

ALEX MENDEZ DE ARRUDA

**AÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 35% SOBRE A MORFOLOGIA
DO ESMALTE E SUA INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DES-
REMINERALIZAÇÃO: ESTUDO *IN SITU*.**

ARAÇATUBA
2010

ALEX MENDEZ DE ARRUDA

**AÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 35% SOBRE A
MORFOLOGIA DO ESMALTE E SUA INTERFERÊNCIA NO PROCESSO
DES-REMINERALIZAÇÃO: ESTUDO *IN SITU*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso

ARAÇATUBA
2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G924e Arruda, Alex Mendez de.
Ação do peróxido de hidrogênio 35% na morfologia do esmalte e sua interferência do processo Des-remineralização : estudo *in situ*

Alex Mendez de Arruda. -- Araçatuba : [s.n.], 2010
102 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientador: Prof. André Luiz Fraga Briso

1. Clareamento dental 2. Teste de dureza 3. Peroxido de
Hidrogênio 4. Sacarose

Black D2
CDD 617.6

DADOS CURRICULARES

ALEX MENDEZ DE ARRUDA

NASCIMENTO	16/02/1985 - CORUMBÁ – MS
FILIAÇÃO	Airton Fernando de Arruda Marta Mendez de Arruda
2004/2007	Graduação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS
2008/2009	Obtenção dos créditos referentes ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Dentística, em nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A Deus, por seu infinito amor e grandeza, que me presenteou com a vida.

O Dedico este trabalho aos meus pais, **Airton e Marta**, por seu amor incondicional, ajudando, amparando e apoiando em todos os momentos, sorrindo a cada sorriso meu e enxugando cada lágrima derramada. Vocês foram e são minha base, possibilitando a realizações de todos os meus sonhos, conduzindo meus passos, para trilhar uma vida repleta de conquistas e felicidade. A palavra desistir nunca existiu para mim graças à imensa confiança de vocês em minha capacidade. Obrigado Papai e obrigado Mamãe.

A meu irmão **Bruno**, por ser o verdadeiro significado dessa palavra, motivo de orgulho e muita felicidade. Amo você

A minha Avó **Elba** que sempre me apoiou e se preocupou em me ver bem. Com
a senhora também divido essa conquista!

A minha tia **Cíntia** pela preocupação, pela disposição em me ajudar e sempre
me apoiar nas minhas decisões, essa conquista
também é sua.

A minha cunhada **Roseane**, que ao lado do meu irmão me proporcionaram
momentos de alegria, e sempre abriram minha mente
para tomar as decisões certas, a você Xuxu mais essa
vitória.

Amo Muito Vocês...

AGRADECIMIENTO

ESPECIAL

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Adj. Dr. André Luiz Fraga Briso, que me ajudou em meu início na vida científica, por me apresentar este mundo intrigante e interessante da pesquisa. Agradeço toda a paciência, compreensão e confiança em mim valorizando minha capacidade e aceitando minhas limitações.

Ao Prof. Titular. Renato Herman Sundfeld, um professor extremamente capaz, que me ajudou nos momentos de dificuldades, me apoiou e me orientou. Apesar de não termos realizados muitos trabalhos juntos sempre esteve pronto para me ajudar, com carinho e bom humor. Um exemplo de professor.

Ao Prof. Ass. Dr. Paulo Henrique dos Santos, um exemplo de pesquisador, com futuro promissor. Obrigado pela ajuda em vários trabalhos, inclusive na minha dissertação.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e vice-diretora Prof^a. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**, pela acolhida durante o curso de Pós-graduação.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** e Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi**.

Aos **professores** da Disciplina de Dentística Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelos ensinamentos e carinho durante esses anos de estudos.

Aos **funcionários** do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pois cada um a sua maneira, contribuiu para minha formação na pós-graduação.

À funcionária **Magda**, pela sua competência, presteza e amizade, sempre com um sorriso no rosto. Obrigado pelos lanches durante as horas no departamento que me deixaram acordadas e com disposição.

Aos queridos e inesquecíveis amigos de pós-graduação **Lucas, Ana Paula e Fernanda**, turma linda que conquistei em Araçatuba, amigos para uma vida toda, sejam nos momentos tristes, sejam nas alegrias e festas.

À **Roberta (Coradonha)**, amiga-irmã que ganhei nesses anos em Araçatuba, pessoa incrível, de alegria incomparável, presente em vários momentos, companheira de muitas histórias, passamos por muitas dificuldades juntos, mas vencemos. Obrigado Rô.

A amiga **Jorgiana (cabeção)**, pelo companheirismo e pelas horas de lazer e conversas que passamos juntos, pelo carinho desde a época de graduação, e por toda a ajuda que me deu durante os anos que passamos juntos em Araçatuba. Obrigado do fundo do coração.

Às amigas **do Departamento de Pediatria**, que sempre me apoiaram e me ensinaram muito sobre trabalhos in situ.

Aos **funcionários** da Sessão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela paciência, ajuda e amizade.

Ao Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do Prof. Dr. **Alberto Carlos**

Botazzo Delbem pela autorização do uso de equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos **bibliotecários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela dedicação, pelos ensinamentos, colaboração e presteza durante todo o período de elaboração deste trabalho.

A **Sandrine Berger** pela ajuda nas leituras de microscopia eletrônica de varredura na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

A professora **Mônica Campos Serra**, por ter disponibilizado o microdurômetro da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, e por ter me orientado como realizar melhores leituras.

As voluntárias – **Tamires, Leticia, Patricia, Vanessa, Natalia, Allana, Simone, Ana Helena, Ariane, Najla, Jorgiana**. Pela participação responsável e consciente no projeto, o que garantiu ao trabalho a confiabilidade necessária.

À empresa, **FGM Produtos Odontológicos**, pelos géis clareadores utilizados.

À **FAPESP**, pela Bolsa concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desse trabalho, seja pela torcida, com simples palavras, com pensamentos positivos.

Obrigado a todos.

EPÍGRAFE

“Quem for fundamentalmente um mestre, apenas toma
a sério tudo que se relaciona com os seus discípulos,
incluindo a si próprio.”

(Friedrich Nietzsche)

LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	= porcentagem
µm	= micrometro
Adj	= Adjunto
ANOVA	= Análise da variância
Ass.	= Assistente
DIP	= Dispositivo Intra Bucal palatino
et al.	= e colaboradores
FOA	= Faculdade de Odontologia de Araçatuba
IL	= Illinois
Inc.	= Incorporation
Ind. Com. Ltda.	= Indústria e Comércio Limitada
Ltda.	= Limitada
KHN	= Knoop Hardness Number (Número de Dureza Knoop)
MEV	= Microscopia Eletrônica de varredura
mm	= milímetro (unidade de medida equivalente a 10 ⁻³ m)
MN	= Minnessota
MOLP	= Microscopia Óptica de Luz Polarizada
n°	= número
Prof.	= Professor
s	= segundo

SP = São Paulo

UNESP = Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Vol. = Volume

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1: Figuras dos cortes em MEV e MOLP.....83, 84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1:	Microdureza dos grupos clareados e controle.....	55
------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1: Critérios de exclusão para os voluntários.....56

CAPÍTULO 2

Quadro 1: Critérios de exclusão para os voluntários.....86

SUMÁRIO

1. Introdução geral	29
2. Capítulo 1 – Ação do peróxido de hidrogênio a 35% na microdureza da superfície do esmalte submetido ao desafio cariogênico: estudo in situ.....	32
2.1.....	Resumo 33
2.2	Abstract 34
2.3	Introdução 35
2.4	Proposição 37
2.5	Material e método 38
2.6	Resultado 44
2.7	Discussão 45
2.8	Referências 49
3. Capítulo 2 – Análise histo-morfológica do esmalte dental submetido a ação do peróxido de hidrogênio a 35% e aodesafio cariogênico: estudo in situ.....	57
3.1	Resumo 58
3.2	Abstract 60
3.3	Introdução 62
3.4	Proposição 65
3.5	Material e método 66
3.6	Resultado 71
3.7	Discussão 72
3.8	Referências 77
Anexos	87

INTRODUÇÃO GERAL

1- Introdução geral

A preocupação dos pacientes com a aparência vem aumentando constantemente, cabendo ao Cirurgião-dentista o planejamento adequado para o restabelecimento de um sorriso esteticamente saudável. As alterações cromáticas dentais ocorrem com frequência tanto em dentes vitais como em despolpados e comprometem substancialmente a aparência do sorriso.

As alterações cromáticas podem ser classificadas em intrínsecas e extrínsecas, dependendo de sua localização e etiologia. Geralmente, as alterações extrínsecas ocorrem por deposição de pigmentos na superfície do esmalte dental, enquanto as intrínsecas são resultado da presença de substâncias cromogênicas no interior dos tecidos dentais mineralizados. Em consequência disso, a busca por dentes brancos e saudáveis fez com que os procedimentos de clareamento dental fossem propostos e, por serem considerados conservativos, ocupassem importante espaço nos planejamentos e tratamentos reabilitadores estéticos.

Basicamente duas técnicas estão disponíveis para o clareamento de dentes vitais: a técnica caseira e a de consultório. O mecanismo de ação do agente clareador é atribuído à oxidação de moléculas que produzem as alterações de coloração ou escurecimento da dentina e do esmalte. Entretanto, a eficácia desse procedimento depende de muitos fatores, variando de acordo com o tipo de pigmento, a condição do dente, se é vital ou não-vital e a presença de alguns hábitos nocivos praticados pelo paciente, em particular em relação à dieta e ao fumo.

O clareamento de consultório é realizado pelo profissional, devendo este ter um controle rigoroso na aplicação do produto clareador, peróxidos de hidrogênio nas concentrações de 35-38% são comumente utilizado nessa técnica. Portanto, é essencial que o profissional tenha um conhecimento com relação ao mecanismo de ação e à segurança

biológica do produto para ter condições de indicá-los corretamente, uma vez que o emprego de produtos em altas concentrações está sendo relacionado com alterações estruturais no substrato dental.

Possivelmente estas alterações tenham relação com a difusão do peróxido pelo esmalte e a conseqüente liberação de compostos reativos de oxigênio que, devido a sua ação inespecífica, além de oxidarem as moléculas pigmentadas, também afetam a matriz do esmalte, provocando alterações sub-clínicas da micromorfologia superficial do esmalte.

Assim, embora a eficácia dos agentes clareadores esteja bem documentada. Observa-se que a literatura apresenta resultados conflitantes nas pesquisas *in vitro* e carência de informações oriundas de análises sobre o conteúdo mineral do esmalte em modelos *in situ*, que apresentam a vantagem de levar a precisão das análises laboratoriais às condições clínicas.

Uma vez conhecidos os efeitos colaterais, mesmo que transitórios causados pela ação do peróxido de hidrogênio na morfologia do esmalte, ainda assim, é comum encontrarmos pacientes que são submetidos às técnicas clareadoras, sem que antes recebam tratamento para adequar a saúde do meio bucal. Espera-se que antes da realização de procedimentos estéticos, os fatores causadores da cárie dental sejam controlados e, sobretudo, que os pacientes recebam orientações e monitoramento sobre a formação de placa bacteriana sobre os dentes a serem clareados.

Deste modo é importante que se verifique a ação de agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio a 35% sobre esmalte dental hígido e submetido ao desafio cariogênico, através de análises microscópicas e testes de microdureza.

CAPITULO 1

**Ação do peróxido de hidrogênio a 35% na microdureza da superfície do esmalte
submetido ao desafio cariogenico: estudo in situ**

2.1- Resumo

Este trabalho analisou *in situ* o efeito de um clareador a base de peróxido de hidrogênio a 35%, na microdureza superficial em esmalte bovino. Para tanto, 100 fragmentos dentais com dimensões de 4x4x2mm, foram polidos e submetidos à leitura inicial de microdureza Knoop. Foram selecionados os 44 fragmentos com microdureza mais próxima da mediana e estas unidades experimentais foram aleatoriamente divididas em grupos de 4 elementos que foram adaptados a aparelhos moveis usados por 11 indivíduos. Os voluntários foram orientados a utilizar o dispositivo durante todo o dia, com exceção dos momentos destinados à alimentação, higienização e às sessões clareadoras. Metade dos fragmentos de cada dispositivo foi submetida a uma sessão de clareamento (3 aplicações de 15 minutos) por semana, durante 14 dias, totalizando 3 sessões clareadoras. Os fragmentos não clareados permaneceram no dispositivo sem sofrer qualquer tipo de influência do clareador. Durante o uso do aparelho os fragmentos dentais foram submetidos ao acúmulo bacteriano, sendo gotejada uma gota da solução de sacarose a 20% em cada bloco, oito vezes ao dia, visando aumentar o desafio cariogênico. Após 7 dias, do término dos tratamentos foi realizada nova análise da microdureza e os valores foram submetidos à Análise de Variância ao nível de 5%. Pôde-se observar diminuição nos valores de microdureza, tanto para o grupo clareado (média: 238,9 – 179,4), quanto para o grupo controle (média: 237,3 – 191,7), sendo as médias mais baixas encontradas no grupo clareado. Concluiu-se que o tratamento clareador com peróxido de hidrogênio a 35% potencializou a redução da microdureza em dentes submetidos ao desafio cariogênico.

