quatro fragmentos de esmalte, planificados e polidos, (4mm²) obtidos de pré-molares recém-extraídos. Os espécimes foram divididos em dois grupos para procedimentos *in situ* e *in vitro*. Os espécimes foram clareados com PC 10% com um agente espessante a base de polímero carboxipolimetileno (carbopol) por 8h durante 14 dias. Os espécimes *in vitro* foram armazenados em água deionizada e os *in situ* na cavidade oral de quatro voluntários. As análises de microdureza Vickers (indentador modelo 1600, Buehler), foram realizadas antes do início e após o final das aplicações com três indentações de 100g por 5s para cada amostra. A dosagem de cálcio foi feita a partir do gel coletado após a exposição no primeiro dia, entre os dias dois e sete e entre os dias oito e catorze através de um

espectrofotômetro de absorção atômica com limite de detecção 0,05 microgramas (μg). A morfologia da superfície foi observada a partir de dois fragmentos controle e dois espécimes de cada experimento por MEV (Phillips XL 20 com 15kV). A interação entre a condição testada e o tempo foi significativa, demonstrando que houve um desempenho diferente para os experimentos. As amostras clareadas *in situ* mostraram microdureza semelhante ao controle e apresentaram uma dureza estatisticamente maior do que as amostras tratadas *in vitro*. As maiores remoções de cálcio ocorreram após o primeiro dia para ambas as condições, com redução drástica da perda no segundo período analisado e também no terceiro. Isso demonstrou para os autores que o agente clareador primeiramente atacou a porção superficial dos cristais. A perda de cálcio *in vitro* aos 14 dias foi 2,5 vezes maior do que no procedimento *in situ*. Fotomicrografias em MEV demonstraram que as alterações superficiais foram mais pronunciadas *in vitro* com depressões mais evidentes que indicaram perda de mineral por dissolução segundo os autores. Algumas regiões apresentaram aspecto semelhante a esmalte condicionado com soluções ácidas. Os autores defendem que a presença da saliva e seu papel remineralizador podem justificar os menores efeitos observados nos experimentos *in situ*. Desse modo, os autores defendem que estudos *in vitro* podem mascarar a realidade e produtos caseiros seguros para uso na cavidade oral terem resultados exacerbados pelas condições de teste.

Leonard et al. (2005) avaliaram os efeitos de dois produtos de bancada sobre a microdureza do esmalte quando comparados a um controle e um gel de clareamento caseiro supervisionado. Foram utilizados 80 fragmentos de esmalte humano divididos em quatro grupos: (1) controle; (2) Opalescence (PC 10% - Ultradent Products, Inc); (3) Crest Night Effects (percarbonato de sódio 19% equivalente a H_2O_2 5,3% - Procter & Gamble); e (4) Colgate Simply White Night (H_2O_2 8,75% Colgate-Palmolive Co.). Todos os procedimentos clareadores foram realizados por 8h diárias durante duas semanas. Entre as aplicações, os espécimes planejados e polidos foram mantidos em saliva artificial a 37°C . Após essa etapa, metade dos espécimes dos grupos 2 a 4 ($n = 10$) foram submetidos a sete dias adicionais de clareamento enquanto a outra metade foi armazenada em saliva artificial pelo mesmo intervalo. A microdureza foi medida como números de dureza Knoop (Micromet 2100, Buehler Ltda.) antes do início das aplicações e após 1, 7, 14 e 21 dias. Foram realizadas três indentações com carga de 50g por 15s. Foi observada uma redução estatisticamente significativa nos valores médios de microdureza quando os intervalos de tempos 1, 7, 14 e 21 dias foram comparados aos valores iniciais no grupo 4 e para sete dias de aplicação do grupo 3 comparado ao controle. Houve diferença estatística do grupo 4 para o controle e o gel

clareador caseiro, com redução para os intervalos 7, 14 e 21 dias de aplicação. Os autores concluíram, através das avaliações de microdureza realizadas, que os produtos clareadores de bancada testados tiveram efeitos negativos no esmalte *in vitro*. Os autores recomendaram cautela para essa classe de produtos aplicada sem orientação profissional.

Bistey et al. (2007) buscaram determinar a alteração no esmalte humano após aplicação de H₂O₂ usando espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR; SPECTRUM-ONE: Perkin-Elmer Inc.). Foram avaliadas soluções de H₂O₂ 10, 20 e 30% em trinta dentes humanos (10 molares, 15 pré-molares, 5 incisivos; n=10). As amostras foram planejadas e passaram por um tempo total de aplicação de 120min. Os espectros foram adquiridos antes do início e após 30, 60 e 120min de utilização. Também foram realizadas leituras uma semana após o final da terapia nas seguintes condições: intervalo de 4000-650cm⁻¹, resolução de 4cm⁻¹, 4 espectros de co-adição e temperatura ambiente. As análises de ATR-FTIR mostraram duas bandas distintas (PO₄ ν_1 e ν_2) que evidenciaram as alterações na estrutura do esmalte, por variações na área dos espectros. A modificação foi proporcional ao tempo de aplicação e à concentração de H₂O₂. Sendo assim, maiores concentrações e maiores tempos de utilização resultaram em alterações mais severas. A banda ν_1 do PO₄ se tornou mais larga e distorcida após os procedimentos de maneira proporcional à concentração dos clareadores. A banda ν_2 do PO₄ (1460cm⁻¹) demonstrou redução após utilização de H₂O₂ 20% e sumiu após aplicação com a concentração de 30%. A evolução dos intervalos de aplicação para o H₂O₂ 10% demonstraram redução progressiva da banda ν_2 PO₄. As alterações mais severas foram observadas para concentração de 20 e 30% sem distinção visível entre elas. As alterações no ν_1 PO₄ foram usadas para quantificar os efeitos. Os espectros adquiridos uma semana após aplicação com armazenamento em uma solução salina isotônica não mostraram reversibilidade espontânea das alterações. Os autores concluíram que os clareadores com H₂O₂ foram capazes de causar alteração na composição do esmalte proporcionais à concentração e tempo de aplicação dos produtos testados. Sendo assim, recomendaram que as menores concentrações sejam prescritas e os intervalos dos procedimentos sejam reduzidos para diminuição do impacto na estrutura de esmalte.

Zantner et al. (2007) buscaram avaliar a influência de procedimentos clareadores caseiros, basicamente produtos de bancada, na microdureza superficial do esmalte humano. 192 incisivos foram divididos em oito grupos. Apenas as superfícies vestibulares foram utilizadas e para isso foram planejadas e polidas. O esmalte preparado foi tratado durante 14 dias com os seguintes clareadores: grupos 1, 2 e 4 PC 8% (Viva Style Paint-on) em

intervalos de 1×20min, 2×20min e 2×5min; Grupo 3 H₂O₂ 5,9% (Colgate Simply White) 2×30min; Grupo 5 PC 10% (Viva Style10%) 1×1h; Grupo 6 H₂O₂ 5,9% (Blend-a-med White Strips) 2×30min; Grupo 7 cloreto de sódio (Odol-med3 Beauty-Kur) 2×10min; Controle do grupo 8, água corrente 1×1h. Para remoção do gel, as amostras foram lavadas em água corrente por 3min com o auxílio de uma escova macia, sendo posteriormente armazenadas em saliva artificial nos intervalos. Foi utilizado o teste de microdureza Knoop com uma carga de 1N por 30s (Durimeter, Leitz). Os valores foram medidos antes do início da aplicação e reavaliados após o último dia de utilização clareador e após 6 semanas de armazenamento em saliva artificial. Foram também realizadas observações em MEV com aumentos de até 2000x (Digital Scanning Elektron Microscop, CamScan Eletronics). As análises estatísticas mostraram que nos grupos 3, 6 e 7 a microdureza foi significativamente reduzida após os procedimentos. Já para os grupos 1, 2, 4, 5 e 8 não houve diferenças significativas. As análises após o clareamento e o intervalo final em saliva artificial mostraram diferenças significativas para os grupos 3, 6 e 7, enquanto que para os grupos 1, 2, 4, 5 e 8 onde não foram detectadas diferenças significativas. A comparação de medidas antes dos procedimentos clareadores, após as aplicações e armazenamento em saliva artificial revelou diferenças estatisticamente significativas apenas para o grupo 7. Houve redução percentual da dureza principalmente para o grupo 7, seguido do 6 e do 3 após o clareamento. Após o armazenamento em saliva houve aumento significativo da microdureza, apesar de o grupo 7 não ter atingido seus valores iniciais novamente. Os grupos 1-3, 5 e 8 não tiveram diferença em nenhum momento. Nas imagens de MEV, o grupo 7 apresentou alterações de superfície, com aumento de trincas seguindo os bastões do esmalte. Após as seis semanas em saliva não foram observadas alterações. Os autores concluíram que tanto o tipo de agente clareador quanto a concentração de H₂O₂ tiveram influência significativa nos valores de microdureza observados. Entretanto, em função da capacidade natural de remineralização, os autores sustentaram que não haveria efeitos relevantes no ambiente clínico.

Maia et al. (2008) avaliaram a influência de dois agentes clareadores (PC10% - Nite White, Discus Dental e H₂O₂ 7,5% - Day White, Discus Dental) na microdureza do esmalte através de um estudo *in situ*. Noventa fragmentos de esmalte planificados e polidos foram obtidos a partir de terceiros molares humanos. Os valores de microdureza Knoop foram obtidos sob uma carga de 50g por 5s através de três indentações separadas por 100µm em cada amostra (Microhardness Tester Shimadzu Hmv / 2000, Shimadzu). Os espécimes foram fixados a dispositivos intra-orais entregues a 10 voluntários que os utilizaram 24h/dia durante todo o experimento. Os espécimes foram divididos em três grupos, dois experimentais e um

controle (sem clareamento). O protocolo clareador foi de 1h/dia durante 21 dias consecutivos. Os valores médios da microdureza iniciais e finais foram: 348 e 352,2; 346,6 e 354,5; 342 e 340,8, para os grupos controle, PC10% e H₂O₂ 7,5%, respectivamente. Houve aumento de 1,86% e 1,62% no grupo de aplicação do NiteWhite e controle, respectivamente. Já para os espécimes com aplicação do DayWhite houve ligeira redução na microdureza (0,35%). Ainda assim, isso não representou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, apenas uma tendência à redução da microdureza para os espécimes tratados com H₂O₂ 7,5%. Essa tendência correspondeu à alteração na textura superficial do esmalte observada.

Azer et al. (2009) avaliaram a nanodureza e o módulo de elasticidade do esmalte humano após utilização de clareadores em moldeiras (prescritos por profissionais) e em tiras. Cinquenta e cinco amostras de esmalte humano foram expostas a cinco agentes diferentes (n=10), sendo cinco fragmentos utilizados como controle. As dimensões de 4x4x2mm foram respeitadas e obtidas com planificação e polimento do esmalte. Cinco nanoindentações (Nanoindenter XP; MTS Systems Corporation) foram realizadas por espécime com indentador Berkovich antes e após os procedimentos com carga de 20mN e velocidade de 10nm/s. O tempo de carregamento foi de 15s gerando profundidade em torno de 500nm. Os procedimentos foram realizados conforme a orientação dos fabricantes. Após a remoção do gel com água corrente as amostras foram limpas com uma escova e, no intervalo entre as aplicações, foram armazenadas em saliva artificial. Os seguintes materiais e intervalos foram analisados: Crest Whitestrips Premium Plus (H₂O₂ 10% - 60min por 3 semanas, Procter & Gamble); Crest Whitestrips Supreme (H₂O₂ 14% - 60min duas vezes ao dia por 3 semanas, , Procter & Gamble); NiteWhite ACP (PC 22% - 60min por 3 semanas, Discus Dental); Oral B Rembrandt (PC 22% - 60min duas vezes ao dia por 3 semanas, Oral-B Laboratories); Trèsswhite Opalescence (H₂O₂ 9% - 30 a 60min por 10 dias, Ultradent) As diferenças foram encontradas em função do tempo (antes e após as aplicações) e dos materiais. As medições após as aplicações mostraram diminuição significativa da nanodureza de todos os grupos quando comparados ao grupo de controle. Houve diferença significativa após o final dos procedimentos entre os grupos que usaram Crest Whitestrips Premium Plus e Trèsswhite Opalescence. Com relação ao módulo de elasticidade, houve diferença significativa, quando comparados ao grupo controle, dos grupos Oral B Rembrandt, Trèsswhite Opalescence e Crest Whitestrips Premium Plus. Não houve, no entanto, diferenças estatísticas para este parâmetro, entre os materiais clareadores após o procedimento. Dentro das limitações do estudo, os autores concluíram que a dureza e o módulo de elasticidade do esmalte humano diminuiriam

significativamente após a aplicação dos sistemas clareadores testados, tanto para produtos de bancada quanto para os caseiros recomendados por profissionais.

Demarco, Meireles e Masotti (2009) fizeram uma revisão em que avaliaram o conhecimento até 2009 sobre a eficácia, o mecanismo de ação e a legislação dos produtos clareadores de bancada ou *over-the-counter*. Foram discutidos dados relacionados à composição, mecanismo de ação, eficiência e efeitos colaterais dos mesmos. Com base na revisão da literatura foram extraídas algumas conclusões. As pastas, fios e escovas clareadoras foram considerados agentes de remoção superficial de manchas e não clareadores em si. Os materiais apresentados como *paint-on* e enxaguatórios apresentaram baixos níveis clareadores e poderiam produzir efeitos sem significância clínica, havendo, até então, pequeno número de estudos clínicos disponíveis. As tiras clareadoras pareceram produzir efeito clareador semelhante ao peróxido de carbamida em moldeiras, mas estudos clínicos incluídos na revisão foram, em geral, baseados em avaliações de curto prazo e muitos realizados com a ajuda financeira dos fabricantes, um viés significativo. A análise da legislação disponível à época mostrou grandes variações nos diferentes países, de modo que os autores recomendaram aos clínicos a familiarização com os produtos disponíveis. Os autores recomendaram a observação e realização de ensaios clínicos independentes e a longo prazo, para melhor avaliação da eficácia e dos efeitos colaterais dos produtos de bancada. Do mesmo modo, ressaltam a necessidade de ciência do potencial uso abusivo desses materiais através de auto-aplicação exagerada que poderia produzir efeitos nocivos aos tecidos e pacientes.

Mahringer et al. (2009) utilizaram AFM para estudar os efeitos do clareamento na morfologia da superfície do esmalte em nanoescala. O esmalte dental de seis dentes foi examinado sendo usados dois fragmentos com a estrutura nativa (polida e simulando a cavidade) e outros dois planificados e polidas. O produto clareador testado foi o PC 30% (equivalente a H₂O₂ 10%, Viva Style 30%, Vivadent). As imagens de topografia foram realizadas por AFM (Agilent 5500 - Agilent Technologies) com cantilêveres com constante de mola de 0,03N/m e revelaram diferenças na morfologia e na rugosidade da superfície (rugosidade média quadrática linear – Rq). Os intervalos foram após uma e seis horas de aplicação. As terapias foram realizadas simulando as condições intra-orais (37°C e 98% de umidade). Foram realizados riscos nas amostras na tentativa de manter as imagens em locais próximos, com precisão estimada de 50µm. Três locais e pelo menos quatro imagens de diferentes tamanhos foram realizados por amostra. Imagens de do esmalte nativo 50x50µm antes de aplicações foram realizadas na porção oclusal de terceiro molar mostrando arranhões

e várias características morfológicas. Leituras menores de $2 \times 2 \mu\text{m}$ mostram cristais de hidroxiapatita (30-50nm em diâmetro) e alto valor de R_q de $20 \pm 4 \text{nm}$. Após 1h de aplicação, a mesma superfície passou a ter valores de R_q de $31 \pm 6 \text{nm}$. Sendo assim, houve alterações significativas após 1h, porém não foram observadas diferenças entre esse intervalo e após 6h. Já para as amostras previamente planificadas, houve visualização dos prismas com identificação das regiões interprismáticas. Esta região apresentou profundidade de $8 \pm 2 \text{nm}$ antes do clareamento. Após o clareamento, já nas imagens de $50 \times 50 \mu\text{m}$, pôde ser observado um aumento dessa profundidade para $15 \pm 3 \text{nm}$ e $18 \pm 3 \text{nm}$ após 1 e 6h, respectivamente. Houve diferença estatística para o esmalte planificado antes e depois do clareamento. Os valores de R_q foram baixos para imagens de $1 \times 1 \mu\text{m}$ ($R_q = 1 \pm 0,1 \text{nm}$) nas imagens iniciais, passando para $1,4 \pm 0,14 \text{nm}$ e $1,4 \pm 0,6 \text{nm}$ após 1 e 6h. Houve diferença estatisticamente significativa entre a condição nativa do esmalte e 1h de clareamento. As alterações observadas basicamente na rugosidade e na região interprismática foram relacionadas ao conteúdo orgânico do esmalte. Os autores defenderam que as alterações observadas são uma possível consequência da oxidação e da quebra parcial das proteínas da matriz do tecido.

Mahmoud et al. (2010) investigaram os efeitos de gel de PC 16% na micromorfologia da superfície e rugosidade do esmalte e da dentina radicular (rugosidade média linear - R_a) de pacientes urêmicos (com insuficiência renal que recebem hemodiálise) usando AFM. Vinte molares foram utilizados, sendo dez de indivíduos saudáveis ($n = 10$) e dez de pacientes urêmicos. As raízes foram separadas de suas coroas na junção cimento-esmalte (JCE). Fragmentos de ($3 \times 2 \times 2 \text{mm}$) foram obtidos da superfície vestibular do esmalte e do terço cervical da dentina radicular. Os espécimes foram planificados, polidos e limpos em ultrassom por 10min. Metade dos espécimes foram armazenados em saliva artificial, sem passar por procedimento clareador, servindo como controle. O procedimento clareador com Polanight (SDI Limited) foi realizado por 8h diárias durante 14 dias e o armazenamento nos intervalos foi em saliva artificial. As leituras de AFM foram realizadas em modo contato com velocidade de varredura abaixo de 1 Hertz (Hz) e área de $25 \mu\text{m}^2$ (Thermomicroscop Autoprob CP, Modelo Ap-0100). A análise estatística revelou um efeito significativo da interação do substrato e do agente clareador. A avaliação estatística não mostrou diferença significativa entre o R_a médio do esmalte saudável e os espécimes de esmalte urêmico clareados. Em contraste, houve diferenças significativas entre o R_a médio dos outros espécimes testados. Os espécimes controle de pacientes saudáveis apresentaram a superfície dos prismas com cristais bem compactados sem alinhamento específico. Muitos sulcos longitudinais apareceram entre

os bastões. A observação micromorfológica desse tecido após ser clareado mostrou irregularidades exageradas dos prismas, com cristais maiores e microporosidades entre eles. Já o esmalte controle de pacientes urêmicos apresentou grãos menores e menos identificáveis, com algum grau de porosidades e presença de sulcos. Após o clareamento, as projeções foram menos pronunciadas e o Ra menor, correspondente a um padrão de resistência à desmineralização que pode ser derivada da maior concentração de amônia que torna o pH salivar mais básico nesses pacientes. Já a dentina saudável clareada apresentou dentina peritubular saliente e dentina intertubular erodida com Ra mais alto comparado ao da dentina urêmica tratada. Os autores concluíram que os dentes de pacientes urêmicos apresentam diferenças de morfologia que fizeram que os efeitos dos géis clareadores fossem menos marcantes que em dentes de paciente saudáveis.

Soldani, Amaral e Rodrigues (2010) buscaram avaliar os efeitos de diferentes sistemas clareadores e seus agentes espessantes sobre a microdureza Knoop do esmalte humano *in situ*. Dois fragmentos de esmalte (3x3x2mm) foram obtidos de terceiros molares e fixados na vestibular de primeiros molares superiores em um grupo de 45 voluntários (n=90) após esterilização em autoclave por 20min. Estes foram divididos em cinco grupos (n=18): PC 10% com carbopol como agente espessante (grupo 1; Whiteness Perfect, FGM), 2% de gel de carbopol (grupo 2), pasta de PC 10% com poloxâmero como agente espessante (grupo 3; Colgate Platinum Overnight, Colgate), poloxâmero (grupo 4) ou tiras de H₂O₂ 6,5% durante 21 dias com 2 aplicações de 30min (grupo 5; Crest Whitestrips, Procter & Gamble). Os testes foram realizados em amostras de esmalte planificadas antes e depois das aplicações. Cinco indentações foram realizadas em ambos os intervalos de tempo com espaçamento de 30µm. A carga aplicada foi de 25g por 5s. O fator tempo demonstrou diferença estatística significativa, o que não foi observado para os diferentes materiais aplicados. Todos os procedimentos reduziram a microdureza do esmalte após os 21 dias mesmo armazenados na presença de saliva humana. Os autores concluíram que, clinicamente, pode-se esperar uma redução na microdureza após o procedimento clareador, inclusive pela presença de outros desafios desmineralizantes na cavidade oral.

Tanaka et al. (2010) avaliaram a integridade estrutural interna do esmalte dentário humano com a aplicação de dois clareadores comumente utilizados: H₂O₂ 35% (clareamento de consultório, Hi-Lite, Shofu) e PC 10% (clareamento caseiro, Nite White Excel, Discus Dental). As avaliações foram realizadas em dentes com cor idêntica. A densidade mineral foi quantificada e visualizada através de microtomografia computadorizada de mesa (micro-TC com RX; Shimadzu, SMX-90, Kyoto, Japão). Dez pré-molares humanos foram utilizados

(n=5), de modo que sua face lingual foi utilizada como controle. O grupo PC 10% foi clareado uma vez por dia por 2h durante sete dias. Entre as aplicações, as amostras foram armazenadas em saliva artificial. A aplicação em consultório foi repetida por três vezes, com ativação por luz e as amostras armazenadas em saliva artificial entre os procedimentos. Discos de HAp (CELLYARD, PENTAX) também foram clareados e armazenados em saliva artificial. As avaliações foram realizadas antes e após o clareamento uma vez por dia durante uma semana pelo mesmo operador em uma mesma área. A distribuição mineral, dentro das áreas de interesse nas amostras de esmalte controle e armazenadas em saliva artificial durante uma semana, não foi significativamente afetada. O volume mineral dos espécimes clareados com PC, após exposição durante 2 h, diminuiu significativamente. O volume mineral das amostras clareadas com PC e armazenadas em saliva artificial por um dia não aumentou significativamente. Durante o procedimento, durante uma semana, o volume mineral global das regiões de interesse diminuiu significativamente. O volume mineral global dos discos de HAp exposta a clareadores diminuiu significativamente semelhante às amostras do grupo PC, sendo o efeito observado nas camadas mais externas. O volume de mineral do esmalte clareado com H₂O₂ 35% aumentou significativamente, com maior distribuição de mineral nas porções internas. Sendo assim, os autores concluíram que houve diferenças microestruturais entre as amostras, embora a alteração de cor fosse equivalente. Para o gel caseiro, a modificação representou desmineralização, enquanto que o clareamento de consultório apresentou uma redistribuição dos minerais após as aplicações e posterior mineralização aumentada.

Zimmerman et al. (2010) buscaram investigar a influência de procedimentos clareadores e do condicionamento ácido na estrutura de esmalte e dentina. Foram utilizados 12 dentes humanos. Os materiais clareadores utilizados foram tiras clareadoras (Crest Whitestrips Premium – H₂O₂ 10% por 30min), gel clareador caseiro para uso supervisionado (Opalescence – PC 20% por 1h) e um gel de ácido fosfórico a 35% (UltraEtch – 30s) que funcionou como controle positivo. O objetivo secundário do estudo foi avaliar se o preparo prévio com autoclavagem dos elementos produziram diferenças de resultados. Buscou-se comparar dentes semelhantes que passaram por polimento e banho ultrassônico de 10s entre as etapas de preparo. Os materiais foram aplicados na superfície, mas efeitos foram observados em esmalte e dentina. Foram realizados testes de nanoindentação para avaliação das propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade). A carga máxima foi de 5000µN, com uma distância de 10µm observada entre as indentações (Hysitron Triboscope). Além disso, a rugosidade da amostra foi avaliada com AFM no modo contato (Veeco

Multimode) com obtenção de dados de Rq para análise estatística. Alterações na morfologia também foram observadas com MEV. Foram realizadas avaliações de composição com espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para tentar estabelecer uma possível correlação com as modificações das propriedades mecânicas. Além disso, foram utilizados anticorpos para corar e rastrear alterações em colágeno tipo I através de microscopia de fluorescência. Os valores de Rq do esmalte aumentaram de $12.97 \pm 7.34\text{nm}$ para $342.92 \pm 106.95\text{nm}$ e na dentina de $21.10 \pm 9.95\text{nm}$ para $165.99 \pm 70.86\text{nm}$ devido ao condicionamento. O gel clareador Opalescence aumentou significativamente a rugosidade apenas para dentina ($16.93 \pm 5.12\text{nm}$ para $22.06 \pm 5.98\text{nm}$) e não para esmalte. Dentes autoclavados apresentaram módulo de elasticidade de $31,6 \pm 6,5\text{GPa}$ para dentina e $111,7 \pm 16,0\text{GPa}$ para esmalte. Já os valores de dureza encontrados ficaram em $1,0 \pm 0,3\text{GPa}$ para dentina e $4,3 \pm 0,4\text{GPa}$ para esmalte, ambos de acordo com a literatura. Dentes autoclavados apresentaram aumento da dureza e do módulo de elasticidade quando tratados com Crest. Já a aplicação de Opalescence reduziu o módulo de elasticidade e a dureza em dentina, não demonstrando efeito em esmalte. Os dentes não-autoclavados demonstraram menores valores de dureza e módulo de elasticidade. Dentes não-autoclavados e tratados com Crest apresentaram redução do módulo de elasticidade e da dureza do esmalte e aumento desses parâmetros em dentina. Já a aplicação de Opalescence resultou em queda no módulo de elasticidade da dentina, sem afetar sua dureza e as propriedades do esmalte. Para as análises de FTIR, os espectros evidenciaram uma alteração no padrão de absorbância das ligações de amida em torno de 1550cm^{-1} , podendo indicar perda ou desnaturação, segundo os autores. A modificação no pico em torno de 1645cm^{-1} também pode indicar redução das ligações amida ou redução no conteúdo de flúor (F). Tais alterações foram observados para dentina. Os autores defenderam também que modificações nas propriedades mecânicas poderiam ser, ao menos em parte, derivadas da perda ou desnaturação de proteínas, em especial do colágeno tipo I, devido a evidências ópticas observadas na microscopia por fluorescência e FTIR.

Cavalli et al. (2011) buscaram determinar se a adição de F e Ca a diferentes composições e marcas de agentes clareadores caseiros a base de PC 10% seria capaz de reduzir a perda mineral na superfície e sub-superfície do esmalte. Sessenta fragmentos de esmalte humano foram selecionados a partir de sua microdureza ($n=10$) e submetidos à aplicação de um agente placebo, Whiteness (FGM), Opalescence (0,11% F, Ultradent), Pola Night (0,11% F, SDI), ou um de dois géis experimentais de PC: o primeiro com acréscimo de 0,2% F e o segundo com adição de 0,2% Ca. Os géis foram aplicados por 6h/dia durante 14

dias. As amostras foram submetidas à espectroscopia Raman (RFS 100/S, Bruker Inc.) para avaliar o conteúdo mineral. Além disso, análises de microdureza Knoop (Future Tech, FM-ARS) e com microscópio de luz polarizada (DMLSP, Leica Microsystems) foram realizadas, para determinar a perda inorgânica de esmalte e a profundidade de lesões geradas. As leituras foram realizadas em esmalte planificado e polido com uma área clareada de 7mm^2 antes e após os procedimentos. No intervalo entre as aplicações, os espécimes foram imersos em 22mL de solução remineralizante semelhante à usada por outros autores. Os testes de microdureza Knoop foram realizados de maneira transversal com dez indentações sob uma carga de 25g por 5s a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e $200\mu\text{m}$ da superfície externa do esmalte. Para avaliar as perdas no eixo z, o conteúdo mineral foi subtraído do esmalte hígido. Os espectros Raman foram adquiridos com base em seis vibrações, incluindo P (quatro vibrações, p1 a p4) e carbonato (carbonato de tipo B, duas vibrações p5 e p6): 430 cm^{-1} (p1), 448 cm^{-1} (p2), 580 cm^{-1} (p3), 610 cm^{-1} (p4), 1044 cm^{-1} (p5) e 1070 cm^{-1} (p6), tendo sido obtida a área dos picos encontrados. Seções de $100\mu\text{m}$ de espessura foram analisadas no microscópio de luz polarizada com aumento de 200x. As análises com Raman revelaram conteúdos minerais semelhantes para os grupos. Após o clareamento, houve uma queda da porção inorgânica para o grupo clareado com Whiteness quando comparado aos demais grupos. Não houve alteração significativa para o conteúdo mineral nos demais grupos que apresentaram valores semelhantes entre si. Do mesmo modo, a avaliação de microdureza demonstrou uma perda maior para o grupo Whiteness quando comparado aos grupos placebo, PC + 0,2% Ca e PolaNight. No entanto, não houve diferença com relação aos outros dois grupos com presença de F. A profundidade de lesão para o grupo placebo foi a menor, seguida pelos géis experimentais. O grupo de maior profundidade foi o tratado apenas com Whiteness. Os géis experimentais apresentaram valores semelhantes um ao outro e diferenças para os demais produtos com F. As camadas mais profundas do esmalte (de 80 a $200\mu\text{m}$) apresentaram manutenção do volume mineral com valores semelhantes de dureza para todos os grupos. Os autores concluíram que os géis clareadores puderam causar alterações superficiais e que a adição de F e Ca aos géis pôde reduzir a perda mineral do esmalte.

Junqueira et al. (2011) avaliaram os efeitos de agentes clareadores na morfologia do esmalte humano após procedimento caseiro excessivo. 20 terceiros molares humanos foram utilizados, tendo passado por planificação e polimento de suas superfícies externas. O grupo controle (G0) teve a superfície coberta por esmalte para unhas. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 10): G1 – uma sessão de clareamento com PC 16%

(Whiteness Perfect, FGM); G2 - 3 sessões com PC 16%; G3 - 1 sessão com PC 22% (Whiteness Perfect, FGM); G4 - 3 sessões com PC 22%. Cada sessão durou 8 h/dia, durante duas semanas, com 45 dias de intervalo entre elas. Neste período, os espécimes foram mantidos em saliva artificial a 37°C. Os espécimes foram observados por MEV (JEOL, JMS-5600 LV) com aumentos de 1000x, 5000x e 10000x. Irregularidades e áreas de depressão foram mais evidentes nos grupos 1, 2 e 3. Amostras tratadas com PC 22% em três sessões (G4) apresentaram maior exposição de prismas, depressões, erosão, profundidade de irregularidades e poros. Os autores afirmaram que tais mudanças poderiam estar relacionadas a uma redução significativa na microdureza destes espécimes. Concluíram que o excesso de clareamento, no tempo e nas concentrações utilizadas, teve uma influência negativa sobre a morfologia do esmalte. Como implicação clínica, os autores recomendaram que o clareamento caseiro seja feito com cautela, uma vez que as mudanças foram evidentes no estudo.

Smidt, Feuerstein e Topel (2011) avaliaram os efeitos morfológicos, mecânicos e químicos de géis a base de PC no esmalte humano *in situ*. Foram utilizados três géis clareadores caseiros: NiteWhite (PC 16%, Discus Dental), Polanight (PC 16%, SDI) e Opalescence (PC 15%, Ultradent). Dezoito fragmentos foram destinados para análises por microdureza Knoop e outros dezoito para leituras de MEV e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX). Cada um dos fragmentos foi dividido em dois de modo que a amostra tratada e o controle pertenciam ao mesmo elemento. Todos os 72 espécimes foram planejados, polidos e esterilizados antes dos testes. Moldeiras de silicone foram confeccionadas para três pacientes de modo que um hemi-arco continha as amostras do controle e o outro as clareadas durante dez noites consecutivas. Para cada avaliação os espécimes foram trocados. As avaliações de microdureza Knoop foram realizadas com carga de 100g aplicada por 10s (DMH-2, Matsuzawa Seiki). Já as observações em MEV foram realizadas com ampliações de 500, 1000 e 3000x (Quanta 200, FEI) com EDX acoplado (EDAX, tensão de aceleração de 15kV, tamanho focal de 5nm, 30s de aquisição com resolução de 129,93 eletrovolts - eV). Conteúdo em peso dos elementos foram descritos em %: Ca, P, C, O e F e a razão Ca/P foi calculada. Os valores de dureza variaram de 95,3 a 307,4 para os fragmentos clareados e 97,3 a 302,1 para os controles, sem diferença estatisticamente significativa, não demonstrando indícios de desmineralização das amostras. Através de MEV não foram observadas alterações na morfologia de superfície do esmalte para a maioria das amostras. Nos casos em que surgiram diferenças, o esmalte clareado apresentou aspecto mais suave ou mais poroso do que o controle sem uma tendência definida. Em termos de composição, foram identificadas diferenças estatísticas somente para Ca e P

entre os espécimes clareados e seus respectivos controles com influência dos fatores indivíduos e géis clareadores gerando aumento para os dentes tratados. Apenas Polanight apresentou maiores valores desses componentes para o controle. Assim, a razão Ca/P aumentou nos espécimes clareados de NiteWhite e Opalescence e reduziu para Polanight. Os autores concluíram que os produtos de uso caseiro estudados não geraram alterações negativas em termos de dureza, morfologia e composição elementar do esmalte *in situ*.

