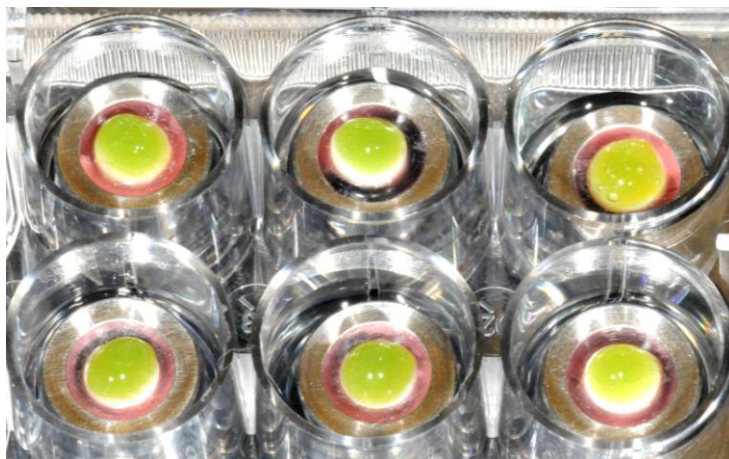




FERNANDA BERNARDI DA COSTA

ANÁLISE DA PENETRAÇÃO DE H_2O_2 EM DENTES
DESMINERALIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO
CLAREADOR



Araçatuba - SP

2013

FERNANDA BERNARDI DA COSTA

**ANÁLISE DA PENETRAÇÃO DE H₂O₂ EM DENTES
DESMINERALIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO
CLAREADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso.

Araçatuba - SP

2013

DEDICATÓRIA

A minha mãe, que é professora, e desde sempre me ensinou o valor dos estudos, a conquistar meus objetivos com garra e dignidade, e que muito me apoiou durante a graduação e no período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que sempre iluminou meus caminhos.

Ao Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso, que durante o período de convivência, muito me ensinou, contribuindo grandemente para o meu crescimento científico; pela oportunidade e confiança, uma vez que foi quem abriu as portas do Departamento, além da sua atenção, paciência e apoio durante a orientação.

Ao Rafael Simões Gonçalves, pela orientação, paciência, e incentivo em todas as fases da pesquisa. Sendo o meu guia durante todo período de trabalho, sempre disposto a ajudar, com calma e inteligência, além de ser um grande amigo.

Aos que colaboraram com o trabalho, dividindo conhecimentos, ajudando na pesquisa, e tornando os dias no Laboratório de Dentística mais agradáveis, são eles: Fernanda Almeida de Azevedo, Marjorie de Oliveira Gallinari, Mariana Campos Hildebrand, André Godas, Laura Molinar Franco, Naiara Montes, Ana Paula Pereira, Laércio Neves Marcon, e Lucas Silveira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

EPÍGRAFE

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.” **Max Weber**

Costa, F.B. Análise da penetração de H_2O_2 em dentes desmineralizados e submetidos a tratamento clareador. 2013. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a penetração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a evolução da desmineralização em dentes com lesões incipientes submetidos ao tratamento clareador. Dentre os 60 dentes selecionados, 30 tiveram a superfície do esmalte imersa em solução desmineralizadora e os restantes permaneceram hígidos. Para a análise da penetração de peróxido de hidrogênio, 15 discos de esmalte/dentina de cada grupo receberam tratamento clareador com o produto à base de peróxido de hidrogênio a 35%. Durante o procedimento, os discos foram posicionados em câmaras pulpares artificiais contendo solução tampão de acetato. Esta solução foi coletada, processada e submetida à análise da densidade óptica em Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível. Posteriormente, três discos de cada grupo foram destinados à análise superficial em MEV e outros dois para a análise de microscopia de luz polarizada. Os 10 discos restantes de cada grupo foram seccionados, polidos e destinados à análise da microdureza interna em diferentes profundidades. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA medidas repetidas e Fisher PLSD ao nível de 5%. Foi observado que os dentes previamente desmineralizados apresentaram maior penetração de peróxido de hidrogênio ($p < 0.0001$). Na análise da microdureza interna do esmalte, notou-se que o clareamento produziu alterações até a profundidade de 20 μm nos substratos hígidos, enquanto que no substrato desmineralizado, as alterações atingiram 90 μm . Concluiu-se que o grau mineralização do esmalte pode ser modulador da penetração dos agentes clareadores nos tecidos dentais e que os agentes clareadores contribuem para a evolução de desmineralização de uma lesão incipiente.

Palavras-chave: Clareamento dental. Peróxido de hidrogênio. Cárie dentária. Penetração trans-amelodentinária.

Costa, F.B. Analysis of penetration of H₂O₂ in demineralized teeth and subject to bleaching. 2013. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

This study evaluated the H₂O₂ penetration and the evolution of demineralization in teeth with incipient lesions submitted to bleaching treatment. Among the selected 60 teeth, 30 had the enamel surface submitted to a cariogenic challenge in demineralizing solution and the rest remained sound. To analyze the H₂O₂ penetration, 15 enamel/dentin discs of each group received treatment with bleaching product based on hydrogen peroxide at 35%. During the procedure, the discs were placed in artificial pulp chambers containing acetate buffer solution. This solution was collected, processed, and submitted for analysis of optical density in Ultraviolet Visible reflectance spectrophotometer. Subsequently, three discs from each group were used for surface analysis with SEM and two others for the analysis of polarized light microscopy. The 10 remaining discs of each group were sectioned and polished for cross-sectional hardness analysis (CSH) at different depths. The data were submitted to ANOVA Repeated Measure and PLSD Fisher test at 5%. It was observed that previously demineralized teeth showed greater penetration of hydrogen peroxide ($p < 0.0001$). After analyzing the CSH of the enamel, it was observed that bleaching caused changes to a depth of 20 μm in sound substrate, while in demineralized substrate the bleaching decreased the CSH of the enamel to a depth of 90 μm . It was concluded that the degree of the enamel mineralization could be a modulator of the bleaching agent's penetration in dental tissues and that bleaching agents contribute to the development of an incipient lesion's demineralization.

Keywords: Tooth bleaching. Hydrogen peroxide. Dental caries. Trans-enamel. Trans-dentinal penetration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incisivos bovinos inicialmente obtidos, com a raiz seccionada	12
Figura 2 - Obtenção dos espécimes na Furadeira de bancada	12
Figura 3 - Espécimes prontos para serem utilizados no experimento	13
Figura 4 - Demarcação da área selecionada para obtenção dos fragmentos de esmalte	14
Figura 5 - Obtenção de fragmentos de esmalte para leitura no microdurômetro	14
Figura 6 - Fragmentos de esmalte embutidos em base acrílica, numerados e com a superfície polida	15
Figura 7 - Seleção dos espécimes e divisão dos grupos experimentais conforme as condições de substrato	16
Figura 8 - Espécime impermeabilizado com esmalte de unha, com exceção da superfície vestibular e imerso em solução desmineralizadora	17
Figura 9 - CPAs	18
Figura 10 - Whiteness HP Maxx composto por 2 frascos	18
Figura 11 - Aplicação do produto clareador sobre o espécime	19
Figura 12 - Gráfico de Concentração x Absorbância	21
Figura 13 - Esquema demonstrando a sequência da metodologia	23
Figura 14 - A: Espécime do grupo controle (hígido). B: Após o tratamento clareador	26
Figura 15 - C: Espécime após ser submetido ao desafio cariogênico. D: Espécime submetido ao desafio cariogênico e ao procedimento clareador	26
Figura 16 - Imagem da microscopia de luz polarizada. A, B, C e D	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da absorbância da curva padrão	20
Tabela 2 - Média (DP) das concentrações de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{g/mL}$) recuperadas de câmaras pulpares artificiais após clareamento dental em esmalte hígido e desmineralizado, de acordo com o número de sessões	24
Tabela 3 - Média (DP) dos valores de microdureza interna antes e após o clareamento dental em esmalte hígido e desmineralizado, de acordo com diferentes profundidades.	25
Tabela 4 - Quantidade de peróxido de hidrogênio difundido pela superfície dental em $\mu\text{g/mL}$ nos espécimes hígidos	33
Tabela 5 - Quantidade de peróxido de hidrogênio difundido pela superfície dental em $\mu\text{g/mL}$ nos espécimes hígidos	34