Palavras-chave: Clareamento de Dente, Testes de dureza, Esmalte dental, Sacarose

The effect of 35%hydrogen peroxide on enamel microhardness submitted to cariogenic challenge: in situ study.

2.2- Abstract

This *in situ* study analyzed the effect of bleaching using 35% hydrogen peroxide on the enamel microhardness. Therefore, 100 dental fragments with dimensions of 4x4x2mm, were polished and subjected to the initial reading of microhardness. We selected 44 fragments presenting microhardness data similar to the mean value and these experimental units were randomly divided into groups of four elements that have been adapted in mobile devices to be worn by 11 volunteers. They were instructed to use the device throughout the day, except in meal times, cleaning and whitening sessions. Bleaching procedures were performed in half of the fragments placed on each device (3 applications of 15 minutes) per week for 14 days, totalizing 3 whitening sessions. Unbleached fragments remained on the device without suffering any kind of influence of the bleaching agent. While using the appliance, dental fragments were lead to bacterial colonization; sine a 20% sucrose solution was dripped eight times a day, aiming to increase the cariogenic challenge. After seven days of the end of the treatment, microhardness \analysis was performed. Data were submitted to ANOVA and Fisher's test at 5%. It was observed a decrease in microhardness values for both bleached group (mean: 238.9 to 179.4) and control group (mean: 237.3 to 191.7), besides that, the lowest values were verified in the bleached groups. It was concluded that bleaching using 35%hydrogen peroxide potentiated the reduction in microhardness in teeth submitted to cariogenic challenge.

Key words: tooth Bleaching, testing the hardness, enamel, Sucrose.

2.3- Introdução *

O sorriso é a principal manifestação de alegria do ser humano. Pessoas com comprometimento estético do sorriso podem sentir-se inibidas, prejudicando o seu convívio em sociedade [Alves et al., 2007; Bagheri et al., 2007].

Esse fato retrata a valorização da estética em nossa cultura e, em função disso, na Odontologia também é notada uma crescente procura por tratamentos relacionados com a melhora da aparência [Gonçalves et al., 2001]. Sem sombra de dúvidas, o clareamento dental é um dos procedimentos clínicos mais procurados pelos pacientes e realizados pelos profissionais para alcançar este fim.

Dentre as formas mais empregadas para se clarear dentes polpados, destaca-se a aplicação caseira de peróxido de carbamida, que de acordo com Haywood e Heymann [1991], tem como principais vantagens a segurança biológica e a facilidade de aplicação.

De encontro à grande demanda pela estética, outros produtos foram desenvolvidos e também podem ser empregados para a mesma finalidade. Como exemplo pode-se citar os produtos à base de peróxido de hidrogênio a 35%, que devem ser aplicados no consultório odontológico sob os cuidados dos profissionais, uma vez que ainda não está estabelecido um protocolo seguro em relação à proteção dos tecidos moles da cavidade bucal [Bagheri et al., 2007; Ernst et al., 1996; Titley et al., 1991; Torneck et al., 1991].

Independente da técnica ou do produto utilizado, o mecanismo de ação desses agentes clareadores baseia-se em uma complexa reação de oxidação, com a liberação de formas reativas de oxigênio, que penetram pelas porosidades dos prismas de esmalte, atingindo a dentina e por meio de um processo químico, provoca a quebra das moléculas orgânicas, originando compostos mais leves, menores e mais claros [Tredwin et al., 2006; Tames et al., 1998; Torneck et al., 1991].

* Normalização segundo a revista Caries Research (Anexo 5)

Apesar dos bons resultados clínicos das técnicas clareadoras, suas realizações tem sido associadas à diminuição da resistência ao desgaste do esmalte e da dentina, ao aumento da rugosidade, à diminuição da microdureza, além de alterações histomorfológicas importantes [Basting et al., 2007; Freitas et al., 2002; Ernst et al., 1996; Feigal et al., 1994]. Porém, a grande variação da posologia empregada nos tratamentos clareadores e o fato da maioria dos trabalhos serem realizados *in vitro*, acabam limitando a comparação dos resultados, além de não permitir extrapolá-los para uma condição clínica, em que os dentes são continuamente submetidos aos ciclos de desmineralização e remineralização.

Estudos *in situ* representam uma etapa intermediária entre os experimentos laboratoriais e clínicos [Zero, 1995]. A sua condução fundamenta-se na tentativa de reproduzir o processo a ser estudado sob influência de fatores biológicos como o efeito protetor da saliva [Zero, 1995]. Adicionalmente, os modelos intrabucais possibilitam uma proximidade da realidade clínica, ao mesmo tempo em que preservam a sensibilidade dos modelos laboratoriais, uma vez que as análises podem ser realizadas fora da cavidade bucal utilizando métodos sensíveis e precisos. Neste sentido, [Basting et al, 2007], estudaram, *in situ*, o efeito do clareamento caseiro sobre o esmalte, verificando que, mesmo na presença de saliva, ocorre aumento nos valores da rugosidade superficial da estrutura dental tratada com peróxido de carbamida a 10%.

Desta forma, em função dos resultados conflitantes encontrados *in vitro*, do número restrito de estudos sobre o efeito do peróxido de hidrogênio no esmalte e da ausência de trabalhos realizados em condições experimentais semelhantes às condições clínicas, nota-se a necessidade de avaliar a ação do clareador, à base de peróxido de hidrogênio a 35%, sobre a microdureza do esmalte submetido ao desafio cariogênico. A hipótese nula testada foi a de que o peróxido de hidrogênio a 35% não potencializaria as alteração na microdureza superficial do esmalte provocadas pelo desafio cariogênico.

2.4- Proposição

O propósito deste estudo foi avaliar *in situ* o efeito do peróxido de hidrogênio a 35% na microdureza do esmalte, exposto ao desafio cariogênico.

2.5- Materiais e métodos

2.5.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (processo n° 2008-01237) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, (ANEXO 1) obedecendo à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e a resolução do Conselho Federal de Odontologia 179/93 do Código de Ética Profissional Odontológico. Os voluntários selecionados tomaram ciência do experimento por meio da “carta de informação ao voluntário” e assinaram um “termo de consentimento livre e esclarecido”.

2.5.2 Delineamento Experimental

O fator avaliado neste estudo *in situ* foi o clareamento dental, realizado em 3 sessões, durante 14 dias. Para obtenção das unidades experimentais, 100 fragmentos dentais bovinos polidos e sem trincas foram submetidos à leitura inicial de sua microdureza superficial, realizando 3 indentações em cada fragmento. Após a obtenção dos valores de microdureza superficial de cada fragmento, os 44 fragmentos que apresentaram valores de microdureza mais próximos da mediana (246) foram selecionados para a continuação do experimento.

A variável de resposta foi a alteração da microdureza Knoop do esmalte dental. Os resultados obtidos passaram por testes estatísticos específicos para verificação da significância entre as médias ($\alpha = 0.05$).

2.5.3 Seleção dos voluntários

Foram selecionados 11 voluntários adultos jovens com idade entre 19 e 26 anos, do Curso de Graduação e Pós - graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Após receberem todas as informações correspondentes à execução da pesquisa, os voluntários em potencial foram submetidos à anamnese e exame clínico, em que foram checados os critérios de exclusão (Quadro1).

Depois de selecionados, os voluntários receberam verbalmente e por escrito esclarecimentos detalhados sobre o estudo (ANEXO 2), e após estarem de acordo com a sua participação, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 3) e receberam um kit contendo escova dental, fio dental, dentifrício fluoretado, um estojo para guardar o aparelho durante as refeições e uma lista de orientações (ANEXO 4).

2.5.4 Obtenção dos fragmentos de esmalte dental

Incisivos de bois abatidos entre 24 e 30 meses foram obtidos em frigoríficos da região de Araçatuba- SP. Após suas extrações, os dentes foram limpos e armazenados em solução neutra de timol a 0,1%. Na seqüência, foram polidos com escova do tipo Robson untadas com pedra-pomes e água e analisados em 45x em lupa estereoscópica (Carl Zeiss Company – DSM-940 A, Oberkochen, Baden- Württemberg, Germany) e aqueles que apresentaram fraturas ou trincas foram substituídos.

Logo após, as raízes dos dentes foram separadas das coroas com a utilização de um disco diamantado dupla-face (7020 KG Sorensen Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brazil), movidos em baixa velocidade. Posteriormente as coroas foram fixadas em uma placa de acrílico e o conjunto foi levado à cortadeira metalográfica (Isomet 2000 - Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), que atuou com 2 discos paralelos, com velocidade de 300rpm e sob refrigeração a água, obtendo-se blocos de esmalte com 4 X 4mm.

Na seqüência, foi feito o aplainamento do tecido dental subjacente com auxílio de lixas de óxido de alumínio de granulações 320 e 600, em velocidade de 100 rpm, pressão de 100g, por 60s. Este procedimento objetivou padronizar a espessura dos fragmentos em 2mm e obter paralelismo entre a superfície polida e a base de acrílico. Em seguida, os blocos foram limpos em ultra-som Branson 2210 (Danbury, Connecticut, USA) durante 10 minutos para remoção dos resíduos, e novamente fixados na base de acrílico, com o esmalte voltado para

cima com intuito de obter uma superfície apta para a análise de microdureza. O aplainamento e polimento da superfície de estudo foram feitas em politriz (Aropol E - Arotec Industria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), empregando discos abrasivos nas granulações 600 e 800 por 2 minutos e 1200 por 4 minutos, em baixa velocidade e sob refrigeração a água. O polimento final foi realizado com discos de feltro umedecidos em pasta diamantada de 1µm (Arotec S.A. Indústria e comercio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), durante 5 minutos. Entre as trocas de lixa, os fragmentos foram levados ao ultra-som Branson 2200 (Sonifier, Danbury, EUA), para remoção dos detritos deixados pelas lixas sobre a superfície do esmalte.

2.5.5 Preparo do Dispositivo Intrabucal Palatino

Após a seleção da moldeira, o arco superior dos voluntários foi moldado com hidrocolóide irreversível e modelos de trabalho foram obtidos em gesso pedra. Posteriormente, os dispositivos palatinos foram confeccionados em resina acrílica contendo 4 cavidades de 4mmx4mmx3mm, sendo duas de cada lado, a qual serviu posteriormente para fixação dos blocos de esmalte bovino.

A disposição dos espécimes nas cavidades do dispositivo foi planejada de forma a evitar interferências de eventuais fatores sítio-específicos nos resultados. Na região anterior do dispositivo houve um bloco exposto ao peróxido de hidrogênio a 35% e um controle, o mesmo ocorrendo na região posterior. Os espécimes foram fixados no dispositivo intrabucal com cera pegajosa (kota Industria e Comercio Ltda, São Paulo, Brazil), de modo que ficaram posicionados 1mm aquém da superfície da resina. A adaptação foi feita cuidadosamente a fim de evitar fendas laterais entre o bloco e a cera, impossibilitando o acúmulo de biofilme em lugares indesejáveis. Para potencializar o acúmulo de biofilme dentário sobre os blocos de esmalte, uma tela de polietileno foi recortada e fixada no acrílico com cera, cobrindo os corpos-de-prova.

2.5.6 Tratamento Clareador

As amostras foram cuidadosamente removidas do DIP (Dispositivo Intra Bucal) e receberam o tratamento clareador utilizando o gel à base de peróxido de hidrogênio a 35%. O produto Whitniss HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Santa Catarina, Brazil) foi aplicado segundo especificações do fabricante, empregando 3 gotas de peróxido de hidrogênio para 1 gota de espessante. Após a mistura, o produto final foi inserido em uma seringa graduada descartável de 1mL, sendo 0,06 mL aplicado sobre cada fragmento, permanecendo em contato com o esmalte por 15 minutos. Foram realizadas 3 sessões clareadoras, e em cada uma, aplicada três vezes o produto, sendo que ao final de cada sessão os fragmentos ficaram um total de 45 minutos em contato com o peróxido de hidrogênio. Para finalizar o procedimento as amostras foram limpas com jatos de água deionizada para a remoção de resíduos do gel, cuidadosamente secas com papel absorvente e então, novamente posicionadas e fixas em seus nichos. Foram realizadas 3 sessões clareadoras obedecendo ao intervalo de 7 dias entre elas.