Bolay, Cakir e Gurgan (2012) avaliaram a rugosidade e a dureza de dentes humanos clareados e não clareados (PC 10% - Opalescence, Ultradent – 1h/dia) submetidos a escovação com água (sem dentifrício), com dentifrício abrasivo com F (Colgate Total, Colgate Palmolive) ou dentifrício clareador (Natural White, Natural White Ltd. Staines). As amostras foram obtidas a partir de terceiros molares e divididas aleatoriamente em cinco grupos (n = 8): G1- Controle (escovado com água sem dentifrício), G2 - Colgate Total, G3 – Natural White, G4 – Opalescence 10% + escovação com Colgate Total, G5 - Opalescence 10% + escovação Natural White. Os dentes foram planificados, polidos e armazenados em água destilada nos intervalos das aplicações realizadas durante um mês. As amostras passaram por escovação simulada com uma escova automática (Colgate) em uma máquina de Nyffenegger modificada que realiza escovação horizontal com peso padronizado. As configurações utilizadas foram de 20000 movimentos de 37mm sobre as amostras. A rugosidade da superfície (Ra) foi analisada com um perfilômetro (Mitutoyo SurfTest 402, Mitutoyo Corp.). Já para a microdureza o teste foi realizado através da dureza Brinell (Frank Prufent – Messen). Houve um aumento nos valores de rugosidade estatisticamente significativa para todos os grupos. Quando o clareador foi combinado com a escovação com dentifrício, houve uma diminuição significativa na dureza apenas para G5. Os autores concluíram que a escovação aumentou a rugosidade da superfície do esmalte e que o procedimento clareador combinado com a higienização com dentifrício clareador diminuiu os valores de dureza. Clinicamente a combinação entre as rotinas poderia alterar a rugosidade da superfície do esmalte e os valores de dureza do mesmo.

Sa et al. (2012) avaliaram a segurança de três concentrações de clareadores caseiros no esmalte humano *in situ*. Sessenta pré-molares foram utilizados obtendo sessenta espécimes que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e tratados com PC 10% (Opalescence PF 10%, Ultradent), PC 15% (Opalescence PF 15%, Ultradent), PC 20% (Opalescence PF 20%, Ultradent) e água destilada, respectivamente. As amostras de esmalte foram planificadas, polidas e passaram por limpeza em ultrassom durante cinco 5min. Espectroscopia Raman, ATR-IR, AFM, microdureza e resistência à fratura (FT) foram

utilizadas para determinar variações na estrutura do esmalte e suas propriedades antes e depois da terapia. Os espectros Raman foram coletados em equipamento com diodo de laser com comprimento de onda de 785nm e ponto focal de 95 μm (i-Raman Portable Raman Spectrometer, B&W Tek Inc.). Cada espectro final foi obtido de uma média de cinco outros nas seguintes condições: intervalo de 0 a 3200cm^{-1} , tempo de integração de 7000 milissegundos (ms) e temperatura ambiente. Os valores de intensidade Raman relativa e fluorescência induzida por laser (LIF) foram convertidos em porcentagem. Para as leituras de ATR-IR os espectros foram adquiridos na faixa de 675 a 4000cm^{-1} com resolução de 4cm^{-1} , com 128 varreduras adicionadas (Nicolet, Madison). Cada espécime foi medido em triplicata. Já para detecção de morfologia da superfície e rugosidade foi usado um equipamento de AFM (Shimadzu SPM-9500J3, Shimadzu Corp.) em modo contato e leituras de $10 \times 10 \mu\text{m}$ para determinação do R_q de cada amostra. Teste de microdureza Vickers foi realizado com três indentações com 100g por 15s (HXD-100TMC/LCD Taining Inc.). Voluntários receberam moldeiras com 12 espécimes distribuídos em 3 colunas. Para o procedimento clareador as amostras permaneceram em estufas a 37°C por 8h, foram lavados, secos e escovados cuidadosamente com escova macia para remoção do gel. Então voltaram para cavidade oral de voluntários onde permaneceram por 16h. As aplicações foram realizadas por 14 dias. Raman revelou pouca variação na intensidade relativa dos picos após a utilização de PC, o que foi consistente com os resultados de ATR-IR, AFM e as análises de microdureza. Já a intensidade de LIF e FT mostraram redução significativa em espécimes tratados com PC. Esses achados sugerem que houve efeitos mínimos de desmineralização dos três agentes clareadores caseiros no esmalte após utilização *in situ*.

Özkan et al. (2013) avaliaram a rugosidade superficial do esmalte humano clareado com PC 10% e agentes a base de H_2O_2 10%. As amostras passaram por processo de escovação simulada. 140 terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizados e divididos em 14 grupos ($n=10$) em função do dentífrico utilizado: 1 – PC 10% sem escovação; 2 – PC 10% + Ipana 3 Dimension Whitening (Procter & Gamble); 3 – PC 10% + Clinomyn Smokers (CCS); 4 – PC 10% + Moos Dent (Moos Cosmetics); 5 – PC 10% + Signal Whitening System (Unilever); 6 – PC 10% + Colgate 2 in 1 Whitening (Colgate Palmolive); 7 – PC 10% + escovação sem dentífrico; 8 – H_2O_2 10% sem escovação; 9 – H_2O_2 10% + Ipana 3 Dimension Whitening (Procter & Gamble); 10 – H_2O_2 10% + Clinomyn Smokers (CCS); 11 – H_2O_2 10% + Moos Dent (Moos Cosmetics); 12 – H_2O_2 10% + Signal Whitening System (Unilever); 13 – H_2O_2 10% + Colgate 2 in 1 Whitening (Colgate Palmolive); 14 – H_2O_2 10% + escovação sem dentífrico. Foram utilizados clareadores

experimentais com valores de pH em torno de 6,5 para evitar eventuais diferenças de composição e características entre diferentes marcas comerciais. As amostras de esmalte foram planificadas antes dos procedimentos realizados por 4 semanas. Foram realizadas análises semanais dos valores de Ra com um perfilômetro de ponta de prova (Mahr Pertometer M2, Mahr GmbH). As amostras foram utilizadas como seu próprio controle e três leituras realizadas por espécime em cada intervalo. O procedimento clareador foi realizado por 6h durante 28 dias e, após cada exposição, os espécimes foram lavados com água destilada por 5s sendo armazenados nesse meio. A solução foi trocada diariamente. A escovação simulada foi realizada três vezes por dia durante 2min com escova elétrica e dentífrico diluído em água destilada (Oral-B CrossAction Power, Procter & Gamble). Foi utilizado um aparato que mantinha a força constante em 200g. Os grupos em que o procedimento clareador foi realizado junto com a limpeza de superfície com ou sem dentífrico apresentaram aumento na rugosidade estatisticamente significativo. Os grupos que passaram apenas por clareamento (G1 e G8) não apresentaram diferenças estatísticas. Este dado mostrou que as mudanças na rugosidade foram principalmente derivadas da escovação realizada. Houve diferença estatística entre a primeira, segunda, terceira e quarta semana das amostras clareadas com PC e escovadas e entre a segunda, terceira e quarta semana de uso do H₂O₂ também com escovação. As maiores diferenças de rugosidade foram encontradas a partir do vigésimo primeiro dia de teste. Os autores concluíram que o clareamento isoladamente não foi capaz de alterar a rugosidade do esmalte, mas quando combinado com dentífricos abrasivos houve aumento significativo desta propriedade.

Alqahtani (2014) realizou um artigo de revisão abordando os tipos de procedimentos clareadores e seu histórico, componentes, mecanismos, efeitos em tecidos moles, tecidos dentários e compósitos. São discutidas questões relativas aos efeitos do clareamento e possíveis impactos clínicos. Para minimizar os riscos, os autores defendem a participação de profissionais para minimização do uso de produtos de bancada sem prescrição e de produtos clareadores em excesso. Além disso, os autores ressaltam que os procedimentos podem gerar alterações em restaurações dentárias determinando necessidade de troca. Nesses casos, foi observado e relatado o efeito negativo dos clareadores sobre as terapias adesivas.

Carey (2014) fez uma revisão em que aborda a segurança e eficácia dos diferentes protocolos de clareamento dentário disponíveis. Mostrou que a pressão por estética fez surgirem diferentes técnicas e produtos clareadores. Apesar da popularidade, ressaltam que profissionais e pacientes devem estar cientes de que há alguns riscos como o aumento da sensibilidade dental e irritação gengival. Além disso, descrevem a possibilidade de suavização

da estrutura do esmalte, surgimento de defeitos, potencial desmineralização, degradação de restaurações dentárias, inclusive com mudanças de cor que determinem a troca das mesmas. Os autores concluíram, através da literatura disponível, que H₂O₂ e PC utilizados seguindo as orientações do fabricante são seguros e eficazes. Defendem que o procedimento deve ser acompanhado por profissionais para resolução de eventuais complicações e adequação ao tipo de paciente, origem das descolorações, hábitos e condições intra-orais. Do mesmo modo, lembraram que a ativação da luz não oferece nenhum benefício para grau de alteração de cor alcançado e durabilidade do procedimento. Foi afirmado que o clareamento caseiro gera menor sensibilidade que o de consultório. Os autores defendem que as altas concentrações de H₂O₂ *in vitro* causam a redução da dureza do esmalte, alteração na rugosidade de superfície e aumento da susceptibilidade à desmineralização. A participação do cirurgião-dentista é fundamental para redução de riscos e otimização de resultados independente da técnica escolhida.

Elfallah et al. (2015) investigaram o efeito de dois agentes clareadores, PC 16% e H₂O₂ 35% sobre as propriedades mecânicas e o teor de proteínas do esmalte humano. 24 molares humanos com esmalte planificado, polidos e limpos em ultrassom por 5min, foram armazenados em solução salina balanceada de Hank (HBSS) no intervalo entre as aplicações. O grupo PC 16% (Polanight, SDI Limited) foi clareado por 90min diários durante 14 dias, enquanto que o grupo H₂O₂ 35% (Polaoffice +, SDI Limited) foi aplicado de 3 a 4x por 10min em única sessão. Os testes foram conduzidos dentro de 24h após a aplicação dos clareadores. As propriedades mecânicas foram analisadas através de indentação Vickers para caracterização da resistência à fratura e também nanoindentação com ponta Berkovich para definição da dureza, módulo de elasticidade e deformação por escoamento (*creep*). Os testes de nanoindentação foram realizados com carga máxima de 10mN e separação de 20µm na face oclusal (UMIS-2000, CSIRO). Do mesmo modo, foram realizados testes para avaliar a dependência das propriedades mecânicas em função da profundidade de penetração. Para isso, cargas de 5, 10, 20 e 50 mN também foram aplicadas. Para avaliação de *creep*, uma carga de 250mN foi aplicada com tempo de espera de 900s no mesmo aparelho. Um outro período de 900s foi incluído com 2% da carga máxima para avaliação de recuperação do esmalte. Além disso, a microestrutura das amostras tratadas e indentadas foram examinadas por FE-SEM (Zeiss Ultra Plus – tensão de 10kV). Após as aplicações e testes, o esmalte e a dentina foram separados e pulverizados. O esmalte foi então desmineralizado com ácido acético 10% junto com inibidor de protease durante 24h a 4°C sob agitação constante. Os procedimentos de extração foram repetidos três vezes. O sobrenadante final foi purificado através da

cromatografia líquida de fase inversa. Os agregados de proteína de cada grupo foram então quantificados com espectrofotômetro (ensaio de Bradfordprotein, Thermo Scientific) e posteriormente separados examinados em eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados indicaram que o módulo de elasticidade e a dureza foram significativamente reduzidos após aplicação com PC (6,5 e 13,7%, respectivamente) e H₂O₂ (5,5 e 10%), sem diferenças estatísticas entre os materiais. Após o clareamento, o *creep* aumentou a deformação na carga máxima e a recuperação no descarregamento foi reduzida. Houve uma redução de mais de 45% na dureza e de cerca de 20% no módulo de elasticidade, à medida que a profundidade da penetração aumentou. A diferença nas propriedades mecânicas do esmalte entre o controle e os dois grupos experimentais foi maior sob cargas mais baixas; à medida que a carga e contato aumentaram, a diferença entre os três grupos diminuiu. Os comprimentos de fratura para PC e H₂O₂ foram aumentados, enquanto a resistência à fratura diminuiu. Além disso, as linhas de fratura se apresentaram com múltiplas rachaduras secundárias e separação do esmalte adjacente se propagando na bainha entre os prismas. O esmalte clareado apresentou maior espaçamento e porosidades entre cristais. Foi observada marcante redução do conteúdo proteico e sua fragmentação aleatória após os procedimentos. Os autores concluíram que os agentes clareadores avaliados puderam produzir efeitos prejudiciais sobre as propriedades mecânicas do esmalte. Todos os demais efeitos observados foram considerados pelos autores como possível consequência dos danos ou desnaturação da pequena matriz de proteínas do esmalte.

Kwon et al. (2015) avaliaram os efeitos de quatro modalidades de clareamento no esmalte superficial através de análises de microdureza, perfilometria e MEV. O clareamento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante para produtos de bancada (H₂O₂ 9,5% - Crest 3D Intensive, Crest Pro Health, P&G – 2h por 7 dias), clareamento caseiro (PC 10% - Opalescence, Ultradent Products Inc. – 6h/dia por 14 dias) e de consultório (H₂O₂ 25% - Philips Zoom White Speed, Philips Oral Healthcare – 45min de aplicação total com troca a cada 15min e ativação por luz). Foi incluído um clareamento faça-você-mesmo (*Do It Yourself* - DIY) em que foi usada uma mistura de morango e refrigerante aplicada 2x/dia durante 5 dias (5min de contato seguido de escovação com escova macia por 30s). Controles positivos (ácido cítrico 1% por 60min) e negativos (água por 60min) foram usados. Um total de 120 espécimes (n=20) de terceiros molares humanos foram utilizados. Estes foram planejados e polidos antes dos testes. Os espécimes foram armazenados em saliva artificial. Os testes de microdureza Knoop foram realizados no *baseline* e 24h após o final das aplicações. Uma carga de 0.49N foi aplicada por 15s e três indentações realizadas para obtenção de uma média

da amostra (M-400-HI, LECO). Já para avaliação de rugosidade foi usado um perfilômetro de contato configurado para leituras de 4mm de comprimento (Mitutoyo SurfTest, SV-2000). Foram realizadas três varreduras com obtenção de pelo menos 100 valores de variação em z para o cálculo da média e obtenção de Ra. As variações de imagens no MEV foram classificadas por escores. Houve redução significativa na dureza Knoop no controle positivo e no grupo DIY. A redução foi maior que 10% no grupo DIY. A rugosidade da superfície aumentou para o grupo das tiras e no controle positivo. As quatro modalidades de clareamento induziram mudanças mínimas na morfologia da superfície observada em MEV. Apenas o controle positivo apresentou padrões de condicionamento do Tipo I e II de maneira evidente na micrografia. Os autores concluíram que nenhuma das técnicas afetou negativamente a morfologia do esmalte. No entanto, cuidado foi recomendado ao usar DIY, pois pode afetar a microdureza do esmalte. Do mesmo modo, o produto de bancada, apresentou potencial para aumento da rugosidade de superfície.

Kwon e Wertz (2015) realizaram uma revisão de literatura em que uniram conhecimentos sobre a difusão dos agentes clareadores, suas interações com os componentes e mudanças na superfície dentária. Seu objetivo foi estabelecer uma melhor compreensão do mecanismo associado ao clareamento dentário. Para isso, uma busca eletrônica no banco de dados *PubMed*, com combinações dos seguintes termos foi realizada: *Tooth Bleaching, Tooth Bleaching Agent, Hydrogen Peroxide, Pharmacokinetics, Tooth Permeability, Oxidation-Reduction, Tooth Demineralization e Color*. Foram incluídos trabalhos publicados em inglês entre 1968 e maio de 2014, totalizando 112 artigos. Os autores puderam observar e concluir que o clareamento é um processo dinâmico e complexo que envolve a difusão do material clareador para interagir com as moléculas de pigmento. Nesse processo promovem alterações na micromorfologia da superfície gerando mudanças que afetam as propriedades ópticas dos dentes. Por afinidade, também ocorrem efeitos na estrutura do esmalte e da dentina. Os autores defenderam que a supervisão por profissionais de saúde conforme recomendado pelo Conselho de Assuntos Científicos da ADA é fundamental para um procedimento seguro e bem-sucedido.

Yu et al. (2015) avaliaram os efeitos de produtos clareadores e de agentes remineralizantes nas propriedades nanotribológicas e nanomecânicas de dentes em ambiente úmido. Oitenta pré-molares foram divididos em quatro grupos: H₂O₂ 12% (Premium Dental Grade Teeth Whitening Gel); PC 15% (Opalescence PF 15); PC 35% (Opalescence PF 35 %); e saliva artificial (grupo controle). As superfícies de esmalte foram planificadas e polidas, obtendo-se rugosidade média inferior a 5nm. Os procedimentos foram realizados por 7 dias e

o armazenamento em saliva artificial com troca a cada 2 dias. Após o final do clareamento, os espécimes foram armazenados em saliva artificial por mais 7 dias. Propriedades foram avaliadas através de testes de riscamento (*nanoscratch*) e nanoindentação em ambiente úmido (Hysitron Triboscope). Para *nanoscratch* a carga foi mantida constante em 1000 μ N com comprimento de risco de 10 μ m. A velocidade de deslizamento de 0,5 μ m/s foi usada para dez testes em cada amostra. A distância entre os traços foi de, pelo menos, 10 μ m. As análises de nanodureza e módulo de elasticidade foram realizadas com uma ponta Berkovich. A carga máxima de 2000 μ N foi aplicada e uma distância entre as indentações de, pelo menos 5 μ m, foi mantida. O tempo de descarregamento foi 10s e foram realizadas 10 indentações no esmalte úmido. Os testes foram realizados antes do início, após uma semana de clareamento e após 7 dias de remineralização. As alterações morfológicas foram avaliadas por MEV (SEM,INSPECT F). Após o clareamento, os grupos H₂O₂ 12% e PC 15% tiveram aumento na profundidade dos riscos realizados com mais áreas de acúmulos nas bordas dos mesmos. Houve diminuição da nanodureza e superfície ficou com aparência corroída. Já o grupo PC 35% mostrou um aumento na profundidade dos riscos dos testes, sem alteração na nanodureza e na aparência da superfície. Nesse grupo, a morfologia do esmalte apresentou áreas fortemente corroídas com vazios e perdas de material sobre a superfície. O coeficiente de fricção aumentou após o clareamento, mas diminuiu com a remineralização, permanecendo ainda, maior que os valores iniciais. O grupo controle não demonstrou nenhuma alteração nessas medidas. Após a remineralização, os três grupos apresentaram diminuição das profundidades dos riscos, porém nenhuma alteração de nanodureza em comparação com os dentes clareados. As propriedades avaliadas dos grupos H₂O₂ 12% e PC 15% foram afetadas pelo clareamento, mas as nanotribológicas foram recuperadas parcialmente enquanto as nanomecânicas não sofreram alterações após uma semana adicional de remineralização. Quanto ao grupo PC 35%, as propriedades nanotribológicas foram influenciadas, porém as propriedades nanomecânicas não foram afetadas.

Borges et al. (2016) avaliaram a susceptibilidade do esmalte e da dentina à abrasão por escovação após o clareamento com H₂O₂ 7,5% com adição ou não de 0,5% de Ca. A escovação foi realizada imediatamente e 1h após a aplicação de clareador, com duas suspensões: de alta e baixa abrasividade. Foram utilizados dentes bovinos para obtenção de fragmentos de esmalte e de dentina após corte e polimento, divididos em 12 grupos (n = 10). Foram avaliados os seguintes fatores: sem clareamento ou aplicação do gel (com ou sem Ca), a abrasividade da pasta (alta ou baixa) e o tempo decorrido entre aplicação e escovação (imediatamente ou após 1h). O grupo controle, não foi clareado, mas sim escovado. Após a

obtenção das amostras, os espécimes foram sonicados por 5min. A terapia consistiu em aplicação de 1h diária por sete dias e escovação de dentes (135 ciclos/dia) imediatamente ou após 1h em saliva artificial. Ra e a perda da superfície (μm) foram medidos antes e após as aplicações por perfilometria de contato (MarSurf GD 25, Mahr, Göttingen). Os valores de Ra foram obtidos numa distância de 0,8mm, corte de 0,8mm e velocidade de 0,1mm/s. A escovação foi realizada em máquina de escovação simulada (SEM-2T, Odeme Dental Research,). Diariamente, foram realizados 135 ciclos de escovação com uma carga vertical de 200g com pasta abrasiva, simulando 45 contatos por vez, três vezes por dia. Os valores de rugosidade foram significativamente influenciados pela abrasividade da pasta. Para perda de esmalte, observou-se uma interação tripla com significado. O grupo clareado e imediatamente escovado com pasta altamente abrasiva apresentou perda aumentada ($1,41 \pm 0,14$) quando comparado aos demais. Os grupos controle e H_2O_2 + Ca escovado após 1h com suspensão pouco abrasiva apresentou menor perda ($0,21 \pm 0,03$ e $0,27 \pm 0,02$, respectivamente). Para perda de dentina, interação significativa foi observada para o clareamento e intervalo. Grupo clareado e imediatamente escovados apresentaram perdas de dentina significativamente maiores ($8,71 \pm 2,45$) do que os outros grupos. Os autores concluíram que a rugosidade da superfície aumentou quando foi utilizada suspensão de alto poder abrasivo, independentemente do clareador. H_2O_2 7,5% aumentou a perda de esmalte e dentina, principalmente associado a escovações abrasivas. A complementação com Ca reduziu a perda da superfície. Além disso, a presença do Ca no gel de H_2O_2 7,5% com ação remineralizante, reduz a perda por abrasão. Os autores recomendaram que a escovação seja atrasada após a aplicação de gel clareador.

Henn-Donassollo et al. (2016) avaliaram os efeitos de dois procedimentos clareadores *in vitro* e *in situ* na microdureza Knoop superficial do esmalte humano. Foram utilizados sessenta espécimes de esmalte obtidos de trinta molares. Todos foram planificados e polidos para serem então divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=15$). Foram utilizados o H_2O_2 10% para uso em moldeiras (WhiteClass, FGM) além de tiras clareadoras que também continham H_2O_2 10% (White Strips, Oral B). Para teste *in situ*, seis voluntários usaram um aparelho intra-oral contendo fragmentos de esmalte. Nas avaliações *in vitro*, os espécimes foram mantidos em água deionizada após os protocolos. Os procedimentos foram realizados por 1h / dia durante 14 dias. A microdureza foi medida antes e depois dos procedimentos e foram realizadas três indentações em cada espécime com uma carga de 50g por 10s com distância de $100\mu\text{m}$ entre eles (Modelo 1600, Bruker). Os resultados não demonstraram

redução na microdureza estatisticamente significativa *in situ*. Já quando as amostras foram tratadas *in vitro*, houve diminuição significativa nos valores. Não houve diferença *in situ* entre os agentes clareadores, enquanto *in vitro*, as tiras geraram menores valores de microdureza nas amostras. Os autores concluíram que não houve efeito deletério sobre o esmalte *in situ*, sendo observada redução da dureza somente *in vitro*.

Luque-Martinez et al. (2016) compararam as alterações de cor produzidas por PC usado com moldeiras com produtos de bancada a base de H₂O₂, através de uma revisão sistemática e meta-análise. A pesquisa bibliográfica foi realizada nas bases *PubMed*, *Scopus*, *Web of Science*, *LILACS*, Biblioteca Brasileira em Odontologia (BBO), *Cochrane Library* e *Grey* sem restrições. Do mesmo modo, os resumos da *International Academy of Dental Research* (IADR) e os registos de ensaios não publicados e em andamento também foram pesquisados. Dissertações e teses foram selecionados usando os bancos *ProQuest Dissertations* e *Teses do Periódicos Capes*. Foram incluídos ensaios clínicos randomizados. As mudanças de cor em termos de alteração na escala VITA e a variação de ΔE foram os principais resultados buscados, assim como sensibilidade dental e irritação gengival. A ferramenta de risco de viés do *Cochrane Collaboration* foi usada para avaliação de qualidade dos trabalhos. 1379 artigos foram inicialmente identificados. No entanto, apenas oito foram considerados com "baixo" risco de viés e incluídos na análise. O número de pacientes incluídos nos estudos escolhidos foi de 16 a 114 participantes com idade média de 35,7 anos. A maioria dos trabalhos usou o PC 10% mas houve variação de concentração de 5 a 35%. Para H₂O₂, as concentrações variaram de 2,5 a 14%, sendo 7,5% a concentração mais utilizada. Os estudos selecionados utilizaram protocolos de utilização de 2 a 28 dias, sendo 14 dias foi o intervalo mais comum. Para ΔE , a média foi de -0,45 que favoreceu os produtos a base PC. A mudança de cor em termos de unidades de escala, a sensibilidade dental e irritação gengival não foram significativamente diferentes entre grupos. Os autores concluíram que os géis de PC para uso caseiro supervisionado mostraram eficácia clareadora um pouco maior do que os produtos a base de H₂O₂ em termos de ΔE , mas apresentaram comportamentos semelhantes em termos de alterações de unidades da escala de cor. Ambos os produtos avaliados demonstraram o mesmo nível de irritação gengival e sensibilidade dental.

Serraglio et al. (2016) visaram comparar a eficácia e a segurança de tiras clareadoras com o clareador caseiro recomendado pela ADA - o gel de PC 10% - através de uma revisão. Foi feita uma pesquisa no *Pubmed* e na Central de Registros de Ensaios Controlados da Central *Cochrane* buscando ensaios clínicos ou ensaios clínicos randomizados que abordassem esse tema. Foram selecionados artigos desde 01 de janeiro de 2000 (data do

primeiro estudo do uso de tiras clareadoras) até outubro de 2014. A eficácia da técnica foi avaliada através dos parâmetros variação total de cor (ΔE), variação de luminosidade (ΔL) e variação do componente amarelo-azulado da cor (Δb), enquanto os efeitos colaterais foram analisados através da sensibilidade gengival, sensibilidade dental e irritação gengival. Os dados foram extraídos de forma independente por dois revisores. Foram incluídos oito estudos na metanálise, a qual não revelou diferença significativa entre os grupos de intervenção com relação à eficácia do clareamento medida como alteração de cor e expressa pela redução do amarelamento (Δb). No entanto, as tiras exigiram, em média, 195min para alcançar a mudança de cor definida, enquanto o PC 10% exigiu aproximadamente 982min. Já para os efeitos colaterais sensibilidade dental e gengival, os valores também foram semelhantes, independentemente do método de clareamento utilizado. O registro de irritação gengival foi maior quando o gel PC 10% foi aplicado em moldeira. Os autores concluíram que não existiam provas sólidas na ciência para apoiar o uso das tiras clareadoras em detrimento à técnica tradicional recomendada pela ADA do gel de PC 10% em moldeiras. Os estudos selecionados, com suas limitações, revelaram alteração de cor assim como sensibilidade dentária e gengival semelhantes para ambas as técnicas de clareamento avaliadas. Porém, os autores ressaltam que ainda não há garantia da eficácia e segurança especialmente devido à probabilidade de uso indevido desses produtos sem monitoramento profissional. Além disso, a aceitação e adaptação do paciente ao procedimento também deve ser considerada pelo profissional na escolha do clareamento.

Polydorou et al. (2017) buscaram avaliar o efeito a longo prazo do clareamento no esmalte humano. Terceiros molares humanos foram divididos em quatro grupos ($n = 20$): Grupo 1 – Opalescence Boost (Ultradent, H_2O_2 40%, 3x20min/semana); Grupo 2 – controle (espécimes armazenados em saliva humana); Grupo 3 – Vivastyle Paint on Plus (Ivoclar Vivadent AG, H_2O_2 6%, 2x10 min/dia – tempo semanal total = 1,4h) e Grupo 4 – Opalescence PF 16% (Ultradent, PC 16%, 6h/dia, 42h semanais). As amostras que passariam pelos testes foram planejadas e polidas. Após cada sessão, os espécimes foram armazenados em saliva humana fornecida por único doador e renovada uma vez por semana. A microdureza Knoop e a rugosidade superficial foram medidas antes do clareamento, após 2 semanas e 8 semanas de aplicação. As avaliações de rugosidade foram realizadas com um perfilômetro óptico (Mikrofocus, UBM, Type 2010, UBM) através de três medições de 0,5x0,5mm. Para a microdureza foram realizadas cinco medições com carga de 1030mN e tempo de carregamento de 30s (Leitz Miniload, Ernst Leitz GmbH). Após 2 semanas de aplicação, a rugosidade superficial foi significativamente aumentada em todos os grupos experimentais,

porém entre os grupos não houve diferença significativa. As mudanças de rugosidade após 8 semanas não foram significativamente maiores do que após 2 semanas. Após 8 semanas de utilização, o aumento na rugosidade causada por PC 16% foi significativamente maior do que o causado por H₂O₂ 40%. A microdureza aumentou em todos os grupos, incluindo o controle. No entanto, apenas para H₂O₂ 40%, o acréscimo foi significativo, sendo o maior observado entre os grupos. O clareamento com PC 16% resultou em maior rugosidade do que com H₂O₂. As descobertas dos autores indicaram que o uso a longo prazo de produtos clareadores caseiros ou de consultório levaram a mudanças semelhantes na rugosidade da superfície. Sendo assim, os autores defenderam que o clareamento de consultório, nos intervalos e modos de aplicação testados com H₂O₂ 40% parece ser, ao menos tão seguro quanto o caseiro, em relação aos efeitos sobre o esmalte humano. Ainda de acordo com os resultados, o tempo de aplicação mostrou exercer um efeito na rugosidade do esmalte e, entre os clareadores usados, o PC gerou maiores alterações.

Sorozini et al. (2017) buscaram avaliar os efeitos sobre o conteúdo mineral do esmalte humano de terceiros molares inclusos submetidos a protocolos de 8 semanas de clareamento caseiro (em excesso). Quatro fragmentos de esmalte obtidos de cinco dentes foram divididos em quatro grupos: Grupo 1 - saliva artificial; Grupo 2 – PC 10% (Opalescence PF 10% Regular, Ultradent, 6h/dia; Grupo 3 - H₂O₂ 9,5% (DayWhite 9,5%, Discus, 2x30min/dia; Grupo 4 - tiras clareadoras (H₂O₂ 10%, Oral B Whitestrips, Anderson Packaging, 2x30min/dia. A alteração no conteúdo mineral foi avaliada semanalmente por análise multi-elementar por fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF - Artax 200, Bruker). As concentrações de Ca e P obtidas no grupo de controle variaram de 38% a 40% e 16% a 18%, respectivamente. Por outro lado, a relação Ca/P variou de 2,2 a 2,4, resultados próximos dos encontrados na literatura para o esmalte humano. As diferenças foram encontradas no Grupo 4 para as concentrações de Ca e P após aplicação das tiras. Para a razão Ca/P, as diferenças foram encontradas no Grupo 2 de PC. Dentro das limitações de um estudo *in vitro*, os autores defenderam que EDXRF provou ser um método adequado para a avaliação de conteúdo mineral no esmalte, apresentando como vantagem a medição da mesma área da amostra em diferentes estágios durante o intervalo e metodologia proposta. Além disso, o uso das tiras demonstrou efeitos mais deletérios. Os autores também defenderam que são necessários mais estudos com outras metodologias complementares, especialmente para avaliar possíveis alterações na composição orgânica. Além disso, a combinação com as demais variáveis presentes na cavidade através de estudos *in situ* e *in vivo* são importantes para determinar os reais efeitos dos produtos sobre o esmalte.