SUMÁRIO

1- Introdução	10
2- Proposição	11
3- Materiais e métodos	11
4- Resultados	24
5- Discussão	27
6- Conclusão	29
Referências Bibliográficas	31
Anexos	33

1- INTRODUÇÃO

O clareamento dental é um dos tratamentos mais procurados para se obter estética, sendo considerado um procedimento conservativo, de fácil execução e de custo relativamente baixo.¹ A técnica do clareamento caseiro é a mais utilizada para dentes vitais, sendo reconhecida por sua eficácia e segurança biológica.^{2,3} A sua realização consiste de aplicações do gel de peróxido de carbamida, em baixas concentrações, realizadas pelo próprio paciente, com a supervisão de um profissional.⁴⁻⁶

Outra alternativa para o clareamento de dentes vitais é a técnica *in-office*, que se caracteriza pelo emprego de produtos à base de peróxido de hidrogênio em concentrações que variam de 20% a 38%. A obtenção de resultados rápidos com a observação imediata do efeito clareador é o principal apelo mercadológico que ancora o sucesso desta técnica.⁷ Sabe-se que seja qual for o agente clareador utilizado, o princípio ativo que irá agir na estrutura dentária é o peróxido de hidrogênio, que deverá penetrar pelo esmalte e alcançar a dentina, produzindo o efeito desejado.

Apesar do sucesso das técnicas clareadoras, tem sido demonstrado que a aplicação do gel sobre o esmalte pode resultar na sua dissolução parcial, desproteinização e aumento da permeabilidade deste tecido.⁸⁻¹⁰

Este fato torna-se preocupante, pois a presença de lesões incipientes, muitas vezes em estágio sub-clínico, podem sofrer interferência do tratamento clareador e evoluírem para lesões mais avançadas ao mesmo tempo em que poderão possibilitar maior penetração de peróxidos durante o tratamento.

Diversas pesquisas *in vitro* comprovam que o H_2O_2 presente nos agentes clareadores, mesmo em baixas concentrações, atravessam facilmente o esmalte e dentina, alcançando o tecido pulpar,^{1, 8, 11, 12} que poderá responder com peroxidação lipídica, fragmentação de proteínas e, conseqüente lesão da membrana celular.¹³

Deste modo, torna-se necessário e interessante avaliar a penetração trans-amelodentinária do peróxido de hidrogênio em substrato previamente desmineralizado ao mesmo tempo em que se avalie a evolução desta lesão ao longo do tratamento clareador.

2- PROPOSIÇÃO

O presente estudo objetiva avaliar a influência da desmineralização dental na penetração trans-amelodentinária de peróxido de hidrogênio, bem como a evolução das lesões após o clareamento com produtos à base de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Maxx, FGM Dental Products, Joinville, SC, Brazil), em dentes bovinos.

As hipóteses nulas do estudo são:

- A desmineralização do esmalte dental não influencia na penetração de peróxido de hidrogênio.
- O tratamento clareador não altera a profundidade de desmineralização de lesões incipientes.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e Padronização dos Espécimes

Foram utilizados cem (100) incisivos bovinos permanentes obtidos de novilhos com idade entre 24 e 30 meses. Depois de limpos, os dentes receberam profilaxia com pedra pomes e água (Figura 1).

Figura 1- Incisivos bovinos inicialmente obtidos, com a raiz seccionada.



Posteriormente, foram fixados em um dispositivo acoplado à plataforma de uma furadeira de bancada (Ferrari modelo FGC-16, São Paulo, SP, Brasil) e com auxílio de uma ponta diamantada para corte de vidro (Dinser Ferramentas Diamantadas Ltda., Sacomã, SP, Brasil), sob constante irrigação, foram obtidos discos com 5,7 mm de diâmetro a partir do terço médio da face vestibular (Figura 2).

Figura 2- Obtenção dos espécimes na Furadeira de bancada.



Em seguida, todos os discos tiveram a superfície dentinária regularizada por meio de movimentos giratórios manuais sobre lixas de óxido de alumínio, de granulação

400 e 600 (T469-SF- Norton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), até que apresentassem a espessura padronizada de 3,5 mm (1,3 mm de esmalte e 2,2 mm de dentina), medidos em paquímetro digital (modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda, SP, Brasil) (Figura 3).

Na sequência, todas as unidades experimentais receberam tratamento para remoção da *smear layer*, com aplicação de solução de EDTA por 1 minuto, seguida da rinsagem com água deionizada por 10 segundos.

Figura 3- Espécimes prontos para serem utilizados no experimento.



Para padronização dos espécimes, a microdureza dos remanescentes dentais foi analisada. Para isso, foram obtidos fragmentos do esmalte adjacente à região de onde foram obtidas as unidades experimentais (Figura 4 e 5).

Figura 4- Demarcação da área selecionada para obtenção dos fragmentos de esmalte.

