MAURICIO NEVES GOMES

Desproteinização do esmalte associada à técnica de remineralização no clareamento em consultório

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; para obter o título de Doutor; pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francci

São Paulo

2011

Gomes MN. Desproteinização do esmalte associada à técnica de remineralização no clareamento em consultório. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Aos meus pais Miriam Cristina Neves Gomes, Manoel Gomes e minha irmã Vanessa Neves Gomes. O apoio, educação, amor e orientação contribuíram para execução deste trabalho e ao crescimento pessoal. Mais importante do que a formação profissional é o aprendizado adquirido na formação. Isto eu devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, sem religião e fé não se chega a lugar algum. A sua busca nos faz sermos cada vez mais seres humanos. Ao distanciarmos percebermos o quanto próximo e presente Ele está.

Aos meus pais *Miriam Cristina Neves Gomes* e *Manoel Gomes*, pela ajuda incondicional e suporte em todas as etapas de minha carreira. Obrigado por ter acreditado no meu sonho e ter dado todas as condições para que fosse concretizado.

À minha irmã *Vanessa Neves Gomes*, como sempre, tenho a honra e a felicidade de ter ao meu lado uma irmã e também uma dentista. Se não fosse sua orientação talvez teria percorrido caminhos ainda mais tortuosos. Sua esperança e motivação foram o combustível para alcançar meus sonhos.

À *Fernanda Gea de Lucena*, por ter sido companheira e estar sempre ao meu lado e compreendido as minhas ausências. Obrigado pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador *Carlos Francci,* por ter me orientado a partir do momento que entrei no Mestrado e encarado o desafio. Pessoa que na distância está mais próximo do que você imagina e nas dificuldades está ao seu lado. A sinceridade e a vontade de buscar o conhecimento foram fundamentais para que nos tornássemos amigos. Ao longo do tempo demonstrou que mais importante do que uma conclusão de tese

está o valor e caráter do ser humano. Obrigado por todas as oportunidades e portas abertas. Espero poder ainda mais melhorar e crescer na profissão. Valeu por tudo e como sempre diz “vamos que vamos”.

Ao eterno amigo *Heraldo Riehl “in memoriam”,* responsável por parte da ideia central desse trabalho. Pude aprender que amigo não se conta pelos anos que está ao seu lado, mas sim pelas virtudes e contribuições transmitidas. O pouco tempo que desfrutei de sua amizade foram importantes na minha formação. Sei que não posso contar fisicamente na minha tese, mas com certeza em cada parte você está presente. Valeu amigo!

À professora *Dra. Rosa Helena Miranda Grande*, obrigado por sempre estar trabalhando em benefício da pós-graduação do Departamento. O trabalho nos bastidores foi fundamental para todos os alunos. O agradecimento é o mínimo que podemos fazer pelo seu reconhecimento e para lhe dar mais energia no superar dos desafios. Valeu tia Rosa.

Às amigas *Flávia Pires Rodrigues – Flapiro, Mônica e Continental Airlines*, onde pude sentir na pele o que é gratidão e amizade sincera. Facebook humano. Tenha seu contato que a porta internacional se abrirá. Muito obrigado novamente, por todas as viagens à Manchester. Por dar suporte a toda loucura, MSNs, emails desesperados independente da hora do dia. De estagiários desacreditados movidos pelo prazer em estudar Materiais Dentários percorremos caminhos paralelos e conseguimos conquistar nossos sonhos. Tenho a honra de ser seu amigo. Posso dizer, com toda segurança que, agora como professora, está preparada para aturar

qualquer aluno depois de mim. Pode se preparar que ainda terá que me aturar. Valeu por todas as oportunidades e orientações. Escuta o que estou te falando: você vai longe!

Ao amigo *Andre Guaraci De Vito de Moraes*, sua simplicidade e solicitude nos faz sentirmos cada vez mais pequenos. É inimaginável acreditar que ainda existam pessoas como você. Tenho grande admiração e felizes são as pessoas que podem contar com sua amizade. Tenho certeza que todos do Departamento de Materiais te admiram pela pessoa que és. Continue sempre assim, porque, como aprendemos, é isso que importa e o que levamos dessa vida. Espero poder contar sempre com tua amizade.

Aos professores *David C. Watts* e *Nick Silikas* da Universidade de Manchester, Inglaterra, por terem disponibilizado o laboratório, inclusive nas madrugadas. Com a humildade, conhecimento e educação do Prof. David Watts pude perceber o quanto pequeno somos e que tudo se torna possível com o trabalho.

