



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ADRIELLE CAROLINE MOREIRA ANDRADE DIAS

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS DE CÁLCIO E FÓSFORO NA
COMPOSIÇÃO DO AGENTE CLAREADOR SOBRE OS EFEITOS
DELETÉRIOS NO ESMALTE DENTAL**

2018

ADRIELLE CAROLINE MOREIRA ANDRADE DIAS

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS DE CÁLCIO E FÓSFORO NA COMPOSIÇÃO
DO AGENTE CLAREADOR SOBRE OS EFEITOS DELETÉRIOS NO ESMALTE
DENTAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística. Linha de Pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientador: Prof. Assoc. Carlos Rocha Gomes Torres
Coorientadora: Profa. Assoc. Lívia Maria AndalóTenuta

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Dias, Adrielle Caroline Moreira Andrade

Influência da adição de sais de cálcio e fósforo na composição do agente clareador sobre os efeitos deletérios no esmalte dental / Adrielle Caroline Moreira Andrade Dias. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Carlos Rocha Gomes Torres

Coorientador: Maria Andaló Tenuta

1. Clareamento dental. 2. Cálcio. 3. Fósforo. 4. Esmalte dental. 5. Desmineralização. I. Torres, Carlos Rocha Gomes, orient. II. Tenuta, Maria Andaló, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Carlos Rocha Gomes Torres (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Natália Cortez Gutierrez

Universidade Brasil

Campus de São Paulo

Maria Filomena Rocha Lima Huhtala

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de Dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Altair Alves Andrade e Ângela Maria Moreira Andrade, ao meu marido Amaury Aguilera Dias, por serem meu porto seguro todos os dias, por conseguirem sempre me conduzir ao melhor caminho e por me mostrarem Deus em cada detalhe, a vocês meu amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dom da vida! Minha fé é o aspecto que move minha vida, agradeço por me abençoar grandemente em cada detalhe desse projeto.

Aos meus pais, Altair e Ângela– Pelo amor, carinho e dedicação por mim durante todo esse processo de novo aprendizado. Não tenho palavras o suficiente para agradecer tudo o que vocês fazem por mim, sou eternamente agradecida a Deus pelas bênçãos que vocês são em minha vida, Amo Vocês.

Ao meu marido, Amaury– Obrigada pela paciência e amor. Não conseguiria sem você ao meu lado, Amo você.

Ao meu irmão, Albert Luís Moreira Andrade– Mesmo longe, sempre com palavras de ânimo e alegria, obrigada por ser sempre presente, Amo você.

Ao Prof. Carlos Rocha Gomes Torres – Obrigada por nunca medir esforços e tempo em me ensinar e ajudar. Obrigada pelos novos conhecimentos e por sempre me mostrar que posso ser melhor e capaz de realizar meus sonhos.

Aos meus amigos de vida e também novos amigos da UNESP, a vocês sempre a gratidão do companheirismo e paciência.

A minha querida Banca Examinadora, Prof. Filomena H. e Natália G. Muito obrigada por aceitarem o nosso convite prontamente e fazerem parte desse dia tão especial para mim.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, pela oportunidade de novos conhecimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, por acreditar em mim.

“Não temas porque Eu Sou contigo; não te assombres porque Eu Sou teu Deus; Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da Minha justiça.”

Isaías 41:10-13

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Efeito desmineralizante dos clareadores dentários e adição de cálcio e/ou fósforo	20
2.2 Efeitos da presença natural ou da adição de íons cálcio e/ou fósforo em bebidas ácidas na erosão dentária	33
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Delineamento experimental	42
4.2 Determinação do ponto de saturação em peróxido de hidrogênio.....	43
4.3 Determinação do coeficiente de solubilidade dos sais de cálcio e fósforo	47
4.4 Preparo dos Espécimes	52
4.5 Leitura inicial da microdureza	61
4.6 Leitura inicial da rugosidade	62
4.7 Leitura inicial da cor.....	63
4.8 Distribuição dos grupos experimentais	65
4.9 Preparo das soluções clareadoras	67
4.10 Leitura finais de cor, microdureza e rugosidade	69
4.11 Cálculo do efeito clareador.....	69
4.12 Planejamento estatístico.....	69
5 RESULTADOS	71
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	87

REFERÊNCIAS.....	88
------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Trituração dentes de boi para ponto de saturação	44
Figura 2 – Frasco contendo peróxido de hidrogênio a 35% e pó de esmalte dental sob agitação	46
Figura 3 – Determinação coeficiente de solubilidade 1	50
Figura 4 – Determinação coeficiente de solubilidade 2	51
Figura 5 – Corte dos espécimes.....	53
Figura 6 – Padronização da espessura do esmalte.....	55
Figura 7 – Padronização da espessura da dentina	56
Figura 8 – Embutimento dos espécimes	58
Figura 9 – Padronização espessura dos espécimes com resina acrílica branca.....	60
Figura 10 – Padronização dos espécimes embutidos em resina acrílica branca	61

Figura 11 – Leitura microdureza inicial	62
Figura 12- Leitura rugosidade em um perfilômetro de contato	63
Figura 13 – Esquema representativo das três varreduras a serem realizadas durante a leitura da rugosidade	63
Figura 14 – Leitura cor inicial.....	65
Figura 15 – Divisão dos grupos controles e experimentais	67
Figura 16 – Tratamento clareador	68
Figura 17 – Média e desvios-padrão da variação da rugosidade inicial e final.....	73
Figura 18 – Média e desvios-padrão da variação da microdureza inicial e final.....	73
Figura 19 –Médias e desvios-padrão da variação da percepção de cor (ΔE^*_{ab})	74
Figura 20 – Média e desvios-padrão da variação da percepção de cor (ΔE^*_{00})	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Coeficiente de solubilidade (CS) dos diferentes sais de cálcio e fósforo em peróxido de hidrogênio a 35% e pH 7, massa molar (m) dos sais, concentração molar dos sais (M_{sal}) e concentração molar de cálcio e fósforo nessas soluções ($M_{\text{Ca ou P}}$)71

Tabela 2- Médias e desvios-padrão da microdureza e rugosidade para os diferentes grupos e resultados dos testes de ANOVA a um fator e teste de Tukey ..72

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão de ΔE^*_{ab} e ΔE^*_{00} para os diferentes grupos nos resultados dos testes da ANOVA a um fator e Tukey.....74

Tabela 4 - Média e desvios-padrão da coordenada cromática de $L^*a^*b^*$ 75

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão das concentrações iniciais (C_i) e finais (C_f) do peróxido de hidrogênio e percentual de redução da concentração (%).....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Teste de análise de variância
CIE	Comissão internacional de iluminação
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HA	Hidroxiapatita
KMnO ₄	Permanganato de potássio
Na ₂ C ₂ O ₄	Oxalato de Sódio
PH	Peróxido de Hidrogênio
Ra	Rugosidade média
SAV	Leitura de pequenas amostras
SCI	Componente especular incluso

Dias ACMA. Influência da adição de sais de cálcio e fósforo na composição do agente clareador sobre os efeitos deletérios no esmalte dental [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O estudo avaliou se os efeitos deletérios do clareamento no esmalte dental podem ser minimizados pela adição de sais de cálcio e/ou fósforo em variadas concentrações, na formulação do agente clareador, tornando-o progressivamente mais saturado em relação ao conteúdo mineral do esmalte. Inicialmente foi determinada a concentração dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) no agente clareador, provenientes da dissolução do esmalte dental pelo tratamento até atingir seu ponto de saturação. Para tal amostras de esmalte foram trituradas e expostas ao peróxido de hidrogênio (PH) à 35% em pH 7, até que um equilíbrio mineral fosse obtido. A concentração mineral na solução foi determinada através dos métodos de ICP-AES. A seguir o coeficiente de solubilidade de diversos sais de cálcio e fósforo em PH à 35% foi determinado. Aquele mais solúvel para cada elemento foi utilizado para a formulação dos agentes clareadores. Foram preparados 120 espécimes a partir da face vestibular de dentes incisivos bovinos, em formato circular com 4 mm de diâmetro, padronizando-se a espessura de esmalte e dentina em 1mm cada, embutidos em resina branca. Os espécimes foram enumerados e imersos em saliva artificial por 15 dias. Após esse período, foram realizadas leituras iniciais da microdureza Knoop do esmalte empregando um microdurômetro (FM-700, Future-Tech, Tóquio, Japão), da rugosidade superficial em um perfilômetro de contato (MarSurf GD 25, Mahr, Goettingen, Alemanha) e da cor das amostras utilizando espectrofotômetro colorimétrico de reflectância (CM 2600d – Konica Minolta, Osaka, Japan). Todos os grupos experimentais foram clareados com soluções de PH à 35% (p/p) ajustadas para o pH 7. Os espécimes foram divididos em 6 grupos de acordo com a quantidade de cálcio e fósforo adicionada em cada solução clareadora, baseado na saturação em relação à HA, sendo eles: **CN (controle negativo)** – os espécimes foram tratados com água ultra pura; **CP (controle positivo)** – os espécimes foram clareados com PH sem a adição de qualquer mineral; **Ca/P-50** – PH suplementado com **Ca-P/50%** saturados em relação à hidroxiapatita; **Ca/P-100** – PH suplementado com **Ca-P/100%** saturados em relação à hidroxiapatita; **Ca-CS** – PH suplementado com o sal de Ca^{2+} mais solúvel, no seu coeficiente de solubilidade e **P-CS** – PH suplementado com o sal de PO_4^{3-} mais solúvel, no seu coeficiente de solubilidade. Sobre cada espécimes foram aplicados 10µl das respectivas soluções clareadoras, removidas após 20 minutos e reaplicadas mais duas vezes. A microdureza e a rugosidade superficial das amostras foram mensuradas imediatamente após o clareamento. Todas as amostras foram imersas em saliva artificial por 7 dias e a cor novamente avaliada. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente empregando os testes apropriados, dependendo da normalidade dos dados. Os resultados para o teste de ANOVA a um fator constataram que houveram diferenças significativas para todos os grupos ($p=0,005$). Os resultados para o teste de Tukey foram para a **microdureza**: CN 334,48(18,27)^a, CP 226,01(17,49)^b, Ca-CS 331,93(23,64)^a, P-CS 318,11(19,25)^a, Ca-

P/50% 278,86(17,49)^c e Ca-P/100% 339,31(28,47)^a. Para a **rugosidade**: CN 0,025 (0,006)^a, CP 0,067 (0,030)^b, Ca-CS 0,022 (0,005)^a, P-CS 0,025 (0,006)^a, Ca-P/50% 0,044 (0,014)^c e Ca-P/100% 0,035 (0,012)^a. Para a **cor ΔE^*_{ab}** : CN 0,50(0,19)^a, CP 4,77(1,79)^a, Ca-CS 4,41(1,04)^a; P-CS 4,91(1,43)^a, Ca-P/50% 4,75(0,90)^a e Ca-P/100% 4,05(1,06)^a. Mediante os resultados desse estudo, podemos concluir que: A adição de cálcio e/ou fósforo em quantidades correspondente ao ponto de saturação ou ao coeficiente de solubilidade dos testados impediram a queda da dureza e o aumento da rugosidade, sem afetar o efeito clareador.

Palavras-chave: Clareamento dental. Cálcio. Fósforo. Esmalte dental. Desmineralização.

Dias ACMA. Influence of calcium and phosphate salts addition in the composition of bleaching agent on the negative effects over dental enamel. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The study evaluated whether the deleterious effects of bleaching on tooth enamel can be minimized by adding calcium and / or phosphorus salts at varying concentrations in the bleaching agent formulation, making it progressively more saturated relative to the enamel mineral content. Initially, the concentration of calcium (Ca) and phosphorus (P) elements in the bleaching agent were determined, resulting from the dissolution of dental enamel by the treatment until reaching its saturation point. For such enamel samples were crushed and exposed to hydrogen peroxide (PH) at 35% at pH7, until a mineral balance was obtained. The mineral concentration in the solution was determined by ICP-AES methods. Then the solubility coefficient of several calcium and phosphorus salts in PH at 35% was determined. The most soluble for each element was used for the bleaching agent formulation. 120 specimens were prepared from the vestibular face of bovine incisor teeth, in circular format with 4 mm diameter, and the thickness of enamel and dentin was standardized in 1 mm each, embedded in white resin. The specimens were enumerated and immersed in artificial saliva for 15 days. After that, initial Knoop enamel microhardness measurements were performed using a microdurometer (FM-700, Future-Tech, Tokyo, Japan), of surface roughness in a contact profilometer (MarSurf GD 25, Mahr, Goettingen, Germany) and of the samples using a colorimetric reflectance spectrophotometer (CM 2600d - Konica Minolta, Osaka, Japan). All experimental groups were cleared with pH solutions at 35% (w / w) adjusted for pH 7. The specimens were divided into 6 groups according to the amount of calcium and phosphorus added in each bleaching solution, based on saturation at relation to HA, they are: **CN** (negative control) - the specimens were treated with ultra pure water; **CP** (positive control) - the specimens were cleared with PH without the addition of any mineral; **Ca / P-50** - PH supplemented with Ca-P / 50% subsaturated relative to hydroxyapatite; **Ca / P-100** - PH supplemented with Ca-P / 100% saturated relative to hydroxyapatite; **Ca-CS-PH** supplemented with the most soluble Ca 2+ salt in its solubility coefficient and **P-CS-PH** supplemented with the most soluble PO43- salt in its solubility coefficient. On each specimen were applied 10 µl of the respective whitening solutions, removed after 20 minutes and reapplied two more times. The microhardness and surface roughness of the samples were measured immediately after bleaching. All samples were immersed in artificial saliva for 7 days and the color evaluated again. The obtained data were statistically analyzed using the appropriate tests, depending on the normality of the data. The results for the one-way ANOVA test revealed that there were significant differences for all groups ($p = 0.005$). The results for the Tukey test were for the **microhardness**: CN 334,48 (18,27)^a, CP 226,01 (17,49)^b, Ca-CS 331,93 (23,64)^a, P-CS 318.11 (19.25)^a, Ca-P / 50% 278.86 (17.49)^a and Ca-P / 100% 339.31 (28.47)^a. For **roughness**: CN 0.025 (0.006)^a, CP 0.067 (0.030)^b, Ca-CS 0.022 (0.005)^a, P-CS 0.025 (0.006)^a, Ca-P / 50% 0.044 (0.014)^a and Ca-P / 100% 0.035 (0.012)^a. For the

ΔE^*_{ab} color: CN 0.50 (0.19)^a, CP 4.77 (1.79)^a, Ca-CS 4.41 (1.04)^a; P-CS 4.91 (1.43)^a, Ca-P / 50% 4.75 (0.90)^a and Ca-P / 100% 4.05 (1.06)^a. By the results of this study, we can conclude that: The addition of calcium and / or phosphorus in amounts corresponding to the saturation point or the solubility coefficient of the tested ones prevented the hardness from falling and increasing the roughness, without affecting the bleaching effect.

Keywords: Tooth whitening. Calcium. Phosphor. Dental enamel. Demineralization.

1 INTRODUÇÃO

O uso de agentes contendo peróxido de hidrogênio ou carbamida para o tratamento estético ganharam popularidade por serem eficazes no clareamento dental e apresentarem baixo custo (Schemehorn, Novak, 2007). O peróxido de hidrogênio é o composto mais utilizado, sendo empregado em alta concentração de 35% quando aplicado por curto período na técnica em consultório, ou em baixa concentração de 16% quando utilizado por longos períodos na técnica caseira (Sun et al., 2011). Já o peróxido de carbamida quando aplicado sobre os dentes, se decompõe em peróxido de hidrogênio, sendo esse último justamente o responsável pelo efeito clareador. Por apresentar baixo peso molecular, o peróxido de hidrogênio penetra facilmente através dos espaços intercristalinos do esmalte e pelos túbulos dentinários. Sendo uma substância instável, decompõe-se em radicais livres capazes de oxidar os cromóforos orgânicos presentes na estrutura dental, responsáveis por sua cor característica. Os cromóforos absorvem a radiação eletromagnética visível incidente sobre os dentes, modulando a absorbância e a refletância da luz. A oxidação dos cromóforos muda sua estrutura química, reduzindo a absorbância, fazendo com que os dentes adquiram um aspecto mais claro (Dannacher, 2006).

O clareamento tem sido relacionado com alterações físicas da estrutura dentária, o que compromete a segurança do procedimento (Borges et al., 2016; Sa et al., 2012). Por seu efeito desmineralizante, o agente clareador pode causar redução da microdureza, aumento da rugosidade superficial e erosão do esmalte, sendo esses efeitos associados com a composição química e concentração do produto, valores de pH e tempo de exposição (Attin et al., 2007a; Barbour et al., 2003; Hegedus et al., 1999). A queda da microdureza, embora transitória, pode expor os dentes a uma maior taxa de desgaste pela ação da escovação, especialmente quando associado a dentifrícios altamente abrasivos (Sulieman et al., 2004; Crastechini et al., 2018). Superfícies mais rugosas apresentam maior adesão bacteriana, aumentando a predisposição à deposição de pigmentação extrínseca (Silva et al., 2006).

As diversas formulações de géis clareadores apresentam variados pHs. Como o peróxido de hidrogênio é mais estável em pH ácido, alguns produtos apresentam acidez para aumentar sua vida útil. Contudo, essa característica acaba por resultar em maior desmineralização do esmalte (Sulieman et al., 2004). Certos estudos observaram que os agentes clareadores para uso caseiro e em consultório levaram à redução do conteúdo mineral e consequente queda da microdureza do esmalte, sendo esse efeito mais expressivo naqueles com o pH mais ácido (Shannon et al., 1993; Magalhães et al., 2012; Jiang et al., 2014). Por outro lado, algumas análises mostraram que mesmo géis clareadores com pH neutro ou alcalino podem ser capazes de desmineralizar o esmalte (de Moraes et al., 2015). Sendo assim, o pH não é o único fator envolvido nesse efeito. Outra possível explicação para o efeito desmineralizante, mesmo em pHs mais elevados, pode estar relacionado à ação oxidante dos radicais livres. Após a penetração do peróxido de hidrogênio no interior dos espaços intercristalinos do esmalte, ele interage com sua matriz orgânica, formada principalmente pelas proteínas (amelogenina e enamelina), provocando a ruptura de suas cadeias de polipeptídios (Hegedus et al., 1999). Como o conteúdo orgânico participa da composição do esmalte, isso poderia levar indiretamente a alterações no conteúdo mineral do dente, reduzindo a microdureza (Jiang et al., 2014).

Outra hipótese está relacionada à ausência de cálcio nas formulações dos géis clareadores, fazendo com que eles sejam subsaturados em relação à hidroxiapatita (Magalhães et al., 2012a). Quando um corpo sólido é imerso em uma solução, na interface entre eles acontece uma troca de componentes do sólido (no caso do esmalte dental os íons Ca_2^+ , PO_4^{3-} e OH^-). Os íons deixam a superfície e se dissolvem na solução, assim como outros íons deixam a solução para se juntarem ao sólido. Quando a taxa de troca de íons é igual, o sólido e a solução estão em um estado de equilíbrio. Se a solução é subsaturada o sólido perde íons para a solução, e se a solução está supersaturada ela perde íons para o sólido, até atingir um equilíbrio. Esse equilíbrio varia acentuadamente com pH e concentração de íons (Shellis et al., 2012). Alguns estudos avaliaram a capacidade de diversas bebidas e alimentos ácidos em promover a erosão dentária e demonstraram que essa não depende apenas do pH das substâncias, mas também da concentração de íons Ca_2^+ e PO_4^{3-} presentes em sua composição. Eles mostraram que substâncias com

pH ácidos semelhantes, porém com maior concentração de cálcio, resultaram em menor redução da dureza de superfície. Por exemplo, o iogurte natural, que possui pH 3,9 e concentração de Ca_2^{+} de 43,3 mmol/l, e o suco de laranja, que possui pH 3,7 e concentração de Ca_2^{+} de 2,4 mmol/l, apresentam efeitos desmineralizantes diferentes, onde o suco de laranja produz uma grande redução de microdureza e erosão enquanto o iogurte não produz efeito significativamente (Attin et al., 2005).

As primeiras tentativas de se controlar o efeito desmineralizante dos agentes clareadores ocorreram pela adição de flúor em sua formulação. A presença destes íons aumenta a incorporação de íons flúor na hidroxiapatita, através da substituição dos íons OH^{-} da hidroxiapatita por íons F^{-} , formando fluorapatita ou hidroxiapatita fluoretada (Vogel et al., 1992). A fluorapatita é formada quando todas as hidroxilas da molécula de hidroxiapatita são substituídas por flúor, enquanto a hidroxiapatita fluoretada é formada quando essa substituição é parcial. Isso leva a uma maior tendência de íons se juntarem à estrutura, reparando a superfície do esmalte e produzindo um aumento dos valores de microdureza (Li et al., 2014; Moreno et al., 1974). Os estudos mostraram que a adição do flúor ao agente clareador foi capaz de reduzir o desmineralizante em relação aos grupos que não apresentaram esse elemento em sua composição (Borges et al., 2012; Chen et al., 2008; Santos et al., 2016).

Dentre as tentativas de redução do efeito erosivo de bebidas ácidas está a adição de sais de cálcio e fósforo em suas formulações, para torná-las supersaturadas em relação à hidroxiapatita (Larsen, Nyvad, 1999). Os estudos mostraram que essa adição resultou em diminuição significativa da desmineralização e da erosão (Lussi et al., 1995; Margolis et al., 1986; Santos et al., 2016). Como o gel clareador dental também pode causar uma diminuição do conteúdo de cálcio e fósforo no esmalte dental, por estar subsaturado, (Borges et al., 2010), a adição de íons cálcio ao agente clareador foi também proposta a fim de eliminar ou reduzir os efeitos indesejáveis (Barbour et al., 2003). Diversos estudos mostraram que essa adição pode reduzir o efeito desmineralizante dental (Borges et al., 2012; Cavalli et al., 2011; Santos et al., 2016; Schemehorn, Novak, 2007; Borges et al., 2016). Contudo, a adição de cálcio nos níveis testados não foi capaz de eliminar completamente esse efeito. Isso pode estar relacionado às concentrações utilizadas, ao tipo de sal empregado ou ao uso isolado do cálcio. Sabe-se que para

que um equilíbrio iônico esteja presente entre o meio líquido e a superfície do esmalte, resultando na deposição de novos cristais de hidroxiapatita, o meio líquido deve estar supersaturado não apenas em relação ao íon cálcio, mas também em relação aos íons fosfato. Esse último é também um elemento constituinte da substância a ser formada, que é a hidroxiapatita. Em sua falta, a deposição não pode ocorrer. Nenhum estudo prévio analisou a incorporação de sais de fósforo em associação ao cálcio nos agentes clareadores. Além disso, as concentrações necessárias desses elementos nos clareadores a base de peróxido de hidrogênio, para que exista uma saturação em relação à hidroxiapatita, nunca foi determinada.

Com base nas informações atualmente disponíveis, sugere-se que a saturação de cálcio e fósforo na formulação dos géis clareadores possa ser a chave para o controle dos efeitos desmineralizantes do gel clareador. Os diferentes estudos prévios utilizaram variados sais de cálcio, em concentrações diversas, dificultando a obtenção de uma conclusão mais acertada acerca desse assunto. É importante determinar qual a concentração de cálcio e fósforo no agente clareador que resultaria em supersaturação desses elementos em relação à hidroxiapatita, paralisando talvez o processo de desmineralização. Além disso, os diferentes sais de cálcio e fósforo apresentam variadas capacidades de dissolução nas formulações de peróxido testadas, podendo restringir sua adição a níveis abaixo do que supostamente poderiam controlar a desmineralização. Nenhuma avaliação prévia foi realizada com relação ao coeficiente de solubilidade dos diferentes sais em peróxido de hidrogênio. A adição de sais de cálcio pelos fabricantes é feita de forma empírica, baseada na obtenção de uma formulação com características organolépticas adequadas, como a obtenção de uma viscosidade desejada, ao invés de visar a obtenção de uma formulação supersaturada. Sendo assim, a determinação dos níveis de minerais para se atingir um equilíbrio ou supersaturação é desejável, podendo contribuir com o aprimoramento dos produtos existentes e no desenvolvimento de novos agentes clareadores mais seguros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a compreensão dos assuntos abordados nesse estudo, a revisão de literatura foi dividida em 2 partes. A primeira dela relaciona-se aos estudos que analisaram o efeito desmineralizante dos agentes clareadores ou testaram a adição de íons cálcio e fosfato aos mesmos, enquanto a segunda descreve os efeitos da presença natural ou da adição destes mesmos íons em soluções potencialmente erosivas.