Vargas-Koudriavtsev e Herrera-Sancho (2017) analisaram a concentração de moléculas de carbonato no esmalte dental através de espectroscopia Raman após a aplicação de produtos clareadores e agentes remineralizadores. Para isso, sessenta dentes humanos foram divididos aleatoriamente em seis grupos e expostos a três géis caseiros diferentes (1 – Day White, Discus, H₂O₂ 9,5%; 2 – DayWhite, Discus, H₂O₂ 14% e 3 – DayWhite, Discus, PC 38%, 2x30min por 28 dias) e três clareadores de consultório (4 – Zoom! Whitespeed, Philips, 15min com fotoativação; 5 – PolaOffice, SDI North America Inc., 8min com fotoativação e 6 – PolaOffice sem fotoativação – 3 aplicações para cada), todos de acordo com as instruções do fabricante. Os espécimes foram armazenados em água destilada entre as aplicações. Após quatro semanas de utilização contínua, aplicou-se um agente remineralizador durante sete dias, com a mesma frequência que o clareador. A concentração de moléculas de carbonato no esmalte foi medida antes e durante os procedimento com um aparelho Raman confocal (Modelo Alpha300 R, WiTec acoplado a um microscópio Olympus). Além das medidas iniciais, foram feitas análises na segunda e quarta semana para os grupos 1 a 3 e após a primeira e segunda sessão para grupos 4 a 6. Os agentes clareadores caseiros geraram uma diminuição das moléculas de carbonato encontradas na amostra. Esta redução foi estatisticamente significativa para o gel com a maior concentração de H₂O₂ (grupo 2). Os agentes clareadores de consultório causaram um aumento significativo no carbonato para os três grupos, tendo sido a maior variação observada na aplicação com PolaOffice. Houve influência das variáveis semana e grupo nos resultados. Os autores concluíram que os géis de consultório parecem causar um aumento do carbonato na estrutura do esmalte, enquanto que os géis caseiros causaram uma queda no mesmo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar os efeitos de diferentes protocolos de clareamento caseiro considerados normais e excessivos sobre a morfologia, a rugosidade, a composição orgânica e inorgânica, o módulo de elasticidade e a nanodureza do esmalte dental humano. Foram avaliados os seguintes agentes clareadores: PC 10 % (Opalescence PF Regular 10%, Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos Ltda, Indaiatuba, São Paulo), H₂O₂ 10% (WhiteClass 10%, Dentscare Ltda; Joinville, Santa Catarina) e tiras clareadoras (H₂O₂ 10% -Crest Whitestrips; Procter & Gamble, Cincinnati, Estados Unidos).

Hipóteses nulas: Os produtos clareadores testados, mesmo quando usados em protocolos considerados excessivos (8 semanas), não geram alterações sobre o esmalte dentário humano:

- a) na morfologia e na rugosidade;
- b) na composição, compatíveis com padrões de desmineralização ou de perda de matéria orgânica;
- c) nas propriedades mecânicas de módulo de elasticidade e de nanodureza.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e preparo das amostras

O trabalho passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP-HUPE) (Anexo). Terceiros molares humanos foram doados pelo Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO-UERJ) para os experimentos. Como parte do protocolo adotado, os dentes passam por processo de autoclavagem antes da doação. Além disso, foram solicitados elementos de pacientes em uma mesma faixa etária a fim de redução de viés. Os dentes escolhidos foram armazenados sob refrigeração em água destilada até o preparo para os testes. Foram utilizados dez terceiros molares inclusos livres de fissuras e cavidades (Figura 1).

Figura 1 – Exemplo de dente utilizado



Apenas a coroa dos elementos foi utilizada. Não foi feito nenhum tipo de planificação ou polimento das superfícies de esmalte preservando sua curvatura e anatomia. Buscou-se assim a manutenção da microestrutura original sem influência de procedimentos prévios que, além de modificar a organização, poderiam também induzir a formação de artefatos inerentes a técnica como trincas. Os dentes foram seccionados na superfície oclusal na forma de uma cruz, com auxílio de uma microretífica sob irrigação (Microretífica RT650KA,

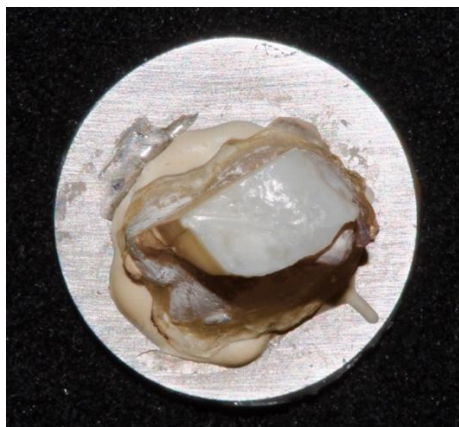
Black&Decker, Tai Po NT, Hong Kong, China). Foram obtidos quatro fragmentos de esmalte e dentina correspondentes a cada uma das faces do elemento (vestibular, lingual, mesial e distal - Figura 2). As amostras foram recortadas de modo a apresentarem uma superfície exposta de cerca de 9 mm² para execução dos procedimentos.

Figura 2 – Obtenção dos fragmentos de esmalte



As superfícies de esmalte ganharam uma base em resina composta e foram fixadas com cola a base de cianocrilato específica para ambientes úmidos em um suporte circular metálico (Figura 3). Após os cortes, estas foram examinadas com uma lupa estereoscópica (Lumagny® 6X, nº 7547, Hong Kong, China) para avaliação quanto à presença de defeitos. Em caso positivo, o elemento era eliminado e um novo era selecionado para corte. Cada fragmento dos dentes aprovados foi identificado por dois números: o primeiro em algarismo romano indicando o procedimento a que seria submetido (I, II, III, IV – Quadro 1); o segundo, em algarismo arábico, correspondia ao número do dente de origem antes do corte (1 a 10).

Figura 3 – Fragmento de esmalte fixado para leituras



Quadro 1 – Protocolos de utilização e composição fornecidos pelos fabricantes (n=10)

Produto	Composição	Aplicação
Grupo I - Saliva artificial (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro).	Cloreto de sódio 0,67g/cL, cálcio 0,1168 g/cL, carboximetil celulose 8g/cL, magnésio 0,0408g/cL, potássio 0,96g, metilparabeno 1g, sorbitol líquido 24g, água destilada 964,938mL, fosfato potássio monob 0,274g	Armazenamento durante oito semanas
Grupo II - Opalescence PF Regular 10% (Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos Ltda., Indaiatuba, São Paulo – LOTE: D018X – Validade: 31/03/2017; LOTE: D014M; Validade: 31/03/2017).	PC 10%, nitrato de potássio, íon flúor	8h diárias por oito semanas
Grupo III – WhiteClass 10%, Dentscare Ltda; Joinville, Santa Catarina – Fabricação: 23/10/2015 – Validade: 02/2017)	H ₂ O ₂ 10%, carbopol neutralizado, nitrato de potássio, fluoreto de sódio, gluconato de cálcio, estabilizante, umectante e água deionizada	Duas aplicações diárias de 30min durante 8 semanas
Grupo IV - Crest Whitestrips (Procter & Gamble, Cincinnati, Estados Unidos – LOTE: 6043V44 – Validade: Junho/2017)	H ₂ O ₂ 10%, água, glicerina, carbômero, pirofosfato disódico, hidróxido de sódio, sacarina sódica	Duas aplicações diárias de 30min durante 8 semanas

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as instruções dos fabricantes e seguindo os intervalos descritos no Quadro 1. Os fragmentos foram armazenados em recipientes herméticos individuais e mantidos em ambiente úmido com temperatura ambiente durante a terapia clareadora. No intervalo entre as sessões, as amostras foram armazenadas em saliva artificial (13,5mL) na mesma temperatura. As soluções foram trocadas diariamente.

Além do procedimento clareador, os espécimes passaram por simulação de escovação com utilização de escova elétrica (Escova Oral-B Vitality, Modelo 3709, Procter & Gamble Oral Care, Alemanha - LOTE: 3224785000 – Validade: 08/2021) sem a utilização de dentifrícios, apenas sob água corrente. As escovações foram realizadas por operador único com uma força de 90g antes da aplicação do gel clareador e após 15min de armazenamento em saliva depois da remoção do gel com gaze e água corrente por 5s (SOROZINI *et al.*, 2017). Esse tempo seria equivalente ao tempo de contato de cada superfície dentária com a escova durante uma escovação padrão com 2min de duração.

Após a escovação, as superfícies de esmalte foram secas com gaze para remoção da umidade e melhor contato com o gel clareador. Os espécimes do grupo I voltaram diretamente para a saliva artificial após esse processo. Nos grupos II e III, os fragmentos receberam 0,05mL de gel clareador em cada aplicação, formando uma camada de cerca de 1mm de espessura. Além disso, foram cobertos com filme plástico para simular as condições intra-orais de utilização de moldeiras. Já para o grupo IV, pedaços compatíveis de tiras clareadoras foram recortados e posicionados na superfície das amostras. Em todos os grupos foi garantido um intervalo de pelo menos 8h entre as aplicações do clareador, descritas no Quadro 1.

As amostras foram avaliadas quanto à alteração na morfologia e rugosidade, variações na composição orgânica e inorgânica, além de propriedades físicas. As análises propostas foram realizadas em três momentos: 0 – antes do início da terapia clareadora, 1 – após 4 semanas de aplicação (28 dias) e 2 – após 8 semanas (56 dias), este último simulando um protocolo clareador excessivo. As leituras foram realizadas 24h após cada intervalo ter sido atingido. Não foram realizadas avaliações de cor, uma vez que a metodologia clareadora já fora validada em estudos anteriores (SOROZINI *et al.*, 2017).

3.2 Marcação das amostras

Marcações em cruz foram realizadas nos espécimes provenientes de todos os dentes em que seriam realizados o acompanhamento das alterações morfológicas e mecânicas do esmalte. Para isso foi utilizado o ensaio de riscamento (*scratch*) realizado no nanoindentador G200 Agilent (MTS Systems Corporation, Santa Clara, EUA – Laboratório de Superfícies e Filmes Finos – Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – PEMM; Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia / Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE-UFRJ – Figuras 4 e 5). Através do microscópio óptico acoplado, foram escolhidas áreas mais planas da amostra para realização das marcações. O ensaio foi programado para realizar dois caminhos de 200 μ m perpendiculares entre si com uma força de 50mN, suficiente para gerar no espécime uma forma semelhante a uma cruz. Desse modo, foram definidos quatro quadrantes onde seriam realizadas as leituras seguintes. A amostra pôde, assim, ser o controle dela mesma com pouca influência da variabilidade inerente ao esmalte *in natura*.

Figura 4 – Desenho esquemático do teste de indentação e de riscamento

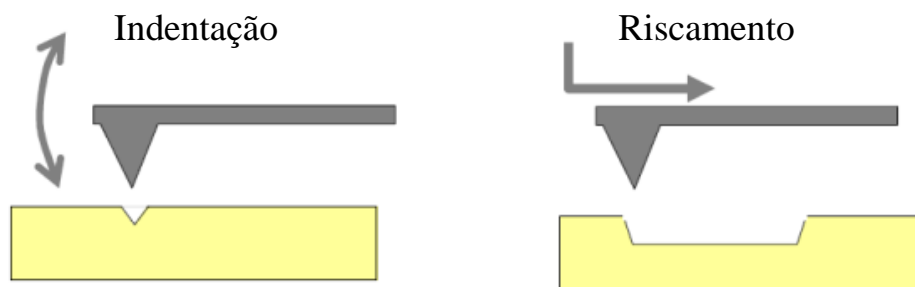


Figura 5 – Nanoindentador G200 Agilent



3.3 Análise por CLSM

As amostras foram analisadas nos intervalos inicial, 4 e 8 semanas através da CLSM no aparelho Zeiss, modelo LSM 700 dotado de laser azul de comprimento de onda de 405nm no Laboratório de Superfícies e Filmes Finos (PEMM/COPPE-UFRJ) (Figura 6). As imagens foram realizadas para avaliação global dos quatro quadrantes delimitados assim como das marcações realizadas antes das leituras (Figura 7).

Foram realizadas imagens ilustrativas para acompanhamento de alterações na superfície de maneira não-destrutiva, sem necessidade de nenhum tipo de preparo da amostra a não ser sua secagem. Sendo assim, foi possível observar as variações produzidas em áreas maiores, de cerca de 300x300µm, assim como as modificações de profundidade nas marcações.

A técnica permite a obtenção de imagens de alta resolução através de cortes ópticos em diferentes profundidades de campo pré-determinados pelo observador, posteriormente agrupados para se fazer a reconstrução em três dimensões (3D) da topografia de objetos complexos. Ela possibilita a eliminação de informações fora de foco da imagem, o que favorece a aquisição de amostras mais espessas, como tecidos dentários e biofilmes bacterianos, dentre outros tipos celulares (MANNHEIMER, 2002)

As imagens foram obtidas e tratadas pelo software ZEN Black Edition (Zeiss) e permitiram uma análise qualitativa do esmalte humano.

Figura 6 – Aparelho de CLSM Zeiss modelo LSM 700



Figura 7 – Exemplo de imagem por CLSM da marcação em cruz realizada nas amostras



3.4 Análise por AFM

As amostras foram analisadas nos intervalos 0, 1 e 2 em aparelho de Microscopia de Varredura por Sonda modelo Dimension Icon (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA) no Laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. (Figura 8). Imagens foram obtidas através da identificação prévia da marcação em cruz, feita por riscamento (Figura 9). Estas foram realizadas em cada um dos quadrantes identificados de modo que foi possível diminuir eventuais discrepâncias entre as áreas analisadas.

Figura 8- Aparelho de AFM Dimension Icon

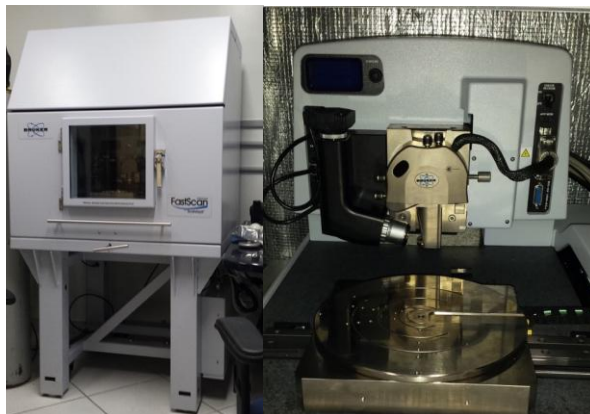
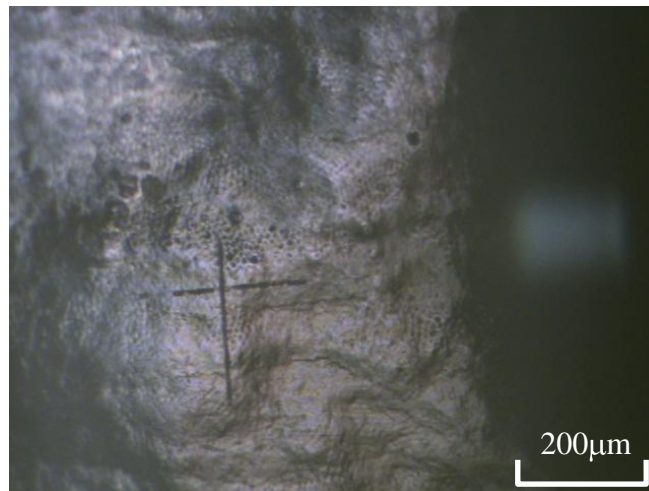


Figura 9 – Exemplo de imagem da câmera com dispositivo de carga acoplada (CCD) do equipamento de AFM



Antes de cada uma das análises, as amostras foram imersas em cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner, Odontobras, São Paulo, SP, Brasil) por 5min e então secas com leve jato de gás inerte. As imagens foram realizadas no modo de varredura PeakForce Tapping[®], utilizando pontas arredondadas (RTESPA Bruker, Camarillo, CA) com constante nominal de mola 40N/m. Para diminuir danos às amostras e também ruídos, as imagens foram adquiridas utilizando uma baixa frequência de varredura na ordem de 0.6 Hz, com resolução de 512X512 pixels. O processamento de imagem (planificação em linha apenas) foi feito em uma sequência de comandos desenvolvida pela Bruker utilizando como plataforma o programa NanoScope Analysis (Bruker, EUA). Para auxiliar nas análises, a matriz de dados, que gera as imagens planificadas, foi transformada em uma espécie de visualização, possibilitando um maior discernimento dos dados obtidos pelo AFM.

Para análise de rugosidade, foram coletados no software NanoScope Analysis os valores de S_q e S_a para análise estatística. S_a representa a média aritmética dos valores absolutos encontrados na superfície varrida. Já S_q representa a média dos valores absolutos de altura dos cinco maiores picos e a profundidade nos cinco perfis mais profundos da superfície escaneada, conhecido como altura pico ao vale (LOYOLA-RODRIGUEZ et al., 2010).

As microscopias do grupo de varredura por sonda permitem a análise das amostras a nível micro e nanométrico. Para isso são utilizadas sondas formadas por uma haste flexível denominada de cantiléver e pontas de prova (*tip*) com diâmetro nanométrico que percorrem a amostra, registrando suas propriedades, em função das interações entre ambas a nível atômico (Figura 10). Além disso, ao registrar pressões realizadas sobre os espécimes pode-se obter

informações sobre suas propriedades adesivas e elásticas (WEISSMÜLLER, ROCHA, MONCORES, 2002).

Figura 10 – Imagem representativa do cantiléver RTESPA utilizado



A aproximação da sonda na amostra gera forças inter-atômicas repulsivas que podem ser detectadas pela deflexão do cantiléver, o qual funciona como uma mola. Essa modificação de posição será medida por um sensor óptico e assim refletir a topografia da amostra em tempo real (Figura 11). Quando os valores detectados pelo sensor estiverem diferentes de valores pré-definidos de força ou deslocamento, ocorre a movimentação do cantiléver através do seu elemento piezoelétrico de maneira vertical para que a interação com a amostra se mantenha constante. As imagens de AFM são, portanto, a medida da deflexão do cantiléver durante toda a varredura, detectadas pelo movimento de um feixe de laser que atinge o cantiléver e através de um espelho é direcionado a um detector (Figura 12) (WEISSMÜLLER, ROCHA, MONCORES, 2002).

Figura 11 – Interface do programa NanoScope Analysis

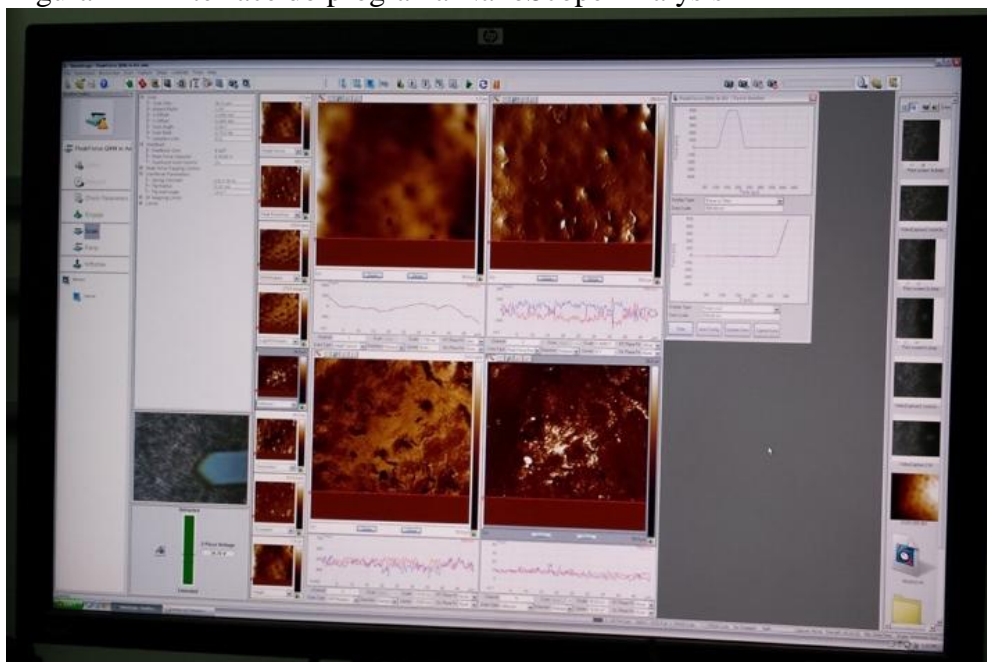
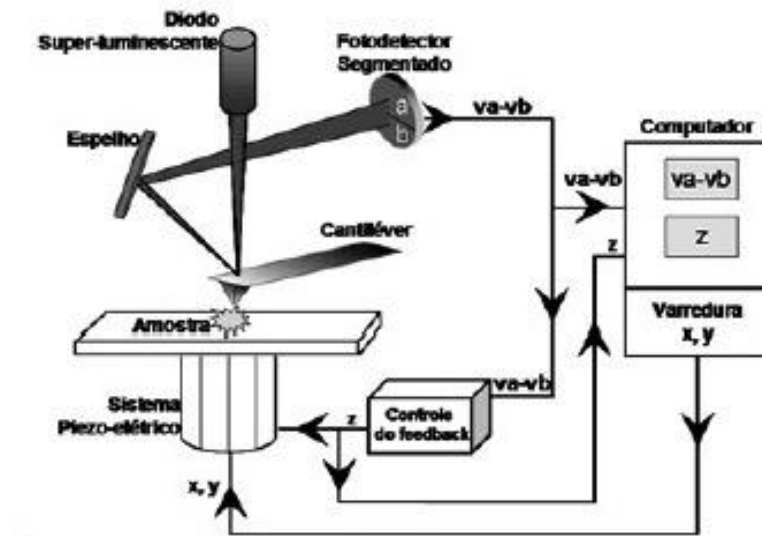


Figura 12 – Figura esquematizada de uma unidade detectora de AFM



Fonte: WEISSMÜLLER, ROCHA, MONCORES, 2002.

O cantiléver é feito de silício ou nitreto de silício, tem comprimento de 100 a 500 μm e espessura de 0,5 a 5 μm e, para pequenas deflexões, pode ser considerado como uma mola que obedece a Lei de Hooke. (WEISSMÜLLER, ROCHA, MONCORES, 2002)

O modo de leitura PeakForceTappingTM permite a varredura da amostra através de um contato intermitente com a manutenção das forças realizadas em valores constantes (*setpoint*). Nesse método, o cantiléver é posto a oscilar em determinada frequência sendo feito o registro de sua deflexão em um ciclo de compressão e relaxamento do cristal que controla sua posição (Figura 13). Esse processo é realizado em cada ponto da amostra com obtenção de curvas de força que registram a aproximação e o afastamento da ponta de prova e assim é feita a reconstrução da imagem da superfície (WEISSMÜLLER, ROCHA, MONCORES, 2002).

Figura 13 – Posição do cantiléver durante a aproximação com amostra



Legenda: A- Sonda distante da amostra. B- Forças atrativas sobre a sonda. C – Com o contato, há deflexão do cantiléver. D- Processo de afastamento entre a sonda e amostra com a manutenção de forças de atração prendendo à superfície. E – Força sobre o cantiléver maior que a atrativa e o cantiléver se desprende da superfície.

Fonte: WEISSMÜLLER; ROCHA; MONCORES, 2002.

3.5 Análise por microespectroscopia Raman

Espécimes foram destinados para análises de composição com microespectroscopia Raman (inVia Qontor, Renishaw, New Mills, Gloucestershire) nos intervalos previamente descritos: 0,1 e 2 (Figura 14). As leituras foram realizadas no modo StreamLineHr™, uma tecnologia desenvolvida que permite que o laser percorra a amostra de maneira constante e suave, eliminando artefatos e gerando espectros de áreas pré-definidas de maneira rápida e eficaz. Trata-se de um novo formato do laser em linha permitindo mais rapidez de leitura do que o laser pontual e com conseqüente menor chance de danificar a amostra por aquecimento excessivo. São obtidos espectros de áreas que permitem a conjugação da informação de composição com a distribuição das moléculas nas áreas das amostras (RAE et al., 2014).

Figura 14 – Aparelho de Raman inVia Qontor



Para todas as análises foi utilizado o laser 785nm. Foram registrados três espectros em intervalos diferentes a fim de obter melhor resolução dos picos referentes tanto a composição inorgânica e orgânica da amostra, uma vez que a proporção entre elas é bastante diferente no esmalte (96% de HAp e 2% de proteínas). No esmalte dentário, regiões correspondentes a um bastão foram selecionadas para análise em cada amostra (Figura 15). Em função dos picos mais relatados na literatura para os componentes do esmalte (GOO et al., 2004; SCHULZE et al., 2004), foram escolhidas três configurações do equipamento:

- a) Intervalo do espectro de 390 a 1551 cm^{-1} (centro 1000 cm^{-1}) com potência de 10% do laser, única acumulação de 5s
- b) Intervalo do espectro de 1130 a 2150 cm^{-1} (centro 1665 cm^{-1}) com potência de 100% do laser, única acumulação de 10s
- c) Intervalo do espectro de 2494 a 3271 cm^{-1} (centro 2900 cm^{-1}) com potência de 100% do laser, única acumulação de 10s.

Figura 15 – Exemplo destacado da região de um prisma selecionado para leitura com auxílio da câmera CCD no equipamento Raman



Os dados obtidos foram analisados no programa Wire (Renishaw). Foram realizadas remoções de raios cósmicos e a média dos espectros obtidos em cada amostra foram normalizados.

A espectroscopia Raman é um método não-destrutivo e sem contato direto com a superfície, sem necessidade de planificação, responsável por detectar a composição molecular através de ondas de vibração via excitação da amostra com laser (fonte de luz monocromática) (RAE et al., 2014; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). Quando há interação eletromagnética com o substrato, diferentes tipos de fenômenos podem ser observados. O primeiro seria o espalhamento elástico ou Rayleigh, no qual a energia incidente é igual antes e após a colisão. Em outros casos, há uma variação da energia em função da troca com as moléculas ali presentes. Este evento representa o espalhamento inelástico ou Raman. Trata-se de um espalhamento inelástico de fótons devido ao momento

induzido pelo campo eletromagnético e característico de cada ligação presente na amostra. O espectro de luz espalhada permite identificar a amostra e entender melhor sua composição. A probabilidade desse fenômeno acontecer é cerca de 100 vezes menor que o Rayleigh. O espalhamento Raman ocorre em uma região do espectro eletromagnético próximo ao infravermelho (RAE et al., 2014; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). A técnica é bastante sensível a alterações a nível molecular, podendo detectar mudanças na estrutura da amostra, sendo ideal para avaliação de eventuais alterações na pequena composição orgânica do esmalte. Isso ocorre, pois, o ponto de laser sobre a amostra é pequeno ($<1\mu\text{m}$), alcançando alta resolução espacial ainda com relação ao comprimento de onda do laser. O espectro gerado apresenta picos ou bandas de modo que a sua posição está relacionada à frequência Raman detectada e à composição e estrutura do material. (RAE et al., 2014; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017).

3.6 Análise por nanoindentação

O teste foi realizado no mesmo nanoindentador modelo G200 (Agilent). O equipamento tem resolução de deslocamento $<0,01\text{nm}$ e de força de 50nN . Um microscópio óptico com aumento de 40x acoplado ao indentador foi usado para escolher locais para indentação que estivessem livres de sujeiras e bem focalizados.

Medições convencionais de nanoindentação foram realizadas para obtenção da dureza e módulo de elasticidade (módulo de Young) com um indentador Berkovich com raio de 20nm e área da ponta calibrada. Uma carga máxima de 20mN foi utilizada. O tempo de carregamento foi de 15s com manutenção da força máxima por 2s em cada indentação. A razão de Poisson empregada foi de $0,2$ (AZER et al., 2009). Dois testes ($n=20$) foram realizados em cada amostra, com distância mínima de $40\mu\text{m}$. Testes prévios foram realizados para definir tais parâmetros. A dureza e o módulo de elasticidade foram determinados segundo o método Oliver e Pharr (2004) pelo software Nanosuite 5 através das fórmulas abaixo (1) e (2):

$$H = \frac{P_{\max}}{A}$$

(1)

Onde: H = dureza

$P_{m\acute{a}x}$ = carga máxima alcançada

A = rea de contato do indentador

$$\frac{1}{E_{\text{eff}}} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

(2)

Onde: E = módulo de Young do material

ν = razão de Poisson da amostra

E_i = módulo de Young do indentador

ν_i = razão de Poisson do indentador

Em tecidos compósitos como o esmalte, há um comportamento mecânico intermediário. A resistência  deformco plástica é considerada na avaliação de nanodureza. Já o comportamento de deformco elástica da amostra é apresentado nos cculos de módulo de elasticidade (OYEN, 2006). Durante os testes, as marcas de indentação geradas são pequenas para serem avaliadas através de sua rea. Desse modo, a ponta calibrada antes da leitura, com conhecimento prévio de seu diâmetro, ângulo ($65,3^\circ$) e área, permite cculos mais precisos. As fórmulas são preenchidas pelo software com valores pré-determinados, sem necessidade de observação das indentações geradas para os cculos. Assim, são obtidos valores mais fis de dureza que os testes Knoop ou Vickers, por exemplo (Figura 16). São obtidas curvas e no momento de remoção da carga, onde considera-se que a deformco plástica atinge seu valor máximo. Nesse gráfico podem ser obtidas as propriedades da amostra (OYEN, 2006) (Figuras 17 e 18).

Figura 16 – Formato em desenho esquemático da ponta Berkovich

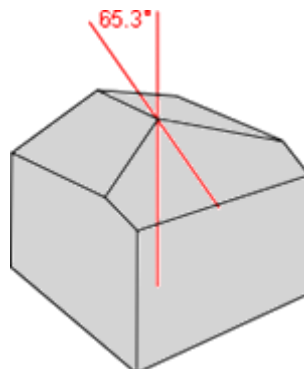
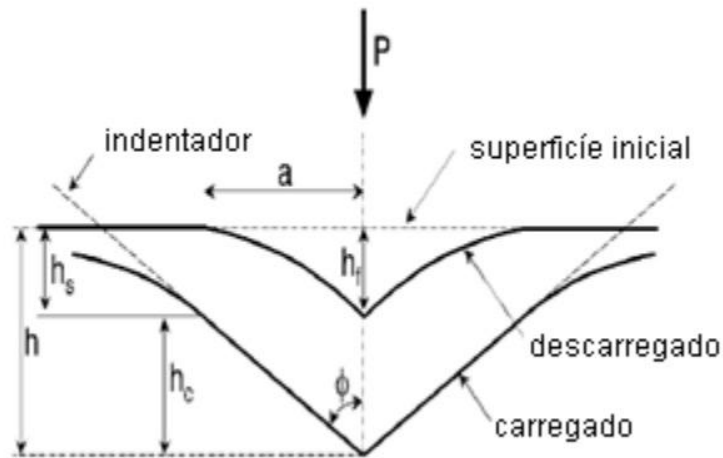


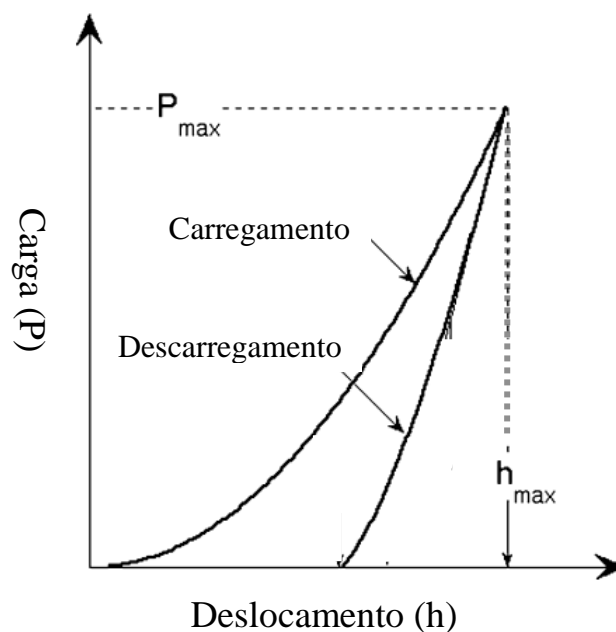
Figura 17 – Desenho esquemático do ensaio de nanoindentação



Legenda: O esquema ilustra dois momentos diferentes nos testes de indentação e os dois tipos de deformações registradas, elástica e plástica. O primeiro momento consiste na aplicação de uma carga até que atinja seu valor máximo, gerando uma deformação tal no material, com potencial de recuperação. O segundo momento, consiste no momento de remoção da carga, onde é deixada uma indentação no material, correspondente à deformação plástica alcançada. P = carga aplicada; a = aresta da indentação gerada; h = profundidade máxima de penetração do indentador; h_c – profundidade de penetração correspondente à recuperação elástica do material; h_s = Profundidade de penetração do indentador no momento de remoção da carga; h_f = profundidade da indentação gerada na amostra.

Fonte: OLIVER e PHARR, 2004.

Figura 18 – Exemplo das curvas obtidas em que os dados para os cálculos são extraídos da curva de descarregamento



Fonte: OLIVER e PHARR, 2004.