Ao *Phil Salmon*, *application scientist* da Skyscan na Bélgica, pela ajuda em grande parte do conhecimento adquirido para análise dos dados de tomografia computadorizada. Sua disponibilidade e paciência foram fundamentais para que os resultados fossem explorados e conseguíssemos sair do zero.

À *Neslihan Efeoglu* do Kent Hospital em Izmir, Turquia, sua ajuda e dicas ajudaram na metodologia para escaneamento das amostras. As trocas de e-mails foram

essenciais para refletirmos sobre a melhor forma de estarmos escaneando os espécimes.

À *EMBRAPA São Carlos,* por ter aberto as portas nos estudos pilotos com microtomografia computadorizada.

À equipe do laboratório de caracterização tecnológica da POLI-USP por ter nos auxiliado na execução das imagens obtidas por FEG, MEV e EDS. Especial agradecimento a Mariane Brumatti pela grande disponibilidade e dedicação.

Aos professores *Antonio Muench, Fernando Nogueira, Josete Meira, Igor Medeiros, Leonardo Eloy Filho, Paulo Capel, Paulo Cesar, Roberto Braga, Rafael Ballester e Walter Miranda* do Departamento de Materiais Dentários. Cada um com sua característica e profissionalismo, foram os responsáveis por todo o período da pós graduação na minha formação ao longo dos 7 anos que permaneci no Departamento. Sentirei falta de poder tirar dúvidas e ter a possibilidade de estar aprendendo com vocês.

Ao *Antonio Lascala* e *Silvio Peixoto Soares*, técnicos do Departamento de Materiais Dentários da FOUSP, por terem rido das desgraças, auxiliado nos apuros e sempre estarem se preocupando com meu glorioso Corinthians, time que move nossas vidas.

À *Rosa Cristina Nogueira, Elidamar Guimaraes* e *Mirtes*, por sempre nos auxiliar frente a todos os processos burocráticos e estarem presentes dia a dia. Obrigado por tudo em todos esses anos.

Aos amigos e amigas de pós graduação: *Breno Mont'Alverne* – conhecido também como fanfarrão, o rei dos ciclos térmicos, agora dos Lençóis Maranhenses. *Vinícius Rosa*, recém professor da UPF, gaúcho dos pampas, cara que ama a pesquisa. *Márcia Borba*, recém professora da UPF, colega dos Vales do Vinhedos à South Beach, pesquisadora séria, culta e algumas vezes, descontraída. *José Bauer*, professor da UFMA, eterna lenda do Departamento de Materiais. *Marcelo M Pinto* – torcedor da fiel. *Caroline Miyazaki,* agora garota 3M, parceira no Mestrado. *Maico Dutra*, rapaz que passeia com o filho sentado no frango. *Ricardo Sgura*, parceiro no pandeiro, carioca gente fina. *Tathy Ap Xavier*, uma das alunas mais inteligentes que tive contato. *Letícia Boaro*, pinkpanther, dedicação e sinceridade são suas maiores virtudes. *Flávia Gonçalves*, exemplo a todos alunos de como produzir *papers* com simplicidade. *Lilyan Yamazaki*, força de vontade, seriedade e profissionalismo a levará para muito longe. *Luciana Cardoso*, simplicidade e força de vontade foram o combustível para concluir o seu Mestrado. *Nívea R. Fróes Salgado,* pequena de tamanho e grande de coração, sempre me salva nos apuros com muita delicadeza, fiquei muito feliz quando soube que agora é mãe.

À Sirlene Vechiatto, por ter fornecido os agentes clareadores quando foi gerente geral da empresa SDI no Brasil. Obrigado pela atenção e preocupação.

Ao Serviço de Documentação Odontológica (SDO) da Faculdade de Odontologia da USP, o seu acervo e seus funcionários são de enorme valia para esta Instituição. Com certeza uma das melhores e maiores bibliotecas da América Latina.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por ter me recebido e dado oportunidade de estar trabalhando ao longo destes anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à instituição pública em um país com tanta carência educacional e financeira como o Brasil. Este investimento deve ser retornado à sociedade.