2.1 Efeito desmineralizante dos clareadores dentários e adição de cálcio

Al-Salehi et al.(2007),avaliaram o efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na perda mineral e microdureza dos dentes bovinos. Foram utilizados dentes bovinos recém extraídos. Cinco dentes foram selecionados aleatoriamente para mensuração da liberação de íons. Nestes o esmalte foi separado da dentina através de um seccionamento. Os restantes 21 dentes foram utilizados para mensuração da microdureza, sendo embutidos em resina epóxi, polidos e armazenados. A concentração de peróxido de hidrogênio nas soluções foi determinada por titulação. A partir de uma solução de peróxido de hidrogênio (PH) à 30%, diluições a 3%, 10%, 30% foram obtidas, sendo o grupo controle (0%) a água destilada. As cinco amostras do grupo de esmalte e dentina foram imersas em 10 ml das diferentes soluções por 24h a 37°C. Todas as amostras da solução foram analisadas por espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente.Os 21 espécimes preparados para análise da microdureza foram divididos aleatoriamente em três grupos,e tratados com soluções de PH a 3,10 e 30% por 24h a 37°C, seguido por nova avaliação da microdureza. Os dados da liberação de cálcio e fósforo em diferentes concentrações de PH foram analisados utilizando testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As medidas de microdureza foram analisadas utilizando um teste t pareado. Houve um aumento nos valores de liberação de íons de Ca e P com o aumento das concentrações de PH para

amostras de esmalte e dentina. A liberação de íons de cálcio foi consistentemente maior do que a liberação de íons de fósforo em todas as concentrações de PH para esmalte e dentina. Houve uma diferença significativa na liberação de íons, tanto para o esmalte quanto para a dentina, entre o controle e todas as demais concentrações de PH. Além disso, quando a concentração de PH aumentou de 3% para 10%, o teste t pareado mostrou diferenças significativas nos valores médios de microdureza do esmalte antes e após o clareamento em todos os grupos e quanto a porcentagem do PH. Não foram constatadas diferenças significativas nos valores médios de microdureza da dentina antes e após o clareamento em todos os grupos. Os íons de cálcio e fósforo foram liberados do esmalte e da dentina após todos os clareamentos. Os autores concluíram que a exposição prolongada ao PH tem o potencial de afetar o conteúdo mineral e a microdureza dos dentes bovinos.

Schemehorn e Novak (2007), avaliaram a capacidade de um gel clareador contendo cálcio em promover a remineralização de lesões de cárie incipientes preexistentes no esmalte dentário. Dentes humanos foram utilizados, obtendo-se amostras de esmalte de 3 mm de diâmetro (n=12). Lesões de cárie foram formadas artificialmente nos espécimes de esmalte por imersão durante 72 h em um gel de ácido láctico (pH 5). Após a formação das lesões foi realizado a leitura da microdureza com 200 g de carga por 15 s em quatro indentações por amostra. O conteúdo de cálcio de cada espécime foi medido antes do tratamento. Foi coletado saliva humana de três pacientes e refrigeradas até o uso. Para o clareamento foi utilizado um gel clareador formado pela associação de peróxido de cálcio à 14% e peróxido de carbamida a 30% (Forté, Nu Radiance Inc., Green Bay, WI, USA). As amostras foram divididas em três grupos, de acordo com o tratamento aplicado: 1- aplicação apenas do gel de clareamento; 2- aplicação de 12g do gel de clareamento misturado com 3g de saliva humana e 3 - exposição somente à saliva humana. O tratamento consistiu em três períodos de uma hora e meia com as soluções de cada grupo e após cada tratamento os espécimes foram enxaguados com água destilada e colocados na saliva humana durante o restante do dia, e assim, foi repetido o processo por dez dias. O teor de cálcio de cada espécime após o tratamento foi medido utilizando a técnica de amostragem de microperfuração a uma profundidade de 100 μ m. O esmalte removido foi então dissolvido em ácido perclórico 1N e preparado para análise usando o método padrão com absorção atômica. A

quantidade de cálcio na amostra analisada foi determinada e comparada com os níveis de cálcio pré-tratamento e com o controle. Enquanto as lesões incipientes formadas estavam a uma profundidade de aproximadamente 70 μm , a concentração de cálcio foi medida a uma profundidade de 100 μm , a fim de incluir toda a profundidade da lesão. Os testes estatísticos foram realizados e uma vez que o teste ANOVA indicou diferenças significativas, os meios individuais foram analisados pelo teste Student-Newman-Keuls. As amostras tratadas com os géis de clareamento, tiveram uma absorção significativa de 33.000 microgramas de cálcio/grama de esmalte, medida a uma profundidade de 100 μm , e apresentou aumentos correspondentes na dureza da superfície. Os autores concluíram que clareadores que usam o gel de clareador Forté, recalcificam lesões incipientes preexistentes em profundidade significativa no esmalte e aumentam a dureza da superfície também.

Cavalli et al.(2011), avaliaram a inibição da perda mineral no esmalte tratado com agentes clareadores comerciais e experimentais, com ou sem a adição de F e Ca. Foram utilizados 30 terceiros molares, a partir dos quais foram obtidos 60 espécimes de esmalte e dentina, randomizados e distribuídos a partir de sua dureza inicial nos seguintes grupos (n=10): 1- gel placebo semelhante ao gel de clareamento convencional, porém sem o princípio ativo; 2- gel comercial de peróxido de carbamida a 10%Whiteness(FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil),3- Gel de peróxido de carbamida a 10% experimental com adição de 0,2% de fluoreto de sódio; 4- Gel de peróxido de carbamida a 10%experimental com adição de 0,2% de cloreto de cálcio; 5- Gel comercial a base de peróxido de carbamida a 10% Opalescence com adição de 0,11% de fluoreto (Ultradent, South Jordan, Utah, EUA), e 6- Gel comercial a base de peróxido de carbamida a 10% Pola Night com adição de 0,11% de fluoreto(SDI, Bayswater, Victoria, Australia). O tratamento clareador consistiu na aplicação de 0,01 g dos respectivos géis no esmalte, 6 h por dia, durante 14 dias. Cinco espécimes de esmalte de cada grupo foram selecionados e submetidos à espectroscopia FT-Raman para determinar a concentração inorgânica (fosfato e carbonato) do esmalte antes e após o tratamento. Para a microdureza, espécimes de esmalte foram seccionados longitudinalmente no centro, separando em duas partes. Um dos segmentos de esmalte foi incorporado em resina acrílica e foram realizadas 10 indentações no centro dos espécimes do outro segmento, onde os valores médios foram calculados. Imagens digitais foram obtidas

através da microscopia de luz polarizada, onde cada segmento incorporado em resina acrílica, foi retirando da mesma, polidos e colocadas em uma placa de vidro, e assim realizadas as imagens. O FT- Raman, mostrou que antes do clareamento todos os grupos apresentavam conteúdo mineral semelhante ao esmalte hígido. Após o clareamento, observou-se uma diminuição significativa no conteúdo mineral do esmalte no grupo 2. A perda mineral média obtida pela avaliação da microdureza, demonstrou que o grupo 2 apresentou uma perda mineral estatisticamente maior que os grupos 1,3, 4, 5 e 6. Assim, os autores concluíram que a adição de Ca e F aos agentes clareadores caseiros, foi capaz de minimizar os efeitos adversos do peróxido de carbamida na desmineralização superficial e subsuperficial do esmalte.

Amaral et al. (2012), o objetivo do estudo foi determinar as concentrações de cálcio e fósforo no esmalte após a aplicação de diferentes tratamentos clareadores caseiros e de consultório. O estudo foi composto por 80 participantes, divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=20), sendo eles: Opalescence PF10- gel de peróxido de carbamida a 10% para uso caseiro flúor(Ultradent, South Jordan, Utah, EUA); Opalescence PF20 - gel de peróxido de carbamida a 20% para uso caseiroflúor (Ultradent, South Jordan, Utah, EUA); Pola Office - gel de peróxido de hidrogênio a 35% para uso de consultório(SDI, Bayswater, Victoria, Australia) e OpalescenceBoost PF- gel de peróxido de hidrogênio a 38% para uso de consultório(Ultradent, South Jordan, Utah, EUA).Realizaram seis avaliações durante três períodos: antes do tratamento clareador; durante o clareamento aos sete, 14 e 21 dias; e após o tratamento clareador aos sete e 14 dias. Para determinar as concentrações de cálcio e fósforo, obtiveram uma amostra do esmalte dental após cada período de avaliação, usando uma técnica chamada de "microbiopsia do esmalte", onde com o auxílio de uma fita com uma perfuração circular de 1,6mm foi colocado sobre a superfície vestibular dos dentes, e assim foi aplicado sobre essa perfuração 5µL de ácido clorídrico em 70% de glicerol durante 20 s. A solução da biópsia foi então transferida para tubos eppendorf com 200 µL de água purificada. Foi realizado o teste de Fiske e Subarrow para a determinação da concentração de fósforo e de Arsenazo III para determinação da concentração de cálcio. Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os agentes clareadores em cada avaliação e o teste não paramétrico de Friedman para as

comparações entre as avaliações de cada agente de clareamento. Para múltiplas comparações, foi usado o teste de Dunn. Não houve diferenças estatísticas nas concentrações de fósforo entre os tempos de avaliação, independentemente de qual gel de clareamento foi usado. Isso indica que a duração de clareamento não afetou quantidade de fósforo no esmalte dental. A única diferença observada foi na concentração de fósforo no dia 7 e dia 14 pós o tratamento para o grupo Pola Office, mas estes valores foram estatisticamente semelhantes aos valores iniciais. Ao comparar os géis clareadores, no dia 14 de acordo com o tempo de tratamento, o esmalte clareado com Opalescence Boost PF apresentou a menor concentração de fósforo comparado ao esmalte clareado com o Opalescence PF10 e Pola Office. No dia 21, foi observado uma menor concentração de fósforo no esmalte clareado com o Opalescence Boost PF do que no esmalte clareado com o Pola Office. Não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração de cálcio entre o tempo e agente clareador. Isso indicou que os tempos de avaliação não interferiram no teor de cálcio do esmalte clareado. Verificou-se que o grupo Opalescence Boost PF apresentou as menores quantidades de cálcio no esmalte. Os autores concluíram que as concentrações de cálcio e fósforo no esmalte dentário não eram diferentes durante o tratamento clareador com todos os grupos e os géis de uso caseiro e de consultório não alteraram as concentrações de cálcio e fósforo na superfície do esmalte in vivo.

Borges et al.(2013), avaliaram o efeito de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 35%, modificados ou não pela adição de cálcio ou fluoreto, na susceptibilidade do esmalte à erosão dentária. Foram seccionadas amostras de esmalte com 3 mm de diâmetro e 1 mm de altura da superfície vestibular de dentes incisivos bovinos recém-extraídos. As amostras foram polidas removendo aproximadamente 200 µm da camada mais externa do esmalte. Foi realizada a análise da microdureza do esmalte e os espécimes foram alocados em quatro grupos (n=15): grupo controle – sem tratamento; grupo PH - gel de peróxido de hidrogênio a 35% sem adição de agentes remineralizantes; grupo PH+Ca – peróxido de hidrogênio a 35% com adição de 2% de gluconato de cálcio e PH+F – peróxido de hidrogênio a 35% com adição de 0,6% de fluoreto de sódio. Após o clareamento, os espécimes foram imersos em saliva artificial por 2 h e depois submetidos a desafios erosivos por 5 dias. Os ciclos erosivos consistiram em imersão em

refrigerante, usando uma proporção de 20 ml / amostra (Sprite Zero), com pH 2,8 quatro vezes por dia por 2 min cada vez, seguido por uma remineralização com saliva artificial, no período de 2 h entre os desafios erosivos. Foram obtidos perfis das superfícies de esmalte com um perfilômetro após o desafio erosivo. Os Testes estatísticos utilizados foram o de Kolmogorov-Smirnov, Bartlett e ANOVA a um fator, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Houveram diferenças significativas entre os grupos, os grupos de clareamento PH, PH+F e PH+Ca, apresentaram valores semelhantes de desgaste do esmalte. No entanto, espécimes do grupo PH+Ca obtiveram menos desgaste médio do esmalte comparado ao controle após os desafios erosivos, enquanto os grupos PH e PH+F não diferem do controle. Os autores concluíram então que a aplicação de peróxido de hidrogênio à 35% não alterou a suscetibilidade do esmalte à erosão e a adição de cálcio ao gel clareador melhorou a resistência à erosão do esmalte clareado.

Borges et al.(2012), avaliaram a eficácia da adição de agentes remineralizantes aos géis de clareamento caseiro e de consultório. Foram preparadas amostras a partir da superfície vestibular de incisivos bovinos. Antes do tratamento, a cor de cada espécime foi avaliada usando um espectrofotômetro. Ele foi configurado para realizar 3 leituras consecutivas, calculando automaticamente os valores médios de L^* , a^* e b^* . O valor L^* médio de cada espécime de esmalte-dentina foi utilizado para realizar a alocação estratificada dos grupos. Os espécimes foram divididos em 3 grupos, sendo eles: 1- controle negativo ($n = 18$), consistindo de espécimes não clareados que foram mantidos em saliva artificial durante o período de estudo; 2- aplicação de um gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% White Class ($n = 54$) (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil), e 3- aplicação de um gel de peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Blue ($n = 54$) (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil). Cada grupo experimental foi subdividido em 3 subgrupos ($n = 18$): a - não continha agentes remineralizantes; b - adição de gluconato de cálcio a 2% no gel clareador e c- adição de fluoreto de sódio a 2% no gel clareador. Para a técnica caseira com peróxido de hidrogênio a 7,5%, uma camada de 2 mm de gel de clareamento foi depositada sobre a superfície do esmalte, permanecendo em contato com os espécimes durante 1 h à 37° C, e repetido todos os dias durante 14 dias. Para a técnica de clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35%, uma camada de 2 mm de gel de clareamento foi depositada sobre a superfície

do esmalte. O gel permaneceu em contato com os espécimes por um período de 50 min a 37° C. Após sete dias o gel foi aplicado novamente, simulando um tratamento de duas sessões. Os espécimes foram mantidos em saliva artificial durante 24 h e as medidas de cor final foram realizadas. A ANOVA foi utilizada para comparar os fatores de concentração de peróxido de hidrogênio a 7,5% e 35%, remineralizantes (cálcio e fluoreto) e sua interação. O teste de Dunnett foi aplicado para comparar o grupo de controle negativo com os grupos experimentais de teste. A aplicação de ANOVA dois fatores não revelou diferenças significativas para nenhum dos grupos testados. No teste de Dunnett revelou diferenças significativas para todos os grupos e subgrupos em comparação com as amostras não clareadas quando todos os parâmetros foram avaliados. Os autores concluíram que os agentes remineralizantes de cálcio e fluoreto podem ser adicionados a géis clareadores contendo peróxido de hidrogênio a 7,5% ou 35%, sem prejudicar sua eficácia de clareamento e ambos os métodos de clareamento apresentaram efeitos semelhantes.

D'Arce et al.(2013),avaliaram a eficácia do tratamento de clareamento nas alterações de cor do esmalte e da dentina profunda, após o clareamento com agentes de alta e baixa concentração, contendo cálcio ou não na sua composição .Foram obtidos a partir de dentes bovinos, blocos com área de 25 mm² (5 mm de largura x 5 mm de comprimento), polidos de ambos os lados,resultando em um bloco de 2,0 mm de espessura (1 mm de esmalte e 1 mm de dentina) ou 3,5 mm de espessura (1,0 mm de esmalte e 2,5 mm de dentina).Esses espécimes foram randomizados e colocados em 10 grupos (n=5) de acordo com as espessuras da amostra (2,0 mm ou 3,5 mm) e o protocolo de clareamento. Foi realizado a leitura inicial de cor com um espectrofotômetro e no final obtiveram o valor de ΔE (diferença total de cor) e calculando automaticamente os valores médios de L *, a * e b *. Após essa leitura, a dentina de cada bloco foi protegida com cera pegajosa e, em seguida, a amostra foi imersa em uma solução de chá preto durante seis dias à temperatura ambiente para manchar a superfície do esmalte. A solução foi trocada a cada 24 h durante seis dias. As amostras foram armazenadas em saliva artificial durante 15 dias para estabilizar a coloração e depois uma nova medida de cor foi realizada. Os procedimentos de clareamento foram realizados de acordo com os seguintes protocolos: Grupo 1 de 2,0 mm e grupo 2 de 3,5 mm: gel de peróxido de carbamida à 10% Whiteness Perfect (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil)por quatro horas

diárias durante 21 dias; Grupos 3 de 2,0 mm e grupo 4 de 3,5 mm: gel de peróxido de hidrogênio a 6% White Class (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil) com cálcio durante uma hora e meia durante 21 dias; Grupo 5 de 2,0 mm e grupo 6 de 3,5 mm: gel de peróxido de hidrogênio a 20% Whiteness HP Blue (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil) com cálcio durante 50 min por 7 dias; Grupos 7 de 2,0 mm e 8 de 3,5 mm: gel de peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Maxx (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil), foram realizadas três sessões de 15 min de clareamento e o intervalo entre as sessões foi de sete dias e Grupo 9 de 2,0 mm e 10 de 3,5 mm: gel de peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil), com cálcio por 40 min durante sete dias. No final de cada semana de clareamento, houve um período de espera de 24 h para reidratação dos espécimes antes que as leituras do espectrômetro fossem tomadas. A comparação média foi realizada utilizando o teste de Tukey. A variável ΔE foi analisada, considerando medidas repetidas por ANOVA e teste de Tukey's. Os valores de L^* , mostraram que os tratamentos não foram estatisticamente diferentes para a superfície de esmalte nas duas espessuras, e para a dentina com uma espessura de 3,5 mm. Para amostras de 2 mm de espessura, a cor da superfície do esmalte apresentou maior ΔE para os grupos 1, 3 e 7 e foi estatisticamente diferente do grupo 9 com cálcio. Para amostras de 3,5 mm de espessura, os grupos 2 e 4 apresentaram maior ΔE em comparação com os grupos 8 e 10 com cálcio na superfície do esmalte. Na primeira semana de clareamento versus segunda semana de clareamento, a superfície dentinária, dos grupos 2 e 4 apresentaram o ΔE mais alto, diferindo dos outros tratamentos para amostras com uma espessura de 3,5 mm. E o ΔE de variação de cor entre a segunda e a terceira semana do processo de clareamento. Para a dentina de amostras de 3,5 mm de espessura, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para os grupos 9 e 10 com cálcio, as amostras de 2,0 mm de espessura diferiram estatisticamente das espessuras de 3,5 mm na superfície do esmalte, apresentando maior ΔE . O presente estudo demonstrou que a eficácia do clareamento na superfície do esmalte não dependeu das concentrações dos agentes clareadores. No entanto, o peróxido de hidrogênio de alta concentração com cálcio foi menos eficaz em dentina profunda do que o peróxido de carbamida a 10%.

Soares et al. (2013) avaliaram a morfologia e a microdureza do esmalte dental clareado com o emprego de gel de peróxido de hidrogênio parauso em consultório, com adição ou não de cálcio e após a aplicação de agentes remineralizantes à base de flúor ou nanohidroxiapatita. Foram utilizadas 60 superfícies vestibulares de incisivos bovinos. Os espécimes foram divididos em 2 grupos (n=30): 1- gel de peróxido de hidrogênio a 35% contendo cálcio, Whiteness HP Blue(FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil)e 2- gel de peróxido de hidrogênio a 35% sem cálcio, Whitegold (DentsplySirona, York, Pensilvânia, EUA). O tratamento de clareamento foi realizado durante 7 dias, por duas sessões. Imediatamente após a segunda sessão de clareamento, os dois grupos foram divididos em três subgrupos cada (n=10): a- grupo controle em saliva artificial, sem aplicação do gel de clareamento; b- aplicação de gel de fluoreto de sódio a2% (Maquira Prod. Odont., Maringá, Paraná, Brasil) e c- aplicação de um agente à base de nanohidroxiapatita (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil). Foi medido a microdureza, em três momentos: antes do clareamento, 24 h após a aplicação dos agentes remineralizantes e 14 dias após a aplicação dos agentes remineralizantes. Imagens com microscópio eletrônico de varredura foram obtidas. Os dados de microdureza foram analisados por meio de ANOVA a dois fatores e teste de Tukey. No grupo 1, houveram diferenças estatisticamente significantes entre os agentes remineralizantes, entre o tempo e na interação dos agentes remineralizantes. Antes do clareamento, amostras de todos os grupos foram estatisticamente semelhantes. Os grupos a e c apresentaram estatisticamente a maior microdureza 24 h após suas aplicações em comparação com outros agentes remineralizantes. Quatorze dias após a exposição aos agentes remineralizantes, amostras do grupo c, aplicado após o clareamento mostrou os maiores valores de microdureza. Apenas a saliva não recuperou a microdureza depois de 24 h. No grupo 2 não houve diferenças estatisticamente significantes entre os agentes remineralizantes. Antes do clareamento, as amostras de todos os grupos foram estatisticamente semelhantes. O grupo c apresentou estatisticamente a maior microdureza 24 h após sua aplicação em comparação com outros agentes remineralizantes. Quatorze dias após a exposição aos agentes remineralizantes, todos os três materiais forneceram meios de microdureza estatisticamente semelhantes. Apenas o flúor não recuperou a microdureza depois de 24 h. As imagens iniciais em microscopia eletrônica de

varredura, mostraram esmalte liso e polido. Após o clareamento com gel de peróxido de hidrogênio a 35%, as imagens mostraram depósitos de cálcio. Após o clareamento com gel de peróxido de hidrogênio à 35% sem cálcio, não foi observada deposição de cálcio, mais sim algumas irregularidades, como depressões. Assim, os autores concluíram que estudos adicionais devem ser realizados para analisar os efeitos de substâncias remineralizantes sobre o esmalte dental. Verificaram ainda 14 dias após o tratamento clareador, os dois agentes clareadores usados diminuíram a microdureza do esmalte. A remineralização dos géis utilizados neste estudo não conseguiram manter os valores de microdureza inicial.

Alexandrino et al. (2014) realizaram a adição de 2% de gluconato de cálcio em solução de peróxido de hidrogênio a 35% e se isso reduziria a perda de integridade e morfologia dentária durante o tratamento clareador, sem afetar a eficácia do tratamento geral. Dentes incisivos bovinos foram utilizados, e espécimes obtidos da face vestibular, em tamanhos de 9mm² de área e 2 mm de espessura. A área recortada foi proveniente da área central da superfície vestibular para garantir prismas de esmaltes com a mesma inclinação. As amostras foram polidas e armazenadas em saliva artificial. Elas foram divididas em três grupos (n=5), sendo eles: grupo 1 – controle negativo – nenhum tratamento; grupo 2 – controle positivo – Gel de peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil) e grupo 3 – Gel de peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Blue (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil) com adição de 2% de gluconato de cálcio. O teste de microdureza foi realizado antes e depois do tratamento clareador. A leitura de cor foi realizada antes e depois do tratamento clareador, com os valores de L*, a* e b* avaliados e obtidas imagens no microscópio eletrônico de varredura. As imagens foram avaliadas de forma duplo cego por três avaliadores previamente calibrados. Os resultados da microdureza e colorimetria foram tabulados e analisados estatisticamente pelo teste Tukey. Os grupos 1 e 2 mostraram diferenças estatisticamente significativas entre a microdureza final e inicial, e no grupo 3 não houve diferenças significativas. O valor médio de Δa (diferença de cor em vermelho e verde) não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos e os valores médios de ΔE (diferença de cor), ΔL (diferença de cor claro e escuro) e Δb (diferença de cor em amarelo e azul) foram significativamente superiores nos grupos 2 e 3. As imagens demonstraram o esmalte intacto sem alterações morfológicas em

todos os grupos. Os autores concluíram que a adição de 2% de gluconato de cálcio no gel de peróxido de hidrogênio a 35%, foi capaz de prevenir alterações na dureza e morfologia do esmalte sem reduzir a eficácia do clareamento.