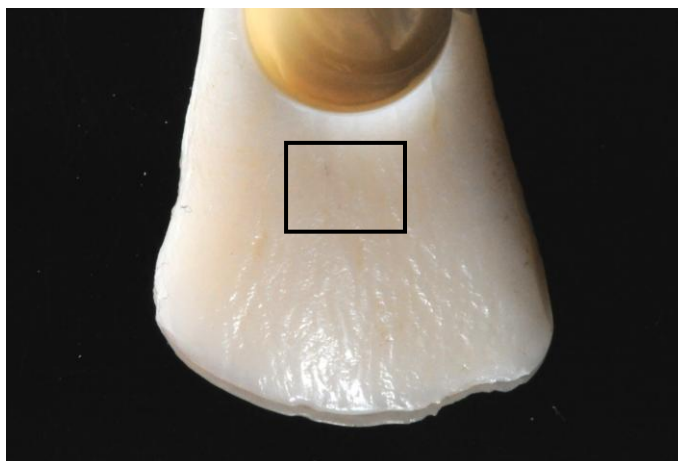


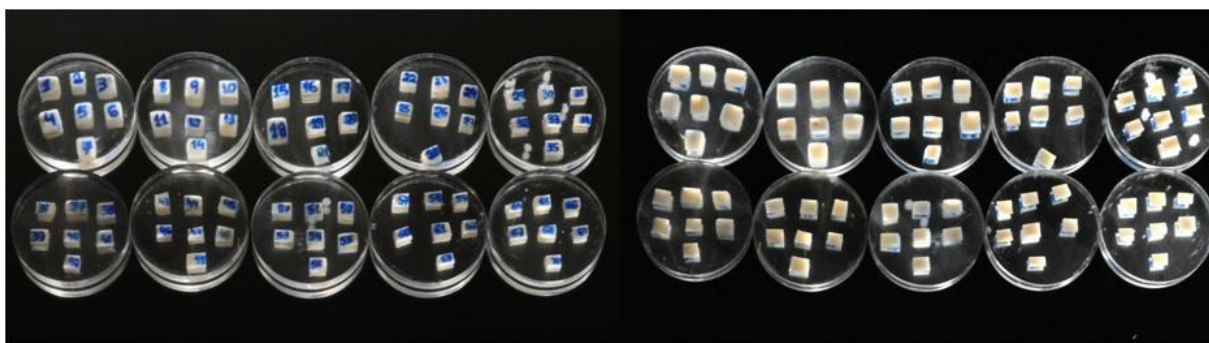
Figura 5- Obtenção de fragmentos de esmalte para leitura no microdurômetro.



Os fragmentos obtidos foram embutidos em uma base acrílica, possibilitando realizar os tratamentos superficiais necessários para obter uma superfície adequada para a análise de microdureza (Figura 6). O aplainamento e polimento da superfície de estudo foram realizadas em politriz (Aropol E - Arotec Industria e Comércio Ltda, Cotia,

São Paulo, Brasil), empregando discos abrasivos nas granulações 600 e 800 por 2 minutos e 1200 por 4 minutos, em baixa velocidade (90 rpm) e sob refrigeração a água. O polimento final foi realizado com discos de feltro umedecidos em pasta diamantada de 1 μ m (Arotec S.A. Indústria e comercio Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil), durante 5 minutos.

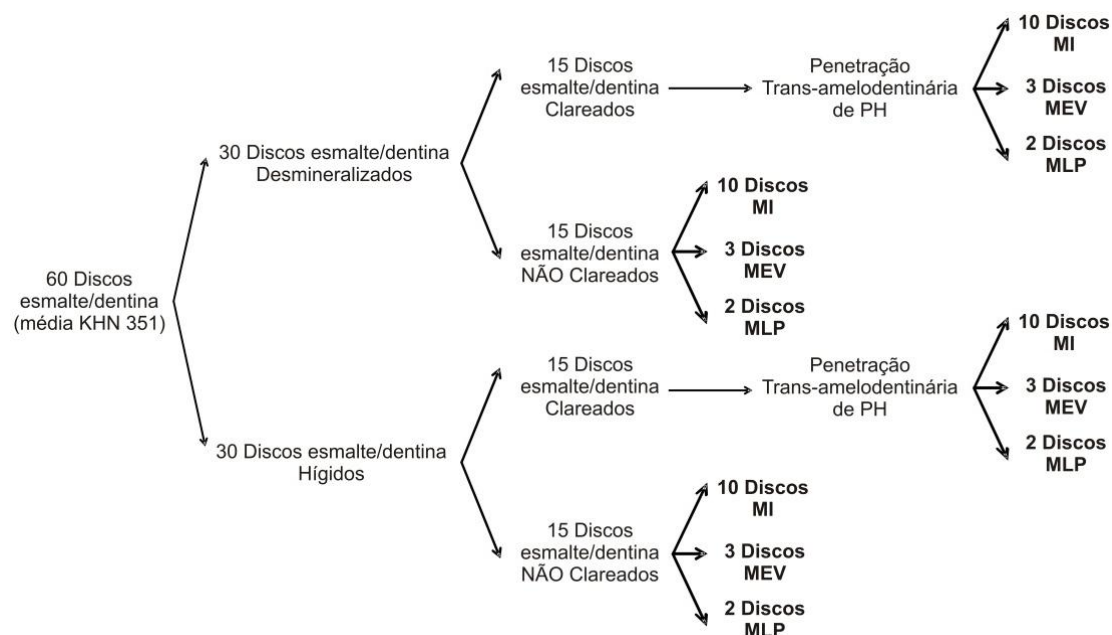
Figura 6- Fragmentos de esmalte embutidos em base acrílica, numerados e com a superfície polida.



A dureza do esmalte foi verificada em microdurômetro (HMV-2000 SHIMADZU, Maryland, USA), com penetrador tipo Knoop que atuou com carga estática de 25 gramas por 10 segundos. Foram realizadas 03 endentações, no centro do fragmento, com distância entre elas de 100 μ m. A média das 3 leituras foi considerada a microdureza do espécime.

Obtidos esses dados, os 60 espécimes com microdureza mais próxima da média (351) foram selecionados e divididos em 2 grupos, como apresentado na Figura 7 e descrito abaixo.

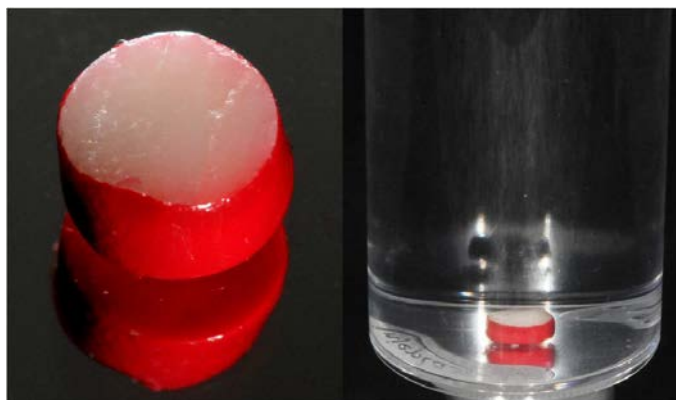
Figura 7- Seleção dos espécimes e divisão dos grupos experimentais conforme as condições de substrato.



Os espécimes do **Grupo I** apresentaram o esmalte dental íntegro, sendo o grupo controle, uma vez que ofereceram maiores desafios para a penetração do peróxido e permeabilidade dos tecidos dentais.

Os espécimes do **Grupo II** foram impermeabilizados com 2 camadas de esmalte de unha, com exceção da superfície vestibular que recebeu o tratamento. Em seguida, foram imersos em solução desmineralizadora, contendo 0,05 mol/L e com pH=5,0, durante 24 horas (Figura 8). Esta solução contém 1,28mmol/L Ca, 0,74mmol/L Pi e 0,03 µgF/mL e foi preparada a partir dos sais $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 e NaF, respectivamente.¹⁴ Posteriormente, os espécimes foram retirados da solução, lavados abundantemente com água deionizada e o esmalte de unha foi removido cuidadosamente. Este tratamento produziu lesões de mancha branca no esmalte dental.

Figura 8- Espécime impermeabilizado com esmalte de unha, com exceção da superfície vestibular e imerso em solução desmineralizadora.



Preparo da Câmara Pulpar Artificial (CPA):

Os discos foram adaptados a um dispositivo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-Unesp.¹⁵ Cada CPA apresenta 2 compartimentos: o da porção superior, apresenta uma abertura de 8 mm de diâmetro e outra abaixo com 6 mm de abertura, permitindo o posicionamento e travamento adequado do espécime; a porção inferior apresenta perfurações laterais que permitem a circulação da solução utilizada para quantificar o peróxido penetrado no espécime (Figura 13).