3.7 Análise estatística

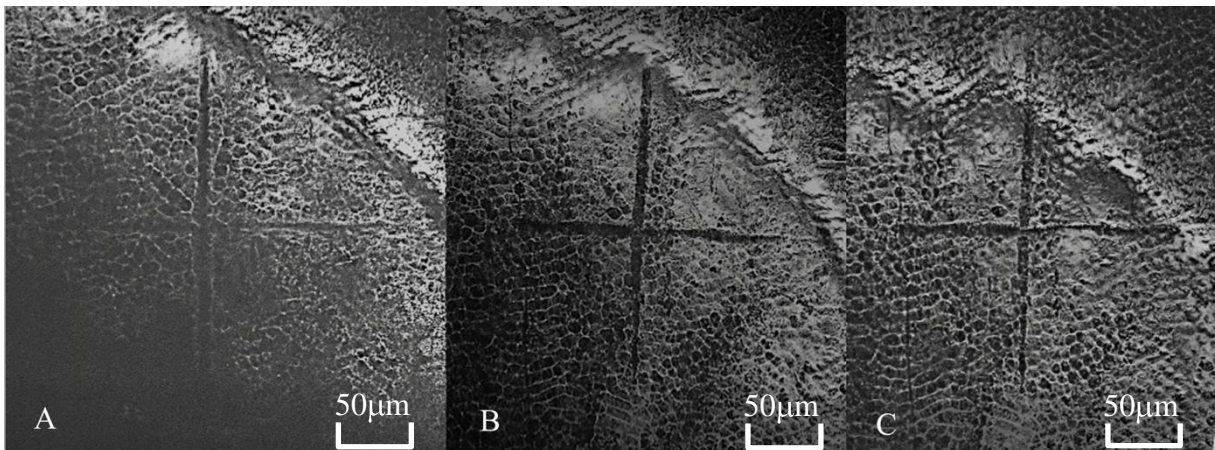
Para análise estatística da rugosidade, foram obtidas as médias das quatro leituras de cada fragmento. Sendo assim, foi registrado um valor médio de S_q e S_a para cada corpo-de-prova. Buscou-se assim, a eliminação da variabilidade inerente à amostra biológica não planejada, por não haver garantia da realização das medidas exatamente no mesmo local. Foi obtido um $n=10$. Já para as medidas de nanodureza e módulo de elasticidade provenientes dos testes de nanoindentação foram considerados os valores de ambos os testes realizados por amostra ($n=20$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software “SPSS 20.0 for Windows” (2011), com nível de significância de 5%. A análise de variância *two-way* ANOVA por medidas repetidas foi utilizada levando em consideração os fatores tempo e procedimento clareador. Desse modo foi possível a avaliação da amostra com a evolução dos procedimentos. A comparação múltipla dos resultados através do teste *Tukey* também foi utilizada na avaliação dos dados.

4 RESULTADOS

4.1 Análise qualitativa das imagens através de CLSM

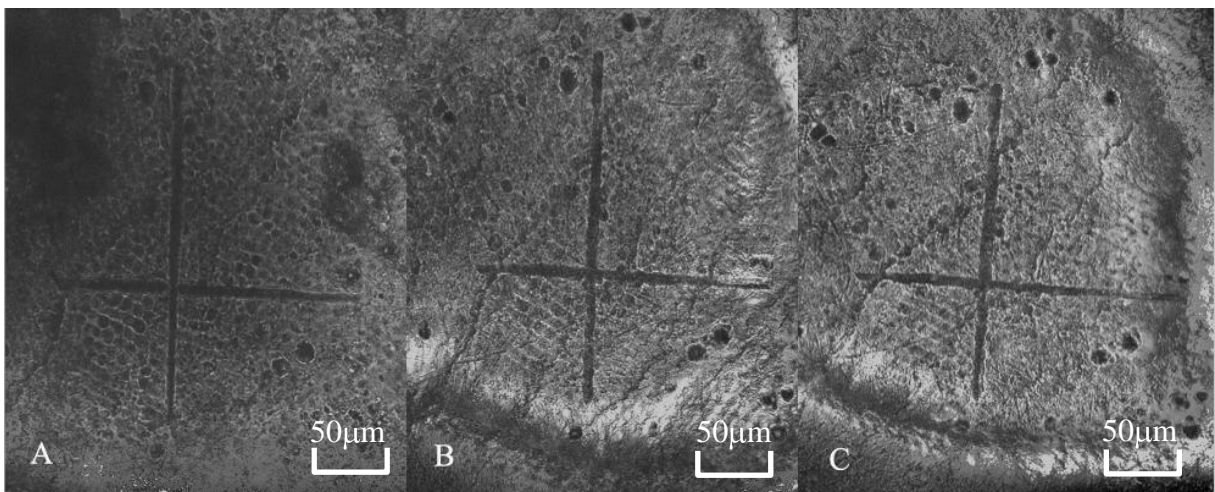
As análises das imagens por CLSM se mostraram pertinentes e complementares às imagens de AFM por possibilitar a avaliação de uma maior área da amostra sem destruí-la. Foi possível a visualização de toda a região envolvida nas leituras de AFM assim como de alterações nas demarcações realizadas como guia para as leituras. Foram apresentadas as imagens mais significativas de um mesmo espécime dentro de cada grupo e sua evolução nos intervalos de tempo nas figuras 19, 20, 21, 22.

Figura 19 – Grupo I (controle).



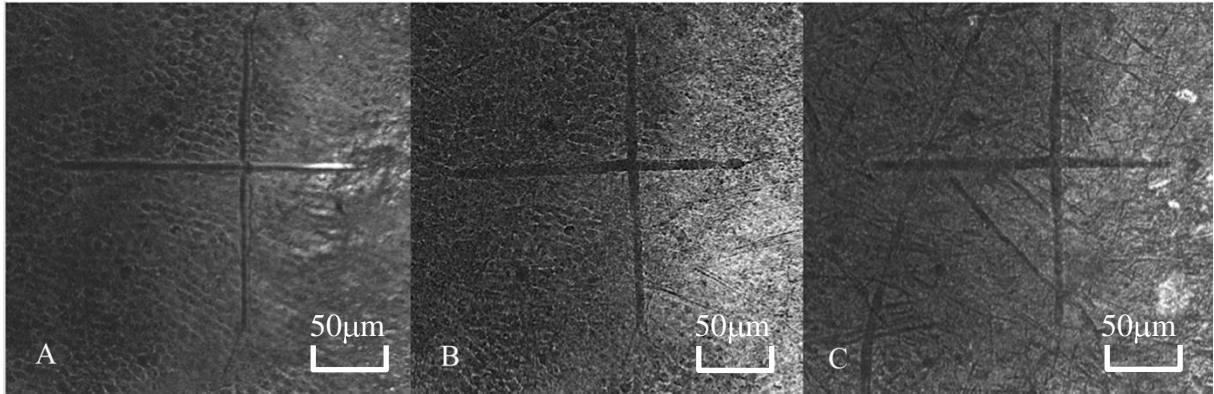
Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Figura 20 – Grupo II (PC 10%).



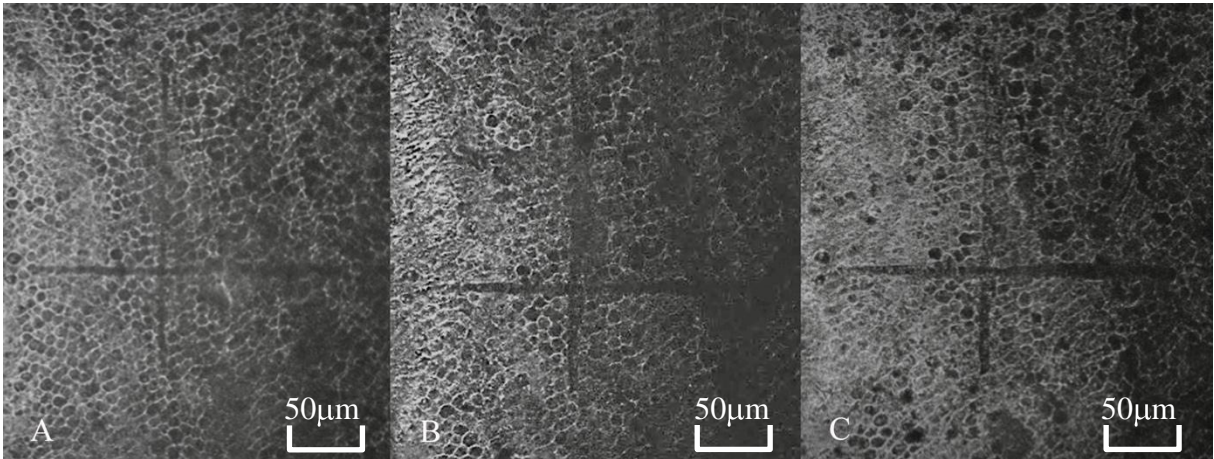
Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Figura 21 – Grupo III (H_2O_2 10%).



Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Figura 22 – Grupo IV (tiras clareadoras).



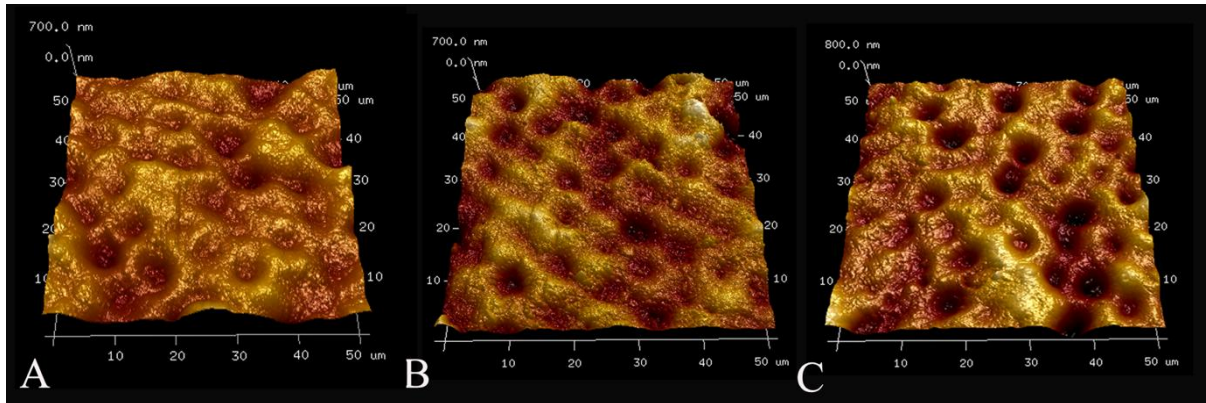
Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Nos grupos I e II não foram observadas alterações significativas nas imagens obtidas nos diferentes intervalos de tempo. Por outro lado, as amostras clareadas com H_2O_2 (grupos III e IV) apresentaram variações na morfologia detectada. Para o grupo III, houve um sutil aumento na profundidade da cruz após 4 semanas de aplicação. Após 8 semanas, foi evidente a presença de riscos na amostra provenientes da escovação. Além disso, não foi mais possível observar a presença de prismas, evidente na figura 21C. Esses eventos foram também observados através de AFM. Do mesmo modo, o grupo IV apresentou aumento na profundidade da cruz após 4 semanas (Figura 22B) e, após 8 semanas (Figura 22C), perda de bastões em algumas das áreas. Estas alterações estão provavelmente relacionadas à desorganização do padrão prismático, com perda de camadas superficiais pela combinação de tiras clareadoras e escovação nos padrões propostos.

4.2 Análise qualitativa das imagens através de AFM

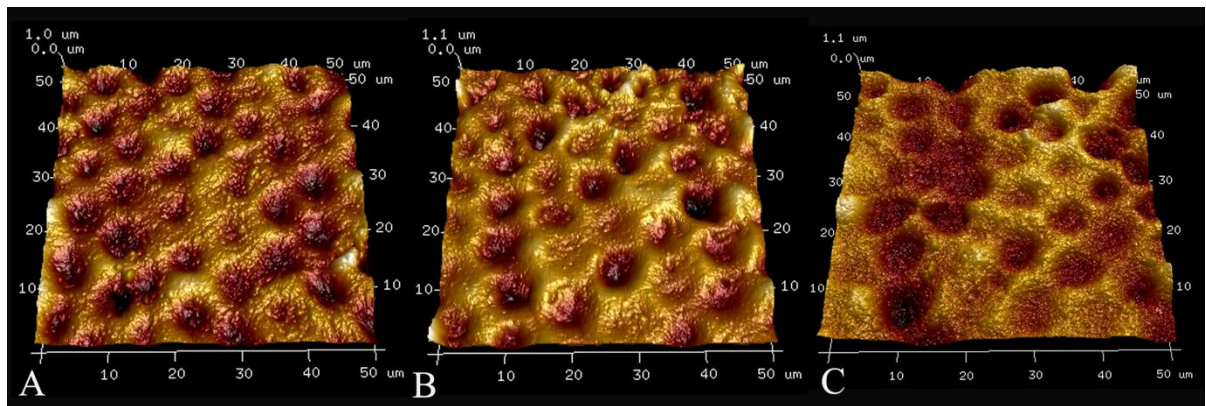
As figuras 23, 24, 25 e 26 trazem exemplos da morfologia de amostras tratadas e a evolução dos grupos conforme o tempo de aplicação. As imagens obtidas sem planificação e polimento, permitiram que inicialmente todos os grupos apresentassem estrutura prismática de fácil identificação, possibilitando o acompanhamento do efeito do clareamento diretamente na superfície *in natura*. Na figura 23 pode-se observar que o grupo controle não aparentou alterações somente com a escovação e o armazenamento em saliva artificial. A estrutura prismática pode ser bem observada e identificada em todos os intervalos. Na figura 24, as amostras que passaram por procedimento clareador com PC 10% também não apresentaram evidências de modificação da superfície. Após 8 semanas (Figura 24C), foi possível a verificação de uma estrutura mais granulosa, com pequenos pontos na superfície: as nanopartículas de cristais de HAp. As imagens por AFM também demonstraram maiores alterações nas superfícies tratadas com H₂O₂. A figura 25, que representa os espécimes clareados com H₂O₂ a 10%, apresentou mudanças significativas nos intervalos de tempo testados. Após 4 semanas (Figura 25B), a estrutura prismática passou a não estar bem definida, com uma degradação do padrão observado inicialmente. Os maiores efeitos na morfologia, no entanto, foram observados após as 8 semanas de clareamento (Figura 25C), em que o padrão prismático foi completamente perdido, sendo observados apenas resquícios, com uma superfície mais suave, com menos da caracterização inicial da amostra. Além disso, puderam ser observados riscos nos espécimes, contribuição do desgaste promovido pela escovação, compatível com remoção de camadas superficiais. Os espécimes ilustrados na figura 26 também apresentam características marcantes após utilização de tiras clareadoras. Após 4 semanas (Figura 26B), os prismas ficaram mais evidentes e sugere-se uma perda de substância principalmente na região interprismática. Esta parece ter porções removidas, o que pode ser ação da escovação combinada com a terapia. Já após 8 semanas (Figura 26C), o padrão prismático ficou mais sutil e pouco evidente, porém em menor intensidade quando comparado ao grupo III. Alguns riscos foram observados na superfície assim como poucos prismas remanescentes.

Figura 23 – Grupo I (control).



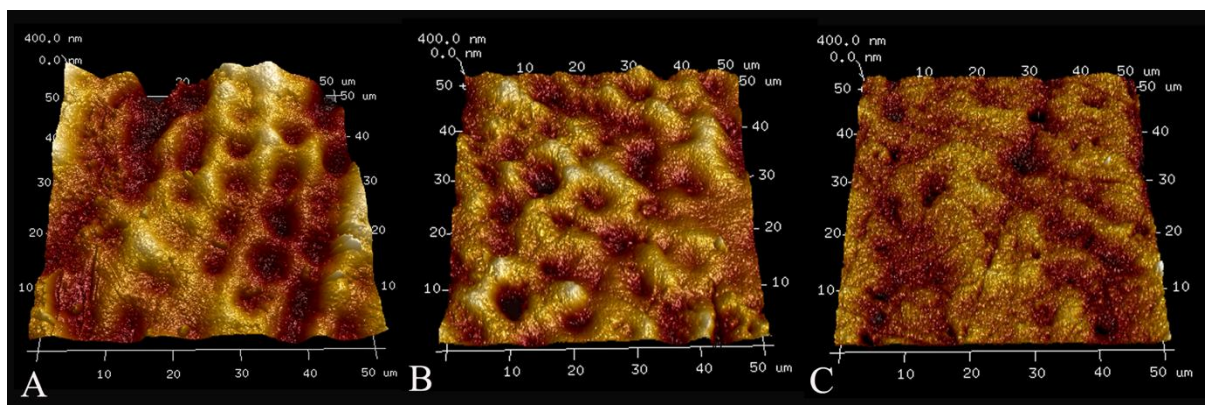
Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Figura 24 – Grupo II (PC 10%).



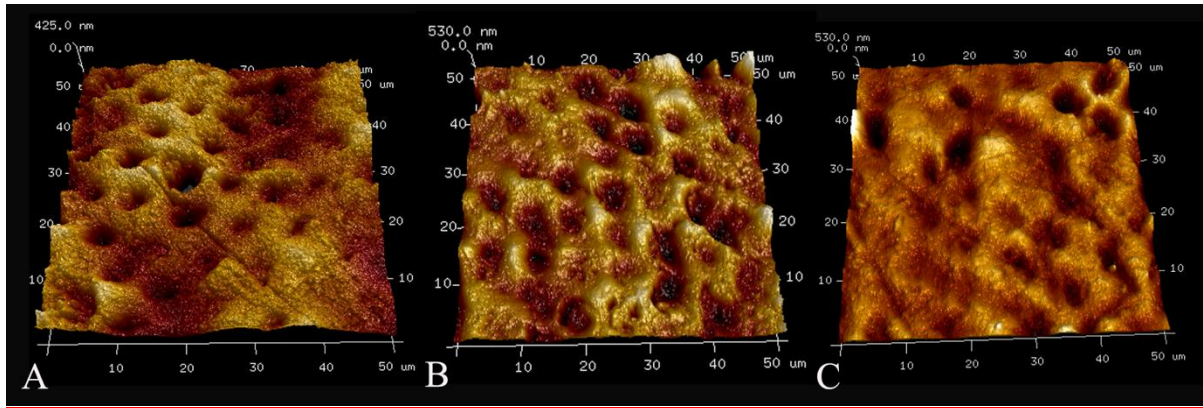
Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Figura 25 – Grupo III (H₂O₂ 10%).



Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

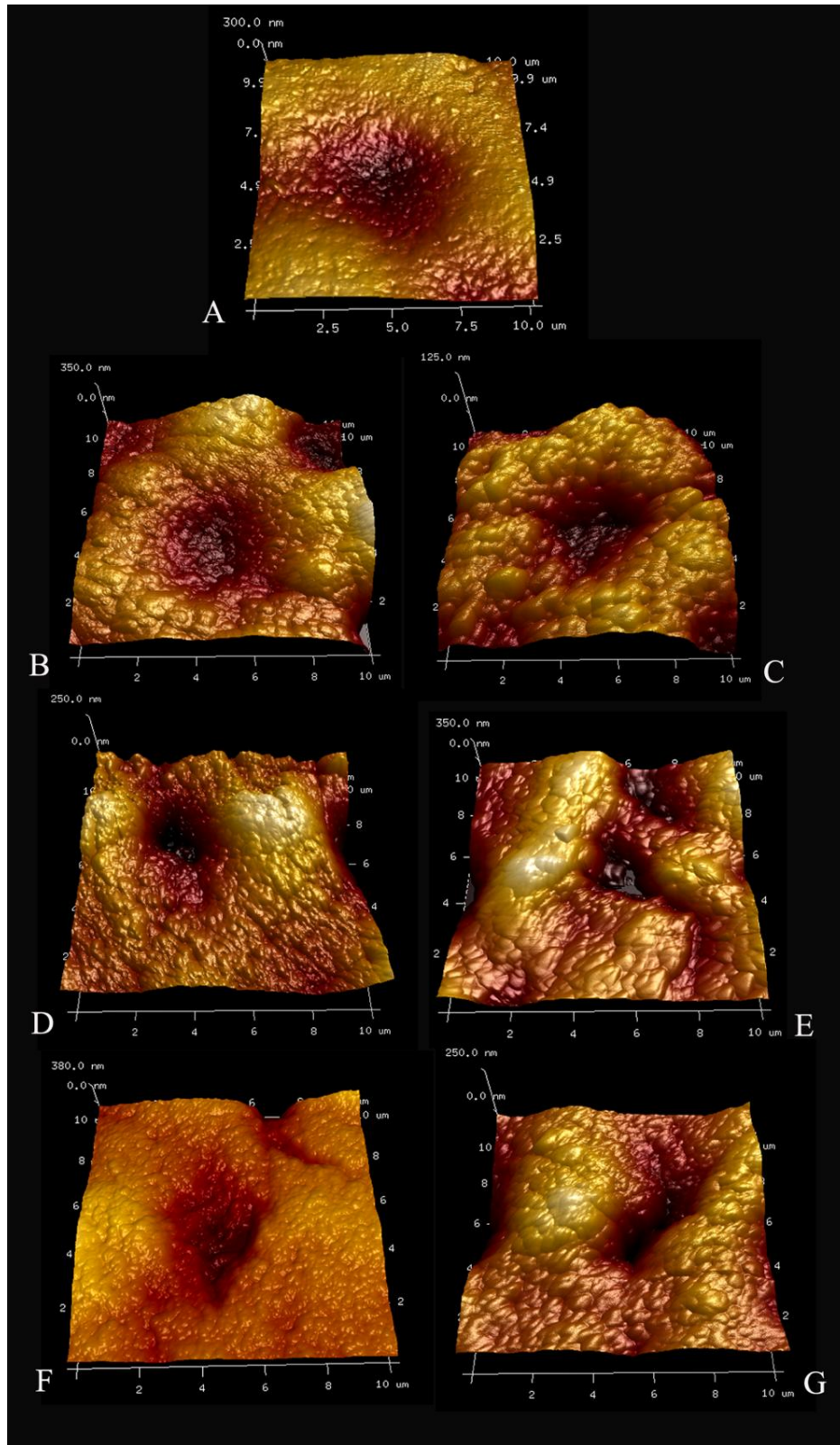
Figura 26 – Grupo IV (tiras clareadoras).



Legenda: A – inicial; B – pós 4 semanas; C – pós 8 semanas

Também foram realizadas imagens em maior aumento ($10 \times 10 \mu\text{m}$) para possibilitar a avaliação da região de um bastão, que apresenta diâmetro em torno de 5 a $7 \mu\text{m}$ (Figura 27). Assim, seria possível verificar eventuais alterações nos cristais de HAp que o compõem. Inicialmente, na figura 27A, pôde-se observar a presença de granulações bem finas, com menor exposição dos cristais. Após utilização de PC a granulação passou a ser mais evidente, principalmente após 8 semanas (figura 27C). Tal evento pode até mesmo ser observado na imagem de menor aumento ($50 \times 50 \mu\text{m}$), em que a figura 24C pós 8 semanas aparece com um aspecto granulado, provavelmente proveniente da maior exposição dos cristais alcançada por tais clareadores. Um padrão semelhante pode ser observado para o clareamento com H_2O_2 e com tiras clareadoras (figura 27D, E, F e G). A aplicação de tiras clareadoras por 4 semanas pareceu ter menos efeitos sobre na exposição dos cristais.

Figura 27 – Evolução dos prismas



Legenda: A – Inicial; B – após 4 semanas de clareamento com peróxido de carbamida; C – após 8 semanas de clareamento com peróxido de carbamida; D – após 4 semanas de clareamento com peróxido de hidrogênio; E – após 8 semanas de clareamento com peróxido de hidrogênio; F – após 4 semanas de clareamento com tiras clareadoras; G – após 8 semanas de clareamento com tiras clareadoras.

4.3 Análise de rugosidade através de AFM

A tabela 1 mostra a média final de cada grupo e seu desvio padrão para os intervalos de procedimentos testados.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão dos valores de Sa e Sq para cada grupo (nm), durante todo o tratamento

Tempo	Grupo	Sa	Sq
Inicial	I	109,01 ± 9,70	128,40 ± 10,67
	II	109,48 ± 11,54	127,22 ± 9,54
	III	109,25 ± 10,10	129,40 ± 9,64
	IV	108,97 ± 12,91	126,64 ± 9,53
4 semanas	I	107,95 ± 10,51	127,20 ± 9,04
	II	105,33 ± 10,06	125,48 ± 9,29
	III	112,85 ± 10,47	125,55 ± 9,21
	IV	112,11 ± 11,49	132,62 ± 8,57
8 semanas	I	108,51 ± 9,44	128,20 ± 9,89
	II	108,43 ± 10,08	125,93 ± 9,35
	III	93,48 ± 9,04	108,16 ± 10,32
	IV	99,34 ± 8,52	116,18 ± 9,07

Houve diferença estatística, para o parâmetro Sa, do grupo III após 8 semanas de aplicação do gel a base de H₂O₂ 10%, quando comparado aos valores: iniciais e pós 4 semanas dos espécimes do mesmo grupo e do grupo IV e iniciais do grupo I e II (valores de $p < 0,05$). Isso pode ser observado no gráfico 1 que ilustra a distribuição das médias dos grupos de maneira linear. Já o gráfico 2 demonstra a evolução dos valores de Sa com o passar do tempo para os quatro grupos.

Gráfico 1 – Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro Sa

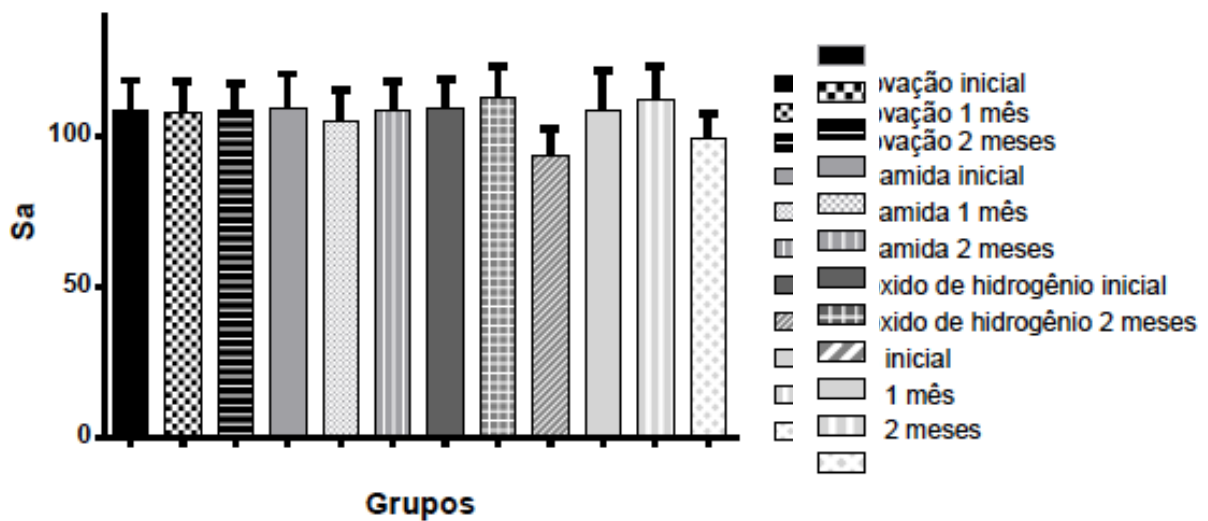
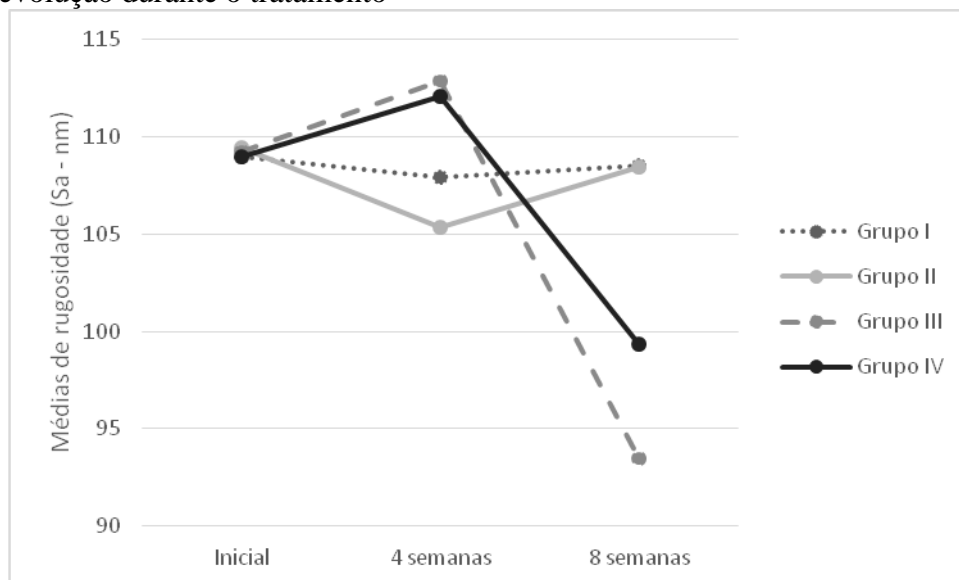


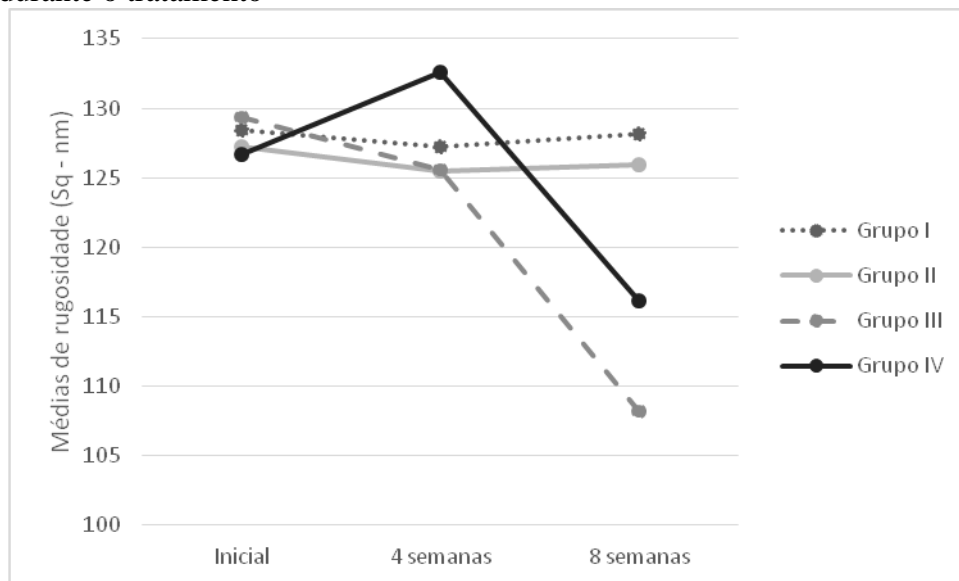
Gráfico 2 – Média dos valores de rugosidade (Sa) dos grupos e sua evolução durante o tratamento



No gráfico 2, pode-se observar que o grupo I manteve sua rugosidade nos intervalos testados. O grupo II, apresentou uma pequena queda após 4 semanas e recuperação dos valores iniciais após 8 semanas de utilização (sem diferença estatística). Os grupos III e IV apresentaram o mesmo padrão de resposta, com aumento de rugosidade e posterior queda na mesma. Todos os dados de Sa obtidos são condizentes com o que foi observado qualitativamente nas imagens apresentadas anteriormente. Nas primeiras imagens, a estrutura prismática parece mais exposta e evidente, tendo sido desorganizado o padrão encontrado. Após 8 semanas, em ambos os grupos que usaram peróxido de hidrogênio, o arranjo parece

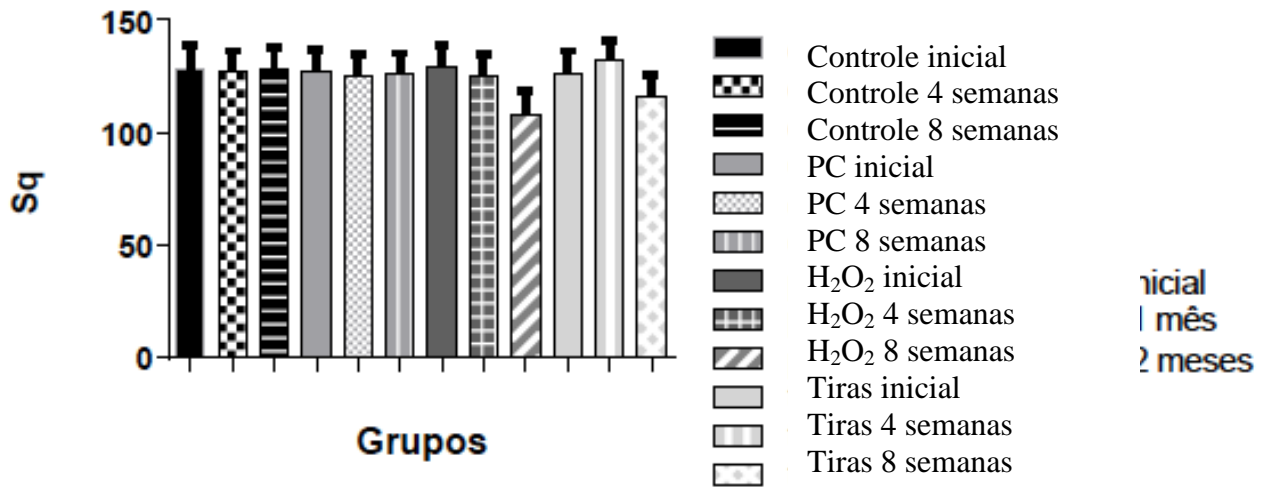
ter sido completamente perdido, com prismas mais suaves e menos evidentes e assim menores valores de rugosidade. O mesmo comportamento foi observado para os valores obtidos para o parâmetro Sq, como pode ser observado no gráfico 3. A exceção se encontra no grupo III que apresentou uma queda constante, o que também pode ser esperado pela perda progressiva da estrutura, de camadas superficiais.