Borges et al.(2014), avaliaram o efeito da adição de flúor e cálcio no gel de peróxido de hidrogênio a 35% sobre a microdureza do esmalte desmineralizado e o efeito da saliva humana no esmalte clareado. Dez voluntários foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e assinaram o consentimento livre e esclarecido. Foram obtidos espécimes com 3 mm de diâmetro, cortados a partir da superfície vestibular de incisivos bovinos. A microdureza de todos os espécimes foi medida e a média das indentações foram usadas para determinação dos grupos. Os espécimes foram divididos em dois grupos (n=30): grupo SE – esmaltes hígidos e grupo DE – esmalte desmineralizados. Os espécimes do grupo DE foram protegidos com cera, e desmineralizados com uma solução própria. A microdureza superficial dos espécimes desmineralizados foi medida e novos valores foram obtidos, permitindo o cálculo da porcentagem de perda de microdureza superficial. As amostras dentro de cada grupo foram divididas em três subgrupos (n = 10), de acordo com os géis de clareamento, sendo eles: 1- grupo controle com gel de peróxido de hidrogênio a 35%, Whiteness HP (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil); 2- gel de peróxido de hidrogênio a 35% com adição de 0,6% de fluoreto de sódio, Whiteness Perfect (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil)e 3- gel de peróxido de hidrogênio a 35% com adição de 2% de gluconato de cálcio,Whiteness HP Blue(FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil). O pH dos géis de clareamento foi medido, com valores de 6,35 para o gel do grupo 1. Para o grupo 2 o valor foi de 8,11 e 7,99 para o gel do grupo 3. Nova leitura de microdureza foi realizado após o tratamento clareador e a porcentagem de alteração foi calculada. Dez dispositivos intraorais foram confeccionados com resina acrílica, contendo seis cavidades de 3 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. Em cada dispositivo, foram fixados seis espécimes de esmalte (um de cada grupo). Os voluntários foram instruídos a usar o dispositivo 24 h por dia, durante sete dias consecutivos, para permitir a ação da saliva nos espécimes ao longo do estudo e simular as condições naturais do ambiente bucal. A microdureza foi medida no primeiro e último dia após o clareamento e a porcentagem de alteração foi calculada. Os dados de microdureza superficial dos grupos SE e DE foram analisados separadamente. Os dados obtidos foram

analisados estatisticamente usando ANOVA dois fatores e teste de Tukey. Houve diferença significativa para o fator tempo entre os grupos, onde o grupo controle apresentou valores de microdureza baixos após o tratamento clareador. Todos os grupos apresentaram aumento significativo de microdureza quando expostos à saliva humana. Os autores concluíram que a adição de potenciais agentes remineralizantes em géis clareadores deve ser encorajada, pois eles podem desempenhar um papel importante na manutenção da microdureza do esmalte ou induzir a remineralização do esmalte bovino artificialmente desmineralizado logo após os procedimentos de clareamento com 35% de peróxido de hidrogênio.

Santos et al.(2016) avaliaram o efeito de géis de clareamento caseiros modificados por cálcio e/ou fluoreto e a aplicação de uma pasta nanohidroxiapatita sobre a erosão do esmalte. Foram recortadas amostras circulares de 3mm a partir de dentes incisivos bovinos recém extraídos, e embutidos com resina de baixa viscosidade. Foi realizado a leitura da microdureza do esmalte, as quais foram usadas para a separação em seis grupos (n=20), sendo eles: Grupo 1- controle – nenhum tratamento; Grupo 2 – PH – gel de peróxido de hidrogênio a 7,5%; Grupo 3 – HP+Ca – gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% com adição de 0,5% de gluconato de cálcio; Grupo 4 – HP+F – gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% com adição de 0,2% de fluoreto de sódio; Grupo 5 – HP+Ca+F – gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% com adição de 0,2% de gluconato de cálcio e 0,2% de fluoreto de sódio e Grupo 6 – HP+NanoP -gel de peróxido de hidrogênio a 7,5%, seguido da aplicação do agente remineralizante e dessensibilizante (NanoP). Os géis preparados foram aplicados durante uma hora na superfície do esmalte, enxaguados com água deionizada e imersos em saliva artificial por 2 h. Para o grupo 6, após a remoção do gel clareador, foi aplicado a pasta nano-HAP por 1 min e com descanso de 5 min, após esse período foi removido o excesso e armazenado em saliva artificial por duas horas. Ao término desses procedimentos, realizou-se o ciclo erosivo. Que consistiu na imersão dos espécimes em refrigerante (Sprite Zero), quatro vezes ao dia durante dois minutos e armazenados em saliva artificial. A perda do esmalte foi medida com perfilômetro de contato, inicialmente e após sete e quatorze dias. Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA e teste de Tukey. Houveram diferenças significativas para o tratamento clareador e o tempo. Todos os tratamentos aumentaram a perda média do esmalte, onde o grupo controle

apresentou perda menor de esmalte. Após sete dias o grupo HP+Ca exibiu a menor perda de esmalte e o grupo HP+NanoP a maior. Após quatorze dias os grupos HP+Ca e HP+F apresentaram perdas médias de esmalte e no grupo HP e HP+NanoP houve as maiores perdas, quando comparados com os outros grupos. Os autores concluíram que o gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% aumentou a susceptibilidade do esmalte a erosão, e a adição de cálcio e fluoreto no gel clareador reduziram o efeito da erosão, enquanto que o NanoP não forneceu nenhum efeito protetor.

Borges et al.(2016) avaliaram se o tempo decorrido entre o clareamento com peróxido de hidrogênio a 7,5% (associado ou não com cálcio) e escovação (com alta e baixa abrasividade) afetaria a rugosidade e o desgaste do esmalte e da dentina. Foram preparados espécimes cilíndricos de esmalte e dentina com 3mm de diâmetro a partir da superfície vestibular de dentes bovinos recém extraídos. Foram realizados as avaliações iniciais das superfícies de esmalte e dentina usando um perfilômetro de contato. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 12 grupos (n = 10). A primeira divisão do grupo foi de acordo com o gel de clareamento: NB: sem clareamento; PH- gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% e PH + Ca- gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% com a adição de 0,5% de gluconato de cálcio.Os géis experimentais foram modificados do fabricante (FGM Prod. Odont., Joinville, SC, Brasil). Uma camada de 2 mm de espessura do gel de clareamento foi aplicada diariamente na superfície dos espécimes durante 1 h. As amostras de cada grupo foram divididas em dois subgrupos, sendo eles:alto – pasta de alta abrasividade ebaixo – pasta de baixa abrasividade. O desafio abrasivo foi realizado utilizando uma máquina automática de escovação de dentes. Diariamente, foram administrados 135 golpes de escovação sob uma carga vertical de 200 g, e os procedimentos de clareamento / abrasão foram repetidos durante 7 dias. Após o final do tratamento, os perfis finais das superfícies foram medidos usando o perfilômetro de contato seguindo os mesmos parâmetros previamente descritos. A diferença entre os valores finais e iniciais para o esmalte e dentina da rugosidade foram analisados com ANOVA três fatores e o teste de Tukey foi utilizado para ambos os resultados. Os fatores de tratamento de clareamento e intervalo pós-clareamento não apresentaram diferenças significativas. A escovação com a pasta de alta abrasividade resultou em perda de esmalte e dentina significativamente

maior do que com a pasta de baixa abrasividade. A análise da perda de superfície do esmalte também foi realizada utilizando ANOVA de três fatores, que mostrou diferenças significativas para todos os fatores estudados. Os resultados do teste de Tukey mostraram que o clareamento com gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% resultou em maior perda de esmalte em comparação com o gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% com adição de 0,5% gluconato de cálcio. Os resultados obtidos da rugosidade com a pasta de alta abrasividade foram maiores do que os mesmos grupos escovados com a pasta de baixa abrasividade. Os autores concluíram que a rugosidade da superfície foi influenciada apenas pela abrasividade da pasta. O clareamento com gel de peróxido de hidrogênio a 7,5% pode aumentar a susceptibilidade do esmalte e da dentina à abrasão, principalmente com suspensões abrasivas elevadas. A suplementação de gel de clareamento com cálcio reduziu a perda de superfície.

2.2 Efeitos da presença natural ou da adição de íons cálcio e/ou fosfato em bebidas ácidas na erosão dentária

Larsen e Nyvad (1999), avaliaram o pH de vários refrigerantes e sucos disponíveis no mercado dinamarquês, seu efeito tampão, com ênfase na faixa de pH em que esse efeito tampão é eficiente, e seus conteúdos de cálcio, fósforo e flúor, para uma comparação com a capacidade de dissolução do esmalte dentário in vitro. Dezoito refrigerantes e sucos comumente disponíveis foram escolhidos para o estudo, sendo eles: Schweppes indiana, Schweppes de uva, Fanta Laranja, Sprite Light, Coca Cola, Pepsi Cola, 7 Up, Suco de laranja, Suco de Laranja com cálcio, água com gás CarlsbergKurvandcitrus, água com gás CarlsbergKurvand, água com gás Azul Tuborgcitrus, água mineral Tuborg Blue, água mineral citrus, água mineral Apolinário citrus, água mineral Maarum, água mineral Apolinário e água destilada. Cada bebida foi caracterizada por análise química para ver as concentrações de íons de interesse dentário pelos seguintes métodos: cálcio por espectrofotometria, fósforo por espectroscopia de cor e fluoreto por eletrodo. O pH foi determinado imediatamente após a abertura das garrafas e, posteriormente quando adicionado

em um volume de 10 ml da bebida. O efeito tampão foi determinado em 3 ml de cada bebida por monitorização do pH após a adição de 0,025 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 mol / L. Para fins de comparação, calculou-se a quantidade de NaOH necessária para alterar o pH de 1 litro da bebida real para pH 4,0, 5,0, 5,5 e 7,0. O potencial erosivo das bebidas e água destilada foi estudado em um total de 54 pré-molares humanos e molares. Durante a exposição às bebidas, os dentes foram pendurados em tubos de ensaios de 2 ml, de forma que o dente não afundasse até o final dos tubos. Garrafas contendo 1,5 litro de refrigerante foram cuidadosamente abertas, alguns mililitros do conteúdo retirado para análise, e um dente pendurado sob o tubo de ensaio foi colocado para flutuar com o dente submerso na bebida antes que as garrafas fossem fechadas novamente. Todos os frascos foram agitados suavemente por 24 h ou 1 semana. Após a exposição, os dentes foram seccionados longitudinalmente e triturados até atingirem aproximadamente 100 µm. Todas as experiências e análises foram duplicadas em duas execuções separadas. Verificou-se que os refrigerantes e sucos se dividem em três categorias diferentes: (a) refrigerantes à base de limão com carboidratos (Schweppes, Coca-Cola, Pepsi), (b) sucos de laranja e (c) bebidas minerais e sem açúcar. Afim de comparação, os refrigerantes à base de limão tinham um pH baixo. O pH dos sucos de laranja variou em torno de 4 e exibiu um efeito tampão elevado, enquanto o pH das bebidas de água mineral variou em torno de 5 com efeito tampão baixo. As concentrações de cálcio e fósforo no suco de laranja suplementado com minerais variaram em torno de 43 e 31 mmol / l, o que, por cálculo, corresponde à solubilidade da apatita em água destilada em pH 4. Refrigerantes de limão causaram uma considerável erosão do esmalte, com algumas das lesões se estendendo até a dentina. O suco de laranja que não continha cálcio e fósforo ocasionou uma lesão profunda no esmalte, em contraste com o suco que continha os dois íons. A adição de cálcio e fósforo em quantidades correspondentes à solubilidade do esmalte foi próxima de estabelecer a saturação em relação à hidroxiapatita e, como observado por experimentação, impediu a dissolução do esmalte. Em conclusão, o trabalho mostrou que as águas minerais corroem o esmalte apenas de forma limitada, em contraste com refrigerantes e suco de laranja. Com exceção do suco de laranja, a capacidade erosiva das bebidas aumentou, inversamente com o pH da bebida e paralela à solubilidade da apatita. Além disso, além do suco de laranja, nenhum

efeito foi observado, nem de cálcio, fósforo e flúor na bebida nem de seu efeito tampão. Para o suco de laranja, o efeito tamponante muito alto e um alto teor de cálcio e fósforo no suco modificados pelo estudo afetaram significativamente a erosão.

Hughes et al. (1999), compararam a erosão do esmalte in situ produzida por uma bebida experimental de suco de groselha com hidróxido de cálcio e suco de laranja, e avaliaram a correlação entre os efeitos in situ com os in vitro. Para o estudo in situ foram recrutados 12 jovens adultos, homens e mulheres. Para cada pessoa foi construído um aparelho removível superior intraoral de acrílico com grampos nos primeiros molares permanentes. O aparelho foi construído para manter uma amostra de esmalte palatal durante o período de tratamento. As amostras de esmalte foram preparadas a partir de terceiros molares humanos. As bebidas testadas foram uma formulação experimental a base de suco de groselha com adição de cálcio, suco de laranja sem cálcio e água. O uso do aparelho intraoral com amostra de esmalte foi utilizado das 9 às 17 h de cada dia de trabalho. Os indivíduos receberam sua bebida, alocada para cada um dos quatro períodos, às 09:00, 11:00, 13:00 e 15:00 h. Todas as bebidas eram de 250 ml em temperatura ambiente. Os aparelhos foram removidos e armazenados em solução salina à temperatura ambiente durante o período de almoço de cada indivíduo e durante a noite. Somente chá, café ou água poderiam ser consumidos enquanto o aparelho estava no local e não foi permitida a escovação dentária durante todo o dia. Aos voluntários também receberam uma escova de dentes e um dentífrico fluoretado convencional para uso de manhã e de noite durante todo o período do estudo. Nos dias 5, 10 e 15 as amostras de esmalte foram removidas e duas medições no perfilômetro foram realizadas. O mesmo experimento foi realizado com amostras de esmalte no laboratório sem saliva. Doze espécimes foram agitados em 250 ml de cada bebida por 10 min, quatro vezes ao dia por 15 dias. Duas medições com o perfilômetro foram realizadas em cada amostra nos mesmos momentos do estudo in situ após 20, 40 e 60 exposições à respectiva bebida (o equivalente a 5, 10 e 15 dias). O estudo foi um design cruzado clássico, randomizado, controlado por placebo para comparar os tratamentos. Para todos os espécimes in situ e in vitro, foram obtidas médias de duas leituras no perfilômetro. Para os dados in situ e mais particularmente in vitro, houve considerável heterogeneidade do desvio padrão, com

a variação no grau de erosão aumentado. Assim, para o estudo *in situ*, as diferenças entre as bebidas foram analisadas utilizando-se testes *t* pareados e para o estudo *in vitro* testes *t* não pareados. Todos os tratamentos produziram perdas progressivas de esmalte, com valores médios de 0,19 μ m para água, 0,41 μ m para suco de groselha preta e 2,54 μ m para suco de laranja. As comparações entre as bebidas revelaram que o suco de laranja era significativamente mais erosivo do que a água ou suco de groselha com cálcio em todos os momentos. Conclui-se que o suco de groselha preta com adição de cálcio tem um potencial erosivo muito menor em comparação com o suco de laranja selecionado para investigação tanto *in vitro*, quanto, para *in situ*.

Attin et al. (2005), avaliaram a erosão dentária *in vitro* após a adição de baixos níveis de cálcio, fósforo e fluoreto à diferentes bebidas. Foram preparados espécimes a partir de dentes incisivos bovinos, polidos, com tamanho de 5mm de diâmetro. Antes da inclusão no experimento, as superfícies polidas foram verificadas quanto a superfície e deficiências com um perfilômetro. O centro da superfície foi marcado com uma caneta resistente à água. Na metade da superfície, foi mensurada a microdureza, enquanto a outra metade foi usada para análise perfilométrica. Em seguida, uma parte da superfície do esmalte foi coberta com fita adesiva, expondo uma área de 1,4 mm por 10,0 mm no centro dos espécimes de esmalte para se posicionar como superfícies de referência que posteriormente não foram submetidas a soluções remineralizantes e permitindo assim medir a perda de substâncias. Os espécimes foram distribuídos uniformemente entre quatro grupos experimentais (n=36): A- Cola-cola; B- Sprite; C- Sprite Light e D- Suco de laranja. Foram divididos também em três subgrupos (n=12) cada, sendo eles: 1- original; 2- Ca, com adição de 1 mmol/l de cloreto de cálcio di-hidratado; 3-combinação, com adição de 0,5 mmol/l de cloreto de cálcio di-hidratado, 0,5 mmol/l de 1 fosfato monopotássico e 0,031 mmol/l de fluoreto de sódio. A amostragem aleatória estratificada foi aplicada, de modo que a microdureza média nos quatro grupos e nos 12 subgrupos foram quase iguais. O processo de desmineralização consistiu na imersão nas bebidas, enquanto a remineralização foi realizada com saliva artificial. Para a desmineralização, as respectivas soluções foram colocadas durante 1 min nas bebidas, seguido imediatamente por um período de remineralização de 1 min. Depois de passar por este procedimento os espécimes foram colocados por 8 h em

saliva artificial. O período de descanso de 8 horas foi escolhido para simular a remineralização durante a noite. Ao todo, o ciclo de desmineralização e remineralização, durou 10 min e foi repetido três vezes para cada espécime, interrompido por períodos de 8 h de remineralização. Assim, foi removida a fita adesiva, e realizado as medições perfilômetro, para a análise de perda de esmalte. Foi conferido o pH das soluções dos subgrupos e a acidez titulável, avaliando a quantidade de NaOH (hidróxido de sódio) necessária para elevar o pH de 10 ml das soluções para 7,0. As concentrações de fósforo e cálcio foram determinadas pelo método colorimétrico, e a de flúor com um eletrodo sensível a essa substância. Vinte e um voluntários (11 mulheres, 10 homens) com idade entre 25 e 45 anos, todos não fumantes, foram selecionados para estimar o sabor dos quatro bebidas e suas modificações em um teste cego. As três soluções cegas (1,2 e 3) de cada uma das quatro bebidas (A, B, C e D) foram oferecidas aos voluntários junto com a bebida original, não modificada. Os voluntários foram solicitados a verificar se as soluções em questão estavam diferentes em comparação com a respectiva bebida original. Este procedimento foi realizado em quatro dias diferentes. Por dia, apenas uma das bebidas e as respectivas modificações foram testadas por volta das 10 da manhã. Os voluntários foram instruídos a absterem-se de comer ou beber durante 1 h antes do teste. Os dados da perda de esmalte foram analisados estatisticamente com o Teste U de acordo com Mann e Whitney, uma vez que os dados não foram distribuídos normalmente. Os dados da avaliação do gosto foram analisados por meio de testes do quiquadrado. A perda de esmalte registrada nas amostras com Sprite original e suco de laranja foi significativamente maior em comparação com todas as outras soluções, e a perda mais baixa, em comparação com as outras soluções originais, foi registrada para o grupo original da Coca-cola. A suplementação das bebidas com cálcio e com a combinação de cálcio, fósforo e flúor ocasionaram perda significativamente menor de esmalte em comparação com a solução original. Para o suco de laranja, esse efeito foi significativamente mais pronunciado para o grupo de combinação do que para o grupo de cálcio. Nenhuma diferença significativa no sabor foi relatada para as bebidas modificadas com cálcio ou sobre as combinações de bebidas. Isto significa que os voluntários não foram capazes de diferenciar claramente entre as bebidas originais, as respectivas soluções e as modificadas. Portanto, os autores concluíram que a modificação das

bebidas de teste com baixas concentrações de cálcio, fósforo e flúor é capaz de reduzir o potencial erosivo das bebidas.

Jensdottir et al. (2005), testaram o potencial erosivo de vários refrigerantes. Determinaram as propriedades de refrigerantes que foram importantes em causar erosão, e testaram a possibilidade de reduzir o potencial erosivo dos refrigerantes por modificação. Foram utilizadas 12 bebidas, sendo os grupos: G1- suco de laranja puro; G2- suco de grapefruit puro; G3- suco de laranja concentrado; G4- malte; G5- ácido láctico derivado do leite; G6- bebida energética - Gatorade; G7- água destilada; G8- Coca-cola; G9- Leite; G10- água mineral sabor limão; G11- Suco de limão concentrado; G12- bebida experimental A com 6,67 g de citrato de cálcio dissolvido em 1 litro de suco de laranja puro; G13- bebida experimental B com 4 g de trifosfato de cálcio dissolvido em 1 litro de suco de laranja puro e G14- bebida experimental C com 8 g de trifosfato de cálcio dissolvido em 1 litro de suco de laranja puro. O pH das bebidas foi determinado com um eletrodo conectado a um medidor de pH padrão, e foi realizado a determinação da acidez titulável. O cálcio foi determinado espectrofotometricamente por um ensaio colorimétrico baseado na reação de Arsenazo III. O fósforo também foi determinado espectrofotometricamente por um ensaio colorimétrico baseado na reação de molibdênio a um comprimento de onda de 670 nm. A partir dos resultados da acidez titulável, calculou-se a capacidade tampão das bebidas. O grau de saturação em relação à hidroxiapatita foi calculado a partir das concentrações / atividades de pH, cálcio e fósforo das bebidas. Os dentes foram preparados a partir de molares não-cariados, com peso de 450 mg aproximadamente, sendo utilizando 2 espécimes em cada grupo. Um foi imerso na bebida por 24 h outro por 72 h, ambos em volumes de 10 ml com agitação constante. O potencial erosivo foi determinado com a porcentagem de perda do peso no contato com a bebida, bem como diferenças na concentração de cálcio das bebidas, decorrentes do cálcio liberado dos dentes durante a imersão. Devido ao pequeno tamanho da amostra, todas as correlações foram analisadas pela análise de correlação de Spearman. Após 72 h de exposição, obteve-se uma correlação altamente significativa entre a perda de peso e a liberação de cálcio dos dentes, no entanto, a correlação correspondente após 24 h de exposição foi muito mais fraca. Foi assumido que a correlação mais fraca obtida entre a perda de peso e a concentração de cálcio após 24 h pode ser devido à precipitação transitória de

outros sais de fosfato de cálcio nas bebidas após a dissolução da hidroxiapatita. Tal precipitação ocorreu provavelmente em bebidas com altas concentrações de cálcio e fósforo. Assim, o leite, que apresentou as maiores concentrações de cálcio e fósforo das bebidas ácidas antes da imersão dos dentes, também foi a bebida que apresentou maior discrepância entre perda de peso e liberação de cálcio após 24 h. A perda de substância dentária após 24 h nas bebidas variou de 0,0 a 9,9% do peso total dos dentes e a liberação de cálcio variou de 0 a 31 mmol. O pH da Coca-Cola e das bebidas esportivas foi menor que o pH dos sucos. Em contraste, a quantidade de base necessária para aumentar o pH para 5,5 foi consideravelmente maior para os sucos de frutas do que para a Coca-Cola, bebidas esportivas e água mineral. Ao comparar o pH real das bebidas com o seu pH crítico, todas as bebidas, com exceção do leite, foram insaturadas em relação à hidroxiapatita. Não surpreendentemente, portanto, o leite foi a única bebida onde não ocorreu perda de peso e liberação de cálcio durante o período de teste. A adição de cálcio e fósforo às bebidas experimentais teve um efeito considerável no seu valor do pH crítico. Assim, o pH crítico foi reduzido de 5,27 no suco de laranja puro para 4,24 na bebida experimental C. Foi descoberto que várias propriedades relacionadas a refrigerantes como pH, ácido titulável, capacidade tampão e grau de saturação em relação à hidroxiapatita têm um impacto sobre o potencial erosivo da bebida. Além disso, os autores concluíram que a modificação de refrigerantes por adição de cálcio e fósforo pode ser uma medida útil para reduzir o potencial erosivo de alguns refrigerantes.

Barbosa et al. (2012), avaliaram se a suplementação de Coca-Cola com diferentes concentrações de glicerofosfato de cálcio (CaGP) seria capaz de reduzir o potencial erosivo desses refrigerantes. Foram preparadas 240 amostras de esmalte a partir de dentes incisivos bovinos. Foi realizado a leitura da microdureza para a divisão em 12 grupos experimentais ($n=20$), as quais diferiram de acordo com o tipo de refrigerante testado (Coca-Cola ou Sprite) e em relação à concentração de CaGP adicionada a estes refrigerantes (0, 0,1, 1,0, 2,0, 5,0 ou 10,0 mM). Após a adição de CaGP ou não, o pH dos refrigerantes foi medido. Os espécimes foram submetidos a 4 ciclos de pH sob agitação em apenas um dia. Cada ciclo consistia na imersão dos espécimes em coca-cola ou sprite por 10 min, com 30ml por amostra. Após os ciclos, o desgaste do esmalte foi determinado em relação às superfícies de referência no aparelho de perfilometria. O pH da Coca-Cola e da Sprite antes da

adição de CaGP foi de 2,72 e 2,87, respectivamente. Para ambas as bebidas, permaneceu quase constante com a adição de CaGP até 2,0 mM. No entanto, para a adição de CaGP a 5,0 e 10,0 mM, o pH aumentou para 4,37 e 5,29, respectivamente, para Coca-Cola e para 3,20 e 3,47, para a Sprite. Para ambas as bebidas, foram encontradas diferenças significativas no desgaste para as distintas concentrações de CaGP. Concentrações de CaGP de 2 mM ou mais reduziram significativamente o desgaste do esmalte tanto para a coca-cola quanto para o zero de sprite, quando comparado ao grupo controle. O CaGP adicionado à coca-cola em 5 e 10 mM previniu completamente a erosão, uma vez que nenhum foi detectado. Quanto a sprite zero, a maior concentração de CaGP testada (10 mM) reduziu o desgaste em 75%, porém ainda era detectável. Os autores concluíram que a suplementação de bebidas com CaGP parece ser uma alternativa viável para reduzir o potencial erosivo dos refrigerantes, uma vez que não alterou o sabor das bebidas. Apenas uma ligeira diferença no sabor foi notada nos grupos contendo as maiores concentrações de CaGP. Isso é muito importante do ponto de vista comercial. Outra vantagem da suplementação com CaGP é que ela é completamente segura, pois mesmo as doses mais altas testadas neste estudo estão muito abaixo do nível máximo de ingestão diária para esse componente.