Os espécimes foram posicionados nas CPAs (Figura 9) entre dois anéis de silicone com diâmetro interno de 4,47 mm e espessura de 1,78 mm (Ref. OR 008-Rodimar rolamentos Ltda., Araraquara, SP, Brasil).

Figura 9- CPAs.



Procedimento Clareador:

O tratamento clareador foi realizado em 15 espécimes de cada grupo com o produto à base de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Maxx, FGM Dental Products, Joinville, SC, Brazil). Este produto apresenta-se comercialmente em dois frascos (Figura 10), um contendo o peróxido e o outro, o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas, na proporção de 3:1 de acordo com as recomendações do fabricante.

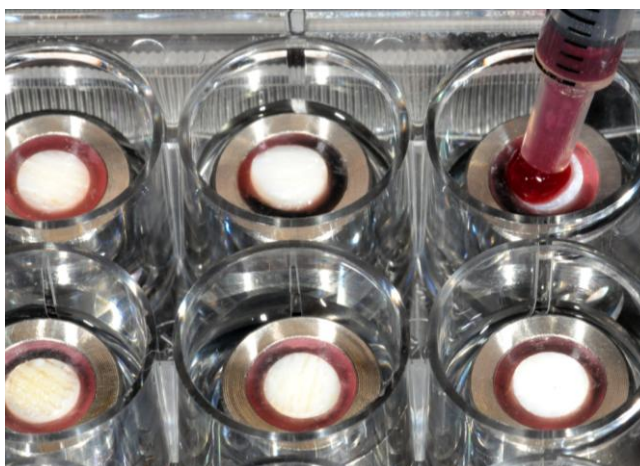
Figura 10- Whiteness HP Maxx composto por 2 frascos.



Após a mistura, o produto final foi inserido em uma seringa graduada descartável de 1 mL, sendo 0,04 mL aplicado sobre cada espécime, permanecendo em contato com o tecido dental por 15 minutos (Figura 11). Posteriormente, a superfície foi limpa

com sugadores e papel absorvente e duas novas aplicações foram efetuadas, totalizando 45 minutos de exposição ao clareador. O procedimento foi repetido por 3 vezes com intervalo de uma semana entre as sessões.

Figura 11- Aplicação do produto clareador sobre o espécime.



Entre as sessões clareadoras, todos os espécimes permaneceram em contato com algodão embebido por saliva artificial a 37°C.

Preparo das soluções e penetração Transamelodentinária de H_2O_2 :

Para quantificar o H_2O_2 que penetrou através dos discos de esmalte e dentina foram colocados 1 mL de solução tampão de acetato nos casulos que receberam as CPAs. A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução e o peróxido de hidrogênio difundido através da estrutura dental passou a fazer parte da mesma. Após o clareamento foi, então, adicionado à solução tampão de acetato, contendo o peróxido difundido, a solução de corante violeta leucocristal e solução com enzima peroxidase.

A solução tampão de acetato foi preparada em três etapas. Durante a primeira etapa foi realizado o preparo da solução de acetato de sódio 2M, com 68,05 g de acetato de sódio dissolvidos em 250 mL de água deionizada. Na segunda etapa houve o preparo da solução de ácido acético 2M, com 18,59 mL de ácido acético glacial concentrado pró análise diluídos em 250 mL de água deionizada. A terceira etapa

consistiu na mistura das soluções em volumes iguais de acetato de sódio 2M e ácido acético 2M. O pH resultante foi ajustado para 4,5. ¹⁶

Para a solução de leucocristal foram pesados 30 mg do corante violeta leucocristal e em seguida dissolvidos em 60 mL de solução ácido clorídrico (HCl 0,5% v/v), obtendo assim uma solução de concentração 0,5 mg/mL. ¹⁶

A solução com enzima peroxidase foi confeccionada com 10mg de peroxidase extraída de rábano silvestre diluídos em 10 mL de água deionizada, resultando em uma solução com concentração de 1mg/mL. ¹⁶

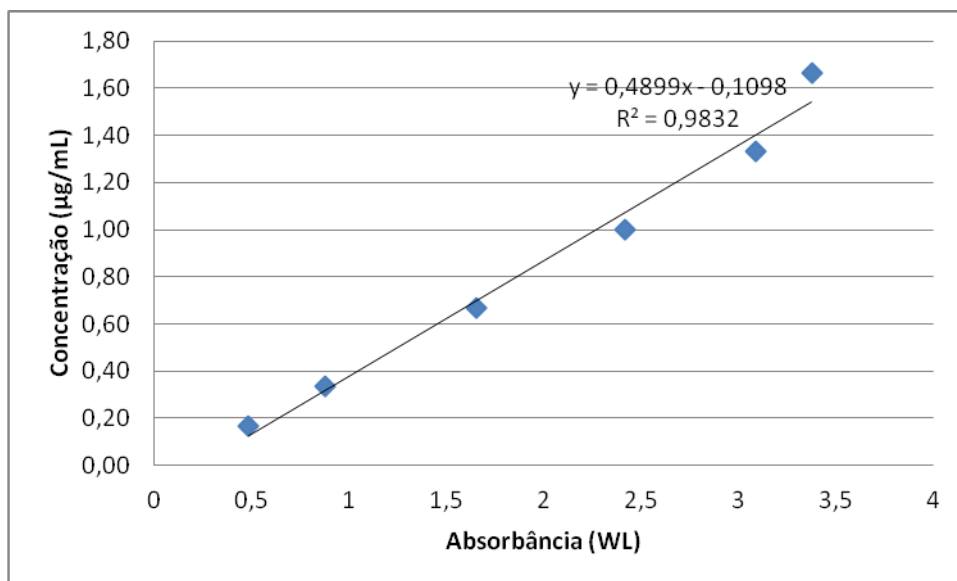
Este método foi preconizado por Mottola et al em 1970 ¹⁷ e baseia-se na reação do PH, e violeta leucocristal, catalizado pela enzima peroxidase. A coloração dessa mistura varia sua intensidade de acordo com a quantidade de peróxido, assim, uma vez que o sinal de absorbância é proporcional à concentração do peróxido torna-se possível avaliar indiretamente a quantidade de peróxido que difundiu da superfície dental para a solução contida na CPA.

Para tanto foi estabelecida uma curva de calibração, onde valores de absorbância de soluções de H₂O₂ de concentrações conhecidas foram medidas. O primeiro passo foi a padronização da solução de peróxido hidrogênio que serviu para obter a curva padrão (Tabela 1) (Figura 12). Para a padronização foi utilizada a iodometria, ¹⁸ que consiste na reação do PH em meio ácido, com a solução de iodeto de potássio 1M liberando iodo, resultando em uma solução cor âmbar escuro.

Tabela 1- Valores da absorbância da curva padrão.

<i>Valor da Iodometria</i>	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	3 µg/mL	4 µg/mL	5 µg/mL
<i>Valor da Absorbância</i>	0,483	0,876	1,655	2,418	3,085	3,374

Figura 12- Gráfico de Concentração x Absorbância.