2.5.7 Desafio Cariogênico

Para promover a formação do biofilme dental cariogênico nos espécimes, os voluntários aplicaram 8 vezes ao dia uma gota de uma solução de sacarose a 20%, sobre cada bloco de esmalte, a cada 2 horas. Após o gotejamento, o dispositivo ficou 5 minutos em repouso antes de retornar a cavidade bucal, para que a sacarose se difundisse pelo biofilme dentário. A primeira exposição diária foi sempre realizada às 8 horas e a última às 22 horas. Para colaborar no controle dos horários, uma etiqueta foi colocada no frasco da solução, para que os voluntários soubessem os horários que deveriam realizar o gotejamento. A solução de sacarose foi substituída a cada 2 dias. Nos dias agendados para o tratamento clareador, os voluntários deveriam fazer o gotejamento apenas às 8 horas, e retornariam a gotejá-la

novamente às 20 horas, pra fins de padronização. Antes do clareamento, os blocos com biofilme dental foram limpos com gaze umedecida, para que não ocorresse interferência na ação do peróxido sobre a estrutura do esmalte.

2.5.8 Avaliação das Amostras

A microdureza superficial do esmalte foi avaliada em dois períodos, Leitura Inicial ($L_{inicial}$), realizada antes da primeira sessão do clareamento, durante a seleção das unidades experimentais e a Leitura Final (L_{final}), que ocorreu após 7 dias do término do clareamento, sendo que nesse intervalo de tempo os fragmentos de esmalte ficaram imersos em água deionizada, trocada diariamente. A dureza do esmalte foi verificada por meio de um microdurômetro (HMV-2000 SHIMADZU, Maryland, USA), com penetrador tipo Knoop que atuou com carga estática de 25 gramas por 5 segundos [Honório et al., 2006; Marta et al., 2005]. Foram realizadas 03 indentações iniciais e 03 finais, no centro do fragmento, com distancia entre elas de 100 μ m. Para análise estatística dos resultados da microdureza foi utilizada as médias das 3 leituras realizadas em cada fragmento. Essas médias foram convertidas em valores de dureza Knoop através da seguinte fórmula:

$$KHN = C.c / d^2$$

Sendo: KHN= Numero da dureza Knoop

$$C(\text{constante}) = 14.230$$

$$c = 25 \text{ gramas}$$

$$d = \text{comprimento da diagonal maior da indentação.}$$

Foi realizada, ainda, a avaliação da porcentagem de diminuição média da dureza através dos valores de microdureza obtidos pela seguinte fórmula:

$$\% = 1 - \frac{\text{KHN(I)} - \text{KHN(F)}}{\text{KHN(I)}} \times 100$$

Onde; KHN(I) é a média de microdureza inicial do grupo e KHN(F) é a média de microdureza final do grupo.

Os resultados colhidos foram submetidos posteriormente a análise de variância ao nível de 5% (ANOVA – Análises repetidas).

2.6- Resultados

A tabela 1 mostra que no período inicial os espécimes do grupo controle e os que seriam submetidos ao tratamento clareador apresentaram valores semelhantes de microdureza. Já, ao final do experimento houve diminuição geral nos valores de microdureza, sendo esta redução estatisticamente mais significativa no grupo clareado ($p=.0069$).

A análise ponderada dos dados mostrou também que o grupo controle sofreu redução de 19,2% da microdureza quando seus espécimes foram mantidos apenas no desafio cariogênico, enquanto que no grupo clareado esta redução foi de 24,9%, indicando maior sensibilidade do desafio cariogênico aos espécimes submetidos ao tratamento clareador.

2.7- Discussão

Devido ao íntimo contato do agente clareador com a estrutura dental, alterações microscópicas da superfície do esmalte têm sido relatadas. O pH dos agentes clareadores, o tempo de aplicação e a composição dos produtos tem sido apontados como responsáveis pelas alterações histológicas e estruturais no esmalte dental [Faraoni-Romano et al., 2007; Pinto et al., 2004; Smidt et al., 1998; Ernst et al., 1996; Ben-Amar et al., 1995].

Este estudo *in situ*, avaliou o efeito do clareador a base de peróxido de hidrogênio a 35% na superfície do esmalte dental, através do ensaio de microdureza superficial. A microdureza mostra indiretamente a perda ou ganho de mineral, apresentando a vantagem de ser um teste não destrutivo, possibilitando diversas avaliações em um mesmo corpo-de-prova ao longo do experimento [Unlu, 2004].

O penetrador Knoop foi aplicado por 5s, utilizando uma carga estática de 25g, essa carga é considerada adequada por alguns autores considerando o substrato, não causando danos ou distorções a superfície, mesmo quando esta se encontra enfraquecida devido ao processo de desmineralização [Honório et al., 2006; Marta et al., 2005; Pinto et al., 2004].

A leitura inicial da microdureza foi realizada em 100 fragmentos de esmalte, que receberam 3 indentações no centro de cada bloco, com 100µm de distância entre elas. Os valores obtidos foram tabulados e a mediana da amostra foi calculada. Para a continuidade do experimento, os 44 fragmentos com valores de microdureza mais próximos da mediana e que são considerados na literatura valores normais da microdureza do esmalte bovino foram selecionados [Maia et al., 2008; Pinto et al., 2004; Basting et al., 2001; Rodrigues et al., 2001].

Nesta pesquisa optou-se pelo dente bovino pelo fato deste substrato ser empregado em vários estudos prévios [Lima et al., 2009; Faraoni-Romano et al., 2007; Honório et al., 2006; Paes Leme et al., 2004; Hara et al., 2003; Tenuta et al., 2003]. A principal vantagem

do dente bovino é a facilidade de ser encontrado em grandes quantidades, além de apresentarem uma coroa mais ampla e plana, o que oferece segurança nos procedimentos de polimento. Outra vantagem está relacionada com a sua composição que é mais homogênea que o esmalte humano, pois sofre menos desafios cariogênicos e tem pouca exposição aos fluoretos [Oesterle et al., 1998].

A opção pelo modelo *in situ* possibilitou que todos os fatores relacionados ao desenvolvimento de lesões cáries estivessem presentes no experimento e fossem devidamente valorizados nos resultados obtidos [Zero, 1995; Featherstoni, 1992].

O acúmulo de biofilme foi conseguido pela fixação dos espécimes 1 mm abaixo do nível do sítio e também pela cobertura dos mesmos com uma tela plástica, o que possibilitou a formação de placa bacteriana uniforme, espessa e com grande capacidade de desmineralização, compatíveis com as regiões de grande acúmulo de biofilme como as regiões interproximais e as regiões de sulcos [Aires et al., 2006; Pecharki et al., 2005; Paes Leme et al., 2004; Tenuta et al., 2003; Cury et al., 2003; Cury et al., 2001; Zero 1995].

Para a formação de biofilme dentário, além das condições físicas (1mm abaixo e tela plástica), o substrato foi submetido ao gotejamento frequente da solução de sacarose, o que segundo a literatura é a mais efetiva para a formação de lesões não cavitadas [Percharki et al., 2005; Paes Leme et al., 2004; Cury et al., 2003; Cury et al., 2001].

Vale destacar que antes das sessões clareadoras, ou seja, a cada 7 dias, realizou-se a remoção do biofilme acumulado, com gaze embebida em água destilada, com intuito de evitar que a realização dos métodos convencionais de profilaxia dental favorecesse a ocorrência de desgastes e prejudicassem a leitura ou mesmo alterassem os valores finais da microdureza [Honório et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Lanza et al., 2000].

Os resultados obtidos mostraram que os grupos clareados e controle sofreram diminuição estatisticamente significativa da microdureza, sendo esta mais acentuada no grupo clareado, portanto a hipótese nula deve ser rejeitada.

Acredita-se que no grupo controle a exposição freqüente à sacarose, causou alteração na composição microbiológica da placa bacteriana, selecionando microorganismos acidogênicos e acidúricos, que levam o pH abaixo do nível crítico, causando desmineralização e, conseqüente, redução da microdureza [Gao et al., 2001; Marsh , 1995]. Aires et al., [2006] demonstraram que o S mutans em presença de sacarose produzem uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares, responsáveis por aumentar o potencial cariogênico da placa.

Já para o grupo clareado, acredita-se que os radicais livres de oxigênio altamente reativos e o contato prolongado com o agente clareador de grande concentração e baixo pH [Rodrigues et al., 2001], sejam os responsáveis pelo aumento da sensibilidade do substrato ao desafio cariogênico.

Neste contexto, [Marson, 2008] constatou que o produto Whiteness HP Maxx varia seu pH de 6 para 5 com o passar do tempo clínico. Este fato, segundo [Lee et al., 2003; Price et al., 2000;], deixa o esmalte propenso a sofrer descalcificações, diminuindo a microdureza. Sabe-se ainda que os peróxidos possam afetar não somente a superfície, mais também a porção inter e intraprismática do esmalte, promovendo uma leve desproteinização. Com isso, qualquer elemento mineral associado com as proteínas do esmalte é também removido, o que explicaria a perda de íons cálcio e fósforo nessas porções, contribuindo dessa forma para a ocorrência de danos microestruturais e possivelmente com as alterações na microdureza [Justino et al., 2004; Park et al., 2004; Patonick et al., 2000; Naimar and Clarkson, 1994].

Outro fator que tem influência importante nos resultados dos estudos *in situ* é a presença constante da saliva. A saliva é composta por componentes orgânicos e inorgânicos e quando estimulada, por meio de substâncias ácidas como o ácido cítrico ou málico, aumentam os constituintes de interesse primário, como ácido carbônico, carbonato de hidrogênio, fosfato de hidrogênio, cálcio e fluoretos, que estão associados ao aumento da capacidade tampão e manutenção do equilíbrio entre os fenômenos de desmineralização e remineralização [Dodds et al., 2005; Dawes and Kubieniec, 2004]. Porém neste estudo estes constituintes não foram capazes de evitar a ação provocada pela placa cariogênica somada à exposição ao peróxido de hidrogênio.

O uso de peróxido de hidrogênio a 35% utilizado para clareamento em consultório deve ser utilizado com cautela, principalmente em pacientes que apresentam frequente acúmulo de placa bacteriana na superfície do esmalte, podendo haver lesões incipientes de cárie de difícil identificação, em função da presença de saliva. Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, superfícies desmineralizadas expostas ao peróxido de hidrogênio em altas concentrações podem sofrer um processo de intensificação dessas lesões.

Conclui-se que o uso do gel clareador a base de peróxido de hidrogênio a 35% levou a maior diminuição da microdureza que o grupo apenas submetido ao desafio cariogênico.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela FAPESP # 08/52711-0. Os autores agradecem à FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil, pela doação dos géis clareadores Whitening HP Maxx usados neste estudo.

2.8- Referências[†]

- 1.Alves EA, Alves FK, Campos Ede, Mathias P: Suceptibility to carieslike lesion after dental bleaching with different techniques. *Quintessence Int* 2007; 38:404-409.
- 2.Aires CP,Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilme formed in situ and on enamel desmineralization. *Caries Res* 2006; 40:28-32.
- 3.Bagheri R, Burrow MF, Tyas MJ: Surface characteristics of aesthetic restorative material- an SEM study. *J Oral Rehabil* 2007; 34:68-74.
- 4.Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC: The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and desmineralized enam and dentin in situ. *Oper Dent* 2001; 26:531-539.
- 5.Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC: Micromorphology and surface roughness of sound and desmineralized enamel and dentin bleaching with a 10% carbamine peroxide bleaching agent. *Am J Dent* 2007; 20:97-102.
- 6.Ben-Amar A, Lberman R, Gorfil C, Bernstein Y: Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. *Am J Dent* 1995; 8:29-32.
- 7.Cury JA, Hashizume L, Cury ABD, Tabchoury CPM: Effect of dentifrice containing fluoride and/or back soda on enamel desmineralization/remineralization an in situ study. *Caries Res* 2001; 35:106-110.
- 8.Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA: Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz Dental J* 2003; 14:147-52.