Gráfico 3 – Média dos valores de rugosidade (Sq) dos grupos e sua evolução durante o tratamento



No teste *Tukey*, para os valores de Sq, houve diferença estatística do grupo III após 8 semanas de utilização quando comparados aos valores de todos os outros grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo IV, também após 8 semanas. Dentro do grupo IV, houve diferença estatisticamente significativa entre os intervalos 1 e 2 (pós 4 e 8 semanas) deste procedimento. Isso pode ser observado no gráfico 4 com a distribuição linear dos valores de rugosidade para o parâmetro Sq.

Gráfico 4 – Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro Sq



4.4 Análise de composição através de microespectroscopia Raman

Os espectros médios obtidos nos intervalos para os grupos são apresentados a seguir. Para o primeiro grupo de espectros (Figuras 28-35), picos relativos aos componentes inorgânicos são relacionados a presença de Ca e PO_4 , provenientes da molécula de HAp (CAVALLI et al., 2011; SA et al., 2012). A banda característica do $\nu_1 \text{PO}_4$ em 960cm^{-1} esteve presente em todos os espécimes. Do mesmo modo, foi possível identificar $\nu_2 \text{PO}_4$ em 430cm^{-1} , $\nu_4 \text{PO}_4$ em 591cm^{-1} e $\nu_3 \text{PO}_4$ em 1028cm^{-1} . O *stretching* característico do carbonato esteve presente em 1075cm^{-1} . Não foram observadas alterações nesses picos para os intervalos.

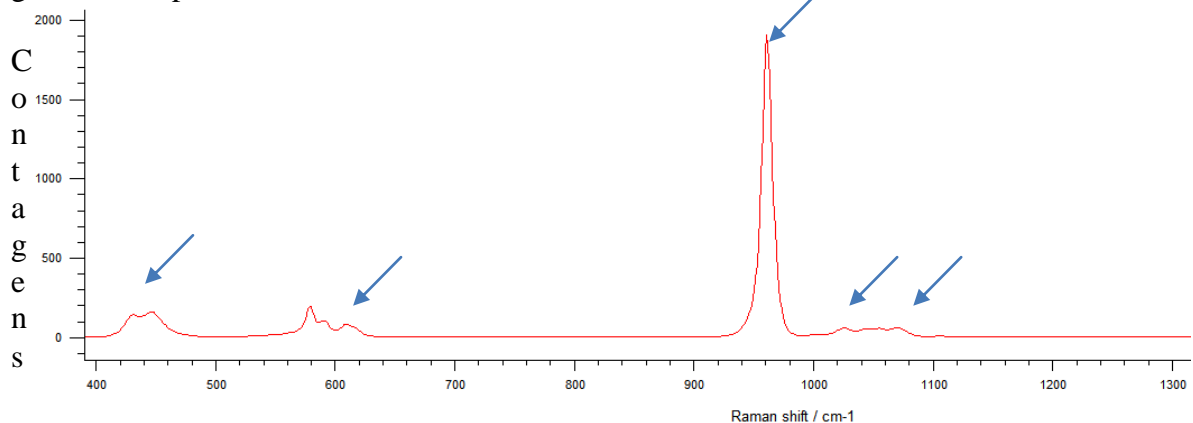
Figura 28 – Espectro PO_4 e carbonato inicial

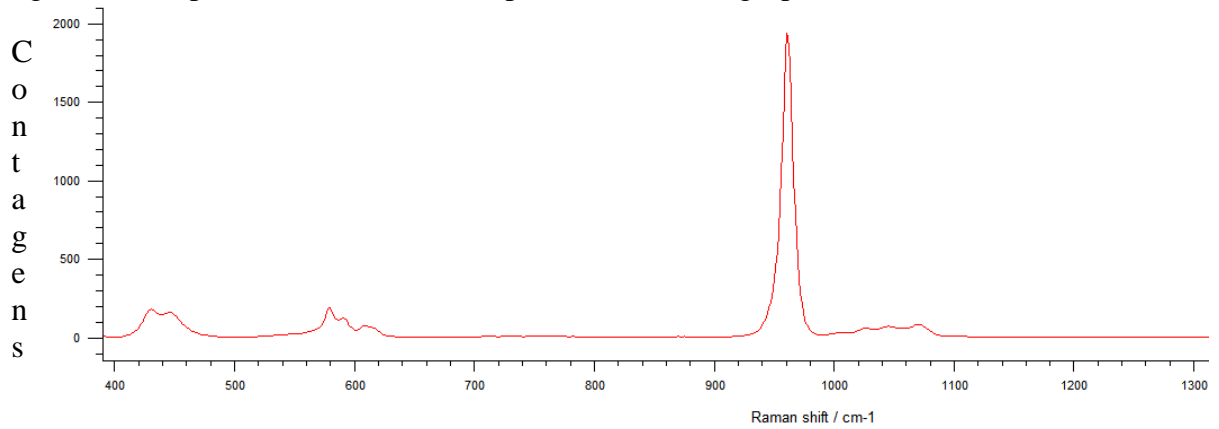
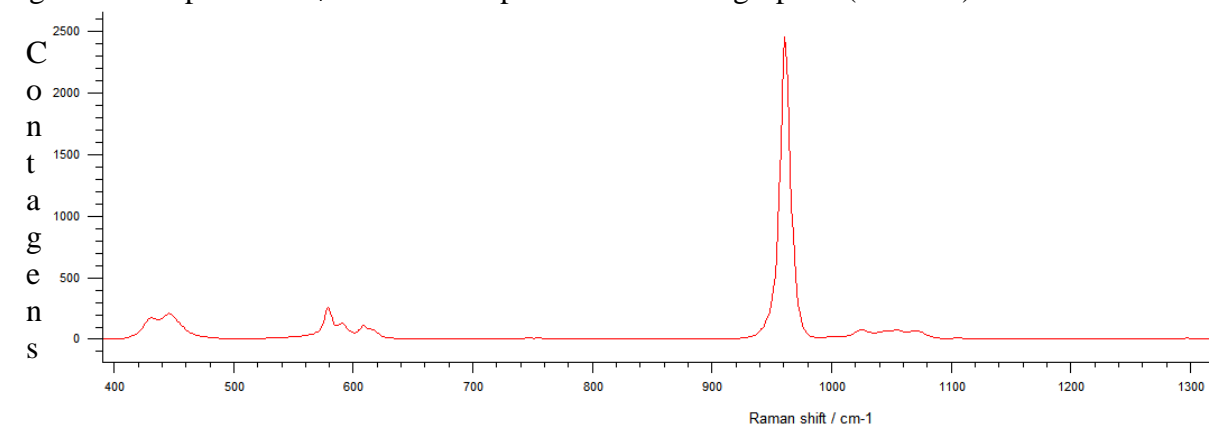
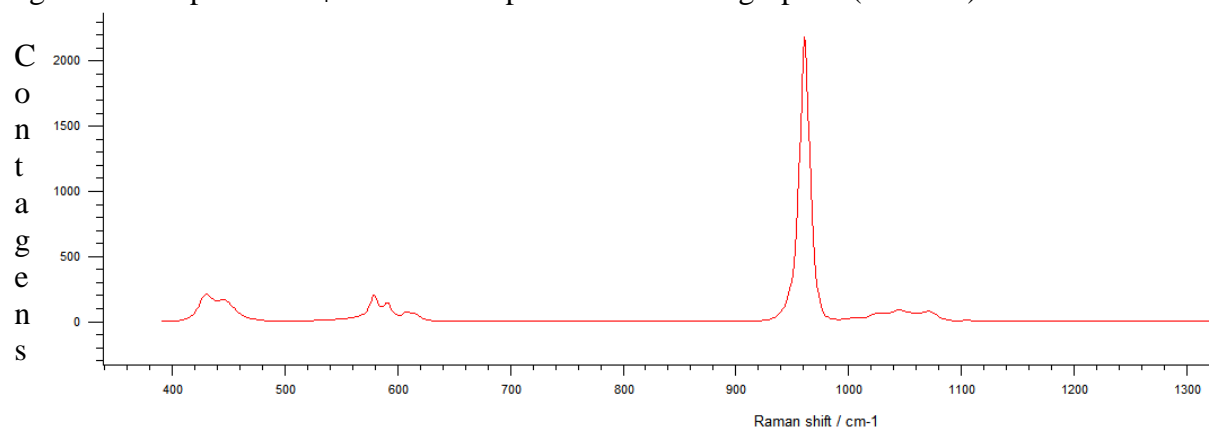
Figura 29 – Espectro PO_4 e carbonato após 8 semanas do grupo I (controle)Figura 30 - Espectro PO_4 e carbonato após 4 semanas do grupo II (PC 10%)Figura 31 – Espectro PO_4 e carbonato após 8 semanas do grupo II (PC 10%)

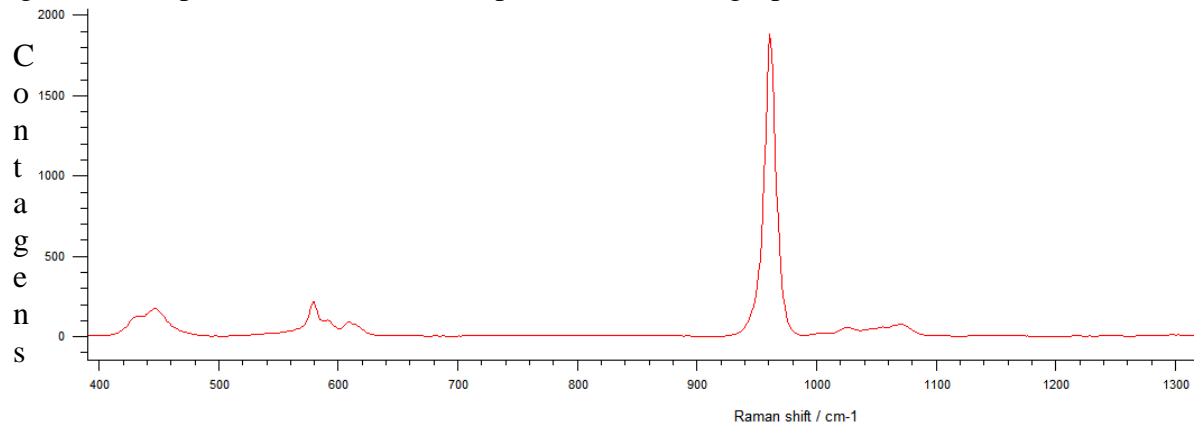
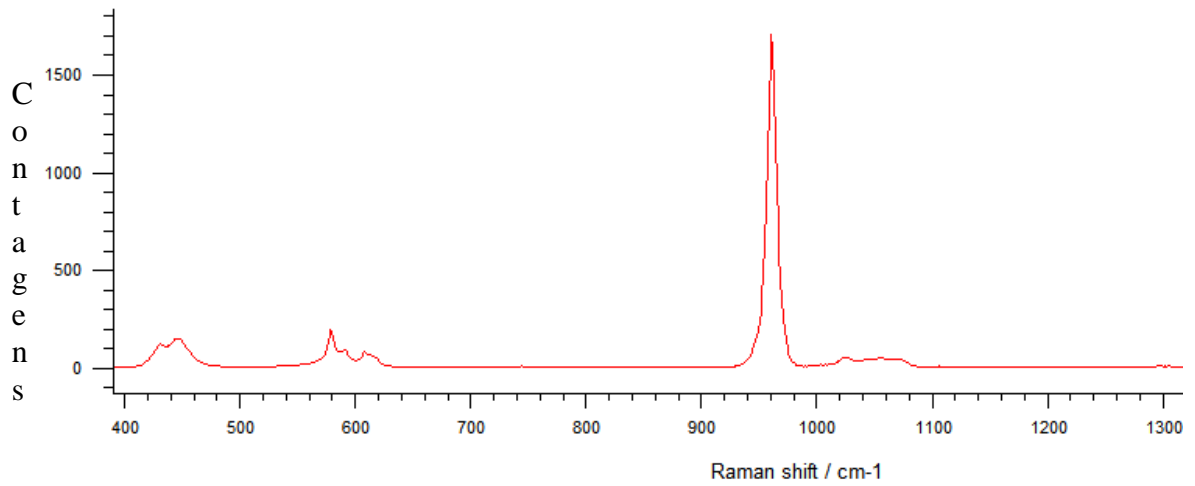
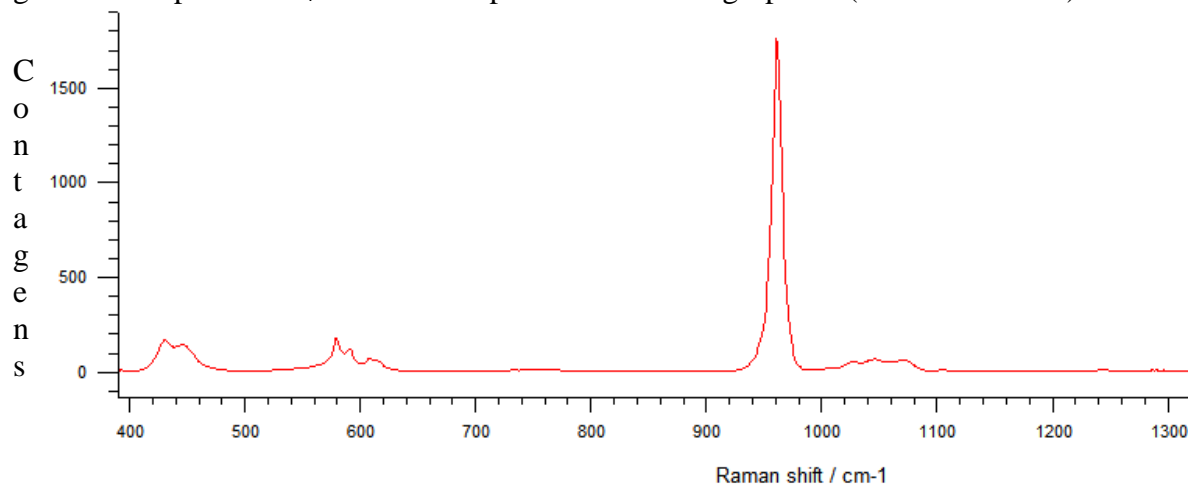
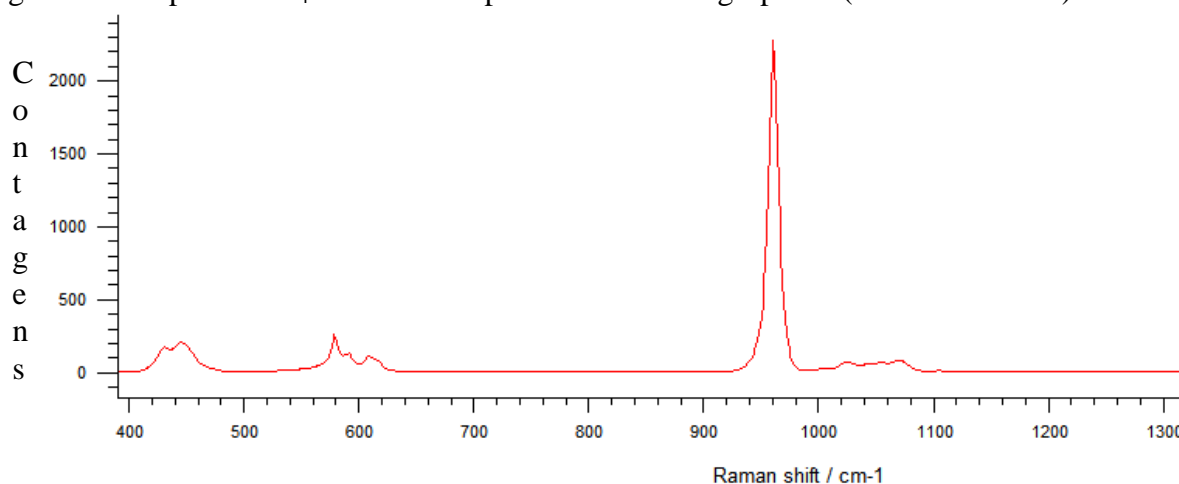
Figura 32 – Espectro PO_4 e carbonato após 4 semanas do grupo III (H_2O_2 10%)Figura 33 – Espectro PO_4 e carbonato após 8 semanas do grupo III (H_2O_2 10%)Figura 34 – Espectro PO_4 e carbonato após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)

Figura 35 – Espectro PO₄ e carbonato após 8 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)



Para detecção dos espectros relacionados ao conteúdo orgânico, as leituras foram realizadas com centro em 1665cm^{-1} . As Figuras 36-43 representam o segundo grupo de espectros através da média obtida na área de um prisma para cada grupo. Apenas um espectro que melhor exemplificou o comportamento das amostras foi representado. As Figuras 37-39 mostram que o grupo I após 8 semanas e o grupo II após 4 e 8 semanas não apresentaram diferenças quando comparados ao controle. Após 8 semanas com escovação houve um pequeno aumento na contagem, assim como após 4 semanas no grupo II. Entretanto, para as amostras do grupo III após 4 semanas, as alterações com aumento na detecção no pico 1450cm^{-1} relativo ao C-H *bending* de ligações das moléculas de proteína foi mais evidente. Do mesmo modo, o pico 1243cm^{-1} correspondente à amida I apresentou acréscimo de contagem nesse intervalo. Os demais picos (1552cm^{-1} correspondente a ligações de oxigênio e 1675cm^{-1} a amida III - GOO et al., 2004; SCHULZE et al., 2004) parecem ter sido reduzidos, porém trata-se apenas do efeito da mudança de escala, com os valores de contagem permanecendo similares ao controle. Após 8 semanas, os grupos III e IV clareados com H₂O₂, tiveram uma queda na detecção, de modo que para o grupo IV os espectros voltaram a ser similares ao controle enquanto no grupo III ainda permaneceram com contagens maiores que o controle.

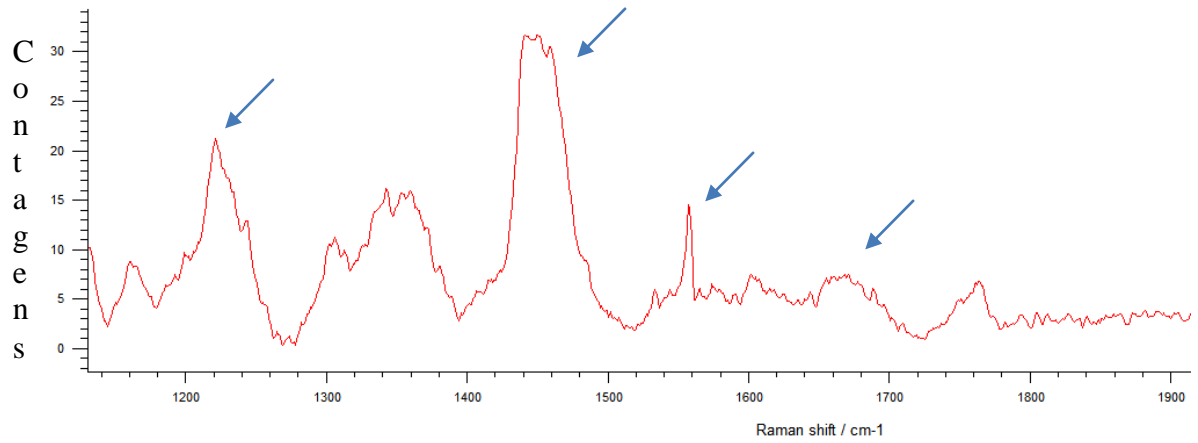
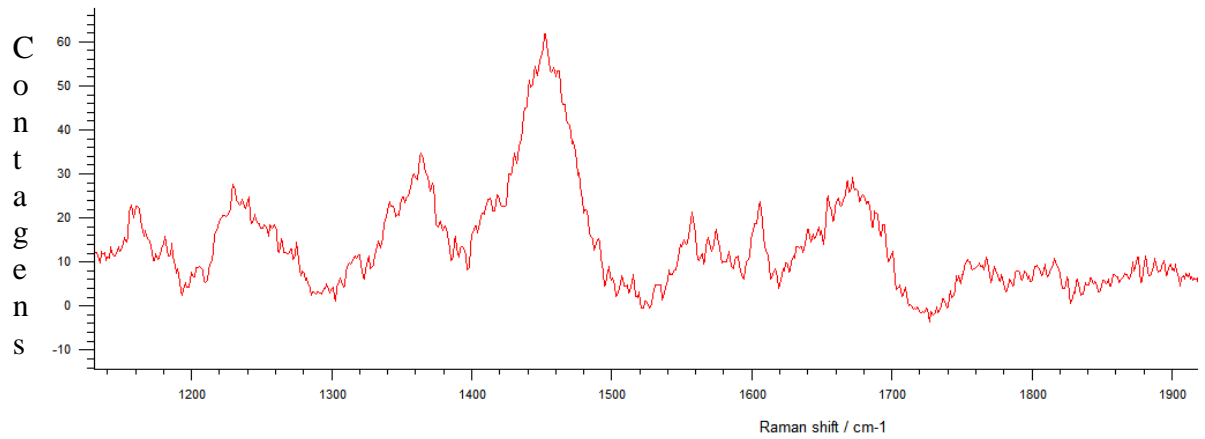
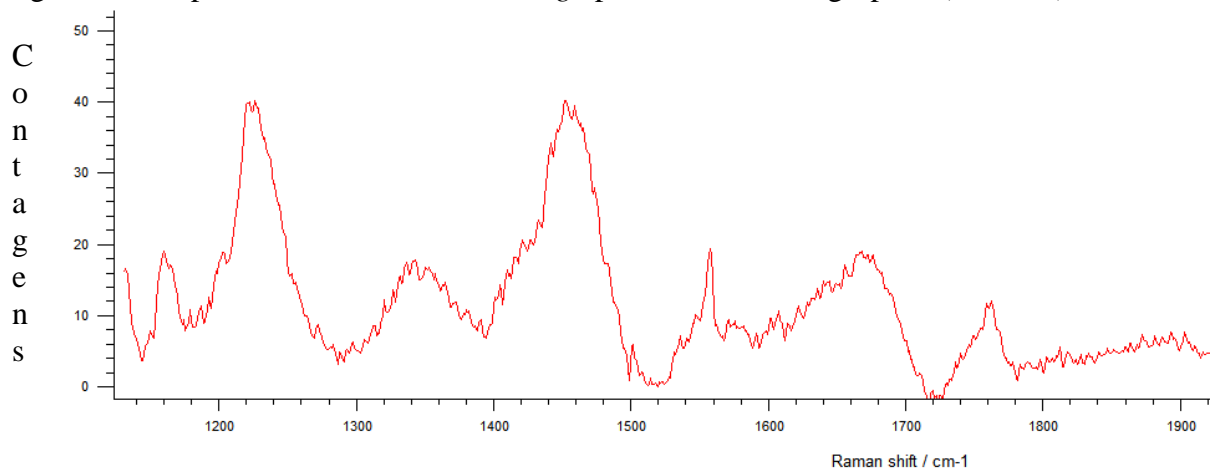
Figura 36 – Espectro amida I e C-H *bending* inicialFigura 37 – Espectro amida I e C-H *bending* após 8 semanas do grupo I (controle)Figura 38 – Espectro amida I e C-H *bending* após 4 semanas do grupo II (PC 10%)

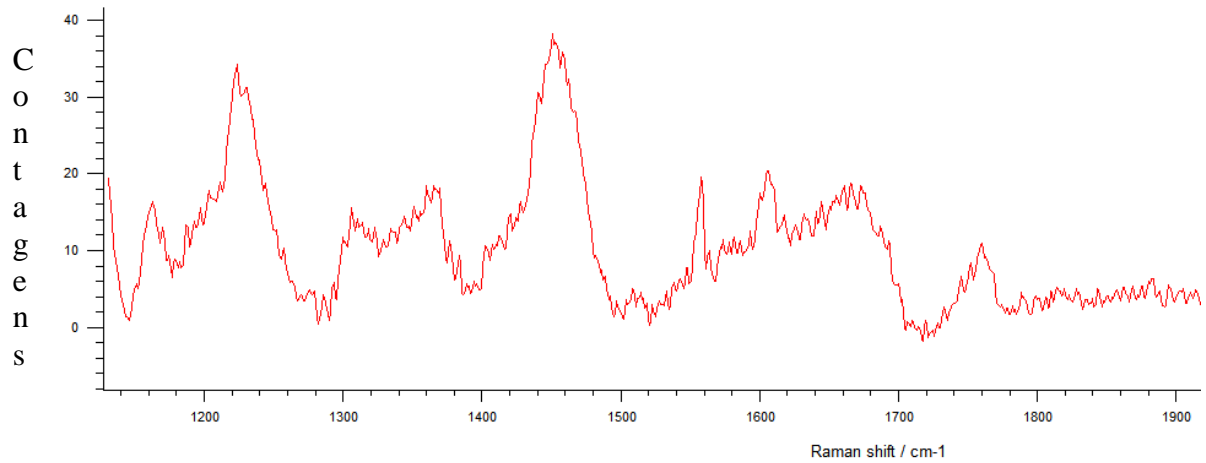
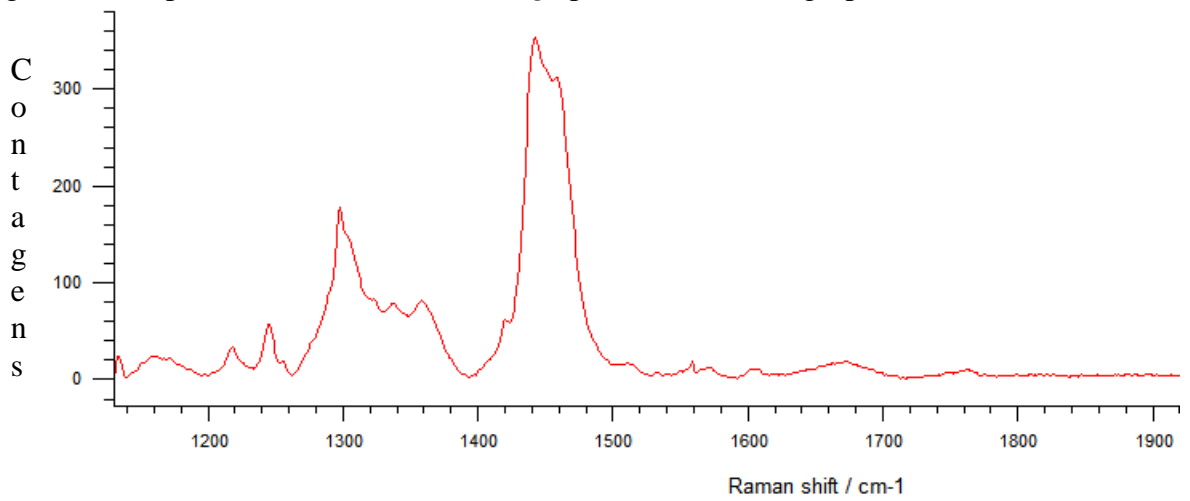
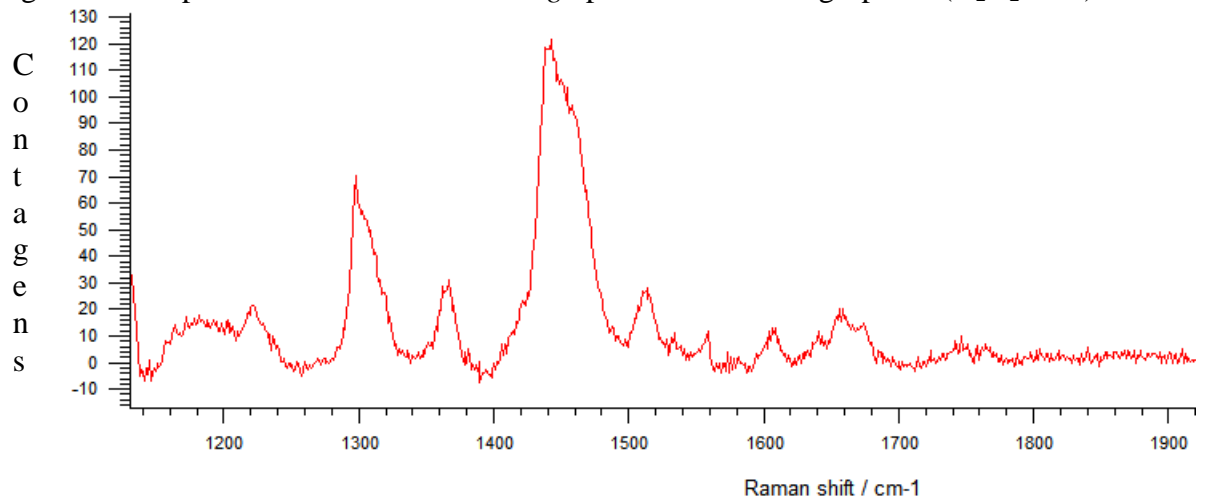
Figura 39 – Espectro amida I e C-H *bending* após 8 semanas do grupo II (PC 10%)Figura 40 – Espectro amida I e C-H *bending* após 4 semanas do grupo III (H₂O₂ 10%)Figura 41 – Espectro amida I e C-H *bending* após 8 semanas do grupo III (H₂O₂ 10%)

Figura 42 – Espectro amida I e C-H *bending* após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)

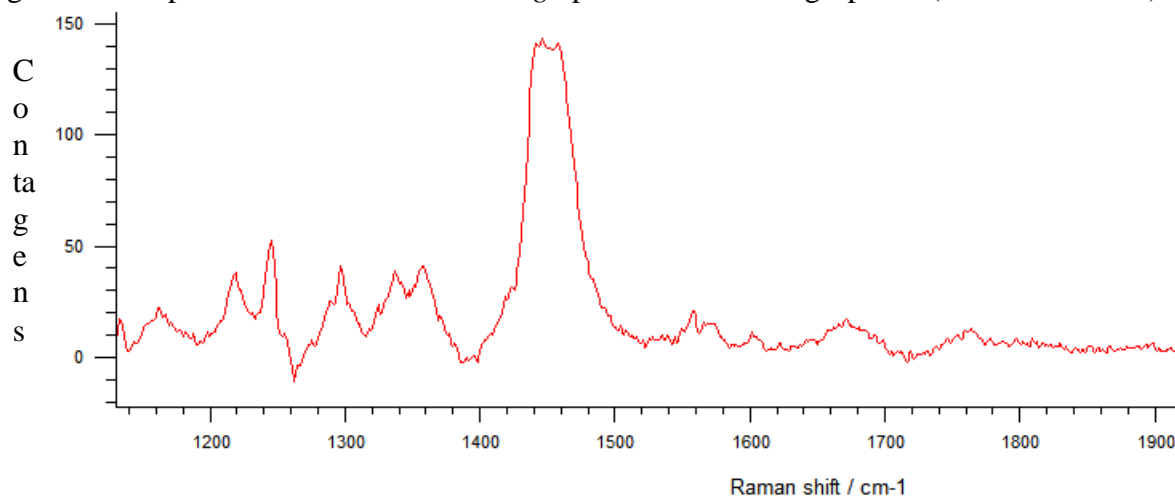
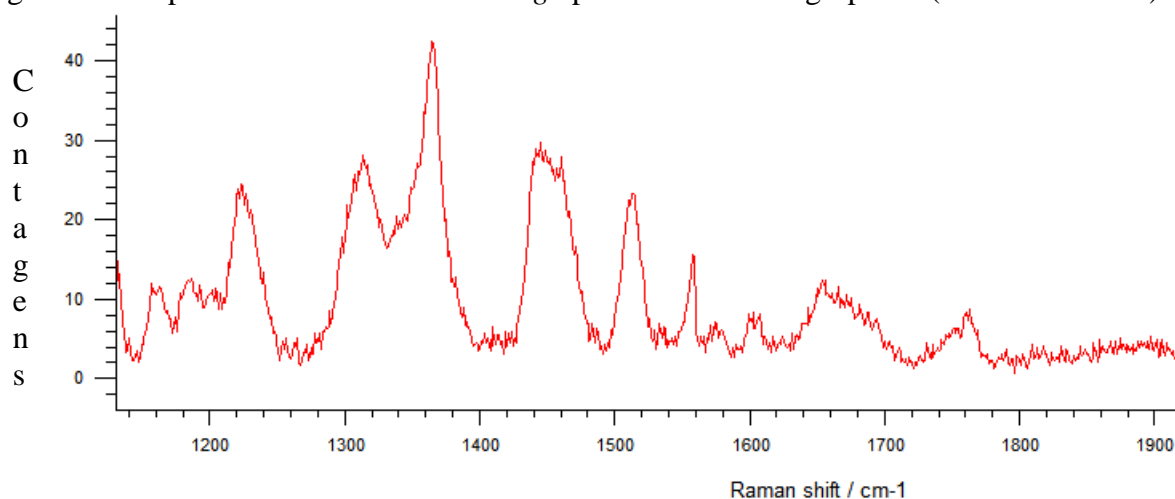


Figura 43 – Espectro amida I e C-H *bending* após 8 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)



Para o terceiro grupo de espectros, adotou-se o centro em 2900cm^{-1} para que fossem detectados outros picos relativos ao conteúdo orgânico. Estes estão localizados em 2881cm^{-1} e 2950cm^{-1} , sendo o último relatado na literatura como relativo ao C-H *stretching* de moléculas orgânicas e o primeiro apenas como característico de conteúdo orgânico (GOO et al., 2004; SCHULZE et al., 2004). O mesmo padrão descrito anteriormente foi encontrado para essas bandas. As figuras 44-51 trazem um espectro médio de exemplo para cada grupo da mesma área analisada nas configurações anteriores. Após 8 semanas com escovação (grupo I), houve um pequeno aumento na contagem, assim como após 4 semanas no grupo II e no grupo IV após ambos os intervalos (Figuras 45, 46, 50 e 51). Entretanto, as amostras do grupo III após 4 semanas, apresentaram o maior aumento na detecção (Figura 48). Este foi seguido de uma

queda para valores próximos ao controle quando o tempo de 8 semanas foi analisado (Figura 49).