Realizado o procedimento clareador, 25 µL de solução tampão acetato foram removidas e misturadas com 2.750 µL de água destilada, 100 µL de violeta leucocrystal (0.5 mg/mL - Sigma Chemical Co., St. Louis – MO, USA) e 50 µL de enzima peroxidase (1 mg/mL - Sigma Chemical Co., St. Louis – MO, USA). A solução foi diluída para um volume final de 3 mL com água destilada.

A leitura da solução foi realizada com o Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), 30 minutos após cada sessão clareadora.

As soluções foram coletadas em 3 momentos distintos: T1- Leitura realizada imediatamente após a primeira sessão clareadora; T2- leitura realizada imediatamente após a segunda sessão clareadora e T3- Leitura realizada imediatamente após a terceira sessão clareadora.

Análise da dureza subsuperficial

Após a quantificação do peróxido de hidrogênio 10 espécimes de cada grupo, incluindo os discos de esmalte/dentina que não foram clareados, foram seccionados no sentido longitudinal, utilizando disco flexível diamantado dupla face – Ø 22 mm (KG Sorensen Ind. e Com. Ltda. Barueri – SP, Brasil) movido em baixa rotação e sob intensa refrigeração a água. Cada espécime foi embutido em resina acrílica na embutidora Pre 30 (AROTEC S.A. Indústria e Comércio, Cotia-SP, Brasil), de tal forma que a face seccionada ficou exposta para os tratamentos superficiais.

O polimento foi realizado com lixas de óxido de alumínio, nas granulações 320, 600, 1200 e com pasta diamantada de granulação 1µm (Extec Corp. Enfield –CT, USA). A microdureza interna foi determinada com microdurômetro (HMV-2000 SHIMADZU, Maryland, USA), com penetrador tipo Knoop que atuou com carga estática de 5 gramas por 10 segundos. As impressões foram realizadas no centro do bloco às distâncias de 10, 20, 30, 60, 90, 120 µm a partir da superfície do esmalte. Mais duas séries de demarcações foram realizadas 200 µm à direita e à esquerda das marcações realizadas no centro do espécime (Figura 13).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Três espécimes de cada grupo, inclusive os que não foram submetidos ao tratamento clareador foram preparados para análise superficial em microscopia eletrônica de varredura (EVO HD LS-15, Carl Zeiss do Brasil Ltda., SP, Brasil). Para tanto, os espécimes foram limpos, desidratados, metalizados e foram obtidas fotomicrografias do esmalte dental nas diferentes condições em estudo, em 3000x de aumento.

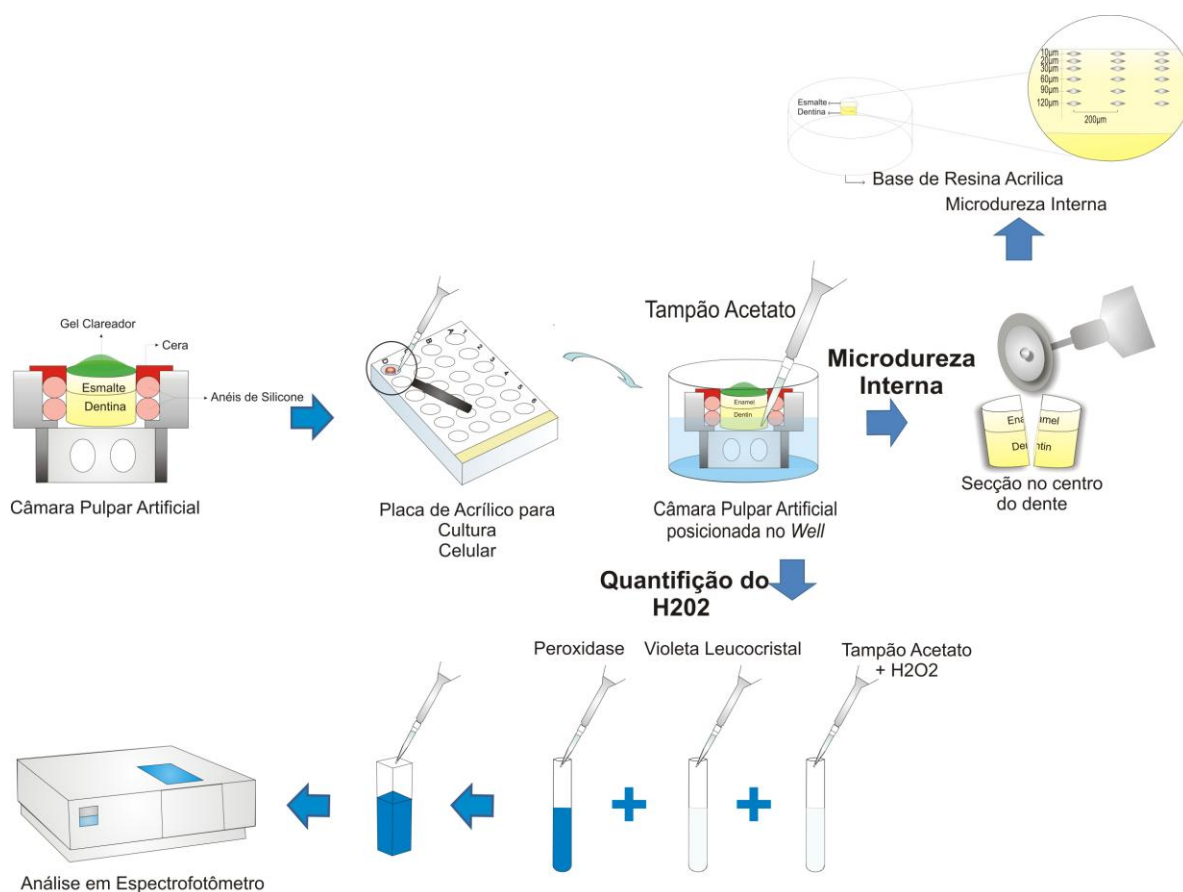
Análise em Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

Dois espécimes de cada grupo, incluindo os que não foram submetidos ao procedimento clareador, foram destinados à análise em MLP. Os espécimes foram embutidos e cortados seriadamente no sentido longitudinal em cortadeira metalográfica (Isomet 2000, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, USA). As fatias (slices) obtidas foram

polidas com lixas de oxido de alumínio nas granulações de 600 e 1200 até obter amostras de aproximadamente 100 µm de espessura.

Posteriormente, os slices foram posicionados em lâminas de vidro, imersos em água destilada, e cobertos com uma lamínula. A análise foi realizada utilizando o microscópio de luz polarizada (Axiophot Zeiss DSM-940 A, Oberkochen, Germany) em um aumento de 25X. Para a análise utilizou-se o software AxioVision 4 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Figura 13- Esquema demonstrando a sequência da metodologia.



4- RESULTADOS

A aplicação do teste ANOVA medidas repetidas mostrou que a penetração de peróxido de hidrogênio, foi diferente no grupo com esmalte hígido e no desmineralizado ($p < 0.0001$).

A aplicação do Teste de Fisher 's LSD ao nível de significância de 5% mostrou que a condição do substrato influenciou a intensidade de penetração do peróxido de hidrogênio, verificando-se maiores valores nos espécimes submetidos ao desafio cariogênico, independente da sessão clareadora (Tabela 2).