[†] Referências identificadas no texto entre colchetes e descritas no item 2.8 em ordem alfabética (Anexo 5)

9. Dods MW, Johnson DA, Yeh CK: Health benefits of saliva: A review. *J Dent* 2005; 33:223-233.
10. Dawes C, Kubieniec K: The effect of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004, 49:665-669.
11. Ernst CP, Briseño M, Zönnchen BM: Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. *Quintessence Int* 1996; 27:53-56.
12. Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC: Concentration-dependent effect of bleaching on microhardness and roughness of enamel and dentin. *Am J Dent* 2007; 20:31-34.
13. Featherstoni JDB, Zero DT: In situ model for simultaneous assessment of inhibition of desmineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; 71:804-810.
14. Feigal RJ, Douglas WH, Pintado MR: Home-use bleaching agents: An in vitro study on quantitative effects on enamel, dentin, and cementum. *Quintessence Int* 1994; 25:541-546.
15. Freitas PM, Basting RT, Rodrigues AL, Serra MS: Effects of two 10% peroxide carbamida bleaching agents on dentin microhardness at different intervals. *Quintessence Int* 2002; 33:370-375.
16. Gao XJ, Fron Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC: Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res* 2001; 80:1834-1839.
17. Gonçalves FC, Monte Alto LA, Ramos MAB: Alteração cromática e morfológica do esmalte dental após tratamento com peróxido de carbamida a 10%. *J Bras Clin Odont Int* 2001; 29:413-417.
18. Haywood V, Heymann, HO: Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int* 1991;22:515-523.

- 19.Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzales-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues Jr AL, Serra, MC, Cury JA: Influence of Fluoride-Releasing Restorative Material on Root Dentine Secondary Caries In situ. *Caries Res* 2003; 40:435-439.
- 20.Honório HM, Rios D, Abdo RCC, Machado MAAM: Effect of different prophylaxis methods on sound desmineralized enamel: *J Appl Oral Sci* 2006; 14:117-123.
- 21.Justino LM, Tames DR, Demarco FF: In situ and In vitro effects of bleaching with Carbamide peroxide on human enamel. *Oper Dent* 2004; 29:219-225.
- 22.Lanza CRM, Lima JEO, Torres SH, Machado MAAM: Effect of professional dental prophylaxis with sodium bicarbonate jet on the cariogenic microbiota. *Pesqui Odontol Bras* 2000; 14:87-92.
- 23.Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH: Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. *J Oral Rehabil* 2003; 33:229-233.
- 24.Lima FG, Romano AR, Correa MB, Demarco FF: Influence of microleakage, surface roughness and biofilm control on secondary caries formation around composite resin restoration: An in situ evaluation. *J Appl Oral Sci* 2009; 17:61-65.
- 25.Maia E, Baratieri LN, Caldeira de Andrade MA, Monteiro SJr, Vieira LC: The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness an in situ study. *J Dent* 2008; 36:2-7.
- 26.Marsh PD: The role of microbiology in model of dental caries. *Adv Dent Res* 1995; 9:244-254.
- 27.Marson FC, Sensi LG, Reis R: Novo conceito de clareação dentária pela técnica no consultório. *R Dental Press Estét Maringa* 2008; 5:55-66.

- 28.Marta SN, Lima JEO, Vono BG, Silva SMB, Machado MAAM, Pin MLG: Effect of professional cleaning and dental washing with or without fluoride dentifrice on enamel remineralization. *J Oral Appl Sci* 2005; 13:222-226.
- 29.Naimar SM, Clarkson BH: Fluoride profile in mature unerupted enamel following removal of surface organic material. *Caries Res* 1994; 28:83-86.
- 30.Oesterle LJ, Shellhart WC, Bellanger GK: The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998; 114:514-519.
- 31.Paes Leme A, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury A, Rosalen P, Cury: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel desmineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004; 83:71-75.
- 32.Park HJ, Kwon TY, Nam SH, Kim HJ; Kim KH, Kim YJ: Change in bovine after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. *Dent Mater J*; 23:517-521.
- 33.Pecharki GD, Cury JA, Paes leme AF, Tabchoury CPM, Del Bel Cury A, Rosalen PL: Effect of sucrose containing iron(II) on dental biofilme and anamel desmineralization in situ. *Caries Res* 2005; 39:123-129.
- 34.Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Gianinni: Peroxide bleaching agent effect on enamel surface microhardness of human enamel. *Braz Dent J* 2004; 18: 306-311.
- 35.Potočnik I, Kosec L, Gaspersic D: Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure and mineral content. *J Endod* 2000; 26:203-206.
- 36.Price RBT, Sedarous M, Hiltz GS: The pH of tooth-whitening products. *J Can Dent Assoc* 2000; 66:421-426.

- 37.Ribeiro HZV, Lima JEO, Vono BG, Machado MAAM, Silva SMB: Airpolishing effect on bovine enamel and posterior remineralizing effect of saliva: An in vitro study. *J Appl Oral Sci* 2006; 14:117-123.
- 38.Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Jr AL: Effect of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *Am J Den* 2001;14(2):23-29.
- 39.Smidt A, Weller D, Roman I: Effect of bleaching agent on microhardness and surface morphology of tooth enamel. *Am J Dent* 1998; 11:83-85.
- 40.Tames D, Grando LJ, Tames DR: Alterações do esmalte dental submetido ao tratamento com peroxide de carbamida a 10%. *Rev Assoc Paul Cirur Dent* 1998; 52:145-149.
- 41.Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury CPM, Cury JA: Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel desmineralization and plaque composition in situ. *Pesq Odontol Bras* 2003; 17:326-331.
- 42.Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Chernecky R, Adbfar A: Scanning electron Microscopy observation on the penetration and structure of resin tags in bleached an unbleached bovine enamel. *J Endod* 1991; 17:72-75.
- 43.Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A: Effects of water leaching on the adhesion of composite resin to bleached and unbleached bovine enamel. *J Endod*; 17:156-160.
- 44.Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C: Hydrogen peroxide tooth-withening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dent J* 2006; 200:371-376.
- 45.Ünlü N, Çobankara FK, Altinoz C, Ozer F: Effect of home bleaching agent on the Microhardness of human enamel and dentine. *J Oral Rehabil* 2004; 31:57-61.
- 46.Zero DT, LUSI A: In situ caries models: *Adv Dent Res* 1995; 9:214-230.

LEGENDAS

Tabela 1. Comparação das médias de microdureza entre os grupos clareado e controle

* Letras maiúsculas para comparar colunas, letras minúsculas para comparar linhas.

Quadro 1. Critérios de exclusão aplicados para seleção dos voluntários da pesquisa.

TABELAS

Tabela 1

GRUPO	MÉDIA (DP)	
	INICIAL	FINAL
CONTROLE	237.3 (17.9)A a	191.7 (15.8)B a
CLAREADO	238.9 (21.3)A a	179.4 (12.5)B b

QUADROS

Quadro 1

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
Voluntárias grávidas ou amamentando
Voluntários fumantes
Voluntários com próteses fixas ou removíveis
Voluntários com aparelho ortodôntico
Voluntários com atividades de cárie
Voluntários com doença periodontal
Fazer uso de medicamentos que afetam o fluxo salivar (Antidepressivos, Narcóticos e Diuréticos)
Presença de distúrbios de ordem digestiva
Indisponibilidade de comparecer a faculdade nos dias pré-agendados para a parte laboratorial

CAPÍTULO 2

Análise histo-morfológica do esmalte dental submetido à ação do peróxido de hidrogênio a 35% e ao desafio cariogenico: estudo *in situ*

3.1- Resumo

Este estudo *in situ* avaliou o efeito do peróxido de hidrogênio a 35%, utilizado no clareamento in-office, na histomorfologia do esmalte bovino submetido ao desafio cariogênico. Para tanto, 11 voluntários utilizaram aparelhos removíveis de acrílico contendo 4 fragmentos de esmalte, durante 24 horas por 21 dias, com exceção dos momentos destinados às refeições, higienização e às sessões clareadoras. Dois fragmentos de cada dispositivo foram submetidos a uma sessão clareadora por semana (3 aplicações de 15 minutos), durante 14 dias, totalizando 3 sessões (inicial, aos 7 e 14 dias). Os fragmentos não clareados permaneceram no dispositivo sem sofrer qualquer tipo de influência do agente clareador. Durante o uso do aparelho os fragmentos dentais foram submetidos ao desafio cariogênico por acúmulo de biofilme bacteriano, sendo gotejada uma solução de sacarose a 20%, oito vezes ao dia. Na seqüência, um dos fragmentos clareados e um controle foram removidos do dispositivo, limpos, desidratados e metalizados para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia superficial em aumentos de 1000 e 3000 vezes. Os fragmentos restantes foram seccionados, desgastados e montados em lâminas de vidro para análise da profundidade das alterações em microscopia óptica sob luz polarizada (MOLP), nos aumentos de 25 e 100 vezes. A análise da superfície do esmalte, bem como da profundidade das alterações revelou que os fragmentos submetidos ao desafio cariogênico e ao tratamento com a substância clareadora apresentaram alterações histomorfológicas mais severas. Foi verificado aumento da porosidade superficial caracterizado por maior quantidade de erosões e exposição dos prismas de esmalte, assim como, áreas isoladas de desmineralização em maior profundidade.

Concluiu-se que o clareamento com peróxido de hidrogênio a 35% potencializou as alterações histomorfológicas na superfície e subsuperfície do esmalte exposto ao desafio cariogênico.

Palavras-chave: Clareamento de Dente, Anatomia & histologia, Microscopia, Esmalte dental

Histo-morphological analysis of dental enamel submitted to 35%hydrogen peroxide and a cariogenic challenge: in situ study

3.2- Abstract

This *in situ* study evaluated the effect of 35%hydrogen peroxide used in the in-office bleaching, on the morphology of bovine enamel submitted to a cariogenic challenge. Thus, 11 volunteers had worn acrylic removable appliances containing four enamel fragments for 24 hours during 21 days, except in meal times, cleaning and whitening sessions. Two fragments of each device underwent a bleaching session per week (three applications of 15 minutes) for 14 days, totalizing three sessions (starting at 7 and 14 days). The fragments remained on the device without cleansing or suffering any kind of influenceof thebleaching agents. While the volunteers were wearing the appliance, dental fragments were submitted to cariogenic challenge by the impregnation of bacterial biofilm, and a 20% sucrose solution of was dripped eight times a day. Subsequently, one of the fragments bleached and the one used as control were removed from the device, cleaned, dried and coated for surface morphology examination in scanning electron microscopy (SEM) in 1000 and 3000x of magnitude. The remaining fragments were cut, abraded and mounted on glass slides to examine the depth of the changes in optical microscopy under polarized light (MOLP) in 25 and 100x of magnitude. The analysis of enamel surface and the depth of the changes revealed that the fragments submitted to cariogenic challenge and bleaching treatment showed more severe histomorphological changes. It was also verified an increase of surface porosity characterized by the greater amount of erosion and exposure of enamel rods, as well as isolated areas of demineralization in greater depth. It was concluded that bleaching using 35% hydrogen peroxide potentiated

the histomorphological changes in enamel surface and subsurface exposed to cariogenic challenge.

Key words: Tooth Bleaching, Anatomy & histology, Microscopy, Enamel

3.3- Introdução[‡]

A obtenção de um sorriso belo e saudável é uma preocupação constante dos profissionais e dos pacientes. Com isso, os tratamentos odontológicos estéticos podem ser decisivos na elevação da auto-estima, sendo cada vez mais requisitados pelos pacientes e estimulados pela mídia, que tem dado ênfase à saúde associada à beleza [Alves et al., 2007; Bagheri et al., 2007]. Neste contexto, a presença de alterações cromáticas dentais, sejam elas extrínsecas ou intrínsecas estimularam o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de clareamento [Basting et al., 2007; Berga Caballero et al., 2007; Cavalli et al., 2004].

Dentre as formas mais empregadas para se clarear dentes polpados, destaca-se a aplicação caseira de peróxido de carbamida, que de acordo com [Haywood and Heymann, 1991], tem como principais vantagens à segurança biológica e a facilidade de aplicação.

Frente à grande demanda pela estética, outros produtos foram desenvolvidos e também podem ser empregados para a mesma finalidade. Como exemplo pode-se citar os produtos à base de peróxido de hidrogênio 35%, que devem ser aplicados no consultório odontológico sob os cuidados dos profissionais, uma vez que ainda não está estabelecido um protocolo seguro para sua utilização [Bagheri et al., 2007; Ernst et al., 1996; Titley et al., 1991, Torneck et al., 1991].