Figura 44 – Espectro C-H *stretching* inicial

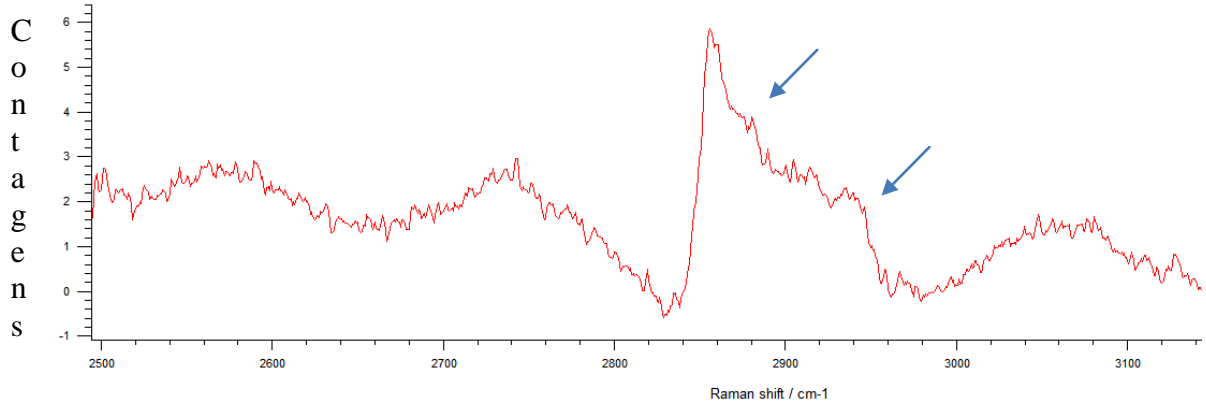


Figura 45 – Espectro C-H *stretching* após 8 semanas do grupo I (controle)

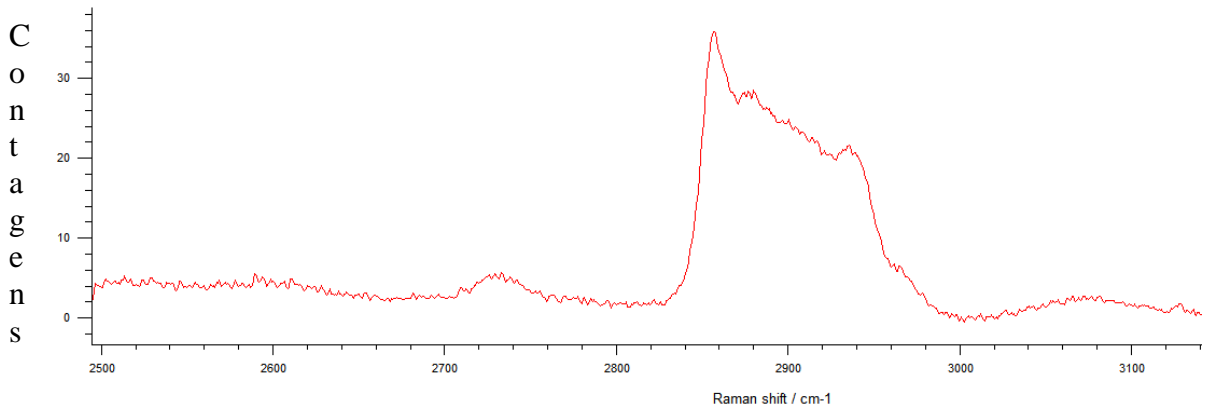


Figura 46 – Espectro C-H *stretching* após 4 semanas do grupo II (PC 10%)

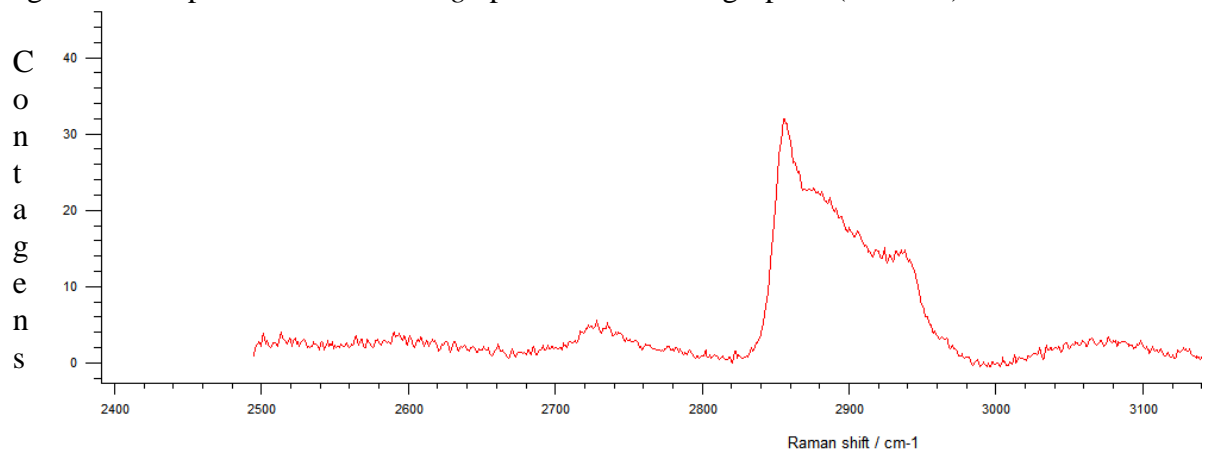


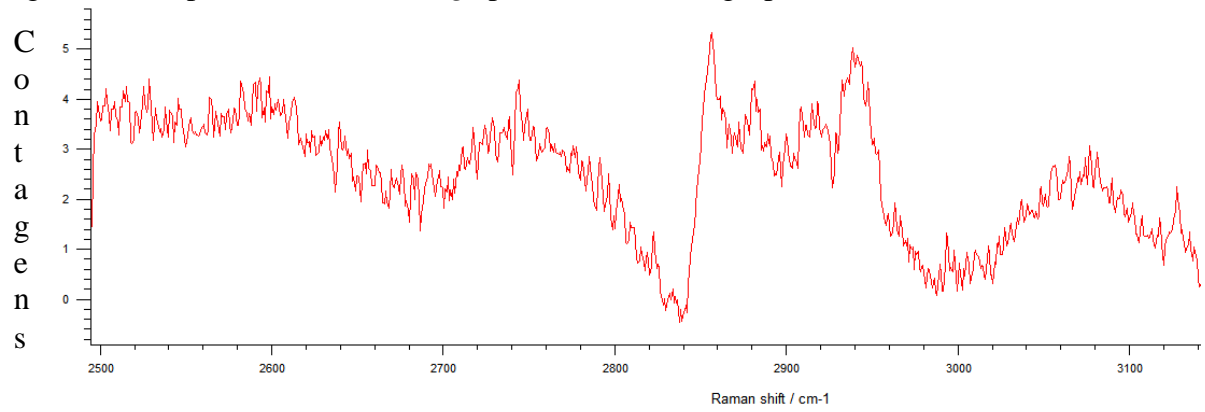
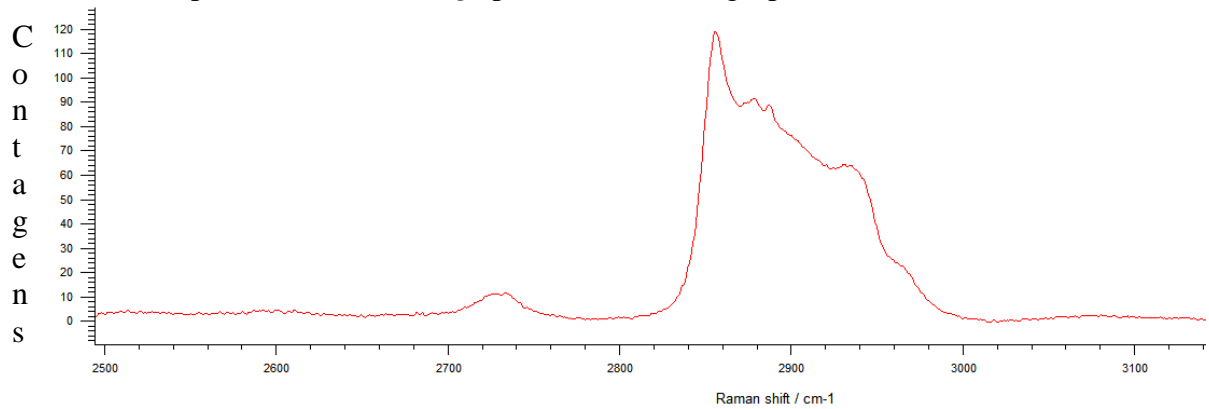
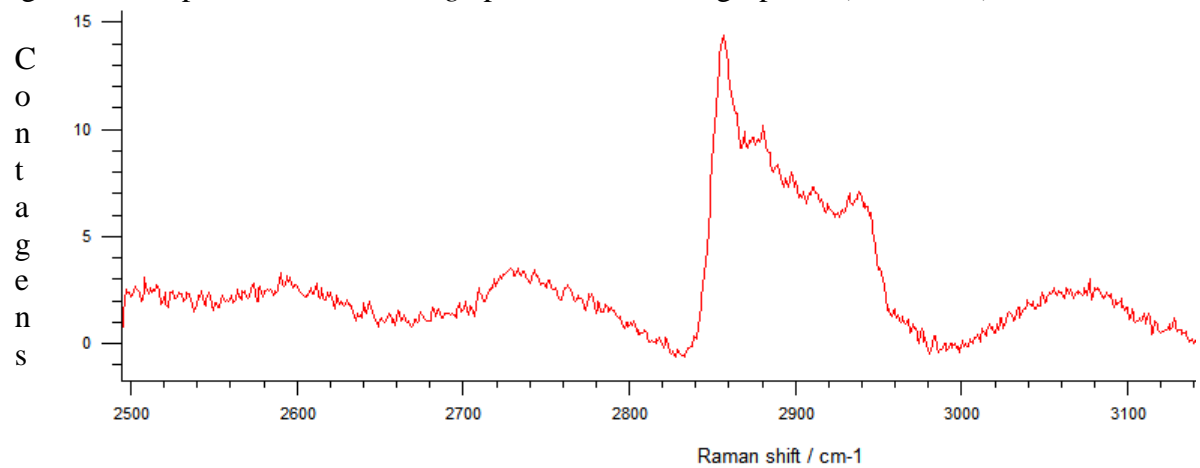
Figura 47 – Espectro C-H *stretching* após 8 semanas do grupo II (PC 10%)Figura 48 – Espectro C-H *stretching* após 4 semanas do grupo III (H₂O₂ 10%)Figura 49 – Espectro C-H *stretching* após 8 semanas do grupo III (H₂O₂ 10%)

Figura 50 – Espectro C-H *stretching* após 4 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)

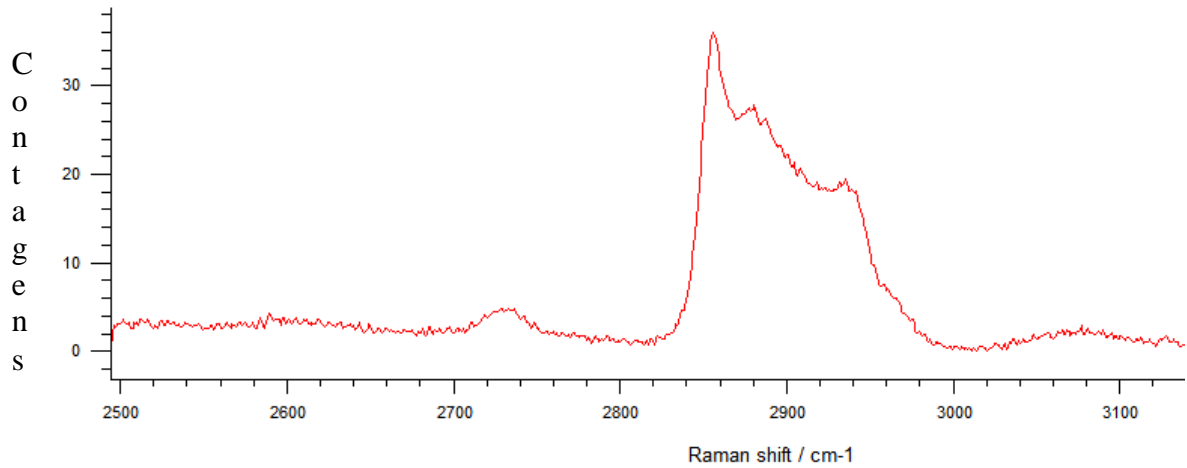
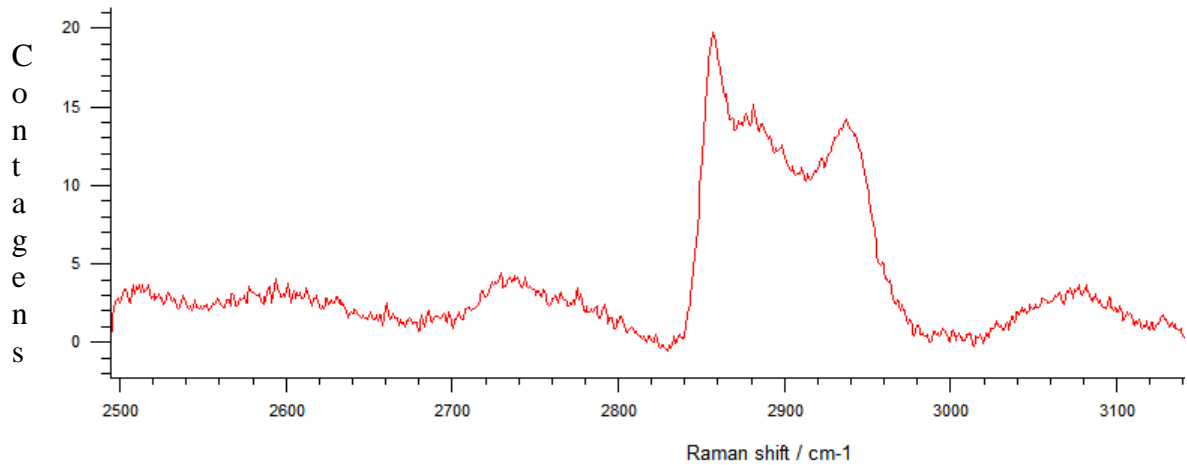


Figura 51 – Espectro C-H *stretching* após 8 semanas do grupo IV (tiras clareadoras)



4.5 Análises de módulo de elasticidade e nanodureza através de nanoindentação

Foram feitas duas medidas de nanoindentação para cada dente e os valores obtidos para o módulo de elasticidade e nanodureza com uma carga de 20mN foram considerados para análise estatística (n=20). A média e o desvio-padrão para estes parâmetros estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio-padrão dos valores de nanodureza e módulo de elasticidade para cada grupo (GPa), durante todo o estudo

Tempo	Grupo	Nanodureza	Módulo de elasticidade
Inicial	I	2,30 ± 0,21	91,91 ± 9,28
	II	2,36 ± 0,27	92,54 ± 7,69
	III	2,35 ± 0,21	92,81 ± 9,02
	IV	2,35 ± 0,23	93,62 ± 9,14
4 semanas	I	2,31 ± 0,22	91,79 ± 8,72
	II	2,34 ± 0,23	92,60 ± 8,68
	III	2,30 ± 0,19	93,69 ± 9,11
	IV	2,32 ± 0,33	95,45 ± 5,43
8 semanas	I	2,33 ± 0,23	92,56 ± 9,39
	II	2,34 ± 0,20	92,39 ± 9,34
	III	2,78 ± 0,20	103,31 ± 8,70
	IV	2,79 ± 0,28	100,99 ± 9,43

No gráfico 5 são apresentadas as tendências ocorridas para módulo de elasticidade com a evolução do tempo. Espécimes do grupo I e grupo II apresentaram manutenção nos valores do módulo de elasticidade. Tal comportamento está de acordo com o observado nas imagens, em que a morfologia da superfície não sofreu alterações. Já os grupos III e IV apresentaram uma tendência de aumento dos valores de módulo de elasticidade. Entretanto, a análise estatística *post Hoc* com o teste *Tukey* não mostrou diferença estatística entre nenhum dos grupos em nenhum dos intervalos ($p > 0,05$). A distribuição linear das médias de módulo de elasticidade está demonstrada no gráfico 6.

Gráfico 5 – Média dos valores de módulo de elasticidade (GPa) durante o tratamento para todos os grupos

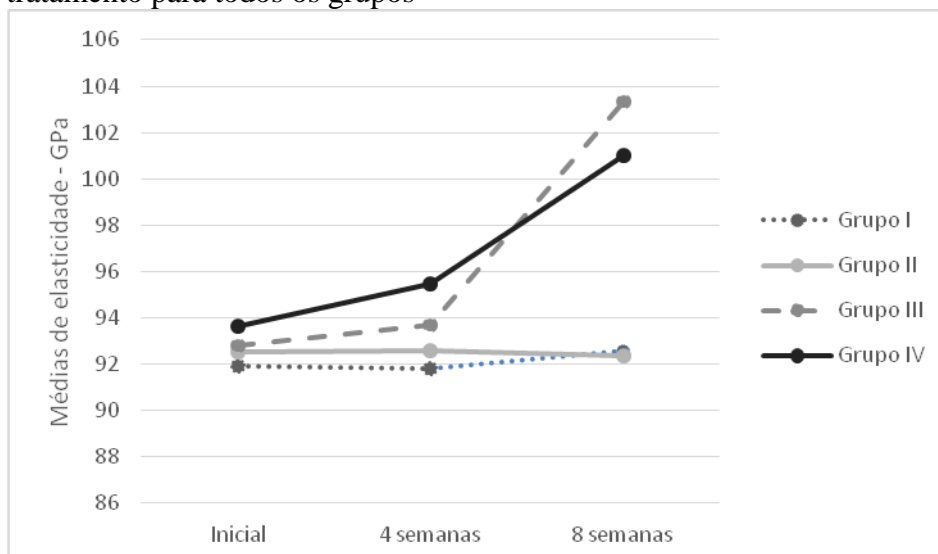
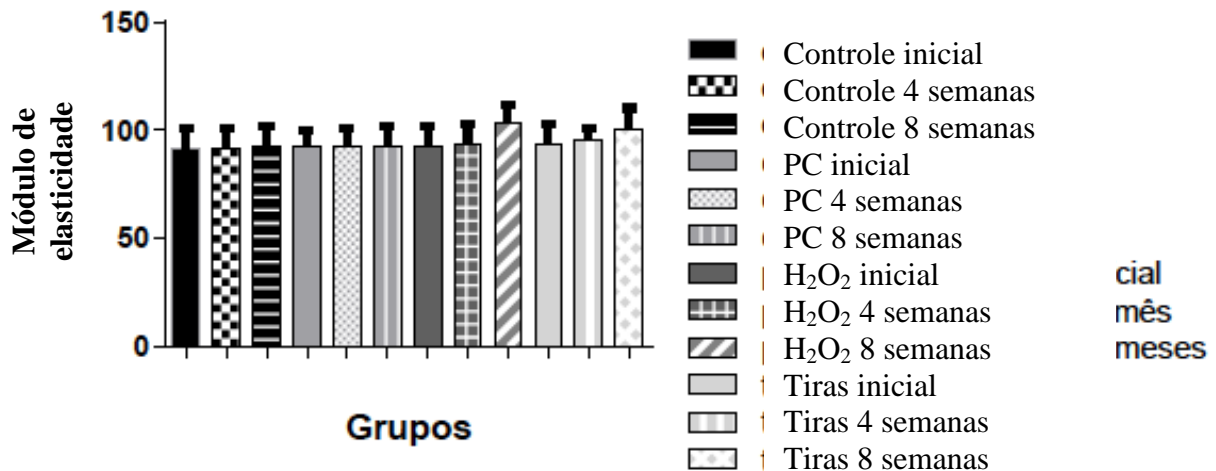


Gráfico 6 – Distribuição linear das médias: parâmetro módulo de elasticidade



O comportamento das amostras com relação à nanodureza pode ser observado no gráfico 7. Apenas os grupos III e IV após 8 semanas de utilização apresentaram diferença estatística para todos os demais grupos ($p < 0,05$), exceto entre si. Deste modo, a alteração na superfície foi refletida em um aumento da dureza das amostras. Pode ser observado no gráfico um pequeno aumento com a evolução do procedimento para o grupo I e uma pequena queda para o grupo II, sem significância estatística. Tais resultados podem estar relacionados à alteração na superfície com perda da organização do arranjo estrutural, além da possível influência da remineralização com saliva artificial em função do desafio clareador. O gráfico 8 traz a distribuição linear das médias de nanodureza.

Gráfico 7 – Média dos valores de nanodureza (GPa) durante o tratamento para todos os grupos

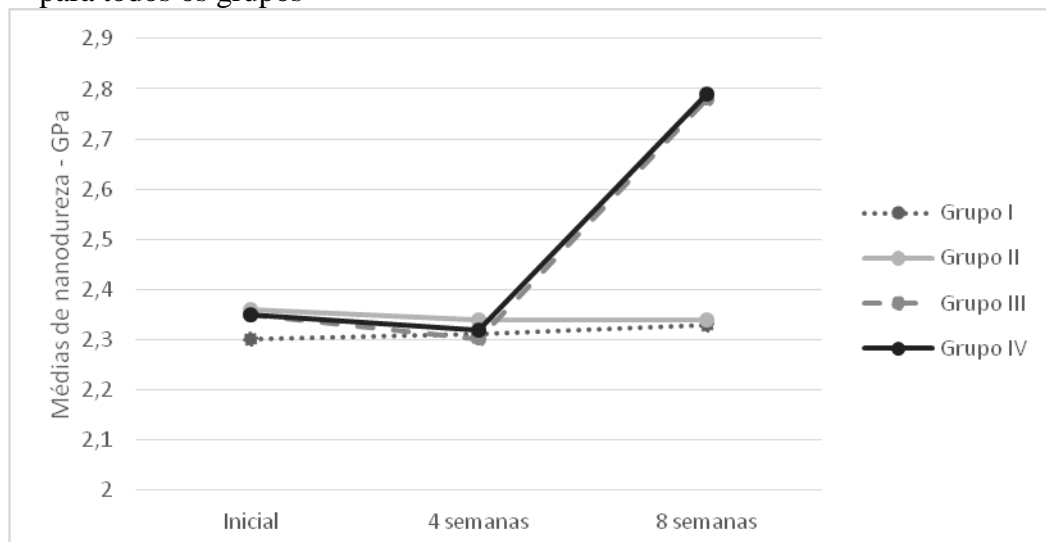
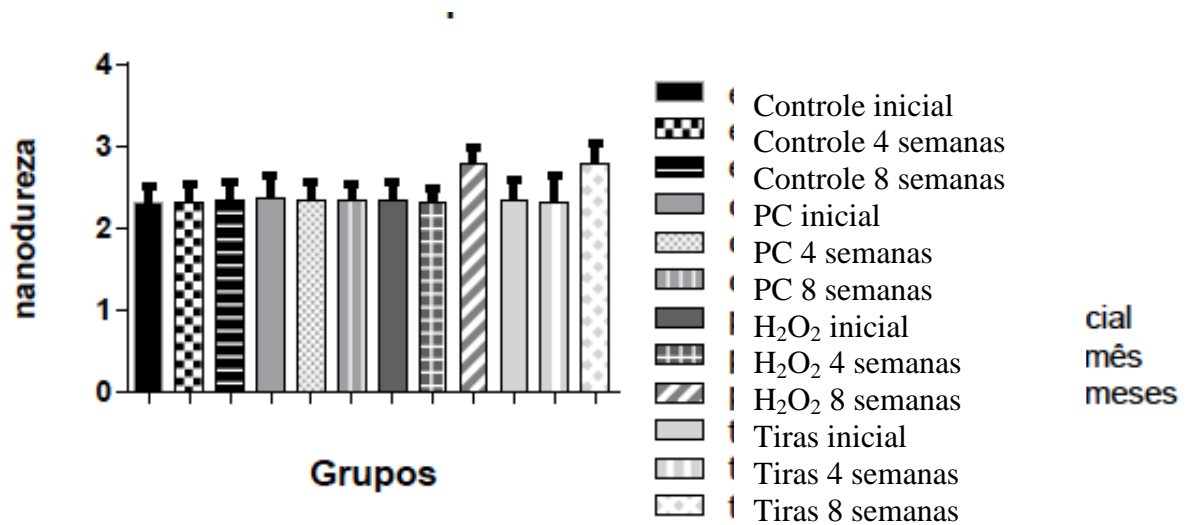


Gráfico 8 – Distribuição linear das médias de cada grupo: parâmetro nanodureza



O quadro 2 traz o resumo dos resultados obtidos nos diferentes testes realizados.

Quadro 2 – Compilação dos resultados obtidos (continua)

Grupos	Análise qualitativa por CLSM e AFM	Rugosidade – Sa e Sq	Microespectroscopia Raman	Nanoindentação
Grupo I (escovação e armazenamento em saliva artificial)	Sem alterações significativas	Sem alterações significativas	Pequeno aumento na escala de contagem após 8 semanas para conteúdo orgânico	Sem alterações significativas
Grupo II (PC 10%)	Sem alterações significativas	Sem alterações significativas	Pequeno aumento na escala de contagem após 4 semanas para conteúdo orgânico (2950cm ⁻¹)	Sem alterações significativas

Quadro 2 – Compilação dos resultados obtidos (conclusão)

Grupos	Análise qualitativa por CLSM e AFM	Rugosidade – Sa e Sq	Microespectroscopia Raman	Nanoindentação
Grupo III (H ₂ O ₂ 10%)	Após 4 semanas: maior exposição dos primas; após 8 semanas: destruição do padrão prismático, com superfície mais suave e presença de riscos	Após 4 semanas: aumento de Sa sem diferenças estatísticas; após 8 semanas: redução de Sa e Sq, com diferenças estatísticas	Após 4 semanas: considerável aumento na escala de contagem para conteúdo orgânico (1243, 1450, 2881 e 2950cm ⁻¹); após 8 semanas: redução desses valores, se aproximando do controle	Após 8 semanas: aumento nos valores de nanodureza, com diferença estatística
Grupo IV (tiras clareadoras com H ₂ O ₂ 10%)	Após 4 semanas: maior exposição dos prismas; após 8 semanas: desorganização e redução do padrão prismático com superfície mais suave e com riscos	Após 4 semanas: aumento de Sq; após 8 semanas: redução Sq, com diferenças estatísticas entre eles	Comportamento como anterior, com exceção do pico 2950cm ⁻¹ que apresentou aumentos menos evidentes na escala após 4 e 8 semanas.	Como anterior

5 DISCUSSÃO

O esmalte é o tecido mais duro do corpo humano. É um híbrido de componentes orgânicos e inorgânicos que seguem um padrão estrutural bastante marcante de prismas ou também chamados bastões. Este arranjo pôde ser observado em todas as amostras iniciais utilizadas neste trabalho. O esmalte é constituído, aproximadamente, em 96% de mineral e 4% de porção orgânica e água. O conteúdo inorgânico corresponde basicamente aos cristais de HAp, identificados facilmente nas avaliações de composição empregadas. Contudo, vários outros íons podem ser incorporados se disponíveis durante a formação do tecido (BISWAS, DEY e MUKHOPADHYAY, 2012; SA et al., 2012; ELFALLAH et al., 2015; NANCI, 2008). Os cristais são longos e próximos, com cerca de 60-70nm de largura e 25-30nm de espessura (CUI e GE, 2007; FARINA et al., 1999; FINKE, JANDT e PARKER, 2000; LIPPERT, PARKER e JANDT, 2004; NANCI, 2008; TERUEL et al., 2015). Eles são fixados uns aos outros por uma fina camada de proteína (FINKE, JANDT e PARKER, 2000; HE e SWAIN, 2007; HEGEDÜS et al., 1999; LIPPERT, PARKER e JANDT, 2004). A composição do esmalte é bastante homogênea de modo que a principal diferença entre a região prismática e interprismática é a orientação dos cristais, mais paralelos ao longo eixo no centro do prisma e mais inclinados na periferia (CUI e GE, 2007; GE et al., 2005). Tal padrão é visualizado quando cortes são realizados como preparo prévio das amostras.

O processo de biomineralização que orienta essa progressiva organização de cristais em bastões é mediado pela matriz de proteínas. Elas são secretadas em grande quantidade na amelogênese e conforme começam a ser degradadas e removidas, geram fusão e aumento de espessura dos cristais, determinando o arranjo em bastões com diâmetro em torno de 5µm. Essa dimensão foi compatível com a encontrada tanto nas análises por CLSM quanto AFM empregadas neste estudo. Os fragmentos das proteínas remanescentes permanecem, principalmente, na região interbastão formando uma bainha rica em amelogenina e enamelinina (GE et al., 2005; NANCI, 2008). Esta região mesmo com pequeno conteúdo proteico, traz grandes variações nas propriedades e influi diretamente no comportamento do esmalte, que apresenta mais resistência aos esforços e testes mecânicos quando comparados a pastilhas somente de HAp. A presença de proteínas dá características ao esmalte de um material compósito (ELFALLAH et al., 2015; TANAKA et al., 2010). Do mesmo modo, a pequena presença de íons, substituindo ligações nas moléculas de HAp, em especial na superfície mais externa, colaboram na variação das propriedades mecânicas e solubilidade do tecido

(TERUEL et al., 2015; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). No entanto, as análises por Raman não foram capazes de detectar esses componentes nas amostras utilizadas.

A superfície mais externa do esmalte pode se apresentar de maneira prismática ou aprismática em função da presença de bastões (HEGEDÜS et al., 1999; LIPPERT, PARKER e JANDT, 2004). Esta última costuma ser encontrada em regiões determinadas da coroa, como na cervical e proximal, sendo rapidamente perdida nas demais quando em função (HEGEDÜS et al., 1999; LIPPERT; PARKER; JANDT, 2004). Quando há prismas, estes podem chegar em diferentes direções na superfície assim como cristais apresentam seu próprio arranjo em regiões distintas do tecido (NANCI, 2008). É inegável a influência do processo de preparo das amostras, como corte para observação em microscopia, no formato e características dos prismas observados pelos pesquisadores. Sendo assim, optou-se no presente estudo por eliminar a planificação ou polimento das amostras possibilitando o estudo direto da microestrutura e dos efeitos de clareadores sobre as mesmas. Autores como Lippert, Parker e Jandt (2004), Zantner et al. (2007), Elfallah et al., (2015) e Borges et al. (2016) defendem que o preparo prévio das amostras dificulta ainda mais comparações com a realidade clínica. Inicialmente, a estrutura submetida ao procedimento não será a mesma. Além disso, as camadas mais externas geralmente mais mineralizadas, com maior conteúdo de íons e fluoretos são removidas e porções mais internas são expostas aos procedimentos. Finke, Jandt e Parker et al. (2000) afirmam que esse processo acaba por aumentar a taxa de dissolução do esmalte ao expor a microestrutura interna e alterar a relação entre porção orgânica e inorgânica. Apesar de um desafio para a execução das técnicas, o uso de amostras *in natura* representa a obtenção de resultados mais fidedignos. Dos estudos que embasaram este trabalho, apenas quatro utilizaram amostras de esmalte sem polimento: Hegedüs et al. (1999), Mahringer et al. (2009), Tanaka et al. (2010) e Vargas-Koudriavtsey e Herrera-Sancho (2017). A metodologia desenvolvida por Mahringer et al. (2009) merece destaque, uma vez que os autores realizaram planificação e polimento em metade das amostras obtidas de um mesmo dente que passariam pelas mesmas terapias clareadoras para análises com AFM. Os espécimes previamente preparados apresentaram efeitos mais deletérios dos clareadores, com aspecto de degradação da região interprismática caracterizado pela presença de sulcos e poros no local.