Tabela 2- Média (DP) das concentrações de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) recuperadas de câmaras pulpares artificiais após clareamento dental em esmalte hígido e desmineralizado, de acordo com o número de sessões.

	<i>Sessão Clareadora</i>		
<i>Substrato</i>	<i>1^a</i>	<i>2^a</i>	<i>3^a</i>
<i>Desmineralizado</i>	5.27 (0.22) Aa	5.10 (0.18) Aab	4.90 (0.42) Ab
<i>Hígido</i>	4.68 (0.52) Ba	4.60 (0.33) Bab	4.31 (0.36) Bb

Letras diferentes (maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas) indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

A aplicação do Teste de Fisher's LSD (Least Significant Difference) para os dados relativos à análise da microdureza interna mostrou que de um modo geral, os valores da microdureza interna foram crescentes em todas as condições experimentais, desde a profundidade de 10 μm até 120 μm . A Tabela 3 também mostra que, os substratos hígidos apresentaram maiores valores de microdureza até a profundidade de 90 μm , igualando-se com os desmineralizados na leitura realizada nos 120 μm de profundidade.

Quando analisado somente o efeito do agente clareador no substrato hígido, observou-se alteração da microdureza até a profundidade de 20 μm . Por outro lado, a

ação do clareador no substrato desmineralizado influenciou nos valores da microdureza interna do esmalte, que apresentaram alterações mais pronunciadas que o grupo não clareado, até a profundidade de 90 μm .

Tabela 3- Médias (DP) dos valores de microdureza interna antes e após o clareamento dental em esmalte hígido e desmineralizado, de acordo com diferentes profundidades.

<i>Substrato</i>	<i>Hígido</i>		<i>Desmineralizado</i>	
<i>Tratamento</i> <i>Profundidade</i>	<i>Não clareado</i>	<i>Clareado</i>	<i>Não clareado</i>	<i>Clareado</i>
10 μm	278.9 (20.45) Ea	253.0 (9.96) Eb	94.3 (9.68) Fc	37.8 (13.84) Fd
20 μm	303.8 (5.77) Da	269.1 (8.54) Db	139.0 (32.97) Ec	74.8 (18.26) Ed
30 μm	325.1 (9.77) Ca	313.5 (14.63) Ca	170.5 (52.35) Db	124.5 (39.69) Dc
60 μm	343.2 (10.11) Ba	343.0 (9.55) Ba	249.1 (35.53) Cb	239.7 (22.67) Cb
90 μm	351.1 (7.77) ABa	352.7 (4.57) Aa	313.9 (17.72) Bb	268.9 (9.51) Bc
120 μm	354.6 (8.77) Aa	353.5 (4.55) Aa	350.2 (5.55) Aa	350.3 (6.95) Aa

Letras diferentes (maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas) indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

Observações Microscópicas

Figura 14- A: Espécime do grupo controle (hígido) apresentando os canais de difusão característicos do esmalte dental (3,000 X). **Figura 14- B:** Após o tratamento clareador, nota-se a remoção de parte da camada aprismática e dissolução parcial dos prismas (3,000 X).

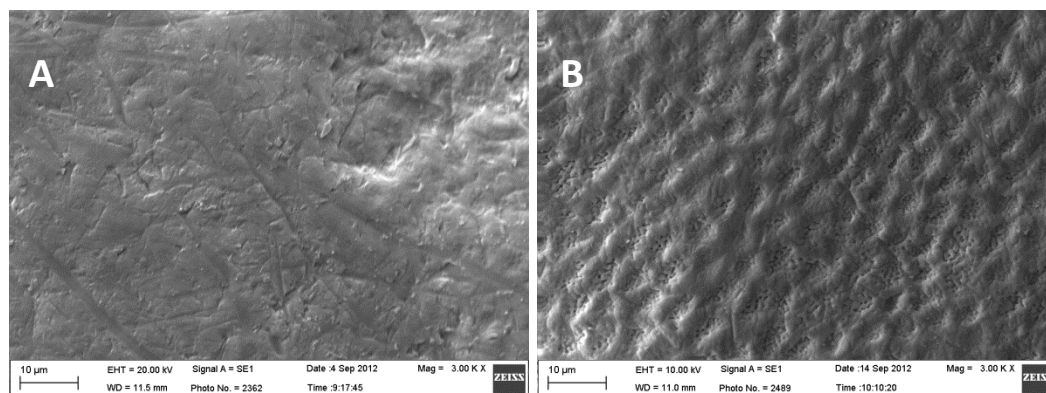
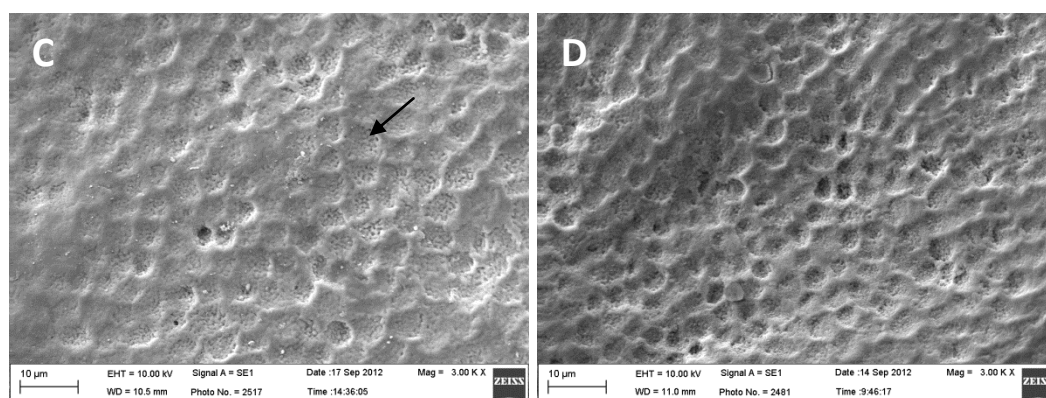
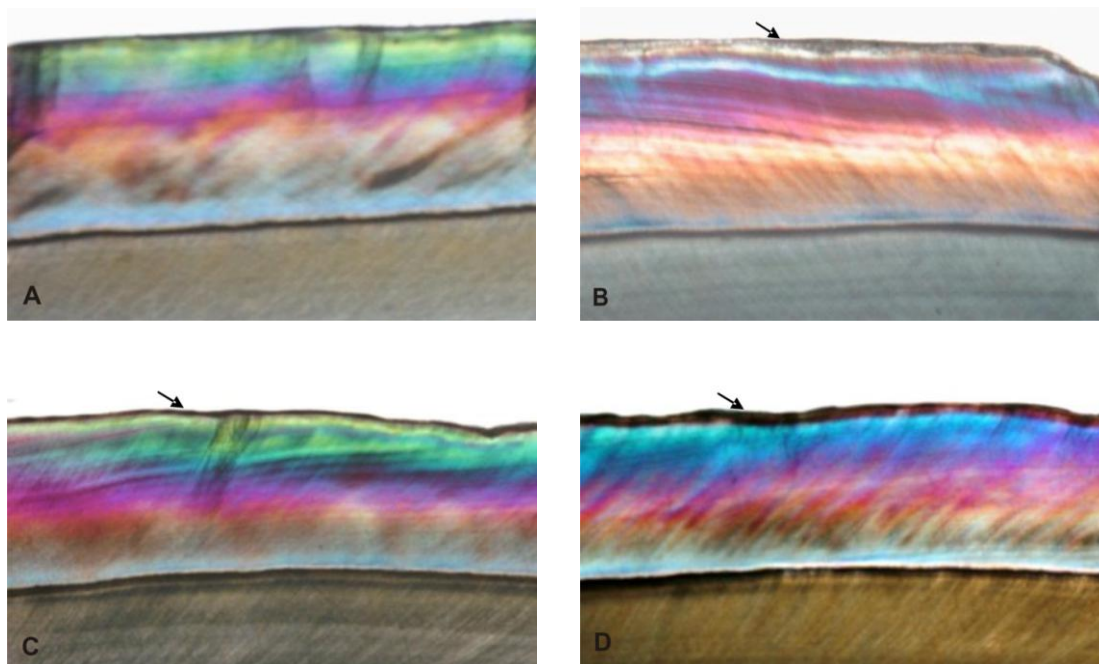