Independente da técnica ou do produto utilizado, o mecanismo de ação desses agentes clareadores baseia-se em uma complexa reação de oxidação, com a liberação de radicais livres de oxigênio, que penetram através das porosidades dos prismas de esmalte, atingindo a dentina e por meio de um processo químico, provoca a quebra das moléculas orgânicas, originando compostos mais leves, menores e mais claros [Tredwin et al., 2006; Teixeira et al., 2004].

[‡] Normalização segundo a revista Caries Research (Anexo 5)

Apesar dos bons resultados clínicos das técnicas clareadoras, alguns autores observaram aumento da porosidade do esmalte, erosão e áreas de desmineralização superficial no esmalte clareado [Justino et al., 2004; Cavalli et al., 2004; Potocnick et al., 2004]. No entanto, o fato da maioria dos trabalhos serem realizados *in vitro* e a ausência de sinais clínicos dos danos ao substrato, acabam por não permitir extrapolar os resultados observados nestas publicações para uma condição clínica real.

O efeito dos materiais clareadores sobre as lesões iniciais de cárie também é desconhecido, uma vez que o diagnóstico da lesão inicial de cárie é difícil ou não interpretável pela maioria dos Cirurgiões–dentistas. Além disso, em uma época em que a estética tem um grande valor sobre as pessoas, muitos profissionais podem indicar as técnicas de clareamento, sem antes realizar a adequação do meio bucal. Portanto, há a necessidade de saber os efeitos do peróxido de hidrogênio em altas concentrações sobre a histomorfologia do esmalte desmineralizado.

Uma forma analisar as alterações provocadas por essa reação de oxidação na estrutura do esmalte é a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), usada rotineiramente para análises microestruturais de materiais sólidos e que veio oferecer maior precisão na observação de prováveis alterações na superfície do esmalte, permitindo um estudo mais criterioso de sua morfologia [Pinto et al., 2009; Justino et al., 2004]. Associada à MEV a microscopia óptica com luz polarizada (MOLP) vem sendo muito utilizada em estudos [Pinto et al., 2009; Basting et al., 2007; Marcovick et al., 2007; Pinto et al., 2004; Spalding et al., 2003] com o intuito de complementar as técnicas microscópicas, diferenciando estruturas em um mesmo tecido e possibilitando analisar, em profundidade, as alterações eventualmente verificadas na superfície.

Desta forma, em função dos resultados alarmantes encontrados *in vitro*, do número restrito de estudos sobre o efeito do peróxido de hidrogênio no esmalte e da possibilidade de

agentes clareadores estarem sendo aplicados sobre lesões incipientes, torna-se interessante avaliar o aspecto histomorfológico da superfície do esmalte dentário, por meio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz polarizada após aplicação de peróxido de hidrogênio a 35% em esmalte desmineralizado por um intenso desafio cariogênico.

A hipótese nula testada foi a de que o peróxido de hidrogênio 35% não potencializaria as alterações histomorfológicas da superfície do esmalte submetido ao desafio cariogênico.

3.4- Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a *in situ* as alterações histomorfológicas provocadas pela ação do peróxido de hidrogênio 35% no esmalte dental bovino submetido ao desafio cariogênico.

3.5- Materiais e métodos

3.5.1- Delineamento Experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (P. 2008-01237) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, (Anexo 1) obedecendo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, a resolução do Conselho Federal de Odontologia 179/93 do Código de Ética Profissional Odontológico e a Declaração de Helsinki. Os 11 voluntários selecionados, com idade entre 19 e 26 anos, tomaram ciência do experimento por meio da “carta de informação ao voluntário” e assinaram um “termo de consentimento livre e esclarecido”(Anexo 2 e 3). Após receberem todas as informações correspondentes à execução da pesquisa, foram submetidos à anamnese e exame clínico, em que foram checados os critérios exclusão (Quadro1).

Depois de selecionados, os voluntários receberam um kit contendo escova dental, dentifrício fluoretado, fio dental, um vidro com sacarose a 20% e um estojo para guardar o aparelho durante as refeições e uma lista de orientações (Anexo4).

O fator avaliado neste estudo *in situ* foi o clareamento dental, realizado em 3 sessões, totalizando um período de 14 dias. Cem fragmentos dentais bovinos nas dimensões 4X4mm foram obtidos com o auxílio de uma cortadeira metalográfica Isomet 2000 (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), que atuou com 2 discos paralelos, com velocidade de 300rpm e sob refrigeração a água. O aplainamento e polimento das superfícies de estudo foram feitas em politriz Aropol E (Arotec Industria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), empregando discos abrasivos nas granulações 600 e 800 por 2 minutos e 1200 por 4 minutos, em baixa velocidade e sob refrigeração a água. O polimento final foi realizado com discos de feltro umedecidos em pasta diamantada de 1µm (Arotec S.A. Indústria e comercio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), durante 5 minutos. Entre as trocas de lixa, os fragmentos foram levados ao

ultra-som Branson 2200 (Sonifier, Danbury, EUA), para remoção dos detritos deixados pelas lixas sobre a superfície do esmalte.

Para padronização do substrato, os fragmentos foram submetidos à leitura inicial de sua microdureza superficial, realizando 3 indentações em cada. Após a obtenção dos valores de microdureza superficial, os 44 fragmentos que apresentaram valores mais próximos da mediana (246) foram selecionados para a continuação do experimento.

Terminado o preparo e a escolha dos fragmentos dentais, iniciou-se a confecção do dispositivo intrabucal palatino (DIP) com a moldagem do arco superior de cada voluntário, realizada com hidrocolóide irreversível e vazado em gesso pedra. Posteriormente, os dispositivos palatinos foram confeccionados em resina acrílica contendo 4 nichos de 4mmx4mmx3mm, sendo duas de cada lado, que serviram posteriormente para fixação dos blocos de esmalte bovino.

A disposição dos espécimes nas cavidades do dispositivo foi planejada de forma a evitar interferências de eventuais fatores sítio-específicos nos resultados. Assim, na região anterior do dispositivo houve um bloco exposto ao peróxido de hidrogênio a 35% e um controle, o mesmo ocorrendo na região posterior. Os espécimes foram fixados no dispositivo intrabucal com cera pegajosa (Kota Indústria e Comercio Ltda, São Paulo, Brazil), de modo que ficaram posicionados 1mm abaixo do nível da superfície da resina. A adaptação foi feita cuidadosamente a fim de evitar fendas laterais entre o bloco e a cera, impossibilitando o acúmulo de biofilme em lugares indesejáveis. Para potencializar o acúmulo de biofilme dentário sobre os blocos de esmalte, uma tela de polietileno foi recortada e fixada no acrílico com cera, cobrindo os corpos-de-prova.

Os voluntários utilizaram o DIP com os fragmentos inseridos em seus nichos por 7 dias para adaptação e formação do biofilme dental, para tanto os voluntários aplicaram uma

gota de uma solução de sacarose a 20%, 8 vezes ao dia, sobre cada bloco de esmalte, a cada 2 horas . Após o gotejamento o dispositivo ficou 5 minutos em repouso antes de retornar a cavidade bucal, para que a sacarose se difundisse pelo biofilme dentário. A primeira exposição diária à sacarose foi realizada às 8 horas e a última às 22 horas e uma etiqueta foi colada no frasco da solução, para que os voluntários soubessem os horários que deveriam realizar o gotejamento e a solução foi substituída a cada 2 dias.

Para o tratamento clareador os fragmentos foram cuidadosamente removidos do DIP e receberam o gel à base de peróxido de hidrogênio a 35%. O produto Whitniss HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Santa Catarina, Brazil) foi manipulado segundo especificações do fabricante, empregando 3 gotas de peróxido de hidrogênio para 1 gota de espessante. Obtida a mistura, o produto foi inserido em uma seringa graduada descartável de 1mL, sendo 0,06 mL aplicado sobre cada fragmento, permanecendo em contato com o esmalte por 15 minutos. Foram realizadas 3 sessões clareadoras, sendo em cada uma, aplicada três vezes o produto. Para finalizar o procedimento as amostras foram limpas com jatos de água deionizada para a remoção de resíduos do gel, cuidadosamente secas com papel absorventes e então, novamente posicionadas e fixadas em seus nichos. Foram realizadas 3 sessões clareadoras obedecendo ao intervalo de 7 dias entre elas.

Nos dias agendados para o tratamento clareador, os voluntários realizaram o gotejamento apenas às 8 horas, e retornaram a gotejá-la às 20 horas, pra fins de padronização. Antes do clareamento, os blocos com biofilme dental foram limpos com gaze umedecida, para que o peróxido atuasse diretamente sobre a estrutura de esmalte.

3.5.2- Preparo e análise das Amostras

•Microscopia eletrônica de varredura

Foram destinados à análise morfológica 22 fragmentos, 11 pertencentes ao grupo controle e 11 do grupo clareado, desidratados em soluções crescentes de etanol, fixados com fita adesiva dupla face de carbono (Electron microscopy sciences 19034, Washington, USA) em “stubs”, e metalizados com cobertura de filamentos de ouro, usando a câmara a vácuo (Balzers SCD 050 sputter coater, Balzers union Aktiengesellschaft, Furstentum Liechtenstein, FL-9496 – Germany), com corrente de 45mA por 160 segundos. A avaliação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JSM – 5600 JOEL USA, Inc., Peabody, MA 01960 - USA) com aumentos de 1000 X e 3000X, levando-se em conta a morfologia superficial do esmalte. As áreas representativas foram fotografadas para avaliação comparativa [Bagheri et al., 2007].

•Microscopia de luz polarizada

Os 11 fragmentos restantes do grupo controle e os do grupo clareado foram submetidos à análise em MOLP. Para isso foram seccionadas ao meio com discos diamantados de dupla face (7020 KG Sorensen Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brazil), obtendo 2 amostras de cada fragmento de esmalte. Estas foram incluídas individualmente em uma base de resina acrílica, com auxílio da embutidora PRE-30S (Arotec S.A. Indústria e comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil). Posteriormente, essa base foi então seccionada em uma cortadeira metalográfica (Isomet 2000 - Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), com disco de 12,5cm x 0,5cm, a uma velocidade de 600rpm sob refrigeração a água, obtendo-se 22 fatias por grupo com aproximadamente 1mm de espessura. Na sequência, elas foram fixadas a uma lâmina de vidro e esta a uma base de acrílico maior para que encaixasse na politriz Aropol E (Arotec S.A. Indústria e Comércio Ltda., Cotia, São Paulo, Brazil). O afilamento foi realizado

com lixas de óxido de alumínio 600 e 1200, em baixa velocidade e sobre refrigeração até a obtenção de fatias com 100 μ m de espessura.

Para a visualização dos espécimes no microscópio de luz polarizada (Axiophot Zeiss DSM-940 A, Oberkochen, Germany), os cortes foram posicionados em lâmina de vidro, imersos em uma pequena quantidade de água destilada e sobre esta, uma lamínula.

A análise foi feita nos aumentos de 25X e 100X, e as imagens geradas foram capturadas por uma câmera digital acoplada ao Microscópio e analisadas com o auxílio do software AxioVision 4 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.6- Resultados

3.6.1 Análises em Microscopia de Luz Polarizada

A análise dos cortes por desgaste em microscopia sob luz polarizada, mostrou que tanto o grupo controle (Figura 1) como o clareado (Figura 2) apresentaram áreas de desmineralização em todos os espécimes, o que comprova a efetividade do desafio cariogênico. Porém, é válido destacar que as alterações histológicas do esmalte dental clareado foram mais nítidas e atingiu maior parte da superfície, maior profundidade de desmineralização e, em vários espécimes, provocou cavitação deste tecido.

3.6.2 Análises das alterações na superfície através de microscopia eletrônica de varredura.

A análise da superfície dos espécimes mostrou que os grupos controle (Figuras 3 e 4) e clareado (Figuras 5 e 6) apresentaram alterações morfológicas superficiais semelhantes, mostrando que o desafio cariogênico foi mais agressivo que o procedimento clareador. Notou-se remoção da maior parte da camada aprismática, dissolução da região central dos prismas e aumento da porosidade superficial.

3.7- Discussão

Devido ao íntimo contato do agente clareador com a estrutura dental, alterações microscópicas da superfície do esmalte têm sido relatadas. O pH ácido dos agentes clareadores, o tempo de aplicação e a composição dos produtos são alguns dos fatores discutidos na literatura como responsáveis pelas alterações superficiais [Smidt et al., 1998; Ernst et al., 1996; Ben-Amar et al., 1995].