O esmalte é a primeira linha de defesa do elemento dental, estando exposto aos inúmeros desafios da cavidade oral. Sendo assim, a observação, inclusive em nanoescala, de fenômenos e procedimentos que possam afetá-lo diretamente é objeto de estudo em muitos

trabalhos. Isso permite melhor compreensão da relação entre estrutura, composição, função e fisiologia dos tecidos dentários (CUI e GE, 2007; NANCI, 2008; TERUEL et al., 2015). A desorganização do padrão estrutural ou efeitos na composição podem ter impactos no seu comportamento intra-oral. Além disso, tais investigações geram conhecimento sobre o mecanismo de ação das terapias e possibilitam o desenvolvimento de novas técnicas, assim como melhoria das já existentes (CUI e GE, 2007). Os géis clareadores são exemplos de materiais utilizados diretamente em contato com a superfície do esmalte por longos períodos de tempo, com o agravante de poderem ser adquiridos e aplicados diretamente pelos pacientes (AZER et al., 2009). Sendo assim, é fundamental a melhor compreensão de seus efeitos, especialmente em superfícies *in natura* com aproximação da realidade clínica, como foi buscado neste trabalho.

Os dentes escurecem por influências externas, como dieta, e internas, como medicações. Também estão sujeitos a mudanças fisiológicas de cor em função da idade (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; GOO et al., 2004; NANCI, 2008). Aliado às pressões estéticas da sociedade e devido ao padrão não invasivo e conservador, o clareamento dental tem ganhado bastante popularidade. Os géis clareadores são atualmente divididos em três categorias de acordo com sua concentração e forma de utilização: produtos de consultório, de uso caseiro supervisionado e de bancada (ALQATAHNI, 2014; AZER et al., 2009; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016). Géis de consultório apresentam como principais concentrações disponíveis o PC 35% e H₂O₂ 38%. São utilizados por profissionais em ambiente ambulatorial e possibilitam maior controle da técnica uma vez que são aplicados em consultas semanais com duração de cerca de 45min e não foram estudados neste trabalho (ALQATAHNI, 2014; HEGEDÜS et al., 1999; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016). Os produtos recomendados pelos dentistas para uso caseiro contêm concentrações menores de PC (10 a 22%) ou H₂O₂ (3 a 10%). Devem ser aplicados com auxílio de moldeiras confeccionadas pelos profissionais com tempo de aplicação e duração de aplicação orientados pelos mesmos (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; HEGEDÜS et al., 1999; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). Já os produtos de bancada foram introduzidos no mercado para evitar o uso de moldeiras e dispensar o acompanhamento do cirurgião-dentista, tornando o procedimento mais barato em tempo reduzido. O indivíduo tem livre acesso para a compra e o material é aplicado por intervalos curtos, por uma a duas vezes ao dia. A forma de apresentação vai de vernizes, canetas, às tiras clareadoras, entre outros. O ingrediente ativo costuma ser o H₂O₂ (5 a 14%), podendo ser combinado com diferentes carreadores, espessantes ou ainda ácidos e assim aumentar a chance de efeitos indesejados na superfície

(ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; LEONARD et al., 2005; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SERRAGLIO et al., 2016).

Os produtos de menores concentração classificados como clareadores caseiros e produtos de bancada apresentam variabilidade de normas e legislação sobre sua comercialização no mundo. A legislação europeia através do *Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers* determinou que produtos com concentração entre 0,1 a 6% somente podem ser usados sob supervisão profissional. Já nos Estados Unidos da América (EUA), o *Food and Drug Administration* (FDA) libera o uso e comercialização de produtos de bancada, considerando-os seguros. Ressaltam que o uso abusivo pode trazer problemas, destacando a maior susceptibilidade de adolescentes, sujeitos a pressões e influências estéticas. Do mesmo modo, *Association Dentaire Française* (ADF) enfatiza que os clareadores devem ser classificados como produtos médicos e não cosméticos de livre compra e venda (DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; POLYDOROU et al., 2017). Recentemente, no Brasil, a ANVISA, determinou que os clareadores com concentração de H₂O₂ igual ou acima de 3% somente deveriam ser vendidos sob prescrição profissional. Ainda assim é possível o acesso sem dificuldades, em especial na internet. Além dos produtos de bancada em suas diferentes formas, os géis de uso caseiro também podem ser adquiridos para aplicação por pacientes que já possuam moldeiras. A auto-medicação cresce em função de pressões da mídia, facilidade de compra, dificuldade de acesso ao cuidado especializado e o custo de terapias profissionais, além da falta de cultura da prevenção e valorização do cirurgião-dentista (DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; MAIA et al., 2008). Sendo assim, tornou-se necessário investigar os impactos dessa utilização na estrutura dental como foi contemplado neste trabalho.

A utilização sem supervisão tem potencial para causar resultados negativos aos pacientes, em especial, quando em uso abusivo (EIMAR et al., 2012; LEONARD et al., 2005; MAIA et al., 2008). A ADF defende que tal comportamento pode se tornar um problema de saúde pública, enquanto americanos chamam tais indivíduos de “*bleachorexics*” ou “*whitening junkies*” (DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009). Os profissionais têm uma grande participação também na conscientização dos pacientes. Do mesmo modo, são necessários estudos clínicos e laboratoriais para embasar a segurança dos produtos. Estes também são úteis para embasar a decisão do próprio cirurgião-dentista por protocolos de uso estendido em casos de descolorações severas, em especial aquelas induzidas por medicação (POLYDOROU et al., 2017).

Atualmente, o padrão de segurança e de comparação de eficiência para géis clareadores é o PC 10%. A técnica caseira supervisionada se tornou popular com Haywood e Heymann, em 1989 (HENN-DONASSOLLO et al., 2016; KWON et al., 2015; SERRAGLIO et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). Há autores que defendem que os resultados das tiras clareadoras podem ser comparáveis a esse tipo de procedimento. Estes produtos de bancada foram lançados no mercado em 2000. Consistem em uma fita flexível de polietileno carregando doses pré-determinadas e reduzidas de gel clareador (CAREY, 2014; HENN-DONASSOLLO et al., 2016; KWON et al., 2015). Riscos locais incluem sensibilidade, irritação gengival, resultados estéticos indesejados e efeitos adversos na estrutura dentária e em materiais restauradores (KWON et al., 2015; LEONARD et al., 2005). Tais efeitos podem ocorrer em qualquer das terapias propostas, sendo relacionadas à concentração do material utilizado, tempo de utilização e composição geral dos produtos (CAREY, 2014). Porém, pacientes que não foram previamente diagnosticadas nem estão sob orientação de um profissional, os efeitos deletérios podem ser exacerbados. Em função disso, optou-se por utilizar os materiais conforme a orientação dos fabricantes.

Ainda há bastante dúvidas acerca do mecanismo de ação de géis clareadores e de seus possíveis efeitos nos tecidos dentários. Na maioria dos agentes, o princípio ativo será o H_2O_2 ou uma substância capaz de gerar esta molécula, como o PC (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; EIMAR et al., 2012; ELFALLAH et al., 2015; GOO et al., 2004). H_2O_2 gera agentes oxidantes (radicais livres) durante sua decomposição que vão apresentar ação clareadora. Dependendo da temperatura, concentração do gel e pH, diferentes espécimes reativos podem ser formados, como: radicais hidroxil, hidroperoxil, ânion hidroperoxil, entre outros (ALQATAHNI, 2014; KWON et al., 2015; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016). Estes compostos de pequeno peso molecular penetram na estrutura dentária através de espaços interprismáticos e eventuais defeitos de superfície no esmalte (KWON et al., 2015; SA et al., 2012; TANAKA et al., 2010). Aceita-se que, ao atingir a dentina, são capazes de oxidar as moléculas cromatogênicas com longas cadeias carbônicas, quebrando suas ligações duplas. Geram então componentes menores que podem sair da estrutura ou ter um comportamento óptico diferenciado que não afete negativamente a coloração do elemento dentário (ALQATAHNI, 2014; CAREY, 2014; EIMAR et al., 2012; GOO et al., 2004; HEGEDÜS et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2011; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; SERRAGLIO et al., 2016; YU et al., 2015). Os radicais podem ficar presos no esmalte, especialmente quando usados por tempos prolongados. Além disso, não apresentam ação seletiva, com potencial de oxidar outras moléculas não envolvidas no processo de clareamento:

componentes orgânicos e inorgânicos da estrutura dentária (EIMAR et al., 2012; ELFALLAH et al., 2015; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; SA et al., 2012; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010; YU et al., 2015). Entretanto, Eimar et al. (2012) mostraram que os géis não apresentam potencial de desmineralização ou desnaturação de proteínas por si só. Eles promovem o clareamento pela oxidação das moléculas orgânicas cromatogênicas e da própria estrutura. Produtos de alta concentração podem atingir a polpa e causar impacto negativo nas células desse tecido, de modo que a sensibilidade dental representa um dos efeitos colaterais mais relatados pelos pacientes (CAREY, 2014; KWON et al., 2015; LUQUE-MARTINEZ et al. 2016; SERRAGLIO et al., 2016). Esta gera impacto negativo na qualidade de vida durante a intervenção, atrapalhando higienização e alimentação, podendo levar a suspensão do procedimento (SERRAGLIO et al., 2016).

Géis a base de H_2O_2 em baixas concentrações (uso caseiro) geram clareamento efetivo com menor grau de sensibilidade esperada quando comparados às técnicas de consultório. Já os géis a base de PC são considerados seguros com pequena incidência de sensibilidade pós-operatória e menor citotoxicidade. Basicamente, esta molécula se decompõe gerando H_2O_2 e uréia em proporção aproximada de 30 e 70% (DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016). A uréia tem ação proteolítica e se decompõe em amônia e água, aumentando o pH da solução aplicada e, ao torná-lo mais alcalino, auxilia na penetrabilidade dos géis (HEGEDÜS et al., 1999; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; POLYDOROU et al., 2017; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). A presença de uréia aumenta a reatividade do gel, além de dificultar a ocorrência de erosão da superfície. Sendo assim, continua sendo a primeira recomendação para procedimentos clareadores (HEGEDÜS et al., 1999; KWON et al., 2015; LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010; YU et al., 2015). Desse modo, o gel de PC 10% aplicado nesse estudo corresponderia a uma concentração de H_2O_2 a 3%, no entanto com outras diferenças de comportamento e composição.

Muitos géis clareadores são comercializados com pH ácido para aumentar sua e estabilizá-los. A inclusão de agentes como carbopol, glicerina ou poloxâmero auxiliam nesse processo. Estes também apresentam a função de tornar a liberação dos radicais livres mais lenta e assim aumentar o poder clareador. É bastante comum sua presença nos géis a base de PC (ALQATAHNI, 2014; HEGEDÜS et al., 1999; JUSTINO et al., 2004; POLYDOROU et al., 2017; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). Muitos autores defendem que comparados com H_2O_2 , os materiais a base de PC apesar de gerarem uma menor concentração de radicais livres, são capazes de agir por mais tempo na superfície (2-4h).

O H_2O_2 é naturalmente produzido, controlado, usado e destruído durante as funções normais do organismo (KWON et al., 2015). Os géis a base de H_2O_2 são utilizados por intervalos reduzidos em função da maior produção de radicais livres e menor tempo de liberação. É comum que sejam comercializados com um pH ainda mais baixo, para estabilização do produto, havendo inclusive a adição em alguns produtos de bancada de pequenas concentrações de ácidos como o fosfórico ou o cítrico (LEONARD et al., 2005). Desse modo, autores defendem que há mais chances de impacto na superfície que apresenta pH para desmineralização entre 4,5 e 5,5 (CAREY, 2014; FINKE, JANDT e PARKER, 2000; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; POLYDOROU et al., 2017; SA et al., 2012; ZANTNER, 2007). Entretanto, acredita-se que mesmo o eventual pH ácido inicial para estabilidade e comercialização do produto tenha pouco impacto, já que ocorre alcalinização logo no início de sua utilização (JUSTINO et al., 2004). Para atuação ótima e maior liberação de radicais livre o pH deve ser alcalino, que é atingido nos primeiros minutos após aplicação e contato com umidade (LUQUE-MARTINEZ et al., 2016; POLYDOROU et al., 2017). Desse modo, avaliações de pH não foram consideradas pertinentes para caracterização dos materiais neste estudo.

A exposição dos tecidos dentários duros aos agentes clareadores oxidantes poderia resultar em alterações da microestrutura do esmalte e influenciar sua rugosidade. Além disso, o processo de oxidação na superfície poderia gerar perda de conteúdo mineral e efeitos sobre a matéria orgânica, causando impactos em propriedades físicas como a dureza (BOLAY, CAKIR e GURGAN, 2012; BORGES et al., 2016; CAREY, 2014; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010). A combinação ainda com a escovação abrasiva poderia gerar respostas negativas acumuladas (BOLAY, CAKIR e GURGAN, 2012; BORGES et al., 2016; ÖZKAN et al., 2013). Entretanto, os resultados dos estudos são conflitantes e comparações dificultadas. Esse problema acomete todas as análises propostas em função da falta de padronização das metodologias aplicadas na literatura. Variam as concentrações dos géis utilizados, os parâmetros e o tempo de sua aplicação, armazenamento da amostra, utilização ou não de substrato humano, testes escolhidos, parâmetros adotados nos ensaios e desafios propostos *in vivo* ou *in vitro* (ALQATAHNI, 2014; BORGES et al., 2016; CAREY, 2014; ÖZKAN et al., 2013; POLYDOROU et al., 2017; SOROZINI et al., 2017). Desse modo, ainda não há certeza do comportamento dos géis clareadores e foram definidas condições padrão para realização deste estudo.

Buscou-se adotar um desenho tão parecido com a realidade clínica quanto possível para um estudo *in vitro*. Para isso, foi aplicada a metodologia previamente desenvolvida pelo

grupo em Sorozini et al. (2017). O primeiro passo, foi a utilização de dentes humanos. Alguns autores como Zimmerman et al. (2010) e Vargas-Koudriavtsev e Herrera-Sancho (2017) demonstram que há variações nas propriedades e composição dos dentes conforme idade, local e tipo utilizados. Há assim, uma dificuldade intrínseca de homogeneizar as amostras (TERUEL et al., 2015). Numa tentativa de minimizar impactos, foram escolhidos dentes de um mesmo grupo: terceiros molares humanos. Além disso, Zimmerman et al. (2010) defendem que testes realizados no mesmo elemento apresentam menores variações de resultados. Nesse sentido, fragmentos do mesmo dente foram destinados para os diferentes grupos de procedimentos clareadores. Em função da variabilidade inerente a materiais biológicos, o cuidado de ainda utilizar a amostra como seu próprio controle, acompanhada em todos os intervalos propostos com técnicas não-destrutivas, possibilitou resultados mais coerentes (MAHRINGER et al., 2009).

Alguns autores utilizam dentes bovinos para testes em função da burocracia para doação dos humanos. Essa prática torna a comparação de resultados e extrapolação para clínica mais difícil. É um tecido com bastante pontos em comuns com a estrutura humana, mas que apresenta particularidades como maior concentração de carbonato e mais substância interprismática orgânica. Essas diferenças podem gerar deduções errôneas na transposição dos achados para humanos, em especial envolvendo padrões de desmineralização, uma das preocupações no uso de géis clareadores (TERUEL et al., 2015). Desse modo, foram evitados artigos que utilizaram dentes bovinos para avaliações. Apenas o trabalho de Borges et al. (2016) foi mantido pela relevância do tema apresentado sobre a susceptibilidade de amostras clareadas à escovação.

Ainda para aproximação com a clínica, os produtos escolhidos foram utilizados conforme recomendação dos fabricantes quanto ao intervalo das aplicações. A duração mais recomendada pelos profissionais costuma ser de até quatro semanas de aplicação. Não há evidências científicas que garantam que este tempo é seguro para todos os casos e produtos. Alguns autores defendem que o acompanhamento do cirurgião-dentista para dosar a continuidade da intervenção é importante, uma vez que o clareamento poderia apresentar um ponto de saturação, a partir do qual não há mais alteração de cor. A continuidade da terapia a partir desse ponto traria somente impactos na estrutura dentária (SOLDANI, AMARAL e RODRIGUES, 2010; SOROZINI et al., 2017). O clareamento passaria então a ser considerado excessivo. Buscou-se simular esse processo através de tempo prolongado da terapia (8 semanas). O intento foi o de abranger, portanto, o potencial uso abusivo de pacientes pouco conscientizados, sem orientação e acompanhamento. É difícil encontrar

trabalhos que desenvolvam metodologias de aplicação além de quatro semanas para comparação. Apenas o trabalho já desenvolvido pelo grupo em Sorozini et al. (2017) e Polydorou et al. (2017) puderam ser comparados nesse sentido. Sorozini et al. (2017) avaliaram a composição mineral das amostras através de EDXRF. Encontraram diferenças estatísticas para o conteúdo elementar de Ca e P na utilização de tiras clareadoras com mesma concentração de H₂O₂ das testadas no presente estudo. Entretanto, as novas avaliações com espectroscopia Raman, que detectam as moléculas de HAp pela vibração de ligações de fosfato, não confirmaram a perda de minerais. As análises de Polydorou et al. (2017) mostraram tendência de aumento na rugosidade para os materiais estudados sem diferenças estatísticas para intervalos de 2 ou 8 semanas. O grupo que utilizou PC 16% apresentou maiores valores de rugosidade mesmo comparado ao H₂O₂ 40%, tendência contrária ao observado no presente trabalho, em que os padrões de alteração de morfologia e rugosidade encontrados para os grupos III e IV (a base de H₂O₂ 10%) produziram maiores impactos que PC 10%. Cabe ressaltar, que as amostras de Polydorou et al. (2017) foram planificadas, polidas, armazenadas na cavidade oral e avaliadas por perfilômetro óptico, condições bem diferentes das adotadas nesse estudo. Existem na literatura outros trabalhos que, para simular excessos, aumentam o tempo de aplicação, reduzindo intervalos entre as exposições ou exagerando o tempo de aplicação total, o que gera resultados com o viés de afastamento da realidade clínica e das orientações dadas aos pacientes. Isso pôde ser observado, por exemplo para Bistey et al. (2007) e Mahringer et al. (2009). O primeiro avaliou géis de H₂O₂ 10, 20 e 30% aplicados na superfície por 30, 60 e 120min e encontraram alterações de composição com FTIR proporcionais ao tempo e concentração do produto aplicado. Já o segundo avaliou PC 30% com aplicações por uma e 6h e observou que não houve diferença estatística para as alterações de rugosidade com o aumento do tempo de uso do gel.

A simulação *in vitro* de condições intra-orais incluiu a decisão sobre o armazenamento das amostras. Autores defendem que a saliva poderia mascarar os efeitos dos agentes clareadores por seu importante papel de solução remineralizadora do esmalte. Alguns autores como Maia et al. (2008); Soldani, Amaral e Rodrigues (2010); Smidt, Feuerstein e Topel (2011); Sa et al. (2012) usam inclusive em seus trabalhos de saliva humana, com armazenamento *in situ* das amostras. Maia et al. (2008) e Smidt, Feuerstein e Topel (2011) não observaram efeitos deletérios quando avaliaram, respectivamente, géis de PC 10% e H₂O₂ 7,5% ou géis de PC 16 e 15% de diferentes marcas comerciais. Sa et al. (2012) mostraram alteração em apenas uma das propriedades avaliadas (resistência à fratura) para géis a base de PC 10, 15 e 20% em aplicações de 8h diárias, intervalo no qual as amostras permaneciam em

estufa. Já Soldani, Amaral e Rodrigues (2010) encontraram redução de microdureza para todos os produtos testados. O diferencial nesse último artigo foi a realização de colagem dos fragmentos na superfície de molares superiores dos voluntários, de modo que até os procedimentos clareadores foram realizados diretamente na cavidade oral com a exposição a inúmeros desafios. Do mesmo modo, a cavidade oral inclui outros aspectos benéficos como a presença de glicoproteínas para formação de película adquirida representando maior nível de proteção, além da presença constante de fluoretos. Estudos *in situ* apresentam alto grau de relevância pela aproximação da realidade clínica (HENN- DONASSOLLO et al., 2016; LIPPERT, PARKER e JANDT, 2004; MAIA et al., 2008 SA et al., 2012; ÖZKAN et al., 2013). No presente estudo, pela maior facilidade e padronização, para redução de variáveis e, ainda assim, garantir condições semelhantes às intra-orais, foi decidido pela utilização de saliva artificial com trocas diárias (AZER et al., 2009; BORGES et al., 2016; KWON et al., 2015; LEONARD et al., 2005; MAHMOUD et al., 2010; SOROZINI et al., 2017; TANAKA et al., 2010; ZANTNER et al., 2007). Os estudos mencionados demonstraram que, mesmo com a utilização de saliva, prejuízos continuaram a ser observados, de modo que não há mascaramento de resultados que passam a ser mais fiéis à realidade. Os valores finais aumentados de nanodureza alcançados após dois meses de utilização de géis a base de H₂O₂, neste trabalho podem também estar relacionados ao efeito benéfico da saliva artificial frente a um desafio. Entretanto, morfologicamente não foram observados com AFM e CLSM padrões de crescimentos de cristais compatíveis com remineralização da superfície como descrito por Lippert et al. (2004). Do mesmo modo, as análises de Raman não demonstraram alterações compatíveis com aumento da mineralização das amostras. Ainda nesse contexto, como forma de evitar eventuais perdas de minerais nos dentes clareados, muitos fabricantes têm incluído em sua composição íons como F, Ca e PO₄ que agem como uma fonte complementar para eventuais necessidades de reposição (ALQATAHNI, 2014; BISTEY et al., 2007; BORGES et al., 2016; CAVALLI et al., 2011; YU et al., 2015). Do mesmo modo, alguns profissionais recomendam uso de outras soluções remineralizantes, como bochechos com F, pastas contendo fosfopeptídeos de caseína estabilizados pelo fosfato de cálcio amorfo (CCP-ACP) após o procedimento, mesmo na ausência de um protocolo efetivo na literatura e informações conflitantes (ALQATAHNI, 2014; BOLAY, ÇAKIR e GURGAN, 2012; HENN – DONASSOLLO et al., 2016). Esses acréscimos também podem ter efeito positivo no desempenho clínico com redução na sensibilidade dental esperada (CAVALLI et al., 2011). Cavalli et al. (2011) demonstraram, na avaliação de géis a base de PC 10%, que a ausência de agentes como o F ou o Ca em sua composição fez com que efeitos mais pronunciados fossem

observados nas avaliações realizadas. Todos os géis utilizados no presente trabalho apresentam componentes como Ca em sua composição, o que não impediu a ocorrência de alterações em relação ao controle.

Finalmente, a decisão para aproximação da realidade clínica consistiu na adoção de um protocolo de escovação como utilizado por Sorozini et al. (2017). A utilização de dentifrícios é reconhecidamente responsável por abrasão da superfície, o que poderia descaracterizar o objeto do estudo (BOLAY, CAKIR e GURGAN, 2012; BORGES et al., 2016; ÖZKAN et al., 2013). Os resultados de Özkan et al. (2013) mostraram valores de rugosidade menores para espécimes que foram apenas clareados (PC 10% e H₂O₂ 10%) quando comparados com grupos em que foram adicionadas diferentes marcas comerciais de dentifrícios. Desse modo, optou-se por manter apenas o efeito mecânico da escovação, o que segundo Bolay et al. (2012) também traria por si só, pequenos efeitos na morfologia da superfície. Estes autores observaram um aumento na rugosidade superficial mesmo de amostras planificadas e polidas que passaram apenas por protocolo de escovação simulada sem terapia clareadora. Houve diferenças metodológicas, uma vez que uma máquina de escovação simulada foi programada para 20000 ciclos, com carga de 600g e armazenamento em água destilada. Ambos valores são considerados exagerados para a escovação de pequeno fragmento de esmalte. Do mesmo modo, Özkan et al. (2013), conservaram as amostras em água deionizada e, mesmo com utilização de escova automática, adotaram o protocolo de 3x2min, compatível com tempo de escovação de uma arcada inteira e não de um fragmento. Para permitir escovações diárias por 8 semanas, optou-se por utilizar protocolos de escovação manual sem dentifrício, como observado em Zantner et al. (2007), Azer et al. (2009), Sa et al. (2012). Entretanto, esses autores não relataram padrões para a escovação adotada. Apenas Azer et al. (2009) descreveram um tempo de 3min e, assim como os demais autores, utilizaram de escova macia associada ao momento de remoção do gel clareador em água corrente. Porém, Borges et al. (2016) relatam que os tecidos dentários apresentam maior susceptibilidade à abrasão por escovação imediatamente após o clareamento. Adotaram um intervalo de 1h e compararam com a escovação imediata com dentifrícios de alta e baixa abrasividade de espécimes clareados com H₂O₂ 7,5% com ou sem Ca. Observaram efeitos deletérios para a variável tempo representada pela escovação imediata com protocolos simulados com cargas de 200g sobre amostra planificada. Mesmo com diferenças na metodologia aplicada, os autores optaram por adotar um intervalo menor, de 15min de armazenamento em saliva artificial antes da escovação sem dentifrícios como realizado por

Sorozini et al. (2017). O uso de escovas elétricas com carga de 90g e operador único foi uma forma de controlar a rotina adotada.

Com relação às técnicas selecionadas para complementar os achados de Sorozini et al. (2017), foram escolhidas aquelas sem potencial destrutivo da amostra, para avaliação de morfologia, rugosidade, composição e propriedades mecânicas. Assim, os espécimes foram acompanhados antes e depois dos procedimentos clareadores, nos intervalos propostos, servindo como seu próprio controle (MAHRINGER et al., 2009). A planificação do esmalte torna mais prática a execução da maioria das avaliações, por padronização da rugosidade das amostras, sendo extensamente adotada na literatura. Em algumas técnicas, inclusive, é um pré-requisito que a superfície seja plana, como EDXRF, ATR-FTIR e perfilometria por contato, por exemplo (SOROZINI et al., 2017). No entanto, todas as avaliações propostas puderam ser realizadas sem preparo prévio da superfície.

A técnica de CLSM foi escolhida em vez do MEV para observação da morfologia de áreas maiores, sem necessidade de preparo prévio relacionado à desidratação e recobrimento, o que impediria o acompanhamento da amostra. Trata-se de uma técnica adequada para materiais espessos, sensíveis a aplicação de um laser. A presença de curvatura natural da amostra não é uma limitação já que a reconstrução da superfície em 3D, permite a sua manutenção (MANNHEIMER, 2002).

Já o AFM permite observação das superfícies e de suas alterações em uma escala nanométrica, sendo uma das mais poderosas ferramentas para avaliação dos cristais de HAp e da organização dos bastões no esmalte. Além disso, é uma técnica que já demonstrou ser eficaz para detectar processos de dissolução e erosão das amostras (AZER et al., 2009; FINKE, JANDT e PARKER, 2000; LOYOLA-RODRIGUEZ et al., 2010). Trata-se também de uma análise não-destrutiva em 3D, bastante interessante para o acompanhamento da evolução de intervenções. Permite a obtenção de imagens de topografia através da detecção de alterações na posição do cantiléver ao varrer uma amostra (MANNHEIMER, 2002; WEISSMÜLLER, ROCHA E MONCORES, 2011)

O modo de leitura escolhido de contato intermitente (Peak Force Tapping[®]) permite que se toque a amostra de forma periódica, evitando desgastes e danos à mesma ou ao cantiléver, como pode acontecer no modo contato. Do mesmo modo, são evitados arrastes de materiais pouco aderidos presentes na superfície (MANNHEIMER, 2002; WEISSMÜLLER, ROCHA E MONCORES, 2011). É importante que se observe durante as leituras se a qualidade da ponta do cantiléver é alterada, pois a qualidade e a resolução das imagens é diretamente afetada pela modificação de formato da sonda (MANNHEIMER, 2002;

WEISSMÜLLER, ROCHA E MONCORES, 2011). Esta é uma limitação de leituras em amostras muito duras como é o caso do esmalte.

As imagens de AFM podem ser realizadas em ambiente, sem necessidade do vácuo, de preparos prévios como desidratação ou cobertura com materiais condutores como ocorre no MEV (AZER et al., 2009; FARINA et al., 1999; HEGEDÜS et al., 1999; MANNHEIMER, 2002). Sendo assim, há maior chance de detectar detalhes próximos à realidade nas três dimensões, com ótima resolução no eixo z (AZER et al., 2009; HEGEDÜS et al., 1999; MAHRINGER et al., 2009). No entanto, pela facilidade técnica e obtenção de boas imagens, muitos autores utilizam MEV como a principal forma de avaliação de alterações na superfície (JUNQUEIRA et al., 2011; JUSTINO, TAMES e DEMARCO, 2004; SMIDT, FEUERSTEIN e TOPEL, 2011; KWON et al., 2015; YU et al., 2015; ZANTNER et al., 2007; ZIMMERMAN et al., 2010). Essa técnica é bastante válida, sendo inclusive recomendada sua associação complementar a AFM e outras microscopias de superfície (FARINA et al., 1999).

O AFM também fornece dados não só para avaliações qualitativas, mas também quantitativas da superfície através da obtenção de parâmetros de rugosidade da superfície. Os estudos de Hegedüs et al. (1999), Mahringer et al. (2009), Mahmoud et al. (2010), Zimmerman et al. (2010), Sa et al. (2012) adotaram tal análise. Mahmoud et al. (2010) e Sa et al. (2012) realizaram planificação das amostras antes das leituras e avaliação de Ra e Rq, respectivamente. Os autores de Sa et al. (2012) não observaram diferenças na rugosidade das amostras em análises de pequenas áreas de 10x10µm. Além disso, relataram a visualização apenas de riscos e artefatos ligados ao preparo nas imagens mesmo após clareamento com PC 10, 15 e 20% por 8h durante 14 dias. Por outro lado, Mahmoud et al. (2010) observaram aumento para o parâmetro Ra após o clareamento com PC 16% no mesmo intervalo. As imagens passaram a apresentar irregularidades exageradas, aumento de cristais e microporosidades. Para comparação, a metodologia adotada por Hegedüs et al. (1999) se aproximou mais do presente trabalho por ter realizado clareamento com PC 10% em amostras com morfologia preservada. Apesar de não terem realizado medições de rugosidade, foi observado um aumento de defeitos na superfície, mais evidentes para H₂O₂ 30% mas também presentes para PC. Entretanto, a avaliação qualitativa das imagens do grupo II, não demonstraram alterações de superfície. Uma comparação interessante pode ser alcançada por Mahringer et al. (2009). Estes autores prepararam amostras de um mesmo elemento dentário para serem polidas ou não e submetidas a exposições de uma e 6h com H₂O₂. Apesar da avaliação de Rq ter sido realizada em imagens de dimensões pequenas, os autores conseguiram detectar valores iniciais de rugosidade maiores nas amostras *in natura*

comparadas com aquelas planejadas, que se apresentaram bastante homogêneas. Ainda assim, houve um aumento nos valores observados para ambos os grupos após 1h sem diferença estatística para avaliação após 6h. No entanto, nas imagens de amostras planejadas foi identificada maior degradação na região interprismática. Uma outra técnica bastante utilizada para avaliações de rugosidade é a perfilometria óptica ou por ponta de prova (BOLAY et al., 2012; BORGES et al., 2016; KWON et al., 2015; ÖZKAN et al., 2013; POLYDOROU et al., 2017). Nesta última, uma sonda é arrastada na superfície para detectar alterações no eixo z, sendo um instrumento de relativo baixo custo e grandes aplicabilidades. Entretanto, esta técnica deve ser utilizada em superfícies planejadas. Efeitos leves na rugosidade podem ser mascarados pela análise de regiões maiores e pela dificuldade inerente à resolução da ponta de leitura (ÖZKAN et al., 2013). Do mesmo modo, o contato direto pode causar danos, contaminar ou destruir parte da amostra (ÖZKAN et al., 2013). Os parâmetros escolhidos de S_a e S_q revelam variações verticais da amostra durante a terapia, englobando toda a área analisada. É importante lembrar que esses valores traduzem a transformação da morfologia em um único valor numérico (LOYOLA-RODRIGUEZ et al., 2010). Em função disso, também é importante a análise qualitativa e descrição das alterações na superfície com os procedimentos.