3 PROPOSIÇÃO

O primeiro objetivo desse estudo será determinar os sais de cálcio e fósforo mais solúveis em peróxido de hidrogênio a 35% e a concentração necessária para conseguir-se uma solução saturada em relação à hidroxiapatita. O segundo objetivo será avaliar se a suplementação de cálcio e/ou fósforo em diferentes concentrações é capaz de reduzir ou eliminar o efeito desmineralizante dos agentes clareadores, sem prejudicar o efeito clareador.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Na primeira fase do estudo, os tipos de sais mais solúveis em peróxido e as concentrações de cálcio e fósforo para atingir o ponto de saturação foram determinadas. Estas informações foram utilizadas para realizar o experimento principal, testando os efeitos da adição dos íons nos agentes clareadores sobre a estrutura dental.

4.1.1 Fatores em estudo

Suplementação do peróxido de hidrogênio com cálcio e/ou fósforo em seis níveis:

- Peróxido sem suplementação (Controle Positivo);
- Peróxido suplementado com cálcio e fósforo 50% subsaturados em relação à hidroxiapatita;
- Peróxido suplementado com cálcio e fósforo 100% saturados em relação à hidroxiapatita;
- Peróxido suplementado com cálcio até o coeficiente de solubilidade do sal de cálcio mais solúvel;
- Peróxido suplementado com fósforo até o coeficiente de solubilidade do sal de fósforo mais solúvel;
- Água ultrapura (Controle Negativo).

4.1.2 Unidades Experimentais

Cento e vinte espécimes de esmalte/dentina obtidos a partir de dentes incisivos bovinos.

4.1.3 Variáveis de respostas

- Microdureza Knoop;
- Rugosidade de superfície (Ra);
- Variação da sensação de cor (ΔE^*_{ab} e ΔE^*_{00}).

4.2 Determinação do ponto de saturação em peróxido de hidrogênio

Para determinar o ponto de saturação do cálcio e fósforo em uma solução de peróxido de hidrogênio a 35%, em relação à hidroxiapatita do esmalte dental, usamos dois dentes incisivos bovinos extraídos de animais recém abatidos, limpos e sem resíduos gengivais. Eles foram seccionados transversalmente ao seu longo eixo, abaixo da junção amelocementária, utilizando um disco diamantado (Dremel, Racine, WI, Estados Unidos) acoplado a um torno de alta rotação (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil), removendo-se as raízes. Uma profilaxia da superfície dentária foi realizada com pasta de pedra pomes e água e uma escova de Robinson, em motor de baixa rotação. Empregando uma ponta diamantada esférica número 3018 (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil), toda a dentina da coroa foi removida através da porção lingual, permanecendo somente o esmalte. Esse material foi levado a uma placa de vidro e posicionada dentro de um dessecador contendo sílica durante 24 h para garantir a completa desidratação do esmalte. Após esse período, as coroas foram trituradas em um almofariz de ferro (Figura 1A) até se obter um pó homogêneo (Figura 1B e 1C). Esse pó foi levado a um jogo de peneiras granulométrica de Tamis composto de 3 unidades, sendo o tamanho dos orifícios da

malha respectivamente 250 μ m, 150 μ m e 75 μ m (Figura 1D). Elas foram empilhadas estando a com orifícios maiores na parte de cima e a de orifícios menores na parte de baixo (Figura 1E). O pó foi posicionado sobre a primeira peneira sendo o conjunto agitado. O material retido na última peneira foi utilizando, restando partículas com tamanho entre 0,074 μ m a 0,1149 μ m (Figura 1E e 1F) (Cury et al., 2017).

Figura 1–Trituração dentes de boi para ponto de saturação



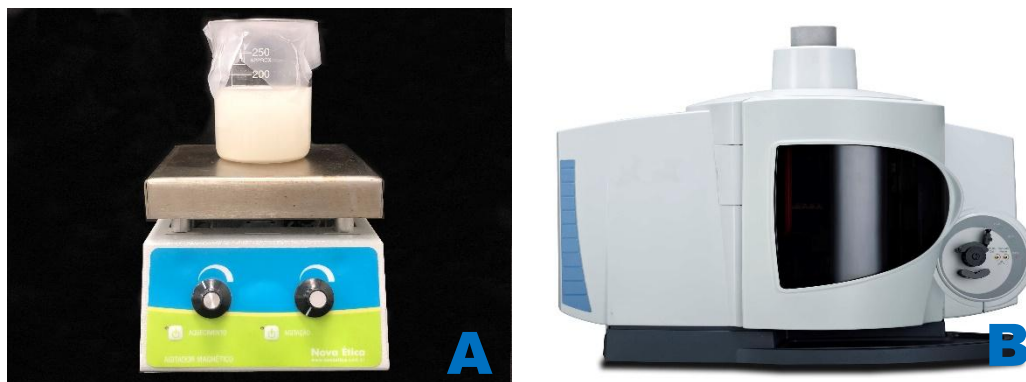
Legenda: a)Almofariz de ferro; b)Colocação do dente bovino no interior; c)Trituração até obter um pó homogêneo; d) Jogo de peneiras Tamiz; e)Jogo de peneiras Tamiz empilhadas na sequência da maior para a menor granulometria; f)Aspecto final do pó peneirado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um frasco tipo Becker com capacidade para 250ml foi empregado. Dentro dele foi colocado 200 ml de peróxido de hidrogênio a 35% (Kolovec do Brasil, Diadema, São Paulo, Brasil) ajustado a um pH 7 utilizando uma solução de hidróxido de potássio a 1M, além de 4g de pó de esmalte. Dentro do frasco foi posicionada uma barra magnética de 3 mm. O frasco foi tampado com uma película plástica (Parafilm, Pechinery Plastic Packaging, Neenah, Wisconsin, EUA) e posicionado sobre um agitador magnético (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) a 800rpm por 72 h (Figura 2A), até que a reação de desmineralização se complete e a solução de peróxido estivesse saturada em relação à hidroxiapatita das partículas de esmalte não dissolvidas.

O valor das concentrações de cálcio e fósforo foram determinados pelo método da Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente ou ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) (Figura 2B), empregando o aparelho iCAP 6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, England). Trata-se de uma técnica de análise química que faz uso de uma fonte de excitação de plasma de argônio à alta temperatura para produzir, em uma amostra introduzida sob forma de neblina no centro do plasma, átomos excitados que emitem radiação em determinados comprimentos de onda, característicos dos elementos nela presentes. As radiações emitidas têm suas intensidades respectivas medidas por meios de detectores e são correlacionadas às concentrações correspondentes através de curvas de calibração. Al-Salehi et al. (2007) e Jensdottir et al. (2005) realizaram estudos parecidos com a mesma metodologia proposta.

Figura 2 – Frasco contendo peróxido de hidrogênio a 35% e pó de esmalte dental sob agitação



Legenda: a) Peróxido de hidrogênio com pó de dente sob agitação; b) Aparelho Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente ou ICP-AES.
Fonte: Elaborada pelo autor e Thermo Fisher Scientific.

A concentração de peróxido de hidrogênio na solução foi checada utilizando o método de permanganometria, conforme a fórmula a seguir:



Foram preparadas soluções de permanganato de potássio (KMnO_4) a 0,1N (0,02 mol/l), ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1M e oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) a 0,67% (p/v). A solução de permanganato de potássio foi padronizada utilizando a solução de oxalato de sódio. Para tal, 25ml da solução de oxalato e 25ml da solução de ácido sulfúrico foram levados ao frasco do titulador. A titulação automaticamente injetou a solução de permanganato de potássio. O ponto final foi determinado potenciometricamente utilizando um eletrodo RedoxHI 3131B, (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA). Foi então calculado o fator de correção, que indicou se a solução de permanganato está mais ou menos concentrada do que o padrão, e entrou no cálculo da concentração de peróxido.

Para determinação da concentração de peróxido desconhecida, 100µl da solução de peróxido foi coletada e levada a um frasco Becker de 100ml, dentro do qual foram adicionados 20ml da solução de ácido sulfúrico. A solução permaneceu

em movimentação por meio de um agitador magnético. A titulação foi feita automaticamente pelo aparelho que injetou a solução de permanganato de potássio. O ponto final foi determinado potenciométricamente utilizando um eletrodo Redox. A concentração de peróxido (p/p) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$C = \frac{V \times 1,701 \times Fc}{m}$$

Onde:

C = concentração (p/p) de peróxido de hidrogênio;

V = volume de permanganato de potássio 0,1N gasto na titulação, em mililitros;

Fc = fator de correção da solução de permanganato de potássio 0,1N;

m = massa da amostra em miligramas.

O pH da solução de peróxido foi determinado utilizando um pHmetroDM-20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil).

4.3 Determinação do coeficiente de solubilidade dos sais de cálcio e fósforo

Diferentes sais de cálcio e fósforo foram testados com relação à sua solubilidade em uma solução de peróxido de hidrogênio a 35%, obtendo-se o coeficiente de solubilidade de cada sal. Denomina-se de coeficiente de solubilidade a quantidade de soluto (material que será dissolvido) que se dissolve 100g de solvente a uma determinada temperatura. Os sais testados são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Sais de cálcio testados

SAIS DE CÁLCIO	FÓRMULA	PESO MOLECULAR	FABRICANTE	CAS
Gluconato de cálcio	$C_{12}H_{22}CaO_{14}$	430.37 g/mol	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil	299-28-5
Lactato de cálcio pentahidratado	$C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5H_2O$	308.27 g/mol	Synth, Diadema, SP, Brasil	814-80-2
Citrato de cálcio	$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4H_2O$	570.50 g/mol	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil	813-94-5
Hidróxido de cálcio	$Ca(OH)_2$	74.09 g/mol	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil	1305-62-0
Sulfato de cálcio	$CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$	145.14 g/mol	Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil	10101-41-4
Óxido de cálcio	CaO	56.07 g/mol	Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil	1305-78-8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 – Sais de fósforo testados

SAIS DE FÓSFORO	FÓRMULA	PESO MOLECULAR	FABRICANTE	CAS
Fosfato de cálcio	$Ca_3(PO_4)_2$	309.80 g/mol	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	7758-87-4
Fosfato de zinco	$Zn_3(PO_4)_2$	386.11 g/mol	Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil	7779-90-0
Fosfato dissódico dodecahidratado	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	141.96 g/mol	Synth, Diadema, SP, Brasil	7558-79-4

Fonte: Elaborado pelo autor.

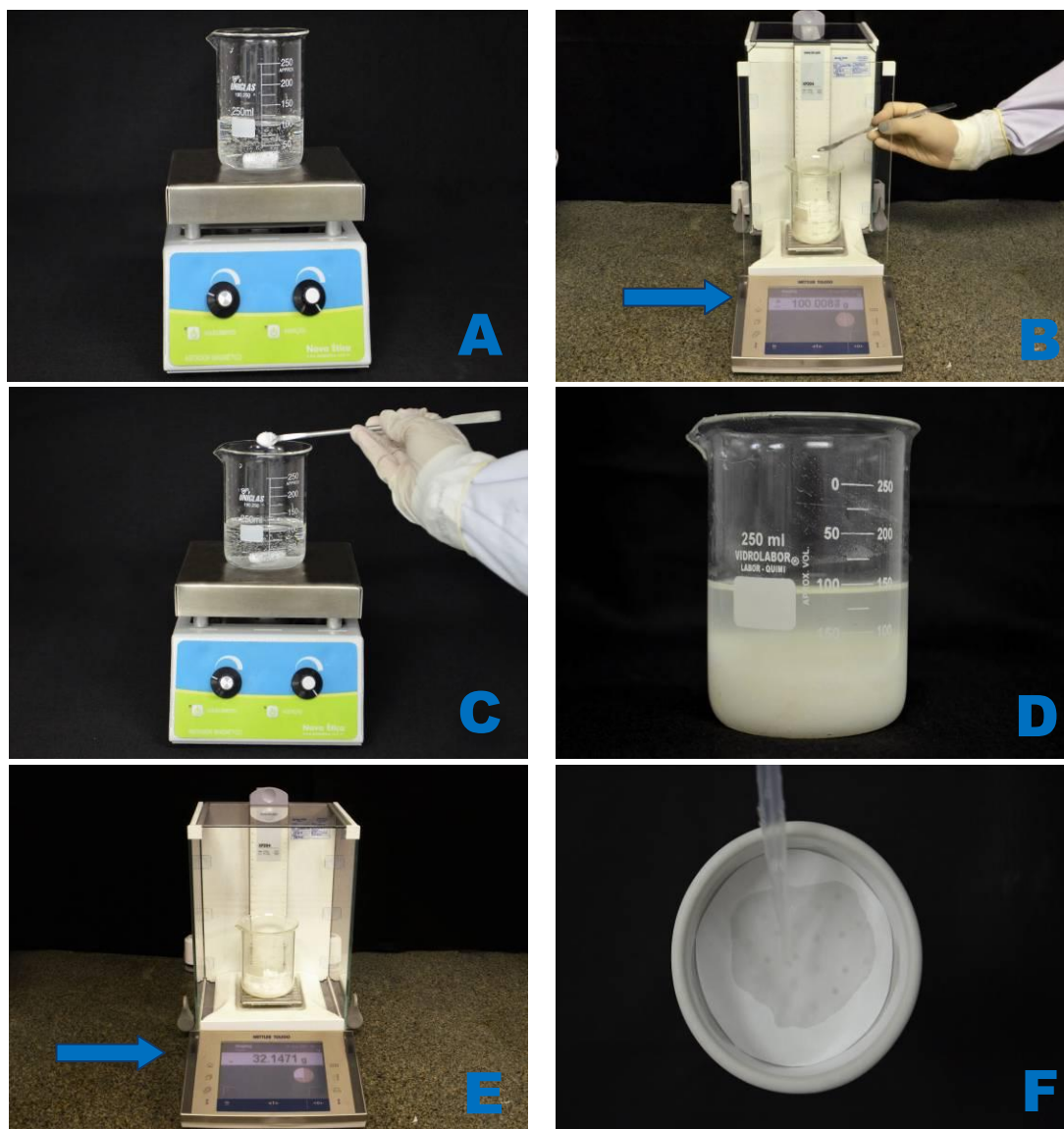
Os sais analisados e filtros de papel em formato circular (Química Moderna, Barueri, SP, Brasil) foram levados a um dessecador contendo sílica durante 24 h para completa desidratação. Para a determinação do coeficiente de solubilidade, 100 g de uma solução de peróxido de hidrogênio a 35% (Kolovec do Brasil, Diadema, São Paulo, Brasil), foi levada a um frasco tipo Becker com capacidade de 200ml. Esse frasco foi posicionado sobre um agitador magnético (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) e dentro dele foi posicionada uma barra magnética de 7 mm (Figura 3A). O agitador foi acionado, executando a rotação da barra magnética a 800 rpm. O experimento foi realizado a uma temperatura ambiente controlada de 22°C.

Cem gramas de cada sal foram pesados utilizando uma balança analítica XP204, com uma precisão de milionésimos de grama (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça). Para tal, um Becker de vidro foi posicionado sobre o prato da balança e a tara obtida, desprezando-se o peso do recipiente. A seguir a pesagem de 100 g de sal foi efetuada adicionando-se a quantidade necessária ao recipiente (Figura 3B - seta). O registro da tara do recipiente foi mantido na balança.

Cada sal foi levado em pequenas porções à solução de peróxido utilizando uma pequena colher metálica, observando-se a completa dissolução de cada porção antes que uma nova fosse adicionada (Figura 3C). A partir do momento que não ocorreu mais a dissolução do sal, observada visualmente pela presença de partículas em suspensão no líquido ou depositadas no fundo do recipiente, a adição foi interrompida (Figura 3D). A quantidade remanescente de sal dentro do recipiente de vidro foi pesada, devolvendo o mesmo à balança (Figura 3E). A quantidade remanescente foi subtraída do peso inicial, obtendo a quantidade utilizada no experimento. A agitação foi interrompida e a barra magnética removida do frasco.

A solução foi filtrada utilizando o método de filtração a vácuo, empregando um papel de filtro adequado posicionado em um funil de Buchner (Figura 3F), o qual foi acoplado a um frasco tipo Kitassato ligado a uma bomba de vácuo. Antes da utilização, a massa do papel de filtro foi determinada. A transferência analítica da solução ao funil foi realizada com o auxílio de um bastão de vidro (Figura 4A). Os sais remanescentes no frasco foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta tipo Pasteur, utilizando uma porção da solução já filtrada (Figura 4B). Após esse procedimento, o papel de filtro foi colocado em uma placa de vidro e levado para um dessecador com sílica (Figura 4C), aguardado 24 h para sua completa secagem. A massa dos resíduos de sal não dissolvido retidos no filtro foi determinada subtraindo o peso do filtro associado ao sal remanescente do peso inicial do filtro antes do uso (Figura 4D e 4E - seta). Essa massa foi subtraída da massa total de sal adicionada durante a dissolução, determinando assim a quantidade exata de sal utilizada para se atingir o coeficiente de solubilidade no peróxido.

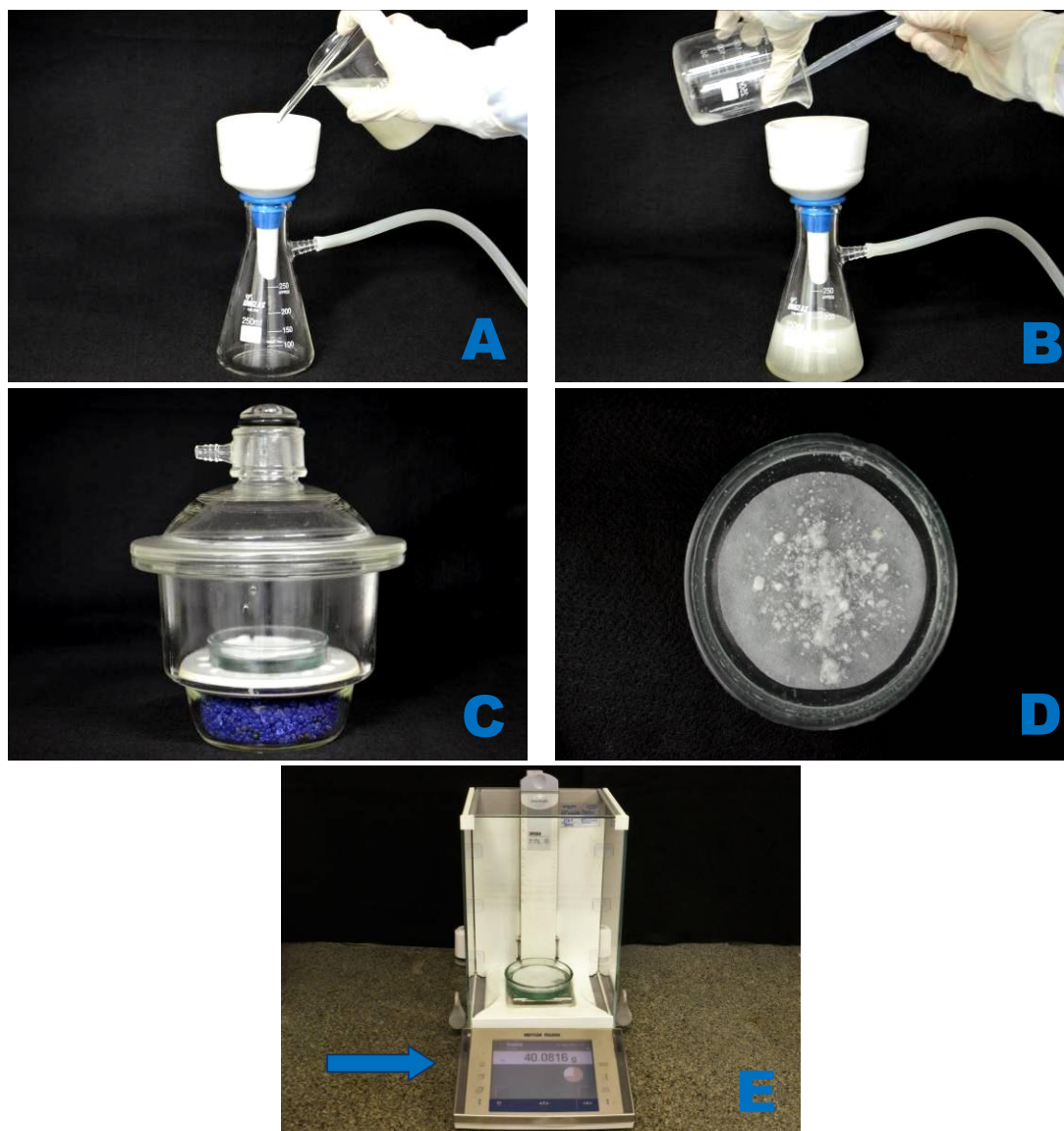
Figura 3 - Determinação coeficiente de solubilidade 1



Legenda: a) Posicionamento do frasco tipo Becker contendo 100 g de peróxido no agitador magnético com barra magnética; b) Pesagem de 100g de sal a ser testado na balança analítica; c) Dissolução do sal de cálcio no peróxido de hidrogênio à 35%; d) Partículas em suspensão e depositadas no fundo do frasco tipo Becker; e) Remanescentes de sais de cálcio não utilizado sendo pesado na balança analítica; f) Filtro de papel do funil de Buchner sendo umedecido.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4- Determinação coeficiente de solubilidade 2



Legenda: a) Transferência analítica da solução para o sistema de filtração a vácuo; b) Com o auxílio da pipeta Pasteur foi realizada retirada de todos os sais do frasco tipo Becker; c) Papel de filtro levado ao dessecador com sílica para secagem; d) Resíduos de sais de cálcio secos no filtro de papel; e) Pesagem no papel de filtro com os resíduos de sais de cálcio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O Coeficiente de solubilidade (CS) foi calculada através da fórmula a seguir:

$$CS = 100 \times (m_1/m_2)$$

Onde:

CS= coeficiente de solubilidade

m_1 = massa do soluto adicionada – quantidade não dissolvida

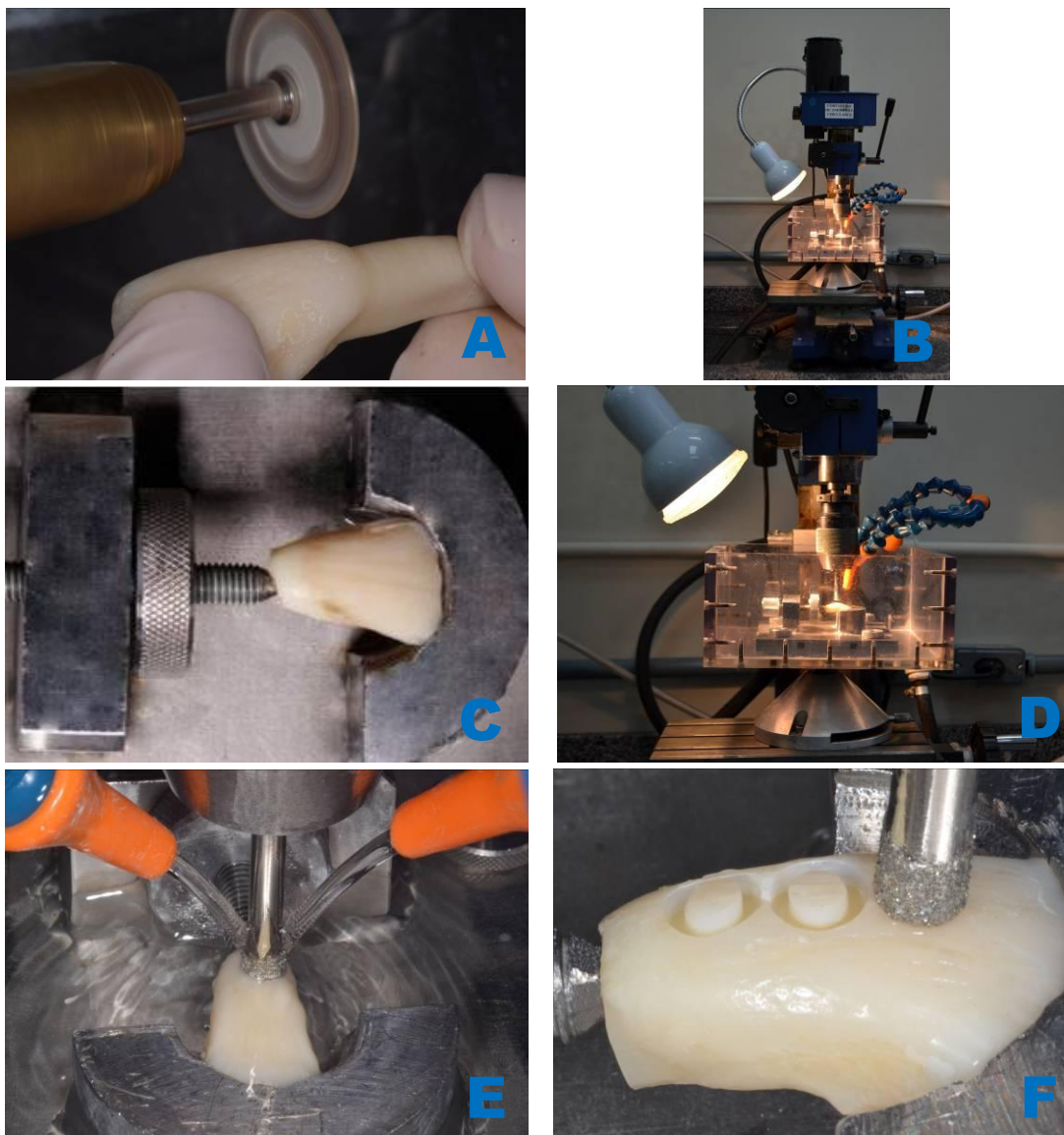
m_2 = massa do solvente (100g de peróxido de hidrogênio a 35%)

4.4 Preparo dos Espécimes

Foram utilizados dentes incisivos bovinos extraídos, obtidos de animais recém-abatidos. Eles foram limpos com curetas de periodontia para remover todos os resíduos de tecidos moles e armazenados em solução de timol a 0,1%, pH 7,0, durante o período de preparo dos espécimes (Attin et al., 2007b).