Figura 15- C: Espécime após ser submetido ao desafio cariogênico. Observa-se a dissolução parcial da camada aprismática (seta) (3000x). **Figura 15- D:** Espécime submetido ao desafio cariogênico e ao procedimento clareador, observa-se a dissolução parcial da camada aprismática e aumento da porosidade, permitindo a visualização da embocadura dos prismas de esmalte, formando novos canais para a difusão para o peróxido de hidrogênio (3,000 X).



As análises em microscopia de luz polarizada mostram que tanto os espécimes do grupo I quanto do grupo II apresentaram áreas de bi-refringência negativa na superfície do esmalte, sendo estas consideravelmente mais pronunciadas e espessas nos dentes previamente desmineralizados.

Figura 16- Imagem da microscopia de luz polarizada. **A-** espécime com superfície de esmalte sem nenhum tipo de tratamento - hígido. **B-** grupo I submetido ao procedimento clareador. **C-** espécime submetido ao desafio cariogênico, desmineralização uniforme na superfície do esmalte (lesão de mancha branca) (seta). **D-** espécime do grupo II submetido ao desafio cariogênico e ao procedimento clareador, seta indica uma maior área de desmineralização superficial.



5- DISCUSSÃO

Dentes bovinos têm sido amplamente utilizados em pesquisas *in vitro*.^{19, 20} Especificamente nesta metodologia, o seu emprego possibilita a obtenção de unidades experimentais com dimensões adequadas para constituição das câmaras pulpares artificiais, sendo possível simular uma condição clínica de aplicação de agentes clareadores sobre o esmalte dentário. Além disso, por ser um substrato quimicamente

uniforme, possibilita menor variação na resposta aos desafios cariogênicos,²¹ sendo uma opção interessante para presente estudo.

A presente pesquisa baseou-se na metodologia proposta por Mottola et al.,¹⁷ e possibilita a quantificação do peróxido de hidrogênio que penetra através da estrutura dentária. A penetração dos agentes clareadores ocorre devido ao baixo peso molecular do peróxido de hidrogênio e à sua habilidade de desnaturar proteínas, aumentando a permeabilidade da estrutura dentária.²²

Os resultados obtidos mostraram que a penetração do H_2O_2 em esmalte desmineralizado foi significativamente maior do que o ocorrido no substrato hígido, rejeitando a primeira hipótese nula do estudo. Acredita-se que o aumento da difusão tenha relação com as significativas modificações histomorfológicas produzidas pelo desafio cariogênico. Neste contexto, as imagens microscópicas mostram que a exposição do esmalte dental à solução desmineralizadora modificou as características superficiais do esmalte e que o tratamento clareador neste tecido acentuou estas alterações.

O efeito dos clareadores na modificação das características superficiais do esmalte já são bem documentados.^{9, 23-26} No entanto a importância do grau de mineralização na penetração de peróxido de hidrogênio nos parece uma informação bastante significativa, mostrando que a integridade do esmalte tem grande importância na modulação da penetração de peróxido de hidrogênio. Este fato é preocupante pois sabe-se que a penetração descontrolada do H_2O_2 no tecido pulpar tem sido relacionada com diferentes graus de agressões celulares.^{13, 27, 28} Deste modo, é importante ressaltar que o cirurgião-dentista deve realizar minucioso exame clínico e os devidos exames complementares antes de iniciar o tratamento clareador, uma vez que a aplicação inadvertida do gel clareador sobre lesões incipientes poderá comprometer a segurança do procedimento⁹.

Com relação à análise da microdureza, os resultados obtidos mostraram que os agentes clareadores foram capazes de aumentar a profundidade de desmineralização das lesões incipientes. Com os dados da microdureza, associados às observações das

imagens microscópicas, é possível considerar que, nas condições experimentais utilizadas, o clareamento dental pode influenciar na evolução do processo de desmineralização,²⁹ rejeitando também a segunda hipótese nula do estudo.

Foi verificado que em esmalte dental integro, as alterações promovidas pelo tratamento clareador não se limitaram à superfície deste tecido, produzindo efeitos deletérios até 20 µm de profundidade. Estes dados estão de acordo com os publicados por Efeoglu et al.²³, que empregando microtomografia computadorizada, comprovaram a existência de perda do conteúdo mineral na subsuperfície do esmalte dentário submetido ao procedimento clareador.

Já quando o clareamento foi realizado em esmalte previamente desmineralizado, os resultados da microdureza interna mostraram que o agente clareador produziu alterações até a profundidade de 90 µm. Estas observações opõem-se às de De Arruda e colaboradores⁹, que constataram que a ação dos clareadores é mais evidente na superfície deste tecido. No entanto, destacamos que os pesquisadores realizaram uma pesquisa in situ e que possivelmente as condições do meio bucal e, principalmente a ação da saliva³⁰⁻³² possam explicar a diferença entre os estudos.

Vale destacar que a partir de profundidade de 120 µm, tanto o agente clareador como a solução desmineralizadora não exerceram influência sobre a microdureza, possivelmente em razão da distância com a superfície externa.³³

Por se tratar de um estudo in vitro, os resultados obtidos não podem ser extrapolados diretamente para uma situação clínica, mas oferecem informações preciosas sobre a importância da integridade do esmalte dental na modulação da penetração do peróxido de hidrogênio, durante a realização do tratamento clareador.