A necessidade de banhos ultrassônicos antes das leituras de AFM para remoção de debris inerentes ao corte e ao tratamento na superfície, pode acabar removendo camadas pouco aderidas dificultando, por exemplo a observação de áreas de remineralização. Alguns autores defendem o uso de tempos menores nos banhos ultrassônicos, em torno de 10s (GE et al., 2005; ZIMMERMAN et al., 2010). Porém um padrão encontrado em muitos artigos e mantido no presente trabalho, por ter demonstrado ser mais eficaz em um piloto, foi o de 5min (BORGES et al., 2016; ELFALLAH et al., 2015; GOO et al., 2004; SA et al., 2012).

Os efeitos em microestrutura observados por CLSM e AFM mostraram perda da organização estrutural para os grupos III e IV. O comportamento das amostras de esmalte nesses grupos está ligado a aplicação de géis de maior concentração de H_2O_2 que geram maior quantidade de radicais livres e que mostraram ter mais efeito deletério na superfície. A presença de riscos mostra que a escovação parece ter tido papel importante em remover minerais despojados em função da oxidação da matriz orgânica (ALQATAHNI, 2014; BORGES et al., 2016; KWON et al., 2015). Assim, uma superfície mais lisa, menos rugosa, com possível exposição de camadas subsuperficiais além das marcações provenientes da escovação puderam ser observadas após 8 semanas de utilização.

Maiores valores de rugosidade iniciais foram encontrados nas amostras desse estudo. Isso está condizente com o uso de superfícies *in natura*, com todos os seus acidentes e características morfológicas. Deve-se ressaltar, contudo, que, mesmo nos grupos que apresentaram uma tendência de aumento na rugosidade (grupos III e IV após 4 semanas de utilização) os valores apurados foram menores do que o limite de 0,2 μm para acúmulo de bactérias (BORGES et al., 2016; POLYDOROU et al., 2017). Deste modo, as alterações detectadas podem não ser clinicamente perceptíveis.

Para análise da composição das amostras, a espectroscopia Raman foi escolhida por se tratar de um método não-destrutivo, que avalia alterações na composição molecular (CAVALLI et al., 2011; RAE et al., 2014; SCHULZE et al., 2004; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). Como vantagens, há o mínimo preparo, resposta linear dos componentes minerais do dente, ausência de dano à amostra, alta sensibilidade para pequenas alterações e possibilidade de escolha da área de análise, nesse estudo, um prisma (VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). Trata-se de uma técnica útil para coletar informações como composição química, mesmo em pequenas quantidades, sendo interessante para avaliar o pequeno conteúdo proteico presente no esmalte. Também é capaz de detectar alterações no tipo de estrutura e orientação de cristais, uniformidade da amostra, distribuição de componentes no material, identificação de contaminantes, entre outros. As análises de amostras biológicas apresentam uma complexidade um pouco maior, uma vez que elementos podem estar presentes em diferentes estados simultaneamente (RAE et al., 2014).

Ao detectar componentes inorgânicos e os orgânicos de baixa concentração, a espectroscopia fornece uma espécie de “assinatura digital da amostra” pelas vibrações de ligações detectadas (RAE et al., 2014; SCHULZE et al., 2004; TERUEL et al., 2015; VARGAS-KOUDRIAVTSEV e HERRERA-SANCHO, 2017). Uma outra vantagem é a utilização da forma e área das curvas dos espectros representando a intensidade dos sinais e permitindo a análise matemática e comparativa. É mais eficiente quando comparada, por exemplo, com outras técnicas não destrutivas como XRF, EDS ou EDX. Estas realizam uma análise química elementar, sendo útil apenas para avaliação de alteração de conteúdo mineral em condições ambientais ou de vácuo quando associados ao MEV (SMIDT, FEUERSTEIN e TOPEL, 2001; SOROZINI et al., 2017; TERUEL et al., 2015). Sendo assim, são necessárias, idealmente, avaliações complementares para conteúdo orgânico. Do mesmo modo, a comparação de resultados dessas técnicas com análises de Raman é mais difícil, já que ambas trabalham com a avaliação de composição, mas com detecção de energias e componentes

distintos provenientes de átomos ou moléculas. A pequena profundidade de penetração do laser para Raman também foi importante, uma vez que se buscou alterações na superfície sem mascaramento de outras camadas profundas. Uma dificuldade inerente das análises de Raman consiste na necessidade de familiarização com a técnica e conhecimento prévio da composição esperada das amostras para que a interpretação dos dados seja facilitada. Pode haver dúvida nas energias de ligações detectadas e o tipo de alteração que significam para aquele substrato (RAE et al., 2014).

Ainda com relação a outras técnicas de análise de composição, o ATR-FTIR também permite detecção de ligações químicas (BISTEY et al., 2007; SA et al., 2012; ZIMMERMAN et al., 2010). Esta metodologia, no entanto, necessita de planificação para varrimento com um cristal, permitindo leituras nas mesmas regiões. Por outro lado, o FTIR necessita de uma transformação da amostra em pó com formação de pastilhas com brometo de potássio (KBr) de modo que pequenas alterações na superfície podem ser mascaradas por regiões subsuperficiais menos afetadas (SA et al., 2012).

A fim de facilitar a detecção de conteúdo orgânico, a coleta dos espectros por Raman foi dividida em três regiões para contemplar as regiões dos picos 1450 e 2950cm^{-1} (GOO et al., 2004; SCHULZE et al., 2004) correspondentes ao conteúdo orgânico. Buscou-se eliminar efeitos da alta de contagem de PO_4 com a realização de espectros isolados. O conteúdo inorgânico do esmalte é bastante pronunciado, sendo 960cm^{-1} o principal pico, relacionado ao $\nu_1\text{PO}_4$. Além disso, Cavalli et al. (2011) e Sa et al. (2012) relataram os picos 430cm^{-1} para $\nu_2\text{PO}_4$; 580 e 610cm^{-1} para $\nu_4\text{PO}_4$ e 1024 e 1045cm^{-1} para $\nu_3\text{PO}_4$. Já o pico 1068cm^{-1} foi relacionado ao conteúdo de carbonato da amostra. Assim como esses autores, não houve diferença nos espectros obtidos no experimento desenvolvido, sem a detecção de novos picos. Cavalli et al. (2011) encontraram queda mineral para o procedimento clareador realizado com PC 10% sem substâncias remineralizantes na composição, enquanto Sa et al. (2012) não obtiveram diferenças significativas mesmo comparando diferentes concentrações de PC, todas com presença de F e de mesma marca comercial que a usada no presente trabalho. Entretanto, para Goo et al. (2004) que fizeram armazenamento em água destilada e clareamento com PC10%, a espectroscopia Raman mostrou redução no pico 1068cm^{-1} relativo ao carbonato. Tal achado ocorreu tanto para o grupo que foi clareado quanto para o grupo de armazenamento em água destilada, demonstrando influência do armazenamento e segurança do procedimento. Também Vargas-Koudriavtsev e Herrera-Sancho (2017) relataram alterações na concentração de carbonato, com aumento em espécimes clareados em géis de consultório e redução para aqueles submetidos à ação de produtos caseiros e armazenamento em água

destilada. No presente estudo, para os espectros com centro em 1600cm^{-1} , houve alteração nas leituras obtidas para as amostras dos grupos III e IV. Após 4 semanas de utilização, a contagem aumentou para ambos os grupos e os picos descritos por Goo et al. (2004) e Schulze et al. (2004) relacionados com conteúdo orgânico, 1243cm^{-1} (amida I) e 1450cm^{-1} (C-H *bending*), ficaram mais evidentes. Após 8 semanas, a contagem voltou a reduzir, com os mesmos picos permanecendo mais evidentes quando comparados ao controle. No grupo III, a mudança foi mais evidente em ambos os intervalos testados. Alterações semelhantes foram observadas para os espectros coletados com centro em 2900cm^{-1} . Houve maior contagem para 2881cm^{-1} e 2950cm^{-1} (C-H *stretching*) especialmente no grupo III após 4 semanas. Um pequeno aumento também ocorreu em outros intervalos, como após 8 semanas de escovação, após 4 semanas de clareamento de PC 10% e após intervenção com tiras clareadoras, porém não de maneira tão relevante quanto no grupo III. Este, por sua vez, ainda apresentou retorno aos padrões iniciais de detecção após 8 semanas. Essas alterações sugerem possível efeito da escovação nos espécimes. Entretanto, a combinação das informações sobre composição com os achados microestruturais de desorganização observados por AFM e CLSM sugerem que os grupos clareados por H_2O_2 passaram por remoção de camadas superficiais com exposição de proteínas subsuperficiais, gerando maiores contagens após 4 semanas de utilização. Possivelmente, minerais despojados por oxidação de matéria orgânica podem ter sido removidos com auxílio da escovação e até mesmo por impacto negativo do uso de ultrassom antes das análises. A continuidade da remoção de minerais em escala nanométrica, gerou após 8 semanas de utilização um padrão ainda mais suave e destruído da microestrutura acompanhado do retorno das contagens de conteúdo protéico para valores similares aos iniciais nos grupos III e IV.

As avaliações de nanodureza e módulo de elasticidade são importantes parâmetros que determinam as respostas dos materiais frente a deformações plásticas e elásticas (AZER et al., 2009; GE et al., 2005; KWON et al., 2015; OYEN, 2006). Os testes de nanoindentação permitem avaliação de profundidades inferiores a 100nm, de modo a buscar alterações diretamente na superfície (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; LIPPERT, PARKER e JANDT, 2004). O teste em pequenas dimensões diminui a influência de defeitos e variabilidade das amostras. Além disso, fatores como tipo de ponta empregada, diâmetro, carga, tempo e profundidade de penetração podem afetar os resultados obtidos nesse tipo de teste (BISWAS, DEY, MUKHOPADHYAY, 2012; CUI e GE, 2007; ELFALLAH et al., 2015; GE et al., 2005; OYEN, 2006; ZIMMERMAN et al., 2010). Maiores cargas significam maior profundidade de penetração e maior influência de camadas subsuperficiais no

comportamento mecânico. Do mesmo modo, a espessura limitada do esmalte determina vantagem para indentações mais superficiais (BISWAS, DEY, MUKHOPADHYAY, 2012; ELFALLAH et al., 2015). A escolha por testes que necessitem de pequena área de contato facilita a manutenção da amostra com sua morfologia natural e permite a seleção de área reduzida para avaliação como, por exemplo, um prisma ou a região interprismática. Desse modo, testes de microdureza podem não ser tão interessantes (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; YU et al., 2015), apesar de ainda serem os mais encontrados na literatura. Dos artigos selecionados para o presente trabalho, onze abordaram testes de microdureza Knoop, Vickers ou até mesmo Brinell (BOLAY, CAKIR e GURGAN, 2012; CAVALLI et al., 2011; HENN-DONASSOLLO et al., 2016; JUSTINO, TAMES E DEMARCO, 2004; KWON et al., 2015; LEONARD et al., 2005; MAIA et al., 2008; POLYDOROU et al., 2017; SA et al., 2012; SMIDT, FEUERSTEIN e TOPEL, 2011; SOLDANI, AMARAL E RODRIGUES, 2010; ZANTNER et al., 2007). Pôde-se observar grande variabilidade dos parâmetros adotados nos testes assim como dos resultados obtidos. Além disso, teste de microdureza Knoop e Vickers necessitam da avaliação das imagens e das áreas das indentações obtidas nas amostras para o cálculo dos valores de dureza e módulo de elasticidade (OLIVER e PHARR, 2004). Trata-se de um método menos preciso do que a nanoindentação com indentador Berkovich. O uso de uma ponta pré-calibrada permite que os valores de carga e deslocamento sejam diretamente inseridos em fórmulas para cálculos mais fidedignos das propriedades físicas (OLIVER e PHARR, 2004). As cargas utilizadas para esses testes variam bastante na literatura. Em função de um piloto prévio ficou decidido pela carga final de 20mN para definição das propriedades do esmalte, em função da profundidade de penetração alcançada. Esse mesmo valor foi utilizado por Azer et al. (2009).

Muitos autores defendem que as propriedades mecânicas estão relacionadas ao pequeno conteúdo orgânico das amostras. Dessa forma, diferentes testes de dureza não são simples testes para avaliar padrões de desmineralização (SOROZINI et al., 2017). A alteração na proporção entre os componentes orgânico e inorgânico gera efeitos no comportamento do material (ELFALLAH et al., 2015; GE et al., 2005; TERUEL et al., 2015; YU et al., 2015; ZIMMERMAN et al., 2010). A matriz orgânica funciona como uma espécie de preenchimento que fica entre os cristais de HAp e na região entre bastões. Desse modo, quando esmalte é submetido a esforço ela permite um certo acomodamento (BISWAS, DEY e MUKHOPADHYAY, 2012). Além disso, o comportamento mecânico frente a estímulos, inclusive quando em função também está relacionado à organização estrutural do esmalte (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; ELFALLAH et al., 2015; GE et al., 2005; HE

e SWAIN, 2007; SA et al., 2012; TERUEL et al., 2015). O arranjo dos cristais de HAp de maneira não uniforme é capaz de promover dissipação de energia, mantendo sua resistência. Os cristais seriam capazes de deslizar entre si, principalmente em função da presença de proteínas (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; HE e SWAIN, 2007). As proteínas seriam responsáveis, portanto, pelo comportamento anisotrópico e viscoelástico do esmalte. Elas apresentam ligações de sacrifício capazes de se desenrolar frente a tensões e recuperar seu arranjo com a remoção das forças (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; ELFALLAH et al., 2015; HE e SWAIN, 2007; OYEN, 2006). Sendo assim, a oxidação desses componentes parece ser determinante para alteração do comportamento mecânico do esmalte (ELFALLAH et al., 2015; GE et al., 2005; SA et al., 2012). No presente estudo, o efeito cumulativo das modificações morfológicas e armazenamento em saliva artificial parece ter sido responsável pelo padrão observado nas amostras de aumento na nanodureza nos grupos III e IV após 8 semanas. Do mesmo modo, a combinação desses resultados com a maior exposição detectada de proteínas também pode contribuir para melhor adaptação às cargas e os maiores valores observados. Deve-se ressaltar que, para tecidos biológicos, a dureza e o módulo de elasticidade não são dependentes. Isso explica a tendência de aumento no módulo de elasticidade que, no entanto, não representou diferenças estatísticas (OYEN, 2006).

Os valores iniciais de dureza e módulo de elasticidade estão compatíveis aos encontrados na literatura. Valores entre 2 e 6GPa e de 70 a 120GPa, respectivamente, são relatados na literatura (BISWAS, DEY E MUKHOPADHYAY, 2012; ZIMMERMAN et al., 2010). Essa margem ocorre devido a variações de preparo das amostras, como planificação, polimento e eventualmente uso de ácidos. Do mesmo modo, alterações na química, cristalografia, local dos testes, grupo de dentes e diferentes doadores também podem causar variabilidade (AZER et al., 2009; ZIMMERMAN et al., 2010).

Os resultados dos testes de nanoindentação obtidos estão contrários à maioria dos achados na literatura. Para Azer et al. (2009), que avaliaram, após três semanas de utilização, amostras de esmalte planificadas e polidas expostas a tiras clareadoras a base de H₂O₂ 10%, H₂O₂ 14% e H₂O₂ 9% e dois géis caseiro de PC 22%, todos os materiais foram capazes de reduzir os valores de dureza e módulo de elasticidade quando comparados ao controle (carga de 20mN). Também para Elfallah et al. (2015) houve redução nas propriedades físicas de amostras expostas a PC 16% por 14 dias e géis clareadores de consultório (carga de 10mN). Essas alterações foram acompanhadas por maior porosidade em imagens de MEV e marcante diminuição de conteúdo proteico através da avaliação com gel de eletroforese. YU et al. (2015), também relataram redução nos valores de nanodureza (carga 2mN) para uso de PC

15% e H₂O₂ 12% após uma semana de utilização acompanhadas de uma superfície mais rugosa e corroída em MEV. No entanto, o armazenamento em saliva artificial foi trocado a cada dois dias, somente. Após remineralização por mais sete dias houve recuperação dos valores que não retornaram aos valores iniciais. O único autor que apresentou resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo foi Zimmerman et al. (2010). Com aplicação de cargas de 5mN e única aplicação de H₂O₂ 10% na forma de tiras clareadoras, amostras de esmalte que haviam sido autoclavadas tiveram aumento na sua dureza e módulo de elasticidade. Este processo é inerente aos protocolos de biossegurança adotados para doação de dentes no Biobanco da FO-UERJ protocolo antes do uso de amostras biológicas. No entanto, os autores defenderam que os elementos que passam por esse preparo prévio apresentam maiores valores de dureza e módulo de elasticidade o que poderia afetar resultados. Os valores obtidos, no entanto, são condizentes aos encontrados na literatura.

Deve-se ressaltar que os testes *in vitro* podem superestimar resultados. Os trabalhos de Justino, Tames e Demarco (2004) e Henn-Donassollo et al. (2016) demonstraram que há diferenças de comportamento de amostras submetidas às mesmas rotinas de intervenção *in vitro* e *in situ*. Justino, Tames e Demarco (2004) aplicaram gel de PC 10% para clareamento por 8h diárias enquanto Henn-Denassollo et al. (2016) também avaliaram géis de PC 10% e tiras clareadoras em aplicações de uma 1h/dia. Ambos realizaram intervenção por 14 dias e nos intervalos, o armazenamento foi feito em água deionizada ou na cavidade oral de voluntários. As análises realizadas em ambos os trabalhos mostraram piores resultados com efeitos deletérios para as condições *in vitro*, o que também pode ser consequência do armazenamento em água e não em saliva artificial. Na cavidade oral, além dos efeitos benéficos da saliva os géis aplicados passam por diluição pelos líquidos, em especial aqueles que não são aplicados com o auxílio de moldeiras personalizadas, como é o caso das tiras (LEONARD et al., 2005; SA et al., 2012; ZANTNER et al., 2007), podendo inclusive ser deslocados pela ação mecânica de lábios e bochechas (LEONARD et al., 2005). Do mesmo modo, há desafios cariogênicos, hábitos alimentares, escovação com dentifrícios abrasivos, quadros de erosão que podem desfavorecer a superfície (SMIDT, FEUERSTEIN e TOPEL, 2011).

É difícil determinar em que grau ocorreria na cavidade oral o mesmo observado nos diferentes ensaios realizados no presente trabalho (CAREY, 2014; DEMARCO, MEIRELES e MASOTTI, 2009; KWON e WERTZ, 2015; SA et al., 2012; YU et al., 2015; ZIMMERMAN et al., 2010). A falta de padronização de estudos *in vitro* determinam interesse e relevância do desenvolvimento de protocolos para ensaios laboratoriais sobre clareamento de

modo a facilitar comparações e aumentar a relevância desse tipo de estudo permitindo extrapolações para a clínica. Além disso, são necessários estudos *in situ* e *ex vivo* que possam verificar se as tendências observadas neste estudo também são verificadas clinicamente. Cabe ressaltar os resultados obtidos ratificaram a segurança dos géis a base de PC 10%. As alterações produzidas pelos grupos a base de H₂O₂ na forma de gel (uso caseiro) e tiras clareadoras (produtos de bancada) gerou alterações que merecem atenção do clínico mas não parecem gerar efeitos clinicamente perceptíveis. Entretanto, a orientação e acompanhamento de profissionais mostrou-se fundamental para adequação à realidade de desafios intra-orais de cada paciente e regulação do tempo de procedimento realizado.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, dentro das limitações deste estudo *in vitro*, em rejeição parcial às hipóteses nulas levantadas que:

- a) o armazenamento em saliva artificial (grupo I) e a utilização de PC 10% (grupo II) não demonstraram alterações na microestrutura do esmalte dentário humano em nenhum dos intervalos. Do mesmo modo, não foram observadas diferenças significativas nos seus valores de rugosidade (parâmetros Sa e Sq). Já as amostras clareadas com produtos a base de H₂O₂ na forma de géis (grupo III) ou tiras clareadoras (grupo IV) demonstraram após 4 semanas uma maior exposição do padrão prismático. Após 8 semanas, houve redução da detecção dos prismas, com uma superfície mais suave, com a presença de riscos provenientes da escovação. Sendo assim, foram observadas diferenças estatísticas para Sa e Sq após 8 semanas no grupo III e para Sq no grupo IV;
- b) a composição inorgânica não apresentou diferenças nos espectros obtidos. Já o conteúdo orgânico teve um padrão de aumento de detecção de picos após 4 semanas de intervenção nos grupos III e IV. Este comportamento foi seguido por redução nas análises após 8 semanas, permanecendo em valores maiores que os iniciais. A maior contagem de componentes orgânicos foi mais marcante na intervenção com gel de H₂O₂ 10% (grupo III);
- c) para o módulo de elasticidade não foram detectadas diferenças entre os grupos e materiais testados, apesar de uma tendência de aumento após 8 semanas de utilização de produtos a base de H₂O₂ (grupos III e IV). Entretanto, para nanodureza, houve diferença estatística representada por aumento dos valores após 8 semanas de utilização nos grupos III e IV, provavelmente derivados de uma superfície mais lisa e resistente à penetração.

Sendo assim, alterações na morfologia observadas nos grupos clareados com H₂O₂ (grupos III e IV) foram acompanhadas de maior exposição de proteínas após 4 semanas. A progressão de alterações na superfície com perda de camadas superficiais e exposição de camadas subsuperficiais geraram menor detecção de arranjo estrutural na superfície. A

superfície menos rugosa e exposta à saliva artificial, apresentou resistência à penetração do indentador e assim, aumento dos valores de dureza. A possível combinação desses achados com a exposição de proteínas promove melhor deslizamento e adaptação dos cristais e melhor desempenho frente às cargas empregadas. Tais alterações, em especial as de rugosidade, podem não ser clinicamente perceptíveis.

Conclui-se assim, que o acompanhamento profissional é fundamental para adequar o procedimento ao paciente e suas condições intra-orais. Cuidado adicional deve ser recomendado nos casos em que H₂O₂ é utilizado, em especial quando protocolos excessivos são empregados. Novos estudos *in situ* e *ex vivo* são fundamentais para que se determine o real impacto clínico desses achados.

REFERÊNCIAS

- ALQAHTANI, M. Q. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *The Saudi Dental Journal*, Riyadh, v. 26, n. 2, p. 33-46, Abr 2014.
- AZER, S.S. et al. Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 37, n. 3, p. 185-190, Mar 2009.
- BISTEY, T. et al. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 35, n. 4, p. 325-330, Abr 2007.
- BISWAS, N.; DEY, A.; MUKHOPADHYAY, A.K. Loading rate effect on nanohardness of human enamel. *Indian Journal of Physics*, Calcutta, v. 86, n. 7, p. 569–574, Jul 2012.
- BOLAY, S.; CAKIR, F.Y.; GURGAN, S. Effects of toothbrushing with fluoride abrasive and whitening dentifrices on both unbleached and bleached human enamel surface in terms of roughness and hardness: an in vitro study. *The Journal of Contemporary Practice*, New Delhi, v. 13, n. 5, p. 584-589, Set 2012.
- BORGES, A.B. et al. Toothbrushing abrasion susceptibility of enamel and dentin bleached with calcium-supplemented hydrogen peroxide gel. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 49, p. 54-59, Jun 2016.
- CAREY, C.F. Tooth whitening: what we now know. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, St. Louis, MO, v. 14S, p. 70-76, Jun 2014.
- CAVALLI, V. et al. Effects of the addition of fluoride and calcium to low-concentrated carbamide peroxide agents on the enamel surface and subsurface. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont, NY, v. 29, n. 5, p. 319-325, Mai 2011.
- CUI, F.Z.; GE, J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Chichester, West Sussex, UK, v.1, n.3, p. 185 – 191, Mai-Jun 2007.
- DEMARCO, F.F.; MEIRELES, S.S.; MASOTTI, A.S. Over-the-counter whitening agents: a concise review. *Brazilian Oral Research*, São Paulo, SP, v. 23S1, p. 64-70, 2009.
- EIMAR, H. et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 40s, p. e25–e33, Dez 2012.
- ELFALLAH, H.M. et al. Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. *Acta Biomaterialia*, Kidlington, Oxford, UK, v. 20, p. 120-128, Jul 2015.
- FARINA, M. et al. Atomic force microscopy study of tooth surfaces. *Journal of Structural Biology*, San Diego, v. 125, n. 1, p. 39-49, Mar 1999.

FINKE, M.; JANDT, K.D.; PARKER, D.M. The early stages of native enamel dissolution studied with atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, Orlando, FL, v. 232, n. 1, p. 156-164, Dez 2000.

GE, J. et al. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials*, Amsterdam, v. 26, n. 16, p. 3333-3339, Jun 2005.

GOO, D.H. et al. The efficiency of 10% carbamide peroxide gel on dental enamel. *Dental Materials Journal*, Tokyo, v. 23, n. 4, p. 522-527, Dez 2004.

HAYWOOD, V.B.; HEYMANN, H.O. Nightguard vital bleaching. *Quintessence International*, Berlin, Germany, v.20, p. 173-176, 1989.

HE, L.H.; SWAIN, M.V. Contact induced deformation of enamel. *Applied Physics Letters*, New York, v. 90, n. 171926, Abr 2007.

HEGEDÜS, C. et al. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 27; n. 7, p. 509-515, Set 1999.

HENN- DONASOLLO, S. et al. In situ and in vitro effects of two bleaching treatments on human enamel hardness. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 56-59, Jan-Fev 2016.

JUNQUEIRA, R.B. et al. In vitro analysis of morphology of human enamel submitted to excessive use of external bleaching agents. *International Journal of Morphology*, Temuco, CL, v. 29, n. 1, p. 118-122, 2011.

JUSTINO, L.M.; TAMES, D.R.; DEMARCO, F.F. In situ and in vitro effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. *Operative Dentistry*, Seattle, v. 29, n. 2, p. 219-225, Mar-Abr 2004.

KWON, S.R. et al. Effect of various tooth whitening modalities on microhardness, surface roughness and surface morphology of the enamel. *Odontology*, Tokyo, v. 103, n. 3, p. 274-279, Set 2015.

KWON, S.R.; WERTZ, P.W. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v. 27, n. 5, p. 240-257, Set-Out 2015.

LEONARD, L.H. et al. Effect on enamel microhardness of two consumer- available bleaching solutions when compared with a dentist-prescribed, home-applied bleaching solution and a control. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, Hamilton, US v. 17, n. 6, p. 343-350, 2005.

LIPPERT, F.; PARKER, D.M.; JANDT, K.D. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science*, Orlando, FL, v. 280, n. 2, p. 442-448, Dez 2004.

LOYOLA-RODRIGUEZ, J.P. et al. Atomic force microscopy observation of the enamel roughness and depth profile after phosphoric acid etching. *Journal of Electron Microscopy*, Tokyo, v. 59, n. 2, p. 119-125, 2010.

- LUQUE-MARTINEZ, I. et al. Comparison of efficacy of tray-delivered carbamide and hydrogen peroxide for at-home bleaching: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, Berlin, v. 20, n. 7, p. 1419-1433, Set 2016.
- MAIA, E. et al. The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: An *in situ* study. *Journal of Dentistry*, Guildford, v. 36, n. 1, p. 2-7, Jan 2008.
- MAHMOUD, S.H et al. Effect of 16% carbamide peroxide bleaching gel on enamel and dentin surface micromorphology and roughness of uremic patients: an atomic force microscopic study. *European Journal of Dentistry*, Ankara, v. 4, n. 2, p. 175-182, Abr 2010.
- MAHRINGER, C. et al. Examination of native and carbamide peroxide-bleached human tooth enamel by atomic force microscopy. *Ultrastructural Pathology*, New York, v. 33, n. 5, p. 189-196, Out 2009.
- MANHEIMMER, W.A. *Microscopia dos materiais*. Edição da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002.
- NANCI, A. *Ten Cate: Histologia oral*. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008.
- OLIVER, W.C.; PHARR, G.M. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research*, Pittsburgh, PA, v. 19, n. 1, p. 3-20, Jan 2004.
- OYEN, M.L. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *Journal of Biomechanics*, Elmsford, v. 39, n. 14, p. 2699-2702, 2006.
- ÖZKAN, P. et al. Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 71, n. 3-4, p. 488-497, Mai-Jul 2013.
- POLYDOROU, O. et al. The effect of long-term use of tooth bleaching products on the human enamel surface. *Odontology*, Tokyo, Mai 2017.
- RAE, A. et al., State of the art Raman techniques for biological applications. *Methods*, Orlando, v. 68, n. 2, p. 338-347, Jul 2014.
- SA, Y. et al. Investigation of three home-applied bleaching agents on enamel structure and mechanical properties: an *in situ* study. *Journal of Biomedical Optics*, Bellingham, WA, v. 17, n. 3, p. 0350021- 03500219, Mar 2012.
- SCHULZE, K.A. et al. Micro-Raman spectroscopic investigation of dental calcified tissues. *Journal of Biomedical Materials Research*, Hoboken, NJ, v. 69, n. 2, p. 286-293, Mai 2004.
- SERRAGLIO, C.R. et al. Efficacy and safety of over-the-counter whitening strips as compared to home-whitening with 10 % carbamide peroxide gel—systematic review of RCTs and metanalysis. *Clinical Oral Investigations*, Berlin, v. 20, n.1, p. 1-14, Jan 2016.

SMIDT, A.; FEUERSTEIN, O.; TOPEL, M. Mechanical, morphologic, and chemical effects of carbamide peroxide bleaching agents on human enamel in situ. *Quintessence International*, Berlin, Germany, v. 42, n. 5, p. 407-412, Mai 2011.

SOLDANI, P.; AMARAL, C.M.; RODRIGUES, J.A. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, Chicago, v. 30, n. 2, p. 203-211, Abr 2010.

SOROZINI, M. et al. Assessment of Ca and P content variation in enamel during an eight-week bleaching protocol using energy dispersive X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Oxford, v. 131, n. 1, p. 93-98, Mai 2017.

TANAKA, R. et al. Micro-structural integrity of dental enamel subjected to two tooth whitening regimes. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 55, n.4, p. 300-308, Abr 2010.

TERUEL, J. de D. et al. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 60, n. 5, p. 768-775, Mai 2015.

VARGAS-KOUDRIAVTSEV, T.; HERRERA-SANCHO, Ó.A. Effect of tooth-bleaching on the carbonate concentration in dental enamel by Raman spectroscopy. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, Spain, v. 9, n. 1, p. e101-e106, Jan 2017.

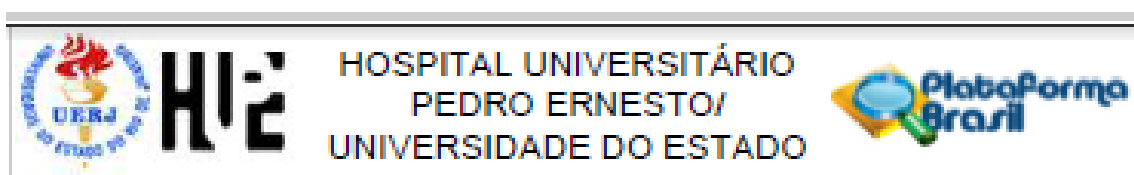
YU, D. et al. Nanotribological and Nanomechanical Properties Changes of Tooth After Bleaching and Remineralization in Wet Environment. *Nanoscale Research Letters*, New York, v. 10, n. 1, p. 463-473, Dez 2015.

WEISSMÜLLER, G., ROCHA, G. M., MONCORES, M. C. Microscopia de Varredura por Sonda e Microscopia de Força Atômica In: DE SOUZA, W. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas* 3. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, cap. 32, p. 387-399, 2011.

ZANTNER, C. et al. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dental Materials*, Washington, DC, v. 23, n. 2, p. 243-250, Fev 2007.

ZIMMERMAN, B. et al. Alteration of dentin–enamel mechanical properties due to dental whitening treatments. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 339–346, Mai 2010.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos de regimes de sobreclareamento associados a géis caseiros sobre o conteúdo mineral e rugosidade do esmalte dentário humano.

Pesquisador: Marianna Sorozini Femeira de Miranda

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24229913.9.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 458.155

Data da Relatoria: 13/11/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado corretamente

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos de substâncias clareadoras de dentes sobre o esmalte dentário

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há, pois serão utilizados dentes de banco

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho é atual e relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos a documentação necessária foi apresentada

Recomendações:

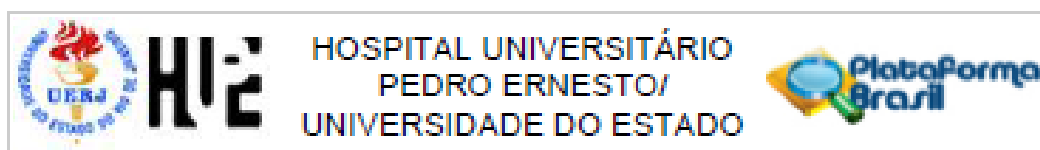
Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho pode ser realizado da forma como foi apresentado

Situação do Parecer:

Aprovado



Continuação do Parecer: 450.155

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 14 de Novembro de 2013

Assinador por:
MARIO FRITSCH TOROS NEVES
(Coordenador)