Os modelos *in situ* oferecem as condições definidas na cavidade bucal e permitiram que todos os fatores relacionados ao desenvolvimento de lesões cáries pudesse estar presentes no experimento. Com isso, o substrato dentário, a formação de biofilme dental com potencial cariogênico, a presença de carboidrato e o tempo são devidamente valorizados nos resultados [Zero 1995, Featherstoni, 1992].

O acúmulo de biofilme foi conseguido por meio da fixação dos espécimes 1 mm abaixo do nível do sítio e também pela cobertura dos mesmos com uma tela plástica, que possibilitou a formação de placa bacteriana uniforme, espessa e com grande capacidade de desmineralização, compatíveis com as regiões de grande acúmulo de biofilme. Associado a isso, houve gotejamento freqüente da solução de sacarose a 20%, que tem sido efetiva para a formação de lesões cáries [Aires et al., 2006; Pecharki et al., 2005; Paes Leme et al., 2004; Tenuta et al., 2003; Cury et al., 2003; Zero, 1995].

A avaliação das alterações morfológicas superficiais do esmalte após clareamento dentário pode ser realizada por vários métodos como microtomografia computadorizada [Efeoglu et al., 2005], microscopia eletrônica de varredura [Pinto et al., 2009], microscopia de força atômica [Hegedus et al., 1999], microscopia de luz polarizada [Joiner et al., 2004] e por microanálises eletrônicas [Lee et al., 2003]. Neste estudo, optou-se pelas análises em MEV e MLP por possibilitarem analisar a superfície e subsuperfície dos espécimes e pela

possibilidade de poder comparar os resultados com estudos prévios [Fu et al., 2007; Basting et al., 2007; Justino et al., 2004; Spalding et al., 2003].

Diversos autores têm analisado as alterações superficiais no esmalte dentário quando em contato com agentes clareadores [Pinto et al., 2004; Oltu and Gurgan, 2000]. Comumente relata-se que as superfícies tratadas com géis clareadores à base de peróxido de hidrogênio 35%, apresentam alterações severas em sua micromorfologia, tendo como características a presença de porosidades, crateras e dissoluções dos prismas de esmalte. Porém, Justino e colaboradores [2004], ao fazer um trabalho comparativo, nos modelos *in vitro* e *em situ*, constataram que o clareamento dental não afeta a morfologia do esmalte. Possivelmente, diferenças nas metodologias empregadas, como o emprego de diferentes substratos, a concentração do gel clareador e o tempo de contato com a superfície do esmalte poderiam ter influenciado nos resultados encontrados.

No presente estudo as alterações mais frequentes observadas em MEV foram a remoção da camada aprismática do esmalte, exposição dos prismas e dissolução parcial desta estrutura. Possivelmente estas alterações estão relacionadas com a grande reatividade do oxigênio [Fu et al.,2007], que por atuar de forma inespecífica, reage com a porção orgânica do esmalte e com isso, qualquer elemento mineral associado às proteínas do esmalte possivelmente são removidos, o que explicaria a ocorrência de porosidades e de danos micro-morfológicos.

Outra hipótese seria a influência do pH do produto, Neste contexto, [Marson, 2008] constatou que o produto Whiteness HP Maxx varia seu pH de 6 para 5 com o passar do tempo clínico, que por ser abaixo do crítico (esmalte < 5,5), pode causar desmineralização do esmalte, com perda mais intensa dos componentes químicos, como fósforo e principalmente o cálcio [Prince et al., 2000]. Com isso, os núcleos dos prismas tornam-se

erodidos, podendo também ocorrer defeitos externos como depressões profundas e aumento da porosidade [Pinto et al., 2004; Turkun et al., 2002; Perdigão et al., 1998].

Na análise em MEV, também foi possível verificar que os espécimes do grupo controle apresentaram características de superfície semelhantes às observadas no grupo clareado, sendo comum a verificação de alterações superficiais semelhantes às descritas por Silverstone [1975], quando observou o padrão tipo I de condicionamento, com dissolução do centro dos prismas do esmalte. Esse fato sugere que o biofilme formado na presença de sacarose a 20% produz danos micro-morfológicos tão ou mais significativos que os provocados pelo peróxido de hidrogênio. Porém, vale destacar que as alterações do grupo controle atingiram uma menor área da superfície e que provavelmente isso ocorreu devido ao grupo controle não ter sofrido influência dos produtos resultantes da degradação do peróxido de hidrogênio [Fu et al., 2007; Pecharki et al., 2005; Pinto et al., 2004; Cury et al., 2003; Spalding et al., 2003; Gao et al., 2001].

A análise em MOLP teve como objetivo principal a avaliação qualitativa da perda ou ganho mineral, possibilitando analisar o espécime em profundidade e identificar as lesões incipientes em esmalte [Arnold et al., 2007; Liu et al., 2006; Hara et al., 2005; Paes Leme et al., 2004].

No presente estudo, foi possível constatar no grupo clareado áreas de desmineralização superficial, lesões cariosas na subsuperfície e regiões cavitadas, enquanto que os espécimes do grupo controle apresentaram áreas isoladas de desmineralização superficial menos intensas, porém, com profundidade de lesão semelhante aos espécimes que receberam o agente clareador. O que aponta para a eficácia do desafio cariogênico e para a ação potencializadora que o uso do peróxido de hidrogênio exerceu em superfícies com acúmulo de biofilme dental cariogênico.

As lesões de cáries observadas pela MOLP apresentaram aspecto já bem documentado na literatura [Arnold et al., 2007; Consolaro, 1996; Tdjaderhane et al., 1995; Hietale et al., 1993], na qual duas zonas distintas são bem evidentes, a zona de superfície representada por uma camada relativamente intacta e o corpo da lesão com desmineralização mais intensa, observada como as regiões mais escurecidas [Silverstone, 1977].

Assim, de uma forma geral, a análise em MOLP e MEV mostrou que as alterações histomorfológicas provocadas pela exposição freqüente à sacarose, possivelmente, causou alterações na composição microbiológica da placa bacteriana e permitiu um ambiente ácido propício para desmineralização, potencializada pela ação inespecífica dos radicais de oxigênio liberado pelo agente clareador e também pelo baixo pH que o produto apresenta. Diante destes achados fica evidente a influência do peróxido de hidrogênio e sua ação no desequilíbrio iônico com perda mineral do substrato dentário [Bollet-Quivogne et al., 2007; Robinson et al., 2000; Legeroz, 1999; Marsh, 1995].

É válido destacar que embora os espécimes ficassem todo o momento na cavidade bucal em contato com a saliva, esta não foi capaz de inibir a desmineralização. Muitos estudos sugerem que a ação da saliva possa reverter a perda mineral [Basting et al., 2003; de Oliveira et al., 2003; Akal et al., 2001], porém devido ao acúmulo freqüente e substancial da placa bacteriana, foi impedido um contato direto entre os constituintes inorgânicos responsáveis pela capacidade tampão da saliva e a superfície do esmalte [Dodds et al., 2005; Dawes et al., 2004; Bardow et al., 2000].

Em conseqüência dos resultados discutidos a hipótese nula deve ser rejeitada, pois o gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35% potencializou as alterações histomorfológicas provocadas pelo acúmulo de biofilme na superfície do esmalte. Porém, novos estudos devem ser realizados, abrangendo outros materiais e técnicas de aplicação

dos clareadores, para que se minimizem as dúvidas existentes e se fundamentem conclusões sobre os efeitos do clareamento nos tecidos dentários sadios e desmineralizados. Somente assim, serão possibilitadas aplicações dos agentes clareadores com maior segurança, produzindo resultados estéticos satisfatórios e biologicamente seguros.

Conclui-se que a aplicação do gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35% intensificou as alterações histomorfológicas no esmalte provocadas pelo desafio cariogênico *in situ*.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela FAPESP # 08/52711-0. Os autores agradecem à FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil, pela doação dos géis clareadores Whitening HP Maxx usados neste estudo.

3.8- Referências[§]

1. Akal N: Effect of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 25:293-296.
2. Alves EA, Alves FK, Campos Ede, Mathias P: Suceptibility to carieslike lesion after dental bleaching with different techniques. *Quintessence Int* 2007; 38:404-409.
3. Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilme formed in situ and on enamel desmineralization. *Caries Res* 2006; 40:28-32.
4. Arnold WH, Sonkol T, Zoellner A, Gaengler P: Comparative study of in vitro caries-like lesion and natural caries lesion at crown margens. *J prosthodont* 2007; 16:445-451.
5. Bagheri R, Burrow MF, Tyas MJ: Surface characteristics of aesthetic restorative material- an SEM study. *J Oral Rehabil* 2007; 34:68-74.
6. Bardow A, madsen J, Nountofte B: The bicarbonate concentration in human saliva does not exceed the plasma level under normal physiological conditions. *Clin Oral Investig* 2000; 4:306-312.
7. Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC: The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *JADA* 2003; 134:1335-1342.
8. Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC: Micromorphology and surface roughness of sound and desmineralized enamel and dentin bleaching with a 10% carbamine peroxide bleaching agent. *Am J Dent* 2007; 20:97-102.
9. Ben-Amar A, Lberman R, Gorfil C, Bernstein Y: Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. *Am J Dent* 1995; 8:29-32.

[§] Referências identificadas no texto entre colchetes e decrita no item 3.8 em ordem alfabética (Anexo 5)

10. Berga Caballero A, Forner Navarro L, Amengual Lorenzo J: In vivo evaluation of effects of 10% carbamide peroxide and 3,5 hydrogen peroxide on the enamel surface. *Med Oral Patol y Cir Oral* 2007; 12:404-407.
11. Bollet-Quivogne FRG, Anderson P, Dowker SEP, Elliot JC: Desmineralization of permeable with alternative water and acidic buffer: scanning microradiographic study of effect of switching period. *Caries Res* 2007; 41:152-160
12. Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM: High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *J Oral Rehabil* 2004; 31:155-159.
13. Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA: Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz Dental J* 2003; 14:147-52.
14. Dawes C, Kubieniec K: The effect of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004, 49:665-669.
15. Dods MW, Johnson DA, Yeh CK: Health benefits of saliva: A review. *J Dent* 2005; 33:223-233.
16. De Oliveira RO, Basting RT, Rodrigues JA, Rodrigues Jr AL, Serra MC: effect of a carbamide peroxide agent and desensitizing dentifrices on enamel microhardness. *Am J Dent* 2003; 16:42-46.
17. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C: Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent* 2005; 33:561-567.
18. Ernst CP, Briseño M, Zönnchen BM: Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. *Quintessence Int* 1996; 27:53-56.

19. Featherstoni JDB, Zero DT: In situ model for simultaneous assessment of inhibition of desmineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; 71:804-810.
20. Fu B, Hoth-Hanning W, Hannig M: effects of dental bleaching on micro and nano-morphological alterations of the enamel surface. *Am J Dent* 2007; 20:35-40.
21. Gao XJ, Fron Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC: Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res* 2001; 80:1834-1839.
22. Haywood V, Heymann, HO: Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int* 1991;22:515-523.
23. Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzales-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues Jr AL, Serra, MC, Cury JA: Influence of Fluoride-Releasing Restorative Material on Root Dentine Secondary Caries In situ. *Caries Res* 2003; 40:435-439.
24. Hegedus C: An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent* 1999; 27:509-515.
25. Hietala EL, Tjaderhane L, Larmas M: Dentin caries recording with schiff's reagent, fluorescence and back-scattered electron image. *J Dent Res* 1993; 72:1588-1592.
26. Joiner A, Thakker G: Invitro evaluation of a novel 6% hydrogen peroxide tooth whitening product. *J Dent* 2004; 32:19-25.
27. Justino LM, Tames DR, Demarco FF: In situ and In vitro effects of bleaching with Carbamide peroxide on human enamel. *Oper Dent* 2004; 29:219-225.
28. Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH: Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. *J Oral Rehabil* 2003; 33:229-233.