Os dentes foram seccionados transversalmente, abaixo da junção amelo-cementária, utilizando um disco diamantado (Dremel, Racine, WI, Estados Unidos) acoplado a um torno de alta rotação (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil), removendo-se as raízes (Figura 5A). Espécimes em formato circular foram recortados da superfície vestibular dos dentes, utilizando uma ponta diamantada tipo trefina com 4 mm de diâmetro interno, em um equipamento de corte de amostras circulares sob constante irrigação com água (Figura 5B). Os dentes foram estabilizados na morsa de fixação (Figura 5C), e posicionados dentro do recipiente de coleta de fluídos. A base do recipiente de coleta é conectada a uma articulação esférica que permite o alinhamento da superfície vestibular dos dentes, local onde foram obtidas as amostras, perpendicularmente ao longo eixo da ponta diamantada utilizada para o corte (Figura 5D). A ponta diamantada foi colocada em movimento rotatório, deslocada no sentido vertical sob irrigação abundante (Figura 5E e 5F). A partir da porção vestibular de cada coroa foram obtidas três amostras com diâmetro de 4 mm. No total foram obtidas 120 amostras que serão as unidades experimentais.

Figura 5 – Corte dos espécimes

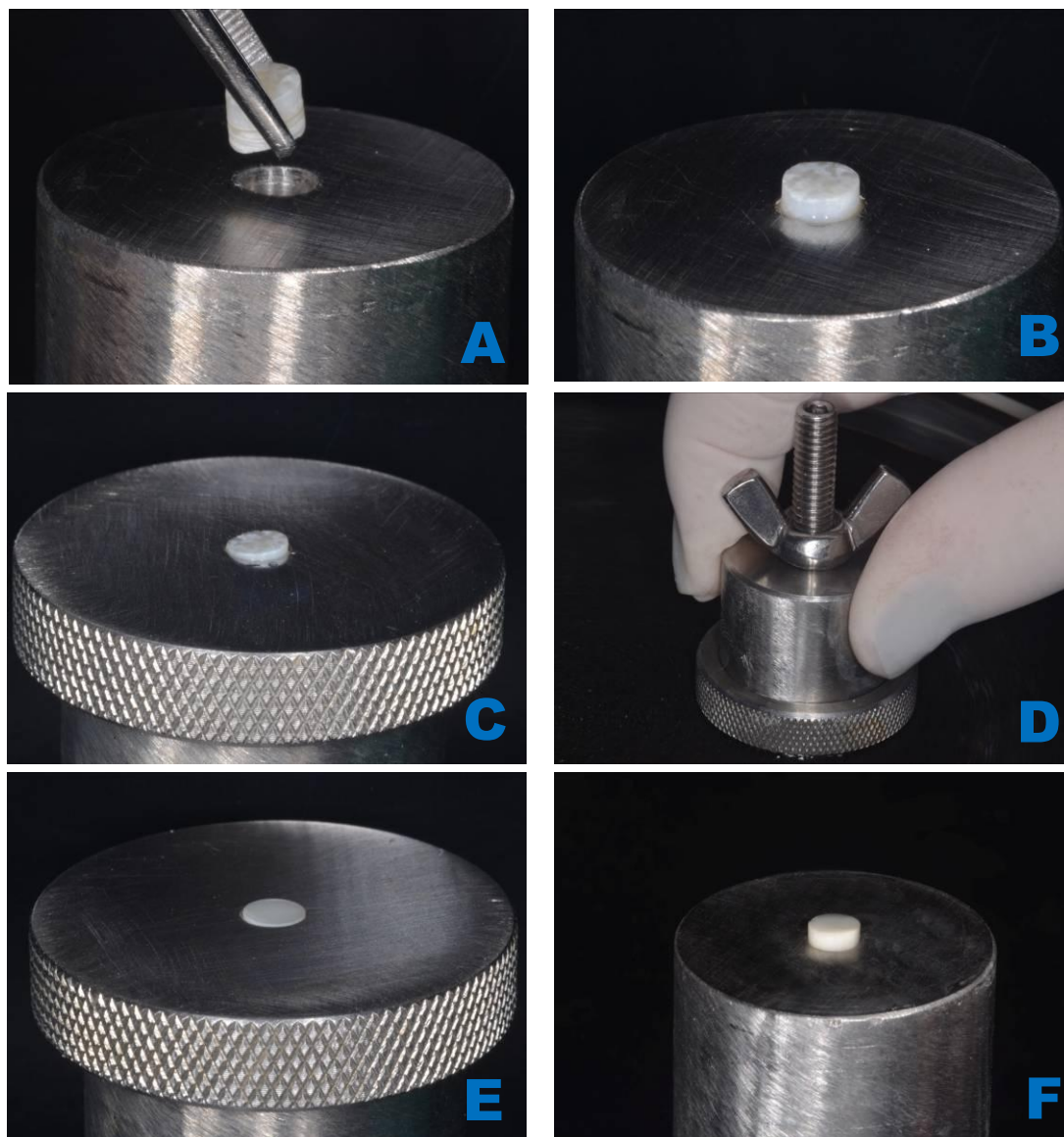


Legenda: a) Separação coroa-raiz em torno da alta rotação; b) Máquina para corte de amostras circulares (UNESP – São José dos Campos); c) Morsa de fixação de dentes bovinos; d) Alinhamento da câmara de coleta de água para que a superfície vestibular do incisivo ficasse perpendicular ao longo eixo da trefina; e e f) Corte dos espécimes circulares.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A espessura do esmalte e dentina foram padronizadas em 1 mm para cada, visando simular a espessura desses tecidos em um incisivo central (Harris, Hicks, 1998; Murray et al., 2002). Para essa padronização, os espécimes foram posicionados em um dispositivo metálico para desgaste, que possui uma perfuração 0,1mm maior que o diâmetro do mesmo. As amostras dos dentes bovinos foram colocadas no orifício com a dentina voltada para baixo e o limite amelo-dentinário alinhado com a superfície do dispositivo, girando o parafuso na porção inferior (Figura 6A e 6B). A seguir foi adaptado sobre o dispositivo de desgaste um delimitador, com espessura de 1,1mm, sobressaindo o excesso de esmalte a ser removido para a superfície do dispositivo (Figura 6C). A seguir ele foi levado à politriz circular DP-10 (Panambra, São Paulo, SP, BR) com lixa de carbeto de silício com granulação P1200 (Fepa-P, Extec, Enfield, CT, USA) sobre refrigeração com água, até que o excesso fosse desgastado (Figura 6D e 6E), obtendo no final 1,1 mm de esmalte (Figura 6F).

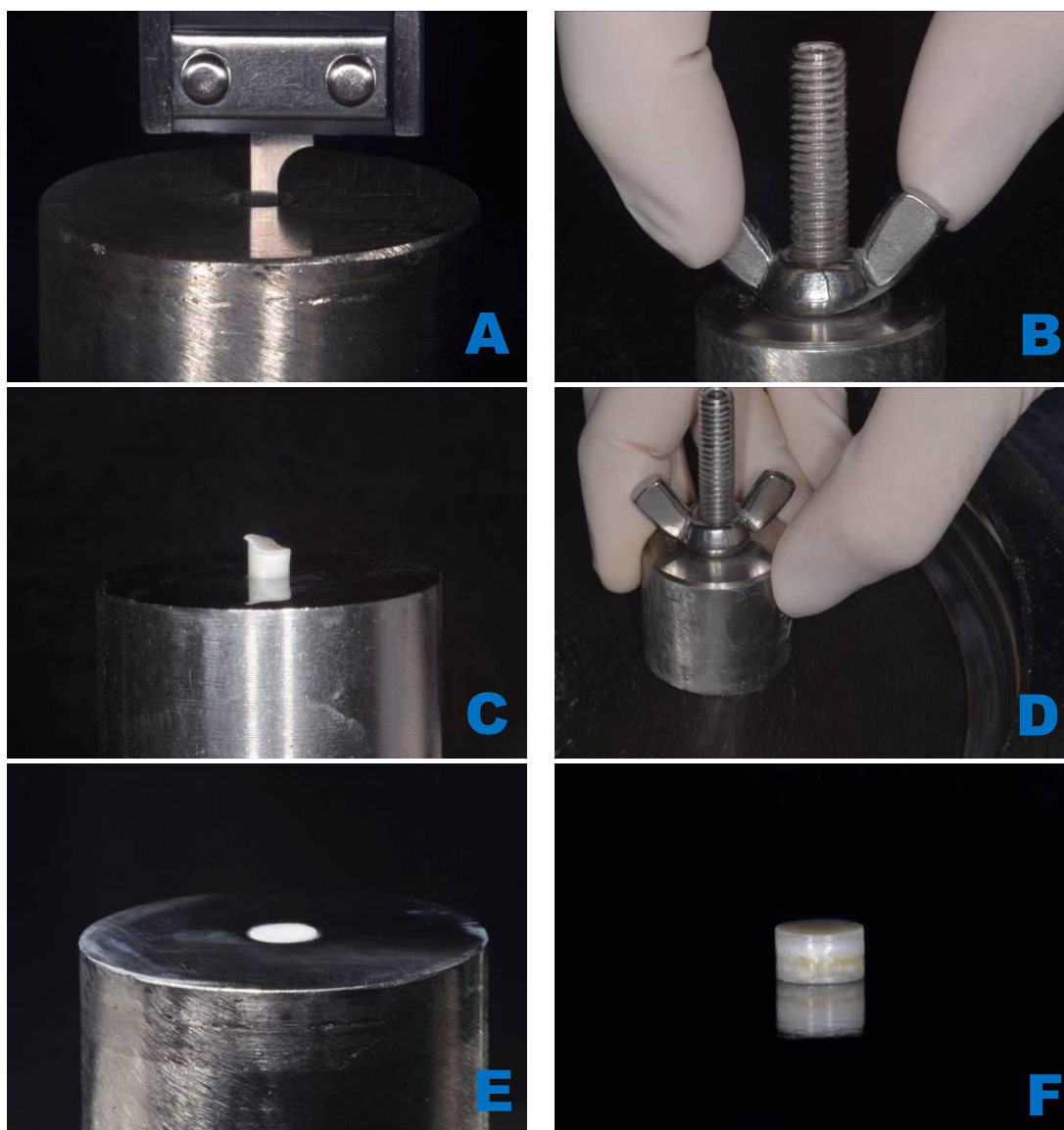
Figura 6 – Padronização da espessura do esmalte



Legenda: a e b) Posicionamento da amostra no orifício e alinhamento da superfície do suporte com o limite amelo-dentinário; c) Adaptação do anel de padronização de desgaste da superfície de esmalte; d) Desgaste na politriz; e) Superfície de esmalte polida na altura correta; f) Esmalte com 1,1mm.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A profundidade do orifício foi então ajustada e travada em 2,1 mm, utilizando um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil) (Figura 7A e 7B). O espécime foi posicionado com o esmalte desgastado voltado para baixo (Figura 7C), onde o excesso de dentina ficou para cima e além da superfície do dispositivo. A seguir realizamos o desgaste na politriz (Figura 7D), obtendo-se espécimes com 1,1mm de esmalte e 1mm de dentina (Figura 7E e 7F).

Figura 7 - Padronização da espessura da dentina



Legenda: a)Ajuste da profundidade do orifício em 2,1 mm com paquímetro; b)Travamento do dispositivo; c)Colocação do espécime com a dentina voltada para cima; d)Desgaste da dentina; e)Excesso de dentina removido;f) Espécime com dimensões adequadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir os espécimes foram embutidos em resina de cor branca, de forma a recobrir e proteger a dentina e a área lateral do esmalte da ação do agente clareador, que deveria ter contato apenas com a superfície externa, assim como acontece durante o tratamento clareador de dentes vitalizados. Para tal, as amostras foram inseridas em uma matriz de silicone com 6 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, contendo uma projeção na porção lateral que criou um sulco necessário para o reposicionamento da amostra no perfilômetro. No fundo dessa matriz existe uma cavidade em segundo nível com 4 mm de diâmetro e 0,1 mm de profundidade (Figura 8A). Os espécimes foram colocados no interior desta cavidade interna com a superfície do esmalte voltada para o fundo do molde (Figura 8B), o qual foi preenchido com resina acrílica de embutimento a frio Acrítec (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) adicionando à mesma 10% de dióxido de titânio (p/p) como pigmento. Essa resina foi escolhida por não sofrer alteração de cor quando exposta ao peróxido de hidrogênio, como se observa com as resinas acrílicas convencionais. A mistura foi realizada em uma centrífuga dual assimétrica (SpeedMixer, Hauschild Engineering, Alemanha) por 20 s (Figura 8C). A matriz foi preenchida utilizando uma pipeta tipo Pasteur. No final, obtivemos espécimes de esmalte embutidos, com exposição de uma área padronizada de esmalte (Figura 8D).

Figura 8- Embutimento dos espécimes



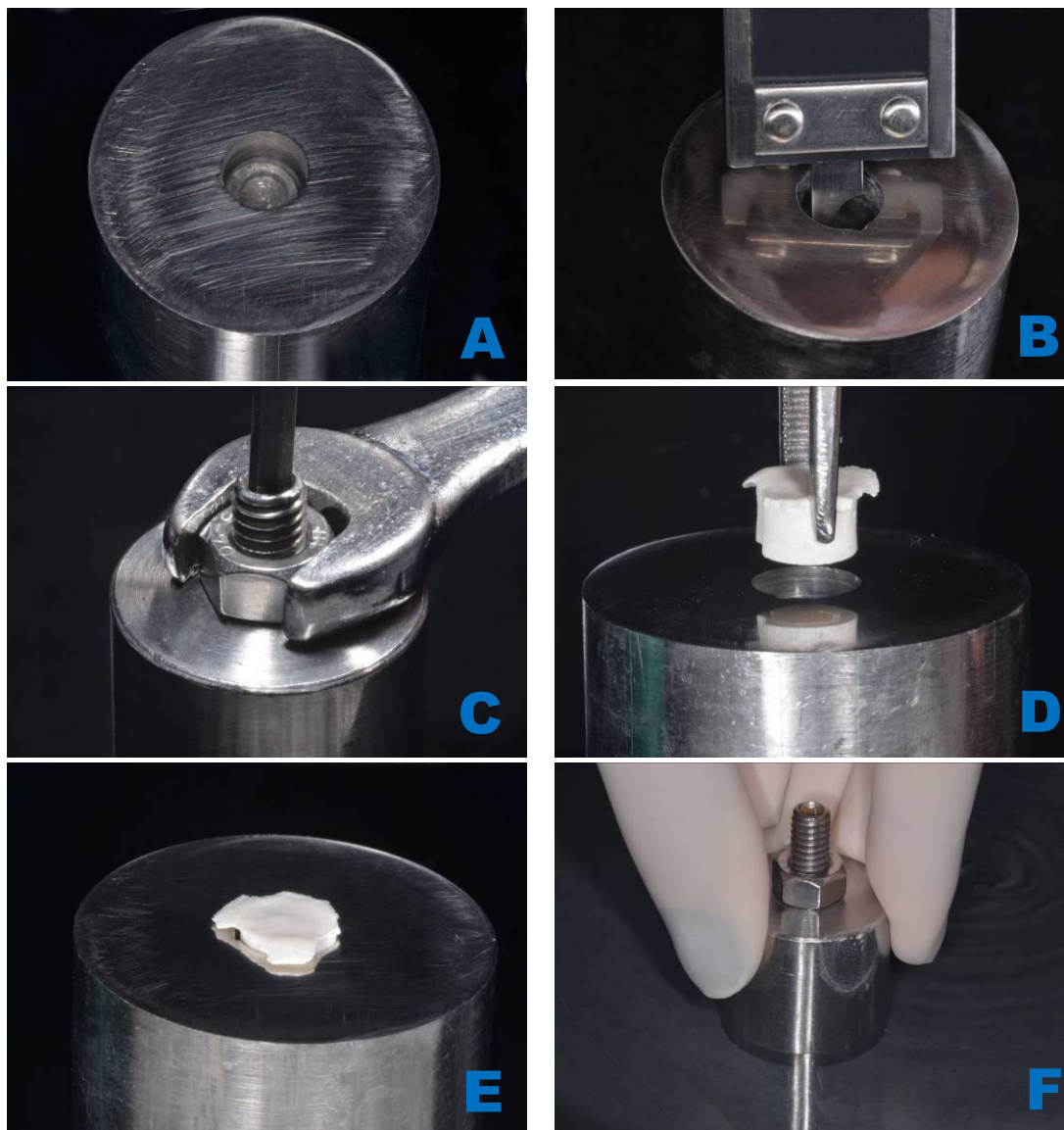
Legenda: a) Matriz de silicone com orifício de 6,0 mm de diâmetro e 2,1 mm de profundidade e cavidade em segundo nível; b) Posicionamento espécimes na matriz de silicone com a superfície do esmalte voltada para baixo; c) Aplicação da resina acrílica branca; d) Espécime embutido.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi realizado o polimento e padronização da superfície dos espécimes embutidos, empregando um suporte metálico para desgaste de amostras. Ele contém um orifício central de 6 mm de diâmetro, com uma cavidade em segundo nível de 4mm de diâmetro para acomodar a projeção do esmalte (Figuras 9A). A profundidade do orifício foi ajustada e travada em 3mm (Figuras 9B e 9C). O espécime foi posicionado no dispositivo com o esmalte voltado para a parte interna (Figura 9E), o qual foi posicionado sobre a plataforma de uma politriz circular munida com lixa de carbeto de silício de granulação P1200 (ExtecCorp., Enfield, CT, USA), para remoção de excesso de resina acrílica na base da amostra e padronização da espessura (Figura 9F). Em seguida a amostra foi invertida dentro do dispositivo, deixando a superfície do esmalte voltada para fora (Figura 10A), realizando o polimento para simular a lisura do esmalte natural e permitir a leitura da microdureza. Foram empregadas as lixas de carbeto de silício de granulação P1200,

P2400 e P4000 (ExtecCorp., Enfield, CT, USA), sob refrigeração com água, por 30 s, 60 s e 2 min respectivamente (Figura 10B e 10C). Entre as lixas e ao final, os espécimes foram lavados em banho ultrassônico na UltrasonicCleaner (Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil), durante 10 min com água tipo II, para retirar resíduos de abrasivos que pudessem interferir na lisura da superfície polida, finalizando seu aspecto (Figura10D).

Os espécimes foram enumerados, na porção inferior em resina, utilizando uma ponta diamantada 1011 acoplada em caneta de alta rotação. A seguir foram colocados em tubos tipo Eppendorf individuais, os quais foram preenchidos com 2ml saliva artificial, segundo a formulação proposta por Gohring et al., (2004), com pH ajustado para 7, permanecendo por 14 dias com trocas diárias, permitindo reidratação das amostras e estabilização das trocas minerais entre o esmalte e a solução.

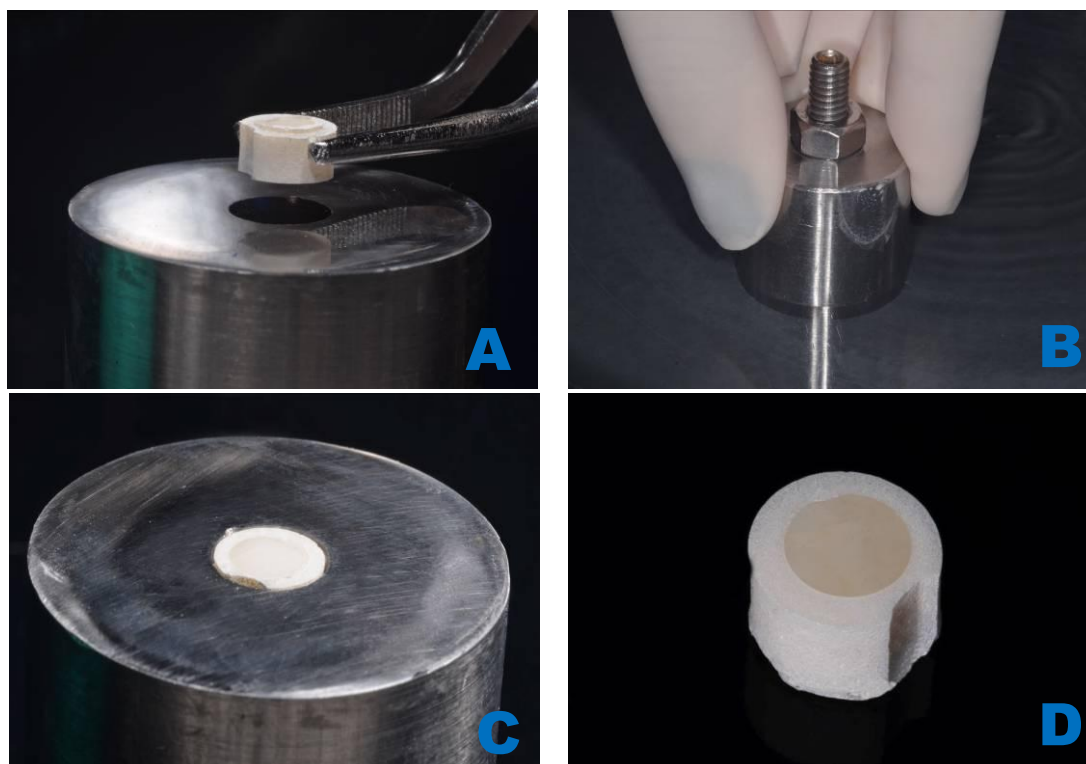
Figura 9 – Padronização espessura do espécime com resina acrílica branca



Legenda: a) Suporte metálico com a cavidade em segundo nível para acomodação da projeção de esmalte; b e c) Ajuste da profundidade do orifício em 3 mm com paquímetro digital e travamento; d) Colocação do espécime no suporte metálico com o esmalte voltado para baixo; e e f) Desgaste da primeira porção.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - Padronização dos espécimes embutidos em resina acrílica branca

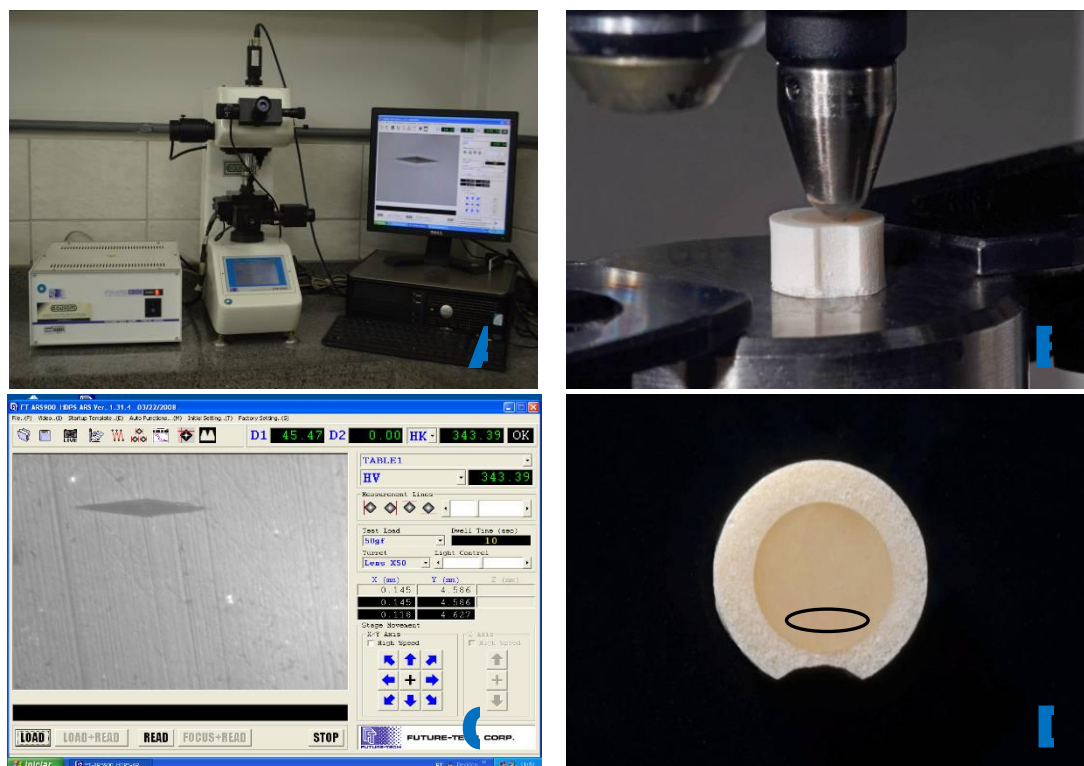


Legenda: a) Colocação do espécime no suporte metálico com o esmalte voltado para cima; b) Desgaste da segunda porção; c) Após o polimento final; d) Espécime Final.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Leitura inicial da microdureza

Os valores iniciais de microdureza do esmalte em todos os espécimes foram mensurados utilizando um microdurômetro com indentador KnoopFM-700 (Future-Tech, Tóquio, Japão) (Figura 11A), empregando uma carga de 50g e tempo de permanência de 10 segundos (Figura 11B e 11C). Três indentações foram realizadas em cada amostra, calculando-se a média desses valores. A área onde foram realizadas as indentações no esmalte correspondem à porção próxima ao sulco lateral em forma de curva na resina de embutimento, pois nesse local não ocorreria interferências na leitura dos perfis da superfície para obtenção dos valores de rugosidade (Figura 11 D).