6- CONCLUSÃO

Considerando os resultados deste estudo, concluiu-se:

- A aplicação de agentes clareadores em esmalte previamente desmineralizado favorece a penetração do peróxido de hidrogênio através da estrutura dental.
- O tratamento clareador pode aumentar a profundidade de desmineralização de lesões incipientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOKAY, O. et al. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. **J Endod**, 26(2), 92-94, 2000.
2. BUCHALLA, W.; ATTIN, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. **Dent Mater**, 23(5), 586-596, 2007.
3. TAM, L. The safety of home bleaching techniques. **J Can Dent Assoc**, 65(8), 453-455, 1999.
4. HAYWOOD, V.B. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int**, 23(7), 471-488, 1992.
5. LEONARD, R.H.Jr. Nightguard vital bleaching: dark stains and long-term results **Compend Contin Educ Dent Suppl**, (28), S18-27; quiz S48, 2000.
6. LEONARD, R.H.; SHARMA, A.; HAYWOOD, V.B. Use of different concentrations of carbamide peroxide for bleaching teeth: an in vitro study. **Quintessence Int**, 29(8), 503-507, 1998.
7. GUAN, Y.H. et al. The measurement of tooth whiteness by image analysis and spectrophotometry: a comparison. **J Oral Rehabil**, 32(1), 7-15, 2005.
8. SCHIAVONI, R.J. et al. Effect of bleaching agents on enamel permeability. **Am J Dent**, 19(5), 313-316, 2006.
9. DE ARRUDA, A. et al. Effect of Hydrogen Peroxide at 35% on the Morphology of Enamel and Interference in the De-remineralization Process: An In Situ Study. **Oper Dent**, 37(5), 518-525, 2012.
10. KWON, Y.H. et al. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. **J Oral Rehabil**, 29(5), 473-477, 2002.
11. GOKAY, O.; MUJDECI, A.; ALGN, E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. **J Endod**, 30(12), 887-889, 2004.
12. HANKS, C.T. et al. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. **J Dent Res**, 72(5), 931-938, 1993.
13. MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J Cell Physiol**, 192(1), 1-15, 10.1002/jcp.10119, 2002.
14. QUEIROZ, C.S. et al. PH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. **Braz Dent J**, 19(1), 21-27, 2008.
15. DIAS RIBEIRO, A.P. et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 108(3), 458-464, 2009.
16. ITTHAGARUN, A. et al. The effect of fluoridated and non-fluoridated rewetting agents on in vitro recurrent caries. **J. Dent**, 29, 255-273, 2001.
17. MOTTOLA, H.A.; SIMPSON, B.E.; GORIN, G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. **Anal Chem**, 42(3), 410-411, 1970.
18. CAMARGO, S. E. A. **Penetração de peróxido de hidrogênio 38% no interior da câmara pulpar de dentes bovinos e humanos com ou sem restauração submetidos ao clareamento externo**. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, São José dos Campos, 2005.

19. ATTIN, T. et al. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. **J Oral Rehabil**, 24(4), 282-286, 1997.
20. ADIBFAR, A. et al. Leaching of hydrogen peroxide from bleached bovine enamel. **J Endod**, 18(10), 488-491, 1992.
21. MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J Dent Res**, 71 Spec No, 913-919, 1992.
22. CAMARGO, S.E. et al. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. **J Endod**, 33(9), 1074-1077, 2007.
23. EFEOGLU, N.; WOOD, D.J.; EFEOGLU, C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. **Dent Mater**, 23(7), 900-904, 10.1016/j.dental.2006.06.032, 2007.
24. SEGHI, R.R.; DENRY, I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. **J Dent Res**, 71(6), 1340-1344, 1992.
25. EFEOGLU, N.; WOOD, D.; EFEOGLU, C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. **J Dent**, 33(7), 561-567, 2005.
26. ATTIN, T. et al. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: a review. **Dent Mater**, 25(2), 143-157, 2009.
27. FUKUYAMA, Y. et al. Hydrogen peroxide induces expression and activation of AMP-activated protein kinase in a dental pulp cell line. **Int Endod J**, 41(3), 197-203, 2008.
28. SAITO, Y. et al. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. **Free Radic Res**, 40(6), 619-630, 2006.
29. MORENO, E.C.; ZAHRADNIK, R.T. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. **J Dent Res**, 53(2), 226-235, 1974.
30. DODDS, M.W.; JOHNSON, D.A.; YEH, C.K. Health benefits of saliva: a review. **J Dent**, 33(3), 223-233, 2005.
31. DE OLIVEIRA, R.O. et al. Effect of a carbamide peroxide agent and desensitizing dentifrices on enamel microhardness. **Am J Dent**, 16(1), 42-46, 2003.
32. AKAL, N. et al. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. **J Clin Pediatr Dent**, 25(4), 293-296, 2001.
33. SOARES, D.N. et al. Cross-sectional microhardness of bovine enamel subjected to three paediatric liquid oral medicines: an in vitro study. **Eur Arch Paediatr Dent**, 13(5), 261-265, 2012.

ANEXOS

Tabela 4- Quantidade de peróxido de hidrogênio difundido pela superfície dental em µg/mL nos espécimes hígidos.

<i>Hígidos</i>	<i>1ª sessão</i>	<i>2ª sessão</i>	<i>3ª sessão</i>
1	4,95 µg/mL	4,82 µg/mL	4,53 µg/mL
2	4,72 µg/mL	4,58 µg/mL	4,74 µg/mL
3	5,08 µg/mL	4,15 µg/mL	3,98 µg/mL
4	4,41 µg/mL	4,14 µg/mL	4,51 µg/mL
5	4,80 µg/mL	4,64 µg/mL	4,74 µg/mL
6	5,22 µg/mL	4,50 µg/mL	4,79 µg/mL
7	4,70 µg/mL	4,98 µg/mL	4,10 µg/mL
8	4,82 µg/mL	4,91 µg/mL	4,41 µg/mL
9	4,31 µg/mL	4,61 µg/mL	4,01 µg/mL
10	4,93 µg/mL	4,82 µg/mL	3,58 µg/mL
11	4,86 µg/mL	4,86 µg/mL	4,01 µg/mL
12	2,99 µg/mL	4,73 µg/mL	4,53 µg/mL
13	4,75 µg/mL	4,86 µg/mL	4,59 µg/mL
14	4,80 µg/mL	4,44 µg/mL	4,16 µg/mL
15	4,86 µg/mL	3,85 µg/mL	4,01 µg/mL
Média	4,68 µg/mL	4,59 µg/mL	4,31 µg/mL

Tabela 5- Quantidade de peróxido de hidrogênio difundido pela superfície dental em µg/mL nos espécimes desmineralizados.

<i>Desmineralizados</i>	<i>1ª sessão</i>	<i>2ª sessão</i>	<i>3ª sessão</i>
1	5,15 µg/mL	5,58 µg/mL	4,44 µg/mL
2	5,43 µg/mL	4,95 µg/mL	4,57 µg/mL
3	5,35 µg/mL	5,08 µg/mL	4,50 µg/mL
4	5,01 µg/mL	4,98 µg/mL	4,77 µg/mL
5	5,48 µg/mL	4,93 µg/mL	4,83 µg/mL
6	4,91 µg/mL	5,12 µg/mL	4,53 µg/mL
7	5,01 µg/mL	5,35 µg/mL	5,56 µg/mL
8	5,48 µg/mL	5,12 µg/mL	4,80 µg/mL
9	5,35 µg/mL	5,27 µg/mL	5,39 µg/mL
10	4,93 µg/mL	5,12 µg/mL	5,15 µg/mL
11	5,56 µg/mL	5,02 µg/mL	5,15 µg/mL
12	5,43 µg/mL	5,00 µg/mL	5,18 µg/mL
13	5,31 µg/mL	4,98 µg/mL	5,71 µg/mL
14	5,43 µg/mL	4,95 µg/mL	4,50 µg/mL
15	5,18 µg/mL	4,98 µg/mL	4,54 µg/mL
<i>Média</i>	5,27 µg/mL	5,10 µg/mL	4,91 µg/mL