- 29.Legeros RZ: Calcium Phosphates in desmineralization/remineralization processes. *J Clin Dent* 1999; 1:65-73.
- 30.Liu JF, Liu Y, Stephen HCV: Optimal Er: YAG laser energy for preventing enamel desmineralization. *J Dent* 2006; 34:62-66.
- 31.Markovic L, Rainer AJ, Nebojsa L, Gaengler P: Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. *JOE* 2007; 33:607-610.
- 32.Marsh PD: The role of microbiology in model of dental caries. *Adv Dent Res* 1995; 9:244-254.
- 33.Oltu Ü, Gürgan S: Effects of tree concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. *J Oral Rehabil* 2004; 27:332-340.
- 34.Paes Leme A, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury A, Rosalen P, Cury: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel desmineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004; 83:71-75.
- 35.Pecharki GD, Cury JA, Paes leme AF, Tabchoury CPM, Del Bel Cury A, Rosalen PL: Effect of sucrose containing iron(II) on dental biofilme and anamel desmineralization in situ. *Caries Res* 2005; 39:123-129.
- 36.Perdigão J, Francci C, Swift Jr EJ, Ambrose WW, Lopes M: Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide bleached enamel. *Am J Dent* 1998; 11:291-300.
- 37.Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Gianinni: Peroxide bleaching agent effect on enamel surface microhardness of human enamel. *Braz Dent J* 2004; 18: 306-311.

38. Pinto FC, Paes Leme AF, Cavalli V, Giannini M: Effect of 10% carbamide peroxide bleaching on sound and artificial enamel carious lesion. *Braz Dent J* 2009; 20:48-53.
39. Potočnik I, Kosec L, Gaspersic D: Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure and mineral content. *J Endod* 2000; 26:203-206.
40. Price RBT, Sedarous M, Hiltz GS: The pH of tooth-whitening products. *J Can Dent Assoc* 2000; 66:421-426.
41. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J: The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:481-495.
42. Silverstone LM: Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning microscopy. *Caries Res* 1975; 9:373-387.
43. Silverstone LM: Remineralization phenomena. *Caries Res* 1977; 11:39-41.
44. Smidt A, Weller D, Roman I: Effect of bleaching agent on microhardness and surface morphology of tooth enamel. *Am J Dent* 1998; 11:83-85.
45. Spalding M, Taveira LAA, Assis GF: Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: Alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. *J Esthet Restor Dent* 2003; 15:154-165.
46. Teixeira ECN, Turssi CP, Hara AT, Serra MC: Influence of post-bleaching time intervals on dentin bond strength. *Braz Oral Res* 2004; 18:75-79.
47. Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury CPM, Cury JA: Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel desmineralization and plaque composition in situ. *Pesq Odontol Bras* 2003; 17:326-331.

48. Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Chernecky R, Adibfar A: Scanning electron Microscopy observation on the penetration and structure of resin tags in bleached and unbleached bovine enamel. *J Endod* 1991; 17:72-75.
49. Tjaderhane L, Hietala EL, Larmas M: Mineral Element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalyzer combined with back-scattered electron image. *J Dent Res* 1995; 74:1770-1774.
50. Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A: Effects of water leaching on the adhesion of composite resin to bleached and unbleached bovine enamel. *J Endod*; 17:156-160.
51. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C: Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dent J* 2006; 200:371-376.
52. Turkun M, Sevgican F, Pehlivan Y, Aktener BO: Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: A scanning electron microscopy study. *J Esthet Restor Dent* 2002; 14:238-244.
53. Zero DT, LUSI A: In situ caries models: *Adv Dent Res* 1995; 9:214-230.

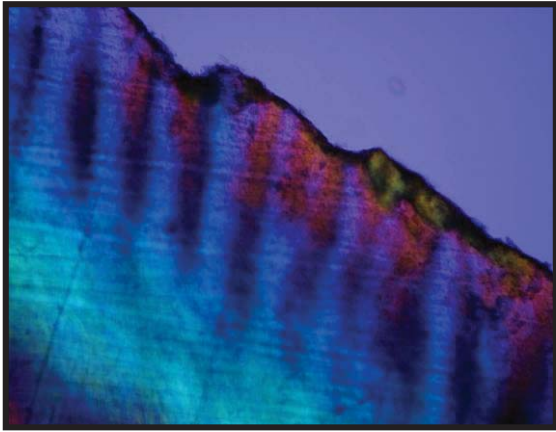


Figura 1

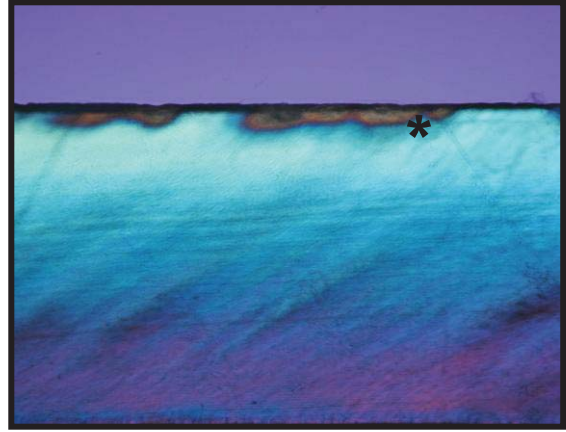


Figura 2

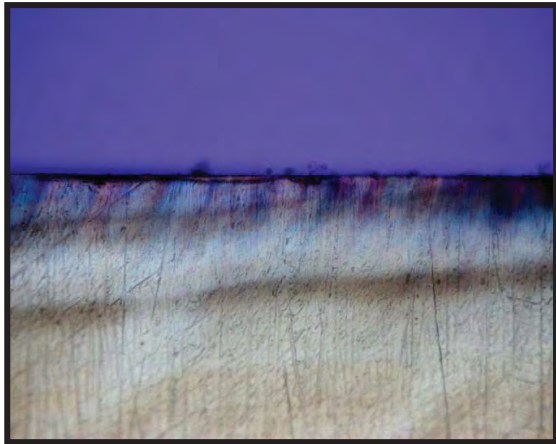


Figura 3

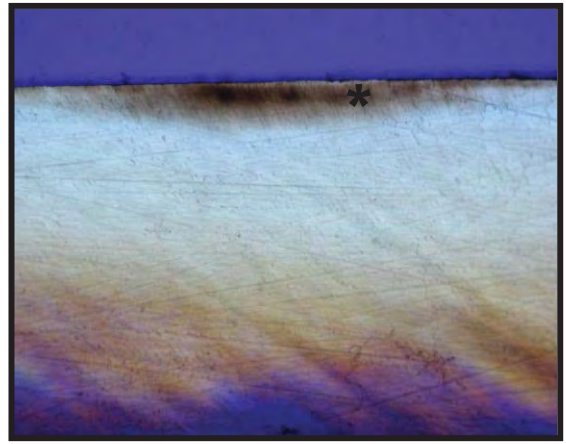


Figura 4

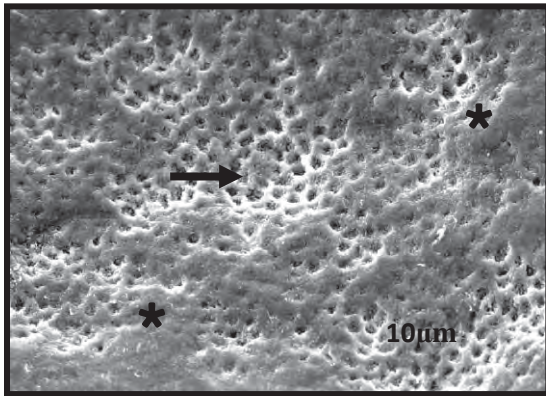


Figura 5

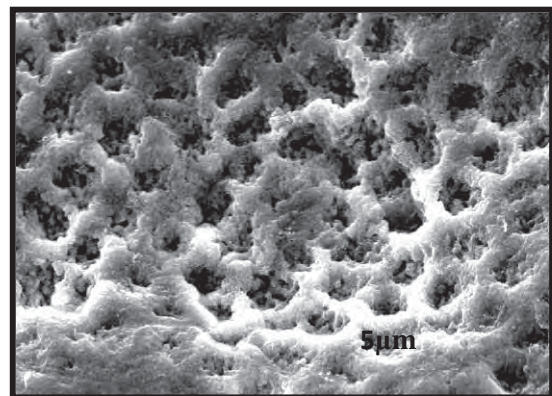


Figura 6

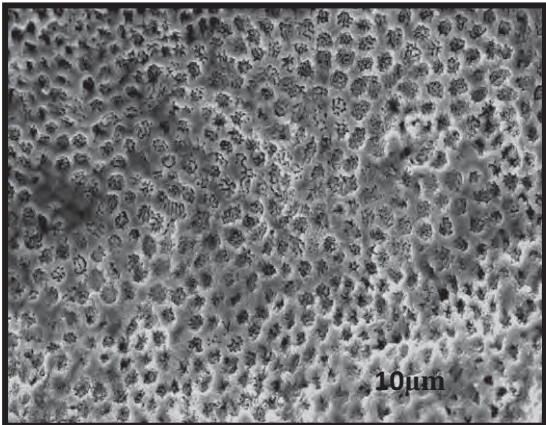


Figura 7

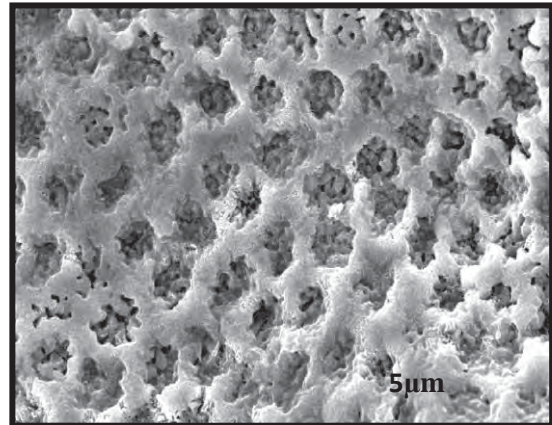


Figura 8

LEGENDAS

Figura 1: Imagem em microscopia de luz polarizada do grupo clareado, em um corte onde clinicamente pode-se constatar cavitação, sendo representada pela região mais acastanhada na imagem. (100x)

Figura 2: Imagem em microscopia de luz polarizada do grupo clareado, mostrando intensa diferença na birrefringência do esmalte. (100x).

Figura 3: Imagem em microscopia de luz polarizada de um corte do grupo controle, com áreas de desmineralização de subsuperfície (região escurecida). (100x).

Figura 4: Imagem em microscopia de luz polarizada de um espécime do grupo controle, mostrando áreas isoladas de desmineralização (região escurecida). (100x).

Figura 5: Fotomicrografia de um espécime do grupo controle observam-se áreas de remoção da camada aprismática e exposição dos prismas (→) e regiões mais preservadas (*) (1000x).

Figura 6: Em maior aumento, observam-se com detalhes as alterações morfológicas presentes. Nota-se remoção da camada aprismática e remoção do centro dos prismas (3000x).

Figura 7: Fotomicrografia de um espécime do grupo clareado, mostrando alterações morfológicas mais homogêneas que o grupo controle e presentes em toda a superfície (1000x).

Figura 8: Detalhe das alterações morfológicas observadas no grupo clareado. Apesar da maior presença de áreas desmineralizadas, o padrão das alterações foi semelhante ao grupo controle (3000x).

Quadro 1. Critérios de exclusão aplicados para seleção dos voluntários da pesquisa.

QUADROS

Quadro 1

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
Voluntárias grávidas ou amamentando
Voluntários fumantes
Voluntários com próteses fixas ou removíveis
Voluntários com aparelho ortodôntico
Voluntários com atividades de cárie
Voluntários com doença periodontal
Fazer uso de medicamentos que afetam o fluxo salivar (Antidepressivos, Narcóticos e Diuréticos)
Presença de distúrbios de ordem digestiva
Indisponibilidade de comparecer a faculdade nos dias pré-agendados para a parte laboratorial

Anexos

ANEXO 1– Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP–

OF. 100/2008
CEP
SFCD/rapv

Araçatuba, 15 de agosto de 2008.

Referência Processo FOA 2008-01237

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **"AÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 35% SOBRE A MORFOLOGIA DO ESMALTE E SUA INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DES-REMINERALIZAÇÃO: ESTUDO "IN SITU"™"** expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado o relatório parcial em 14/08/2009 e o relatório final em 14/02/2010.


Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coordenador do CEP

Ilmo Senhor
Dr. ANDRÉ LUIZ FRAGA BRISO
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.
15/08/2008

Dr. André Luiz Fraga Briso

ANEXO 2 – Carta de informação ao sujeito da pesquisa

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO SUJEITO DA PESQUISA: _____

1. Titulo do trabalho experimental

Ação do peróxido de hidrogênio a 35% sobre a morfologia do esmalte e sua interferência no processo Des-remineralização: estudo *in situ*.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar as alterações morfológicas provocadas no esmalte dental após a realização do clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, e a sua influência no desenvolvimento de lesão cariosa, por meio de análises com microscopia eletrônica de varredura e microscopia optica de luz polarizada. Os experimentos serão realizados por um período de duas semanas consecutivas.