Figura 11 – Leitura microdureza inicial



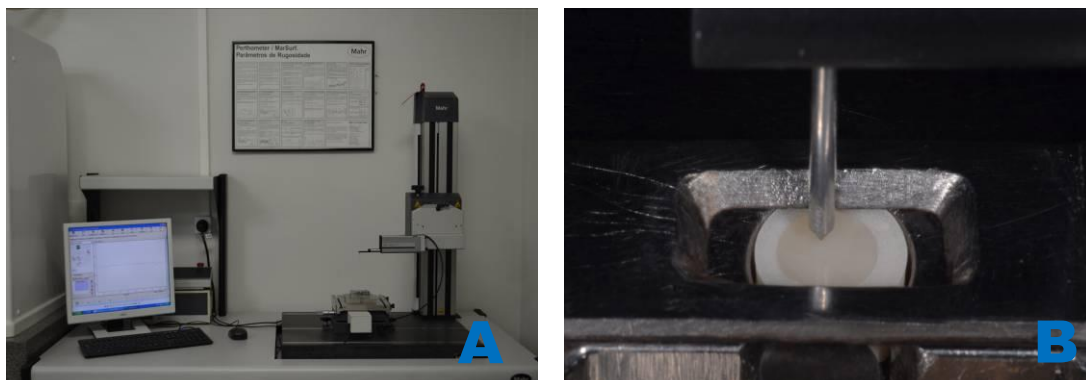
Legenda: a) Microdurômetro com indentador Knoop; b) Indentação sendo realizada na superfície do esmalte; c) Imagem da indentação observada no software; d) Local das onde foram realizadas as indentações.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Leitura inicial da Rugosidade

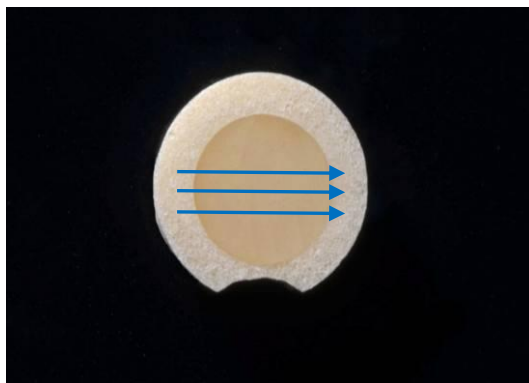
A rugosidade superficial média (R_a) foi mensurada com perfilômetro de contato MarSurf GD 25 (Mahr, Goettingen, Alemanha) (Figura 12A), com a ajuda do software (MarSurf XCR 20 4.50-07SP3). Utilizou-se um cut-off de 0,250 mm, comprimento transversal de 4,807mm e velocidade média de 0,5 mm/s. Os espécimes foram inseridos em um sistema de reposicionamento que os manteve sempre na mesma posição, padronizando os locais onde foram realizadas as leituras iniciais e finais da superfície dos mesmos (Figura 12B). Foram realizadas três varreduras de 4,20 mm, a uma distância de 0,24mm entre elas, obtendo três leituras para cada amostra (Figura 13).

Figura 12 – Leitura da rugosidade em um perfilômetro de contato



Legenda: a) Perfilômetro de contato; b) Leitura com espécime posicionado.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 – Esquema representativo das três varreduras a serem realizadas durante a leitura da rugosidade



Fonte: Elaborada pelo autor.

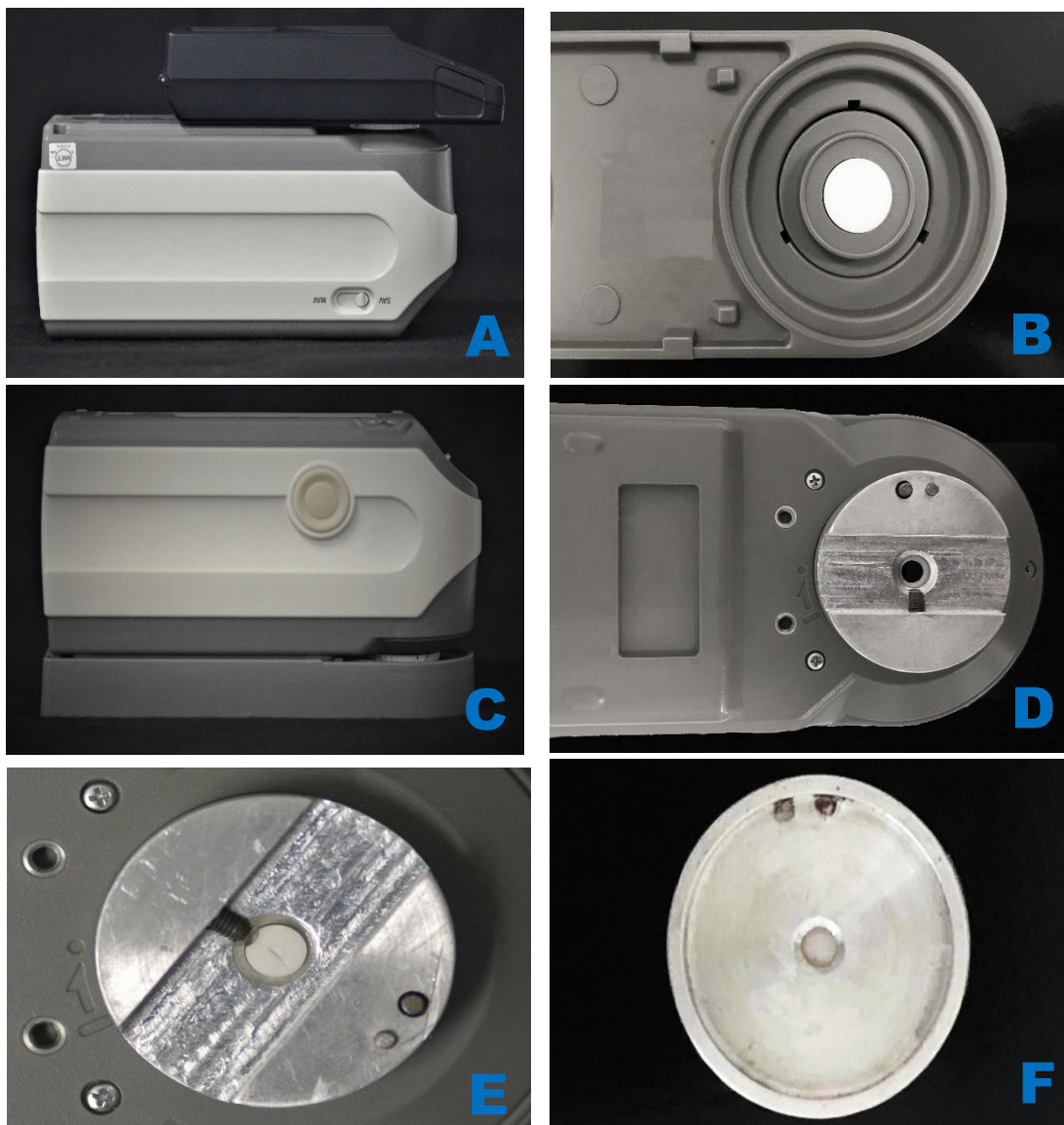
4.7 Leitura Inicial da Cor

A leitura inicial da cor foi realizada utilizando um espectrofotômetro colorimétrico de reflectância CM 2600d (Konica Minolta, Osaka, Japan). O aparelho foi configurado para o iluminante padrão D65 com 100% de UV incluso, ângulo do observador de 2° e componente especular incluso (SCI). O aparelho foi ajustado para a leitura de pequenas amostras (SAV) e calibrado com relação ao preto (Figura

14A) e branco, segundo os padrões fornecidos pelo fabricante (Figura 14B e 14C). Para a leitura da cor apenas da superfície do esmalte, um suporte de amostra que funciona como uma máscara com orifício de 3,5 mm de diâmetro foi posicionada na área de leitura do aparelho. Isso impediu que a cor da resina de embutimento fosse lida simultaneamente (Figura 14D). Os espécimes foram removidos da saliva artificial sendo o excesso de umidade eliminado com papel absorvente e imediatamente levados ao orifício do suporte de posicionamento (Figura 14E). Esse suporte possui um pino de alinhamento que faz com que a amostra seja obrigatoriamente posicionada sempre da mesma forma, adaptando-se ao entalhe da resina de embutimento, determinando a área de leitura no espécime, padronizando a leitura da vista interna (Figura 14F). Foram realizadas três leituras consecutivas da cor. Os dados de reflectância foram convertidos nas coordenadas cromática L^* a^* b^* , utilizando o software Spectramagic NX (Konica Minolta, Osaka, Japan), sendo uma média automaticamente calculada. Após a leitura os espécimes foram removidos do aparelho e guardados novamente nos tubos Eppendorf contendo saliva artificial.

Após a leitura de cor inicial o aparelho foi desligado. A seguir o sistema todo foi reiniciado, refeitos os ajustes e calibrações e uma nova leitura de cor foi realizada, sendo a diferença de cor entre as duas leituras calculada. Essa segunda leitura teve por objetivo determinar a incerteza do método de leitura. Ou seja, a partir de qual valor de variação da percepção de cor pode-se considerar que o efeito observado foi causado pelo tratamento e não pelo método. Foi determinado que um valor de ΔE^*_{ab} de 0,7 e ΔE^*_{00} 0,5 representam a incerteza do processo de leitura empregado.

Figura 14 – Leitura cor inicial



Legenda: a) Dispositivo para a calibração do preto absoluto posicionado sobre o aparelho; b) Cerâmica padronizada para a calibração do branco; c) Aparelho em posição de calibração do branco; d) Máscara para leitura da cor das amostras em posição; e) Colocação do espécime; f) Vista interna da máscara de leitura com espécime em posição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Distribuição dos grupos experimentais

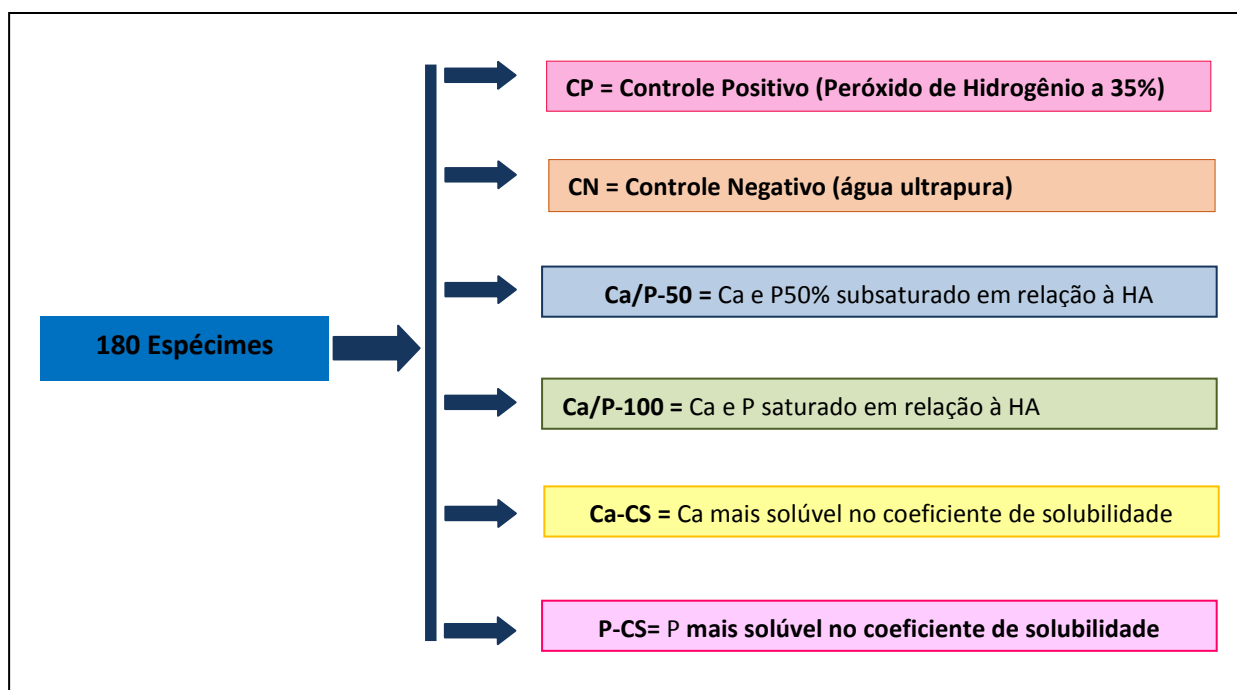
Os espécimes foram estratificados em seis grupos ($n=20$) de acordo com os valores de microdureza inicial, de forma a garantir que médias similares estivessem

presentes nos diferentes grupos. Uma análise estatística foi realizada, empregando o teste de ANOVA a um fator, para se certificar da ausência de diferenças significativas entre eles com relação à microdureza, rugosidade superficial e aos valores das coordenadas cromáticas L^* , a^* e b^* .

No total são dois grupos controles e quatro experimentais (n=20). No grupo controle negativo (CN) as amostras foram tratadas com água ultrapura. No grupo controle positivo (CP) o tratamento clareador foi realizado com uma solução de peróxido de hidrogênio a 35%, ajustada ao pH 7 com hidróxido de sódio, sem qualquer aditivo, servindo como referência do efeito desmineralizante do peróxido. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com as quantidades de cálcio e/ou fósforo adicionadas em cada formulação clareadora, a base de peróxido de hidrogênio à 35%, de acordo com a saturação em relação à hidroxiapatita (HA) e o coeficiente de solubilidade, conforme mostrado de forma esquemática na Figura 15 e descrito a seguir:

- **Ca/P-50** – Solução de peróxido de hidrogênio a 35% suplementado com Ca e P50% subsaturados em relação à HA;
- **Ca/P-100** – Solução de peróxido de hidrogênio a 35% suplementado com Ca e P100% saturado em relação à HA;
- **Ca-Cs** – Solução de peróxido de hidrogênio a 35% suplementado com o a quantidade correspondente ao coeficiente de solubilidade do sal de Ca mais solúvel;
- **P-Cs** – Solução de peróxido de hidrogênio a 35% suplementado com a quantidade correspondente ao coeficiente de solubilidade do sal de P mais solúvel.

Figura 15 – Divisão dos grupos controles e experimentais



Legenda: Esquema da distribuição dos diferentes grupos.

Fonte: Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Preparo das soluções clareadoras

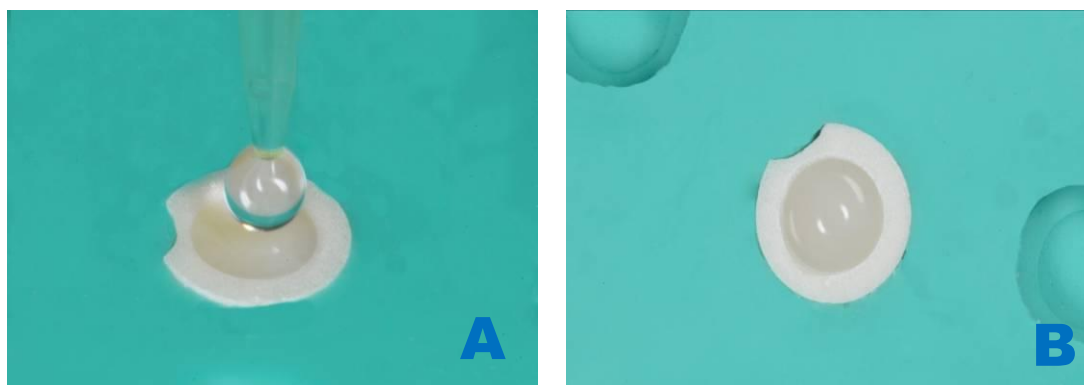
Para o clareamento dos espécimes foi preparada uma solução de peróxido de hidrogênio à 35% (p/p). Essa solução foi obtida diluindo-se uma solução concentrada de peróxido de hidrogênio à 60% (p/p) (Kolovec do Brasil, Diadema, São Paulo, Brasil). Para ter certeza que a concentração correta de peróxido de hidrogênio estaria presente, foi realizado uma titulação usando permanganato de potássio (KMnO_4) a 0,1N e o titulador HI 902CI-02 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA) conforme a metodologia já descrita. A mesma solução de peróxido de hidrogênio a 35% foi empregada em todos os grupos.

Os sais de cálcio e fósforo mais solúveis foram adicionados ao peróxido de hidrogênio, em quantidades determinadas pela primeira parte do experimento, que atingiu a concentração necessária para obter o nível de saturação desejado em relação à hidroxiapatita. Após as adições, de acordo com os grupos, o pH de cada

solução foi mensurado utilizando um pH metro Seven Multi (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) e ajustado a 7 empregando uma solução de hidróxido de sódio a 2,5M. Esse ajuste foi realizado dentro de um frasco tipo Becker contendo uma barra magnética, sobre um agitador magnético rotacionando a 800rpm. Nenhum agente espessante foi associado ao agente clareador, tendo em vista que o espessante por si poderia induzir a desmineralização do esmalte, dificultando a interpretação dos resultados desse estudo (Lima et al., 2008).

Os espécimes foram posicionados em um suporte preparado em silicone (Silibor Clássico, São Paulo, SP, Brasil) que possui orifícios com as dimensões exatas das amostras. Um volume de 10 µl das respectivas soluções clareadoras foram aplicadas sobre as amostras utilizando uma pipeta automática (Figura 16A e 16B). Decorrido o período de 20 min, a solução sobre as 20 amostras foi aspirada com o auxílio de uma pipeta, permitindo que a leitura da concentração de peróxido fosse realizada. Uma nova solução foi reaplicada mais duas vezes, totalizando 60 min em contato com a estrutura dental. Como três aplicações foram realizadas, três leituras da concentração de peróxido ao final do tratamento foram obtidas, das quais foi calculada uma média.

Figura 16- Tratamento clareador



Legenda: a) Aplicação da solução clareadora nos espécimes; b) Solução sobre o espécime.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10 Leituras finais de cor, microdureza e rugosidade

Imediatamente após o tratamento clareador, a microdureza e a rugosidade superficial foram avaliadas para verificação dos efeitos imediatos. A seguir as amostras foram devolvidas aos tubos Eppendorfs e imersos em 2ml de saliva artificial por 7 dias com trocas diárias, para reidratação e liberação do peróxido que penetrou na estrutura dental. Após esse período a leitura da cor final foi realizada.

4.11 Cálculo do efeito clareador

Os valores das coordenadas cromáticas L^* , a^* e b^* na avaliação inicial e final foram utilizadas para o cálculo da variação da sensação da cor, que foi calculada automaticamente pelo software Spectramagic NX, através das fórmulas ΔE^*_{ab} , e ΔE^*_{00} , propostas pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), conforme mostrado a seguir:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$\Delta E^*_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2 + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}}$$

4.12 Planejamento estatístico

As seguintes hipóteses estatísticas de nulidade foram avaliadas:

- H_{0a} – A adição de sais de cálcio e fósforo em diferentes concentrações à solução de peróxido de hidrogênio não influencia a microdureza superficial do esmalte dental;

- H_{0b} – A adição de sais de cálcio e fósforo em diferentes concentrações à solução de peróxido de hidrogênio não influencia a rugosidade de superfície do esmalte dental;
- H_{0c} – A adição de sais de cálcio e fósforo em diferentes concentrações à solução de peróxido de hidrogênio não influencia o efeito clareador;
- H_{0d} – Os grupos experimentais não apresentam diferenças significativas em relação ao grupos controle positivo e grupo controle negativo.

A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram avaliados pelos testes de Komolgorov-Smirnov e Levene. Como uma distribuição normal foi constatada os testes de análise de variância (ANOVA) a um fator e teste de Tukey foram empregados. Para todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os coeficientes de solubilidade dos diferentes sais de cálcio e fósforo e as concentrações resultantes podem ser observadas na Tabela 1. Os mais solúveis foram o lactato de cálcio e o fosfato de sódio bibásico.

Tabela 1 – Coeficiente de solubilidade (CS) dos diferentes sais de cálcio e fósforo em peróxido de hidrogênio a 35% e pH 7, massa molar (m) dos sais, concentração molar dos sais (M_{sal}) e concentração molar de cálcio ou fósforo nessas soluções ($M_{\text{Ca ou P}}$)

	Substâncias	CS*	Fórmula	m^{**}	M_{sal}^{***}	$M_{\text{Ca ou P}}^{***}$
Cálcio	Gluconato de cálcio	0,22	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14}$	430,37	5,11	5,11
	Hidróxido de cálcio	0,23	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	74,09	31,0	31,0
	Sulfato de cálcio	0,26	$\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$	145,14	17,91	17,91
	Óxido de cálcio	0,29	CaO	56,07	51,72	51,72
	Citrato de cálcio	2,66	$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	570,50	46,62	139,86
	Lactato de cálcio	8,18	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	308,27	265,3	265,35
Fósforo	Fosfato de zinco	0,79	$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$	386,11	20,46	40,92
	Fosfato de cálcio	1,8	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	309,80	58,10	116,20
	Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado	47,16	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358,08	1317,02	1317,02

*g/100ml; **g/mol; ***mmol/L

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise do ponto de saturação do Ca e P em peróxido hidrogênio a 35% em relação ao esmalte mostrou uma concentração de cálcio de 0,356 ($\pm 0,2$) mmol/L, enquanto a de fósforo foi de 2,776 ($\pm 2,0$) mmol/L.

Os dados de microdureza e rugosidade obtidos nas avaliações inicial e final foram submetidos ao teste de ANOVA a um fator. Diferenças significativas foram observadas apenas para os dados das avaliações finais (Tabela 2), sendo esses submetidos ao teste de Tukey. Observa-se que o grupo controle positivo apresentou rugosidade significativamente maior e microdureza significativamente menor que o grupo controle negativo. O grupo Ca-P/50% apresentou valores de rugosidade e

microdureza menor e em relação ao grupo controle positivo, e maiores em relação aos demais grupos, mostrando que a adição de cálcio e fósforo 50% subsaturado não foi capaz de interromper o processo de desmineralização dental como os grupos Ca-P/100%, Ca-CS e P-CS. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo. Nos gráficos das Figuras 17 e 18 são apresentadas as médias e desvios-padrão das diferentes leituras para rugosidade e microdureza, respectivamente.