3. Procedimentos utilizados na pesquisa

Inicialmente o voluntário passará por uma análise clínico-anamnésica para inspeção de prováveis problemas sistêmicos ou lesões orais. Num próximo momento, será ensinada a técnica de higienização e entregue um kit com uma escova dental, um dentifrício e um estojo para guardar o aparelho que deverão ser utilizados durante todo o experimento. Moldagem com hidrocolóide irreversível será realizada na arcada superior para confecção dos aparelhos em resina acrílica. Fragmentos de dentes bovinos medindo 4x4x3mm esterilizados serão fixados no dispositivo palatino com cera pegajosa. Em dias previamente agendados os voluntários deverão comparecer a clínica para que ocorra o clareamento das amostras, que acontecerá em três sessões; O dispositivo deverá ser usado durante todo o dia, exceto nos horários das refeições, em que deverá ser guardado em seu estojo.

4. Possíveis riscos e desconfortos

Dificuldade na fonação, até adaptação com o dispositivo.

Possível inflamação da região palatina por má adaptação do aparelho.

5. Benefício do experimento

Além dos resultados obtidos com o estudo, o sujeito da pesquisa será beneficiado com tratamento preventivo (limpeza profissional) e curativo, caso este último seja necessário, sob a responsabilidade do autor.

Tratamento clareador após a conclusão do experimento com Peróxido de Carbamida (Gold Standard)

6. Acompanhamento e garantia de esclarecimento sobre a metodologia

Os voluntários têm a garantia de que receberão resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida, acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. O pesquisador responsável tem o compromisso de fornecer informações atualizadas sobre o experimento quando for perguntado.

7. Liberdade do sujeito de se recusar a participar da pesquisa

O voluntário tem total direito de deixar de participar da pesquisa conforme a resolução 196/96 do CNS do Ministério da saúde. Caso deixe de participar do estudo por qualquer razão o sujeito não sofrerá qualquer tipo de prejuízo.


8. Forma de ressarcimento de despesas ou indenização

Não existirão despesas ao indivíduo nessa pesquisa, dessa forma não haverá qualquer forma de ressarcimento decorrentes da participação da pesquisa, uma vez que o tratamento não será invasivo e não oferecerá riscos ou danos permanentes ao indivíduo.

Alex Mendez de Arruda

Pesquisador

ANEXO 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
 CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende as exigências legais, o senhor(a) _____, portador (a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DE PESQUISA, devidamente explicada pelo profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO. Fica claro que o sujeito da pesquisa, pode retirar a qualquer momento o seu **termo de consentimento livre e esclarecido** e deixar de participar dessa pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do código de Ética Odontológico).

Por estarem entendidos e conformados assinam o presente termo.

Araçatuba, _____ de _____ de 2009.

 Sujeito da pesquisa

 Pesquisador: Alex Mendez de Arruda

 Orientador: Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso

ANEXO 4 – Carta de orientação aos voluntários

Orientação aos Voluntários

- Dormir com o aparelho a noite que antecede o período experimental, após a última higiene bucal;
- Utilizar o dispositivo continuamente (24 hs/dia), exceto durante as refeições (3 refeições diárias, totalizando 3 horas);
- Durante a alimentação o dispositivo deverá permanecer no estojo plástico;
- Não ingerir bebidas fora do horário da alimentação, exceto água, (retirar o dispositivo);
- Não ingerir medicamento durante o período experimental;
- A higiene bucal deverá ser realizada normalmente após as refeições, (café da manhã, almoço e jantar), utilizando da escova e dentifrício fornecido pelo pesquisador;
- Retirar o dispositivo na manhã seguinte após o fim do experimento (final do 14^o dia);
- Goteje a sacarose a cada 2 horas, totalizando oito vezes ao dia; Para fazê-lo, remova o dispositivo da boca, goteje uma gota da solução sobre o bloco de esmalte, sem que a ponta do conta gota toque o aparelho de acrílico para não contaminar, aguarde 5 minutos para que a sacarose se difunda pela placa bacteriana, então coloque novamente o dispositivo na cavidade bucal;
- Se o primeiro gotejamento do dia não puder ocorrer às 8 horas da manhã, atrase todos os outros, afim de que haja um intervalo de duas horas entre eles, e que ao final do dia tenha ocorrido 8 gotejamentos;
- Quando o gotejamento coincidir com o período que o dispositivo estiver fora da boca, realize o gotejamento 5 minutos antes de retornar o aparelho para a boca. Os gotejamentos devem ser realizados nos horários pré-determinados, não goteje a sacarose e fique mais de 5 minutos com o dispositivo fora da boca;
- A solução de sacarose deverá ser trocada a cada 3 dias, quando o voluntário devolver o frasco ele receberá uma nova solução recém preparada;
- O acúmulo de placa bacteriana sobre a tela é desejável, não tente removê-la
- O voluntário deverá retornar a clínica nos dias marcados, para o clareamento dos blocos de esmalte, nos horários agendados previamente;
- Ao final do experimento (14 dias), o aparelho deverá ser guardado no estojo plástico e recoberto com gaze úmida em água, e devolvê-lo o mais rápido possível ao pesquisador;

- Qualquer dúvida entrar em contato com o pesquisador.

Dúvida ligar para: Alex Mendez- (018) 9102 2930

ANEXO 5 – Normas da revista *Caries Research*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

www.karger.com/cre_guidelines

- ▼ [Aims and Scope](#)
- ▼ [Submission](#)
- ▼ [Conditions](#)
- ▼ [Types of Papers](#)
- ▼ [Preparation of Manuscripts](#)
- ▼ [Color Illustrations](#)
- ▼ [References](#)
- ▼ [Digital Object Identifier \(DOI\)](#)
- ▼ [Author's Choice™, NIH-Funded Research, Self-Archiving](#)
- ▼ [Page Charges](#)
- ▼ [Proofs](#)
- ▼ [Reprints](#)

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

[Online Manuscript Submission](#)

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton

(Editor-in-Chief, Caries Research)

Department of Microbiology

The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research

KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower

London Bridge SE1 9RT (UK)

Tel. +44 2071887465

Fax +44 2071887466

david.beighton@kcl.ac.uk

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of 'Caries Research' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages should be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;

- a list of 3-10 key words, for indexing purposes;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares). The fact that a study is conducted on behalf of a commercial body using funds supplied to the investigators' institution by the sponsor does not in itself involve a conflict of interest. Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489-93] for further information.

In any paper involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used; the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Papers on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surface-softened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized-light microscopy of section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-sections can be used to provide the necessary

proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. Figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the [CONSORT Statement](#). The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes](#) and/or the [National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and also acknowledge the source of funding for the project. The position(s) of author(s) employed by commercial firms should be included.

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.

- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 760.00 per

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

	<p><i>Examples</i></p> <p>(a) <i>Papers published in periodicals:</i> Lussi A, Longbottom C, Gyax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. <i>Caries Res</i> 2005;39:284-286.</p> <p>(b) <i>Papers published only with DOI numbers:</i> Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> DOI: 10.1159/000063858.</p> <p>(c) <i>Monographs:</i> Matthews DE, Farewell VT: <i>Using and Understanding Medical Statistics</i>. Basel, Karger, 1985.</p> <p>(d) <i>Edited books:</i> DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): <i>COX-2</i>. <i>Prog Exp Tum Res</i>. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.</p> <p>(e) <i>Patents:</i> Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.</p> <p>(f) <i>World Wide Web:</i> Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.</p>
--	---

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 2,750.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits the final version of your article on your behalf to PubMed Central. For those selecting our premium [Author's Choice™](#) service, we will send your article immediately upon publishing, accelerating the accessibility of your work without the usual embargo. More details on NIH's Public Access Policy is available [here](#).

ANEXO 6 – Resultado estatístico da microdureza

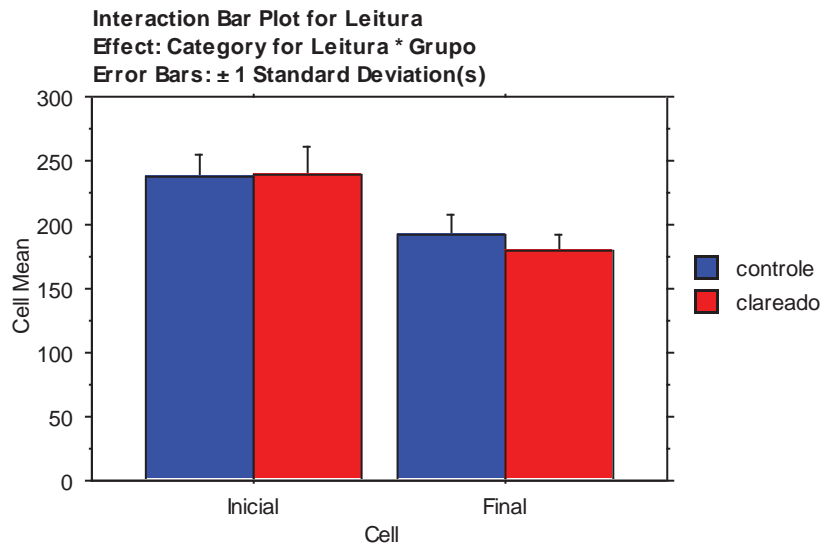
ANOVA Table for Leitura

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Grupo	1	624.001	624.001	1.367	.2489	1.367	.197
Subject(Group)	42	19170.326	456.436				
Category for Leitura	1	60830.153	60830.153	434.521	<.0001	434.521	1.000
Category for Leitura * Grupo	1	1061.729	1061.729	7.584	.0087	7.584	.777
Category for Leitura * Subject(Group)	42	5879.730	139.994				

Means Table for Leitura

Effect: Category for Leitura * Grupo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
controle, Inicial	22	237.288	17.990	3.835
controle, Final	22	191.652	15.882	3.386
clareado, Inicial	22	238.909	21.432	4.569
clareado, Final	22	179.379	12.557	2.677



CONTROLE

ANOVA Table for Leitura

Split By: Grupo

Cell: controle

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	21	9834.515	468.310				
Category for Leitura	1	22909.455	22909.455	213.013	<.0001	213.013	1.000
Category for Leitura * Subject	21	2258.545	107.550				

CLAREADO

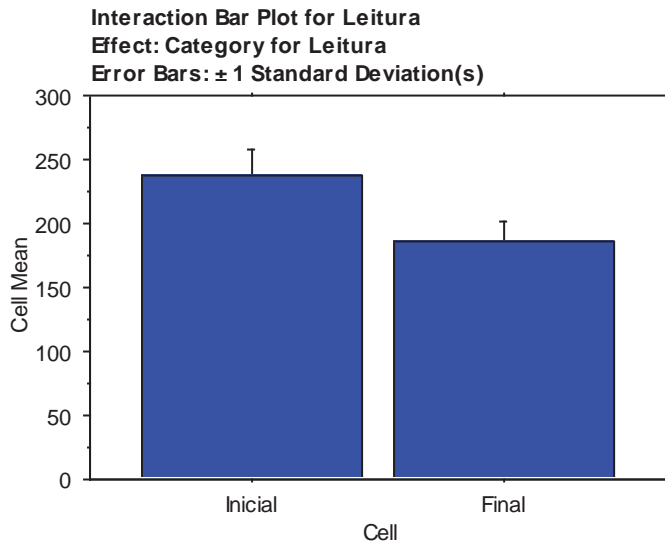
ANOVA Table for Leitura
Split By: Grupo
Cell: clareado

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	21	9335.811	444.562				
Category for Leitura	1	38982.427	38982.427	226.067	<.0001	226.067	1.000
Category for Leitura * Subject	21	3621.184	172.437				

COMPARATIVO LEITURAS

ANOVA Table for Leitura

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	43	19794.327	460.333				
Category for Leitura	1	60830.153	60830.153	376.822	<.0001	376.822	1.000
Category for Leitura * Subject	43	6941.458	161.429				



Inicial

ANOVA Table for Dureza
Split By: Leitura
Cell: inicial

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Grupo	1	28.912	28.912	.074	.7871	.074	.058
Residual	42	16441.662	391.468				

Final

ANOVA Table for Dureza
Split By: Leitura
Cell: final

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Grupo	1	1656.818	1656.818	8.084	.0069	8.084	.805
Residual	42	8608.394	204.962				