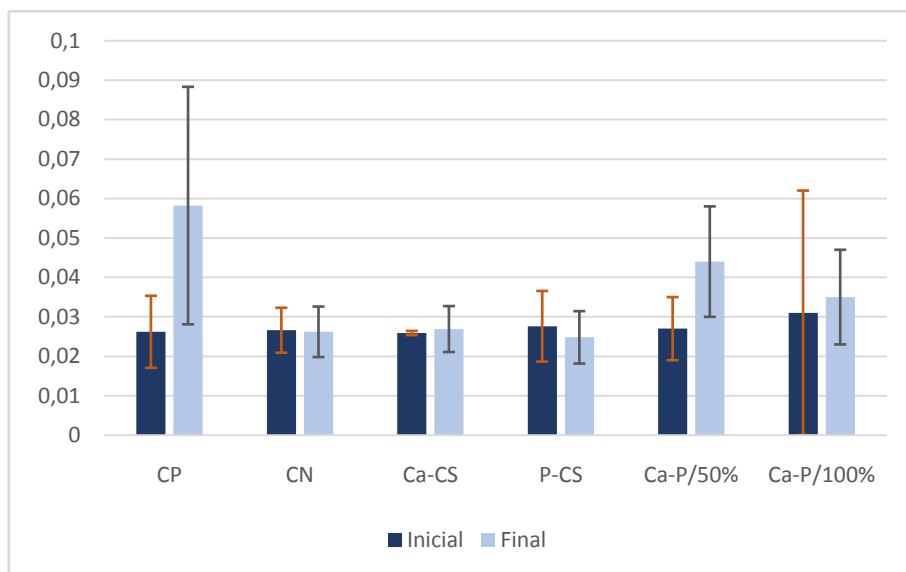
Tabela 2 – Médias e desvios-padrão da microdureza e rugosidade para os diferentes grupos e resultados dos testes de ANOVA a um fator e Tukey

Grupos*	Rugosidade inicial	Rugosidade final	Microdureza inicial	Microdureza final
CN	0,025(0,005) ^a	0,025 (0,006) ^a	334,99(24,45) ^a	334,48(18,27) ^a
CP	0,026 (0,009) ^a	0,067 (0,030) ^b	334,47(18,26) ^a	226,01(17,49) ^b
Ca-CS	0,025 (0,005) ^a	0,022 (0,005) ^a	329,19(18,97) ^a	331,93(23,64) ^a
P-CS	0,027 (0,008) ^a	0,025 (0,006) ^a	335,19(22,75) ^a	318,11(19,25) ^a
Ca-P/50%	0,027 (0,008) a	0,044 (0,014) c	333,02(27,83) ^a	278,86(17,49) c
Ca-P/100%	0,031 (0,014) a	0,035 (0,012) a	330,62(24,91) ^a	339,31(28,47) ^a
ANOVA**	p=0,515	p=0,001**	p=0,987	p=0,001**

*Grupos seguidos de letras diferentes nas colunas apresentam diferenças significativas; **Diferenças significativas para o teste de ANOVA.

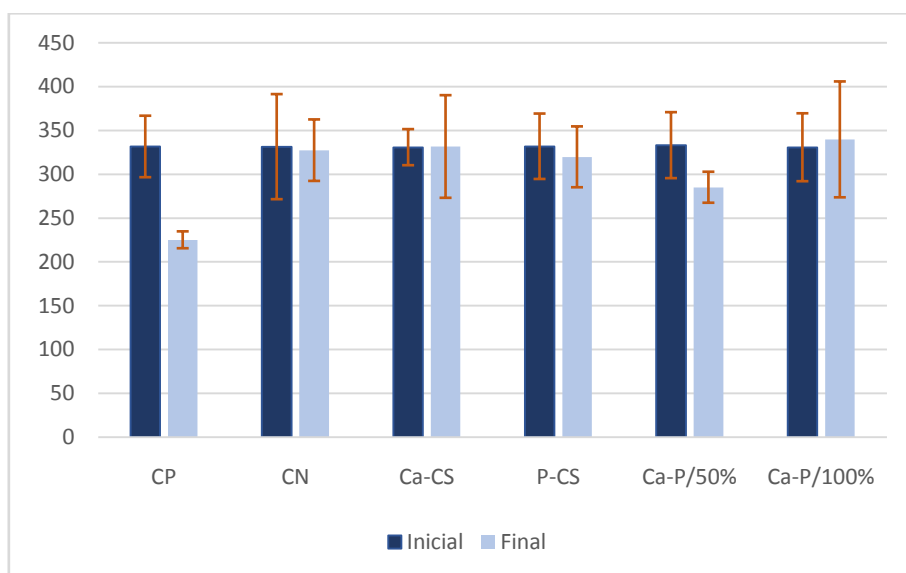
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Médias e desvios-padrão dos valores absolutos da rugosidade inicial e final



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Médias e desvios-padrão dos valores absolutos da microdureza inicial e final



Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação ao efeito clareador, os resultados da ANOVA mostraram diferenças significativas para os dados da variação da percepção de cor (ΔE^*_{ab} e

ΔE^*_{00}). Os valores das médias e desvios-padrão dos grupos e os resultados do teste de Tukey podem ser observados na Tabela 3 e Figuras 19 e 20. O grupo controle positivo e os grupos experimentais diferiram significativamente do grupo controle negativo. Observa-se que a adição dos sais na composição dos clareadores nos grupos experimentais não influenciaram a mudança de cor das amostras em relação ao controle positivo.

Tabela 3 – Médias e desvio-padrão de ΔE^*_{ab} e ΔE^*_{00} para os diferentes grupos, resultados dos testes de ANOVA a um fator e Tukey

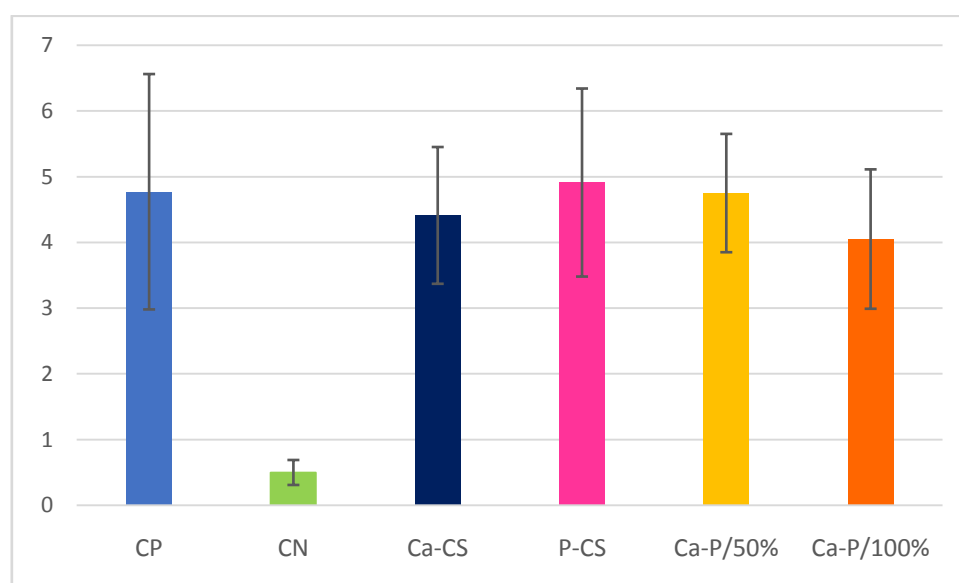
Grupos	$\Delta E^*_{ab}^{**}$	$\Delta E^*_{00}^{**}$
CN	0,50(0,19) ^a	0,45(0,16) ^a
CP	4,77(1,79) ^b	3,79(1,44) ^b
Ca-CS	4,41(1,04) ^b	3,63(0,85) ^b
P-CS	4,91(1,43) ^b	2,97(1,75) ^b
Ca-P/50%	4,75(0,90) ^b	3,07(0,59) ^b
Ca-P/100%	4,05(1,06) ^b	3,38(0,80) ^b
ANOVA	p=0,001***	p=0,001***

**Grupos seguidos de letras diferentes nas colunas apresentam diferenças significativas,

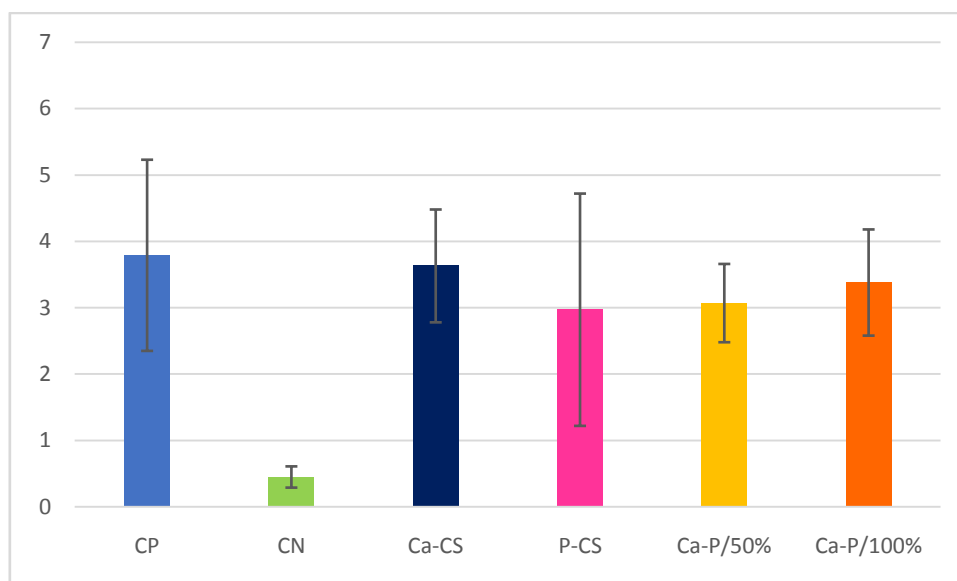
***Diferenças significativas para a ANOVA

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Médias e desvios-padrão da variação da percepção de cor (ΔE^*_{ab})



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20–Médias e desvios-padrão da variação da percepção de cor (ΔE^*_{00})

Fonte: Elaborada pelo autor.

As médias dos valores absolutos de L^* , a^* e b^* para todos os grupos, antes e após os tratamentos, podem ser observados na Tabela 4, assim como os resultados do teste de ANOVA a 1 fator. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos na avaliação inicial. Verifica-se que os grupos que receberam clareamento mostraram um aumento nos valores de L^* e redução nos valores de b^* , indicando que os dentes ficaram mais claros e menos amarelos. Mudanças muito pequenas numericamente foram observadas nos valores de a^* .

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão das coordenadas cromáticas $L^*a^*b^*$

Grupos**	L^*		a^*		b^*	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
CN	74,41(2,75) ^a	74,80(2,91) ^a	-1,16(0,55) ^a	-1,15(0,66) ^a	5,13(2,95) ^a	5,82(2,92) ^a
CP	74,02(3,24) ^b	77,21(3,13) ^b	-0,60(0,93) ^b	-0,48(0,81) ^b	6,38(3,09) ^b	2,81(3,12) ^b
Ca-CS	73,84(2,07) ^b	76,38(2,54) ^b	-0,46(0,95) ^b	-0,35(0,86) ^b	4,50(3,00) ^b	1,81(2,22) ^b
P-CS	73,99(3,00) ^b	76,11(3,18) ^b	-0,70(0,89) ^b	-0,59(0,83) ^b	4,57(3,23) ^b	1,16(2,14) ^b
Ca-P/50%	74,95(2,29) ^b	78,03(2,47) ^b	-0,67(0,70) ^b	-0,50(0,58) ^b	4,02(2,05) ^b	0,61(1,68) ^b
Ca-P/100%	73,44(3,32) ^b	75,73(3,33) ^b	-0,15(0,99) ^b	-0,208(0,88) ^b	4,33(2,40) ^b	1,20(2,12) ^b
ANOVA	0,6051	0,0108 [#]	0,0139	0,0059 [#]	0,1080	0,0001 [#]

**Grupos seguidos da mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas, #Diferenças significativas para a ANOVA

Fonte: Elaborada pelo autor.

As médias das concentrações de peróxido de hidrogênio (peso/peso) das soluções antes e após o clareamento, em todos os grupos, podem ser observados na Tabela 5. As concentrações de peróxido após 20 min da reação foram reduzidas em média de 7,71%, sendo menor para o grupo contendo cálcio e fósforo à 100%.

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão das concentrações iniciais (Ci) e finais (Cf) do peróxido de hidrogênio e percentual de redução da concentração (%)

Grupos*	Ci	Cf	%
CP	35,78(0,24)	31,75(0,43)	11,27
Ca-CS	35,75(0,14)	31,86(1,01)	10,88
P-CS	35,40(0,02)	32,48(1,11)	8,24
Ca-P/50%	35,601(0,61)	34,09(0,61)	4,22
Ca-P/100%	35,708(0,38)	34,28(0,32)	3,98

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Mudanças que podem ocorrer na estrutura dental após o tratamento clareador são relevantes, pois este é um dos procedimentos mais realizados atualmente durante os tratamentos odontológicos estéticos. Um dos efeitos associados a ele é a desmineralização do esmalte e consequente queda de dureza. Estudos prévios sugerem que a redução de dureza do esmalte pode torná-lo mais susceptível ao desgaste pela escovação, manchamento, erosão dentária e conteúdo mineral (Crastechini et al., 2018; Lewinstein et al., 2004; Santos et al., 2016; Al-Salehi et al., 2007).

Para garantir confiabilidade dos resultados da análise da dureza, as amostras foram estratificadas nos diferentes grupos, fazendo com que eles apresentassem médias similares. Quando submetidos à análise estatística, os valores iniciais de todos os parâmetros não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 2). Isso garante que todos os grupos possuíam as mesmas condições iniciais e os efeitos constatados deveram-se aos tratamentos realizados. Além disso, nenhum efeito significativo foi observado no grupo controle negativo (Tabela 2), o que indica que a metodologia empregada foi acurada, somente detectando variações quando efeitos expressivos estiveram presentes.

A desmineralização dentária é a perda de minerais da hidroxiapatita, particularmente cálcio e fósforo, que conferem sua alta dureza característica (Hegedus et al., 1999; Yeh et al., 2005). De uma forma geral, quando um corpo sólido é imerso em uma solução, na superfície de interface entre eles ocorre uma troca de componentes. Os íons deixam a superfície e se dissolvem na solução, ao mesmo tempo que o contrário também acontece, com íons deixando a solução e se juntando ao sólido. Quando essa troca de íons é igual, falamos que o sólido e a solução estão em equilíbrio. Se a solução é subsaturada, o sólido perde íons para a solução e se a solução está supersaturada ela perde íons para o sólido até encontrarem um equilíbrio. Esse equilíbrio varia com o pH e a concentração dos íons na solução onde está imerso (Shellis et al., 2012).

O potencial desmineralizante do agente clareador pode estar relacionado a quatro fatores específicos. O primeiro é a oxidação de moléculas orgânicas dentro

da estrutura cristalina do esmalte, o segundo é o baixo pH de alguns produtos, o terceiro é a ausência ou o pequeno conteúdo mineral das formulações clareadoras, e o último é a utilização de agentes espessantes com potencial quelante.

Com relação ao efeito sobre a porção orgânica do esmalte, sabe-se que durante o processo de clareamento o peróxido de hidrogênio libera radicais livres, que podem penetrar nas microporosidades da estrutura cristalina do esmalte e oxidar suas proteínas, como a enamelinina e amelogenina, que representam cerca de 1% do total do tecido, causando quebra das cadeias polipeptídicas por meio da quebra dos aminoácidos (Hegedus et al., 1999). Eimar et al. (2012) avaliaram dentes desproteinizados e dentes desmineralizados para determinar o efeito do peróxido de hidrogênio após a remoção dos componentes orgânicos e inorgânicos dos dentes. Um aumento de oxigênio foi observado nos dentes desmineralizados, indicando que uma reação de oxidação é mais intensa em dentes com alto conteúdo orgânico. Duas observações indicaram que o peróxido de hidrogênio clareia os dentes oxidando suas estruturas orgânicas: os dentes desproteinizados não se oxidaram e não se tornaram mais brancos com o clareamento. Como o conteúdo orgânico participa da integridade do esmalte, isso poderia causar indiretamente interferências no conteúdo mineral do esmalte (Jiang et al., 2008; Eimar et al., 2012). Contudo, no presente estudo, o efeito desmineralizante foi completamente eliminado quando a quantidade de íons cálcio e fósforo disponibilizados na solução, através da adição dos sais, foi maior que o ponto de saturação em relação à hidroxiapatita (Tabela 2).

Com relação ao pH, este influencia diretamente o efeito desmineralizante de qualquer substância em contato com o esmalte está intimamente ligado ao conceito de pH crítico. O pH crítico é aquele no qual a quantidade de íons H^+ na solução em contato com o sólido é tão alta que está se torna subsaturada de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} em relação à hidroxiapatita (Lussi, Hellwig, 2012). No caso da cárie dental, o cálculo do pH crítico de 5,5 foi realizado levando-se em consideração a concentração destes íons no fluido do biofilme, e em relação a cárie mesmo com o pH crítico, o clareador dental com adição de cálcio se mostrou efetivo na remineralização de lesões em esmalte (Buzalaf et al., 2011; Schemehorn, Novak, 2007). Contudo, no caso dos clareadores, o conteúdo destes íons na formulação do produto irá determinar o seu pH crítico, considerando que não existe biofilme na superfície e o produto contata diretamente o esmalte. Estudos anteriores mostraram que alimentos e bebidas

ácidas podem promover ou não a desmineralização do esmalte, dependendo de seu conteúdo mineral (Jensdottir et al., 2005; Lussi e Hellwig, 2012). Como exemplo temos o iogurte, que embora tenha um pH 3,9, não promove a desmineralização do esmalte por possuir alto conteúdo de cálcio (Barac et al., 2015; Lussi e Hellwig, 2012). Larsen e Nyvad (1999) relataram que em pH baixo, a solubilidade da hidroxiapatita aumenta. O nosso trabalho foi realizado com pH alto de 7, assim a solubilidade da hidroxiapatita é mais baixa, justificando os menores valores encontrados de cálcio e fósforo do ponto de saturação. Embora certos estudos não verificaram efeitos deletérios dos clareadores sobre a dureza do esmalte (Hegedus et al. 1999; Seghi e Denry. 1992), diversos outros mostraram que clareadores dentais com pH ácidos causam maior desmineralização e redução da microdureza quando comparados com agentes clareadores com pH mais elevado (Jiang et al., 2008; Xu et al., 2011; Magalhães et al., 2012). Porém, foi observado que clareadores com pHs neutros ou alcalinos, também causaram desmineralização do esmalte (Crastechini et al., 2018; Magalhães et al., 2012b; Moraes et al., 2015). No presente estudo, o grupo controle positivo que empregou uma solução de peróxido em pH 7 promoveu uma queda significativa da dureza, rejeitando a H_{0a} (Tabela 2, Figura 18). Isso deixa claro que o pH em si não pode ser utilizado como único parâmetro para prever se determinado clareador irá ou não promover desmineralização. O conteúdo mineral na formulação parece ser extremamente relevante.

Com relação ao teor de cálcio e fósforo, estudos sobre desmineralização dentária erosiva avaliaram a capacidade de bebidas ácidas em promover esse processo, evidenciando que a desmineralização depende da concentração destes elementos na composição das mesmas (Jensdottir et al., 2005; Magalhães et al., 2009). Alguns estudos testaram a adição de sais de cálcio e/ou fósforo à estas bebidas, o que resultou uma redução significativa do efeito desmineralizante das mesmas por torná-las saturadas quanto a esses íons em relação à hidroxiapatita (Larsen, Nyvad, 1999; Lussi et al., 1995, Attin et al., 2005). O que se observa em comum nos estudos citados é o fato de que a adição destes sais às bebidas não foram capazes de eliminar completamente o efeito erosivo. Isso pode estar relacionado ao fato de que a adição tenha sido inferior ao produto de solubilidade da hidroxiapatita para aquele determinado pH testado. Attin et al. (2003), demonstrou que a adição de cálcio em uma solução erosiva resultou em perda de esmalte

significativamente melhor do que a adição de fósforo. Outro estudo testou a adição da associação de cálcio e fósforo em bebidas erosivas (Magalhães et al., 2009). Porém, essa associação não impediu a erosão dentária e os autores sugeriram que estes íons reagiram uns com os outros dentro da bebida, reduzindo assim a quantidade de íons "livres" para interagir com a hidroxiapatita (Magalhães et al., 2009). Os resultados deste estudo corroboram com aqueles das pesquisas citadas. Tanto no grupo controle positivo, sem a adição de qualquer mineral, quanto no grupo onde a quantidade de cálcio e fósforo adicionadas corresponderam a 50% do ponto de saturação desses sais, uma desmineralização significativa foi constatada, com queda da dureza e aumento da rugosidade (Tabela 2, Figuras 17 e 18). Os sais com os maiores coeficientes de solubilidade testados foram o lactato de cálcio e o fósforo de sódio bibásico. A adição desses sais em quantidade corresponde ao coeficiente de solubilidade resultou em concentrações de cálcio e fósforo na solução de 265,35 mmol/L e 1317,02 mmol/L respectivamente (Tabela 1). Considerando que os pontos de saturação de cálcio e fósforo em relação ao esmalte dental em peróxido de hidrogênio foram 0,356 mmol/L e 2,776 mmol/L respectivamente, as quantidades utilizadas nesses grupos estavam 74.536% e 47.443% acima dos valores necessários para criar uma solução supersaturada, eliminando completamente o efeito desmineralizante da solução de peróxido (Tabela 1). Barbosa et al. (2012) obteve resultados parecidos com a adição de 5mmol/L e 10mmol/L de cálcio em bebidas ácidas, tipo cola, que preveniu completamente a erosão dentária, sendo esses valores de adição superiores ao ponto de saturação do nosso estudo, corroborando com os grupos Ca-Cs e P-Cs, onde a desmineralização foi totalmente controlada. Contudo, o mesmo efeito de inibição da desmineralização foi constatado quando a concentração correspondente exatamente ao ponto de saturação foi empregada, sugerindo que o uso de uma solução supersaturada pode não ser necessária (Tabela 2, Figura 18).

Uma redução significativa do efeito desmineralizante do clareamento foi observado após a adição de cálcio em estudos prévios (Borges et al., 2010; Cavalli et al., 2011; Santos et al., 2016). Porém nessas pesquisas, o efeito foi reduzido, mas não completamente eliminado. O que pode estar relacionado à concentração utilizada ou ao tipo de agente espessante empregado. Borges et al. (2010) utilizou fosfato de cálcio di-hidratado e a 2% em pH 8,06 e espessante CMC, que resultou

em uma concentração de 257,6mmol/l. Cavalli et al. (2011) empregou o cloreto de cálcio a 0,2% em pH 6,5 e espessante ecarbopol, que resulta numa concentração de cálcio de 18,0 mmol/l. Santos et al. (2016) empregou o gluconato de cálcio a 0,5% em pH 5,60 não citando o tipo de espessante usado, que resultou numa concentração de 11,6 mmol/l. Verifica-se que em todos os casos a concentração empregada era maior do que o ponto de saturação do cálcio observado em nosso estudo, que foi 0,356 mmol/L.

Pode-se observar que nos estudos de Cavalli et al. (2011) e Santos et al. (2016) as concentrações de cálcio foram significativamente menores o ponto de saturação determinado em nosso estudo, e no estudo de Borges os valores foram parecidos, porém com o pH diferente.

Os menores efeitos da adição do cálcio nos estudos de Cavalli et al. (2011) e Santos et al. (2016) poderia estar relacionado ao menor pH de seus produtos. Sabe-se que a solubilidade do mineral do dente é inversamente proporcional ao pH do meio, ou seja, quando o pH é menor e mais ácido, aumenta a concentração de íons hidrogênio no meio, aumentando a solubilidade do dente, fazendo com que perda de cálcio e fósforo seja maior, e vice-versa (Cury et al., 2017). Contudo, no estudo de Borges et al. (2010), o pH era maior do que aquele em nosso estudo, indicando que outro fator deve ter influenciado dos resultados, como o agente espessante.

Diversos estudos demonstraram que determinados agentes espessante tem a capacidade por si de causar desmineralização do esmalte (Basting et al., 2003; Rodrigues et al., 2005; Lima et al., 2008). Rodrigues et al. (2005) avaliaram a microdureza do esmalte após o tratamento com clareadores caseiros e de uso de consultório, sendo um dos grupos, o carbopol utilizado como tratamento placebo, e ele nessas condições realizou a desmineralização dental, diminuindo a microdureza do esmalte. O Carbopol, espessante mais utilizado na odontologia possui propriedades de quelante. Um quelante é uma molécula capaz de formar complexos com o cálcio, alumínio e magnésio. Quando o carbopol é adicionado no clareador dental, ele exerce sua ação quelante mediante a formação de complexos com o cálcio, diminuindo assim a concentração desse íon na solução, resultando em uma solução subsaturada, havendo uma dissolução da hidroxiapatita até atingir o equilíbrio, causando assim a desmineralização dental (Cury et al., 2017).

Visando entender o efeito exclusivamente do peróxido sobre o esmalte, sem a interferência do espessante, o presente estudo empregou apenas soluções. O estudo da interferência do espessante na formulação total do produto deve ser objeto de estudos futuros.

Todas as análises realizadas e resultados observados nesse estudo estão relacionadas à solubilidade do esmalte. A solubilidade de um mineral pouco solúvel, como é o caso da hidroxiapatita depende de alguns fatores, sendo eles o grau de saturação (GS), que determina se uma solução será saturada, supersaturada ou subsaturada. A constante do produto de solubilidade (Kps) que se refere ao sólido em questão e produto de atividade iônica (PAI) que confere as atividades dos íons constituintes da hidroxiapatita. Assim, para determinamos o grau de saturação, precisamos determinar o Kps e PAI, pois a razão do PAI e Kps determinam seu efeito. Quando o produto de atividade iônica é exatamente igual ao Kps, o GS é igual a 1, sendo uma solução saturada em relação à constante de solubilidade desse mineral. Isso quer dizer que há um equilíbrio entre o mineral da hidroxiapatita e os íons que a compõem que estão dissolvidos na solução, não havendo perda nem ganho de mineral entre eles. Quando o GS for inferior a 1, a solução estará subsaturada em relação ao mineral, indicando que há menor quantidade de íons que compõem a hidroxiapatita dissolvidos na solução, nesse caso a tendência é que os íons no mineral do dente se dissolva. Por outro lado, se a solução estiver supersaturada, quer dizer que o GS é superior a 1, tendo maior quantidade de íons que compõem o mineral do dente dissolvidos na solução do que no mineral sólido, fazendo com que excesso de íons se precipitem sobre a hidroxiapatita (Cury et al., 2017).

Ao realizar o tratamento do grupo Ca-P/100%, fizemos um clareador saturado, sendo capaz de manter o equilíbrio do grau de saturação não ocorrendo a desmineralização, mostrando que mesmo não adicionando valores elevados das substâncias protetoras, obteve resultados positivos em relação a microdureza do esmalte dental. Resultado diferente foi encontrado no tratamento clareador subsaturado aplicado no grupo Ca-P/50%, onde a solução não estava em equilíbrio, fazendo com que o esmalte dental perdesse cálcio e fósforo para o clareador dentário. Ou seja, valor inferior ao ponto de equilíbrio não é indicado para a complementação do clareamento dentários. Nenhum estudo foi encontrado na

literatura que tenha realizado análises semelhantes ao nosso experimento em relação ao clareamento dentário e o grau de saturação da hidroxiapatita.

Sempre que a superfície de um material inorgânico sofre desmineralização, espera-se que ela fique mais rugosa, pois uma perda microestrutural é sempre presente. Estudos prévios mostraram que o clareamento pode resultar em aumento da rugosidade (Azrak et al., 2010; Kwon et al., 2015). A análise do aumento da rugosidade de superfície em dentes clareados é de relevância clínica, pois está associada a presença de microporosidades que pode propiciar maior acúmulo de biofilme podendo estar associado também ao aumento da colonização de bactérias cariogênicas, levando a cavitação e lesão de cárie. Além disso, pode ocorrer o aumento da deposição de pigmentação extrínseca e sensibilidade dentinária (Eimar et al., 2012; Hosoya et al., 2003; Soares et al., 2013). No presente estudo, a hipótese H_0 com relação a rugosidade superficial foi rejeitada. O grupo CN não mostrou variações na rugosidade superficial. Contudo, o grupo CP que empregou a solução de peróxido sem adição de minerais resultou em aumentando significativo da rugosidade superficial. Soares et al. (2013) e Trentino et al. (2015), observaram resultados semelhantes, os quais relacionaram ao efeito desmineralizante. Valores na faixa de 0,06 a 3,5 μm de rugosidade na superfície dental são perceptíveis aos pacientes com a língua (Jones et al., 2004). O grupo CP apresentou após o clareamento uma rugosidade de 0,067 μm (Tabela 2), estando esse valor acima daquele limite perceptível pelo paciente, enquanto o grupo controle negativo mostrou uma rugosidade de 0,025 μm . Os grupos experimentais Ca-CS e P-CS (Tabela 2) apresentaram valores respectivamente de 0,022 e 0,025 μm , enquanto os grupos Ca-P/50% e Ca-P/100% apresentaram valores respectivamente de 0,044 e 0,035 não correspondendo a valores perceptíveis de rugosidade pela língua do paciente corroborando na confirmação do efeito protetor dessas substâncias (Jones et al., 2004).

Em relação a cor, a hipótese H_0 foi aceita e também rejeitada em relação ao grupo controle negativo. No clareamento dentário, a avaliação da cor nos ajuda a perceber os efeitos do clareamento, podendo ser detectados visualmente ou por aparelhos específicos como o espectrofotômetro. Para isso o limite de aceitabilidade e perceptibilidade devem ser compreendidos. O limiar de aceitabilidade é a magnitude que constitui uma alteração inaceitável à estética dentária, enquanto o

limiar de perceptibilidade é a diferença de cor que é visualmente detectável na superfície dos dentes (Khashayar et al., 2014). Eles servem como uma ferramenta de controle de qualidade para guiar a seleção de materiais dentários, interpretar os achados visuais e instrumentais em odontologia clínica e pesquisa odontológica. Perceber diferenças na cor após o tratamento clareador é de suma importância, sendo o limite de perceptibilidade empregado nessa análise. O estudo de Paravina et al. (2015) mostrou que o limite de perceptibilidade para o ΔE^*_{ab} é de 1,22 e aceitabilidade de 2,66, e para o ΔE^*_{00} o limite de perceptibilidade 0,81 e aceitabilidade de 1,77. Em nosso trabalho, os valores de ΔE^*_{ab} e ΔE^*_{00} foram maiores para os grupos CP, Ca-CS e P-CS, Ca-P/50% e Ca-P/100% em torno 4,52 para o ΔE^*_{ab} e 3,54 para o ΔE^*_{00} os quais não diferiram estatisticamente entre si. As médias desses grupos foram maiores do que os limites de perceptibilidade e aceitabilidade (Tabela 3), indicando que uma mudança de cor expressiva ocorreu. Todos esses grupos apresentaram valores significativamente maiores que o controle negativo não clareado (Tabela 3), o qual apresentou baixos valores de variação de cor, abaixo dos limites, estando dentro da incerteza de leitura do aparelho e não sendo detectáveis pelos observadores.

O delta é uma fórmula para se analisar diferenças de cor, projetada para fornecer essa diferença de maneira quantitativa, percebida entre amostras coloridas sob um conjunto de condições experimentais (Arikawa et al., 2004). O ΔE^*_{ab} determina o tamanho total da diferença de cor entre as três coordenadas $L^*a^*b^*$ enquanto que o ΔE^*_{00} é uma revisão da fórmula anterior, onde correlações foram adicionadas para corrigir erros na luminosidade, croma e matiz na região do azul e também a correlação para as cores neutras.

A Tabela 4, mostra os valores médios do sistema $L^*a^*b^*$ iniciais e finais de todos os grupos. A coordenada b^* corresponde a variação do amarelo. A redução do seu valor, mostra que os espécimes clareados ficaram menos amarelos. No grupo CN, esse valor não variou, ao contrário dos grupos CP, Ca-CS, P-CS, Ca-P/50% e Ca-P/100%, que obtiveram valores médios finais inferiores, quando comparados com os iniciais, comprovando assim o efeito clareador. Um estudo clínico avaliou respostas pessoais em relação ao clareamento dentário com 50 pessoas. As respostas dos questionários foram analisadas e observaram que a satisfação das

pessoas quanto ao resultado clareador estava relacionada à redução dos valores da coordenada b*.(Gerlach et al., 2002; RW et al., 2000).

É importante ressaltar que, embora o efeito desmineralizante tenha sido eliminado devido a adição de agentes protetores no clareador dental, a inclusão dessas substâncias não modificou o efeito clareador, o que indica que a capacidade oxidante do peróxido foi mantida (Tabela 3). Isso põe em dúvida a teoria do efeito oxidativo da parte orgânica no efeito desmineralizante. Resultados parecidos foram encontrados por Alexandrino et al.(2014), sugerindo que ela possa ser empregada em produtos comerciais, protegendo a estrutura do esmalte durante a aplicação do peróxido.

Durante o processo clareador, a concentração do peróxido de hidrogênio foi medida no início e no final de cada aplicação. Os grupos CP e Ca-CS apresentaram o maior percentual de redução da concentração (Tabela 5), embora uma certa redução da concentração de peróxido de hidrogênio foi constatada em todos os grupos, não sendo expressivo. A decomposição do peróxido é necessária para a formação dos radicais livres que promovem o clareamento. O objetivo de avaliar a variação da concentração de peróxido era verificar se a adição dos sais de cálcio e fósforo iriam influenciar de alguma maneira essa decomposição e também o efeito clareador. Contudo, verificamos que embora uma pequena diferença foi constatada na taxa de decomposição do peróxido (Tabela 5), isso não resultou em diferenças expressivas no efeito clareador (Tabela 3). Fornaini et al. (2013)concluíram que ocorreu uma pequena degradação do peróxido de hidrogênio após 20 min de tratamento clareador, porém não ocorrendo alteração no efeito clareador, dados semelhantes foram encontrados em nosso trabalho.

Dos dados obtidos nesse estudo, fica claro que a concentração de íons cálcio e fosfato dentro do agente clareador pode influenciar a dureza do esmalte. Além disso, a adição de uma quantidade que supere o ponto de saturação desses elementos é essencial. Contudo, comparando com os dados provenientes de outros estudos, fica também evidente que os demais constituintes dos géis clareadores, notadamente o agente espessante, podem ser ainda decisivos para os efeitos deletérios desses produtos sobre o esmalte, mesmo quando uma certa quantidade de cálcio é incorporada. Estudos futuros são necessários para analisar os efeitos da suplementação de cálcio e fósforo em associação com variados espessantes,

tentando criar um produto que mantenha a eficácia, mas promova maior segurança e menor agressão à estrutura dentária.

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados desse estudo, podemos concluir que:

- Os sais que apresentaram o maior coeficiente de solubilidade foram: lactato de cálcio pentahidratado e o fosfato de sódio bibásicododecahidratado;
- O agente clareador sem a adição das substâncias protetoras ou com quantidade reduzida resultaram em queda da microdureza e aumento da rugosidade;
- A adição de cálcio e/ou fósforo em quantidades correspondente ao ponto de saturação ou ao coeficiente de solubilidade dos testados impediram a queda da dureza e o aumento da rugosidade, sem afetar o efeito clareador e a adição de cálcio e fósforo subsaturado não foi capaz de impedir a desmineralização dentária.

REFERÊNCIAS*

Al-Salehi SK, Wood DJ, Hatton P V. The effect of 24 h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness. *J Dent.* 2007;35(11):845–50. doi: 10.1016/j.jdent.2007.08.001. PMID: 17869403.

Alexandrino L, Gomes Y, Alves E, Costi H, Rogez H, Silva C. Effects of a bleaching agent with calcium on bovine enamel. *Eur J Dent.* 2014;8(3):320–5. doi: 10.4103/1305-7456.137634. PMID: 25202210.

do Amaral FLB, Sasaki RT, da Silva TCR, França FMG, Flório FM, Basting RT. The effects of home-use and in-office bleaching treatments on calcium and phosphorus concentrations in tooth enamel: An in vivo study. *J Am Dent Assoc.* 2012;143(6):580–6. doi: 10.14219/jada.archive.2012.0236. PMID: 22653937.

Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent.* 2007a;35(9):755–9. doi: 10.1016/j.jdent.2007.06.005. PMID: 17688995.

Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003;48(11):753–9. doi: 10.1016/S0003-9969(03)00156-0. PMID: 14550377.

Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. *J Dent.* 2007b;35(10):773–7. doi: 10.1016/j.jdent.2007.07.007. PMID: 17709163.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis.* 2005;11(1):7–12. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01056.x. PMID: 15641960.

Azrak B, Callaway A, Kurth P, Willershausen B. Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens. *J Esthet Restor Dent.* 2010;22(6):391–9. doi: 10.1111/j.1708-8240.2010.00372.x. PMID: 21126294.

Barac R, Gasic J, Trutic N, Sunaric S, Popovic J, Djekic P, et al. Erosive Effect of Different Soft Drinks on Enamel Surface in vitro: Application of Stylus Profilometry. *Med Princ Pract.* 2015;24(5):451–7. doi: 10.1159/000433435. PMID: 26111496.

Barbosa CS, Montagnolli LG, Kato MT, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Calcium glycerophosphate supplemented to soft drinks reduces bovine enamel erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(4):410–3. doi: 10.1590/S1678-77572012000400004. PMID: 23032201.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range $2.30 \leq \text{pH} \leq 6.30$ - A nanoindentation study. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(3):258–62. doi: 10.1034/j.1600-0722.2003.00039.x. PMID: 12786958.

Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(10):1335–42. doi: 10.14219/jada.archive.2003.0047. PMID: 14620012.

Borges AB, Dantas RLM, Caneppele TMF, Borges ALS, Torres CRG. Effect of remineralizing agents on the bleaching efficacy of gels. *Gen Dent.* 2013;61(7):67–71. PMID: 24192737.

Borges AB, Santos LFTF, Augusto MG, Bonfietto D, Hara AT, Torres CRG. Toothbrushing abrasion susceptibility of enamel and dentin bleached with calcium-supplemented hydrogen peroxide gel. *J Dent.* 2016;49(2015):54–9. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.009. PMID: 27072568.

Borges AB, Torres CRG, De Souza PAB, Caneppele TMF, Santos LFTF, Magalhães AC. Bleaching gels containing calcium and fluoride: Effect on enamel erosion susceptibility. *Int J Dent.* 2012;2012. doi: 10.1155/2012/347848. PMID: 23193404.

Borges AB, Guimarães CA, Bresciani E, Ramos CJ, Borges ALS, Torres CRG. Effect of incorporation of remineralizing agents into bleaching gels on the microhardness of bovine enamel in situ. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(2):195–201. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1514. PMID: 25095843.

Borges AB, Yui KCK, D'Avila TC, Takahashi CL, Torres CRG, Borges ALS. Influence of Remineralizing Gels on Bleached Enamel Microhardness In Different Time Intervals. *Oper Dent.* 2010a;35(2):180–6. doi: 10.2341/09-117-L. PMID: 20420061.

Buzalaf M, Pessan J, Honorio H, ten Cate J. Mechanisms of Action of Fluoride for. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97–114.

Cavalli V, Rodrigues LKA, Paes-Leme AF, Soares LES, Martin AA, Berger SB, et al. Effects of the addition of fluoride and calcium to low-concentrated carbamide peroxide agents on the enamel surface and subsurface. *Photomed Laser Surg.* 2011a;29(5):319–25. doi: 10.1089/pho.2010.2797. PMID: 21204703.

Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent.* 2008;36(9):718–25. doi: 10.1016/j.jdent.2008.05.003. PMID: 18573586.

Da Costa Soares MUS, Araújo NC, Borges BCD, Da Silva Sales W, Sobral APV. Impact of remineralizing agents on enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(2):343–8. doi: 10.3109/00016357.2012.681119. PMID: 22564069.

Crastechini E, Borges A, Torres C. Effect of remineralizing gels on microhardness, color and wear susceptibility of bleached enamel. *Oper Dent.* 2018:17–150. doi: 10.2341/17-150-L. PMID: 29953340.

Cury J, Tenuta L, Tabchoury C. *Bioquímica Oral*. São Paulo: Artes Médicas; 2017.

D'Arce MBF, Lima DANL, Aguiar FHB, Bertoldo CE dos S, Ambrosano GMB, Lovadino JR. Effectiveness of dental bleaching in depth after using different bleaching agents. *J Clin Exp Dent*. 2013;5(2):100-107 doi: 10.4317/jced.51063. PMID: 24455056.

Dannacher JJ. Catalytic bleach: Most valuable applications for smart oxidation chemistry. *J Mol Catal A Chem*. 2006;251(1-2):159-76. doi: 10.1016/j.molcata.2006.02.031.

Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res*. 2008;28(5):299-303. doi: 10.1016/j.nutres.2008.03.001. PMID: 1000000221.

Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent*. 2012;40(SUPPL.2):e25-33. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.008. PMID: 22925924.

Fornaini C, Lagori G, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Guidotti R, et al. Analysis of shade, temperature and hydrogen peroxide concentration during dental bleaching: In vitro study with the KTP and diode lasers. *Lasers Med Sci*. 2013;28(1):1-6. doi: 10.1007/s10103-011-1037-4. PMID: 22198709.

Gerlach RW, Barker ML, Sagel PA. Objective and subjective whitening response of two self-directed bleaching systems. *Dent Res J*. 2015; 12(1): 20-24. PMID: 25709670.

Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci*. 2008;116(1):60-5. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00513.x. PMID: 18186733.

Harris EF, Hicks JD. A radiographic assessment of enamel thickness in human maxillary incisors. *Arch Oral Biol*. 1998;43(10):825-31. doi: 10.1016/S0003-9969(98)00061-2. PMID: 9796784.

Hegedus C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent*. 1999;27(7):509-15. doi: 10.1016/S0300-5712(99)00006-8. PMID: 10507207.

Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J Dent*. 2003;31(8):543-8. doi: 10.1016/S0300-5712(03)00109-X. PMID: 14554071.

Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ 1. Comparison with orange juice. *J Dent*. 1999;27(4):285-9. doi: 10.1016/S0300-5712(98)00069-4. PMID: 10193106.

Jensdottir T, Bardow A, Holbrook P. Properties and modification of soft drinks in relation to their erosive potential in vitro. *J Dent*. 2005;33(7):569-75. doi:

10.1016/j.jdent.2004.12.002. PMID: 16005796.

Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Shen X, Hu Y, et al. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Opt.* 2014;13(1):014019. doi: 10.1117/1.2870114. PMID: 18315377.

Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Shen X, Hu Y, et al. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Opt.* 2008;13(1):014019. doi: 10.1117/1.2870114. PMID: 18315377.

Jones CS, Billington RW, Pearson GJ. The in vivo perception of roughness of restorations. *Br Dent J.* 2004. doi: 10.1038/sj.bdj.4810881. PMID: 14966503.

Khashayar G, Bain PA, Salari S, Dozic A, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Perceptibility and acceptability thresholds for colour differences in dentistry. *J Dent.* 2014;42(6):637–44. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.017. PMID: 24334221.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res.* 1982;16(2):156–61. doi: 10.1159/000260592. PMID: 6951638.

Kwon SR, Kurti SR, Oyoyo U, Li Y. Effect of various tooth whitening modalities on microhardness, surface roughness and surface morphology of the enamel. *Odontology.* 2015;103(3):274–9. doi: 10.1007/s10266-014-0163-4. PMID: 24972882.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel Erosion by Some Soft Drinks and Orange Juices Relative to Their pH, Buffering Effect and Contents of Calcium Phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81–7. doi: 10.1159/000016499. PMID: 9831784.

Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. *J Prosthet Dent.* 2004;92(4):337–42. doi: 10.1016/j.prosdent.2004.07.019. PMID: 15507905.

Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: A review of the literature. *J Dent.* 2014;42:S12–20. doi: 10.1016/S0300-5712(14)50003-6. PMID: 24993850.

Lima DANL, De Alexandre RS, Martins ACM, Aguiar FHB, Ambrosano GMB, Lovadino JR. Effect of curing lights and bleaching agents on physical properties of a hybrid composite resin. *J Esthet Restor Dent.* 2008;20(4):266–273; discussion 274–275. doi: 10.1111/j.1708-8240.2008.00190.x. PMID: 18768000.

Lima DANL, De Alexandre RS, Martins ACM, Aguiar FHB, Ambrosano GMB, Lovadino JR. Effect of curing lights and bleaching agents on physical properties of a hybrid composite resin. *J Esthet Restor Dent.* 2008;20(4):266–73; doi: 10.1111/j.1708-8240.2008.00190.x. PMID: 18768000.

Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some

beverages. *Caries Res.* 1995;29(5):349–54. doi: 10.1159/000262091. PMID: 8521435.

Lussi A n., Hellwig E. Risk assessment and causal preventive measures. *Erosive Tooth Wear From Diagnosis to Ther.* 2012;25:220–9. doi: 10.1159/000360612. PMID: 24993270.

Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of ion supplementation of a commercial soft drink on tooth enamel erosion. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009;26(2):152–6. doi: 10.1080/02652030802425326. PMID: 19680884.

Magalhães JG, Marimoto ÂRK, Torres CRG, Pagani C, Teixeira SC, Barcellos DC. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. *Acta Odontol Scand.* 2012;70(2):122–6. doi: 10.3109/00016357.2011.600704. PMID: 21780968.

Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ. Effect of Low Levels of Fluoride in Solution on Enamel Demineralization in vitro. *J Dent Res.* 1986;65(1):23–9. doi: 10.1177/00220345860650010301. PMID: 3455694.

Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature.* 1974;247(5435):64–5. doi: 10.1038/247064a0. PMID: 4462607.

Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(4):474–82. doi: 10.1067/moe.2002.120974. PMID: 12029288.

Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ, Bona AD, Igiel C, Linninger M, et al. Color difference thresholds in dentistry. *J Esthet Restor Dent.* 2015;27(S1):S1–9. doi: 10.1111/jerd.12149. PMID: 25886208.

Quintela Souza de Moraes I, Nunes de Brito Silva L, Celerino de Moraes Porto IC, de Lima Neto CF, Barbosa Dos Santos N, Silveira de Mendonça Fragoso L. Effect of in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide with and without addition of calcium on the enamel surface. *Microsc Res Tech.* 2015;78(11):975–81. doi: 10.1002/jemt.22561. PMID: 26279091.

Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GMB, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater.* 2005;21(11):1059–67. doi: 10.1016/j.dental.2005.03.011. PMID: 16143381.

Gerlach RW, Gibb RD, Sagel PA . A randomized clinical trial comparing a novel 5.3% hydrogen peroxide whitening strip to 10%, 15%, and 20% carbamide peroxide tray-based bleaching systems. *Compend Contin Educ Dent Suppl.* 2000;(29):22-8 PMID: 11908406.

Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jiang T, et al. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: An in situ vs.

in vitro study. *J Dent.* 2012;40(suppl. 1): e26-34doi: 10.1016/j.jdent.2012.02.010. PMID: 22381613.

Santos LFTF, Torres CRG, Caneppele TMF, Magalhães AC, Borges AB. Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility. *Acta Odontol Scand.* 2016a;74(2):121–6. doi: 10.3109/00016357.2015.1053150. PMID: 26083582.

Schemehorn BR, Novak ED. Use of a calcium peroxide whitening agent for remineralization and recalcification of incipient lesions. *J Clin Dent.* 2007;18(4):126–30. PMID: 18277744.

Seghi RR, Denry I. Effects of External Bleaching on Indentation and Abrasion Characteristics of Human Enamel in vitro. *J Dent Res.* 1992;71(6):1340-4.doi: 10.1177/00220345920710061201. PMID: 1613185.

Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int.* 1993;24(1):39–44. PMID: 8511257.

Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Erosive Tooth Wear From Diagnosis to Ther.* 2012;25:163–79. doi: 10.1159/000359943. PMID: 16687885.

Silva MFA, Davies RM, Stewart B, DeVizio W, Tonholo J, Júnior JG d. S, et al. Effect of whitening gels on the surface roughness of restorative materials in situ. *Dent Mater.* 2006;22(10):919–24. doi: 10.1016/j.dental.2005.11.029. PMID: 16375964.

Soares DG, Ribeiro APD, Sacono NT, Loguércio AD, Hebling J, Costa CA de S. Mineral loss and morphological changes in dental enamel induced by a 16% carbamide peroxide bleaching gel. *Braz Dent J.* 2013;24(5):517–21. doi: 10.1590/0103-6440201302225. PMID: 24474296.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *J Dent.* 2004;32(7):581–90. doi: 10.1016/j.jdent.2004.06.003. PMID: 15386865.

Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, et al. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *J Dent.* 2011;39(10):686–92. doi: 10.1016/j.jdent.2011.07.011. PMID: 21855600.

Trentino AC, Soares AF, Duarte MAH, Ishikiriama SK, Mondelli RFL. Evaluation of pH Levels and Surface Roughness After Bleaching and Abrasion Tests of Eight Commercial Products. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(7):372–7. doi: 10.1089/pho.2014.3869. PMID: 26154725.

Vogel GL, Carey CM, Ekstrand J. Distribution of Fluoride in Saliva and Plaque Fluid after a 0.048 mol/L NaF Rinse. *J Dent Res.* 1992;71(9):1553–7. doi: 10.1177/00220345920710090201. PMID: 1522286.

Xu B, Li Q, Wang Y. Effects of pH Values of Hydrogen Peroxide Bleaching Agents on

Enamel Surface Properties. Oper Dent. 2011;36(5):554–62. doi: 10.2341/11-045-1. PMID: 21859312.

Yeh S-T, Su Y, Lu Y-C, Lee S-Y. Surface changes and acid dissolution of enamel after carbamide peroxide bleach treatment. Oper Dent. 2005;30(4):507-15.doi: 10.1097/00008390-200010000-00002. PMID: 16130872.