RESUMO

Gomes MN. Desproteinização do esmalte associada à técnica de remineralização no clareamento em consultório [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida

Objetivo: avaliar cor, brilho, rugosidade e alterações ultraestruturais do esmalte dental clareado com peróxido de hidrogênio a 35 %, submetido ao tratamento prévio com agente desproteinizante, ou ao tratamento posterior com o agente remineralizador fosforopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (ACP-CPP). Material e Métodos: Os grupos experimentais foram: GC (controle/consultório): H_2O_2 a 35 % - 4 sessões de 8 min; GE1 (primer+consultório): NaOCl 5,25 % por 1 min, aplicação do H_2O_2 a 35 % como no GC; e GE2 (consultório+ACP): GC + ACP-CPP diariamente por 7 dias. Fragmentos contendo esmalte e dentina (n=8), obtidos de dentes bovinos, foram utilizados para avaliar cor, brilho e a rugosidade. Alteração de cor (ΔE), parâmetros L* e b* foram determinados com colorímetro e o brilho superficial com glossímetro antes, imediatamente após (1h), 4 e 7 dias após o tratamento. Parâmetros de rugosidades, R_a, R_t e R_{Sm}, foram obtidos com perfilômetro de contato antes, imediatamente após o tratamento e 7 dias após os tratamentos. Os resultados de ΔE, brilho superficial e rugosidade foram avaliados separadamente usando ANOVA 2 fatores e teste de Tukey (p=0,05). Para avaliar a alteração ultraestrutural, dentes pré-molares humanos, seccionados nos sentidos vestibulo-lingual e mesio distal foram observados em microscópio eletrônico de varredura, por emissão de campo, e realizada a quantificação de elementos químicos por EDS. Análise tridimensional da estrutura do esmalte foi realizada por microtomografia computadorizada (micro-CT) com resolução 11,24 µm (n=8). Foram realizadas análises dos parâmetros estruturais: espessura estrutural (St.Th.), separação estrutural (St.Sp.) e índice de fragmentação (Fr.I.) antes e após os tratamentos em duas regiões: ROI 1= 56,2 µm e ROI 2= 110,2 µm, ambas a partir da superfície vestibular. Foi utilizado o teste t pareado para análise estatística de cada parâmetro estrutural. Resultados: Não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos de superfície para ΔE, R_a e R_{Sm}. Imediatamente após o clareamento (1h) ocorreu maior aumento do L* e queda do brilho superficial que se manteve por 7

dias. O uso de agente desproteinizante em dentes bovinos não acentuou a redução do brilho do esmalte, mas a aplicação de ACP-CPP acarretou em maior perda brilho e aumento nos valores de rugosidade após 7 dias para R_t. A aplicação do agente desproteinizante previamente ao clareamento em dente humano revelou uma superfície mais lisa, sem alterar os parâmetros estruturais. Há uma maior quantidade de cálcio, formação de um manto de recobrimento após aplicação de ACP-CPP em torno dos prismas de esmalte, aumento de St.Th de 4,1μm, menor espaçamento entre os cristais de hidroxiapatita e redução de St.Sp em 0,8 μm e de Fr.I em 0,01 no ROI-1 após 7 dias. Conclusão: O uso de agente desproteinizante não altera a cor, brilho e a ultraestrutura inorgânica. A aplicação de ACP-CPP após a técnica de clareamento de consultório não contribui para alteração de cor, mas reduz o brilho e altera a ultraestrutura da porção mais externa do esmalte após 7 dias

Palavras-Chaves**:** Clareamento. Micro-CT. Alteração de cor.

ABSTRACT

Gomes MN. Enamel deproteinization associated to remineralization technique on in-office bleaching [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

Purpose: To evaluate color, gloss, roughness and ultrastructural changes of enamel bleached with 35% hydrogen peroxide, subjected to previous treatment with deproteinized agent, or later treatment with remineralizing agent casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP). Materials and Methods: The experimental groups were: GC (control + in-office): 35% H_2O_2 - 4 sessions of 8 min; GE1(primer+in-office): 5.25% NaOCl during 1 min before the application of 35% H_2O_2 as done in GC, and GE2 (in-office+ACP-CPP): GC + ACP-CPP, daily applied during 7 days. Enamel and dentin blocks (n=8), obtained from bovine tooth, were used to evaluate color, gloss and roughness. Color changes (ΔE), L* and b* parameters were done with a colorimeter and surface gloss with a glossimeter, before, immediately after (1h), 4 and 7 days after treatment. Roughness parameters, R_a, R_T and R_{sm}, were done with a contact perfilometer before, immediately after and 7 days after treatments. ANOVA two-way and Tukey's test were performed to evaluate ΔE, gloss and roughness separately (p=0.05). To access human pre-molar ultrastructural changes, teeth were cross-sectioned buccal-lingual and disto-mesio observed by scanning electron microscope, field emission gun, EDS to quantify chemical elements. Enamel three-dimensional images were analysed with microcomputed tomography (micro-CT) with resolution 11,24µm (n=8). Structural parameters were analyzed: structural thickness (St.Th.), structural separation (St.Sp.) and fragmentation index (Fr.I.) before and after treatments in two regions of interest:ROI 1= 56,2µm and ROI 2= 110,2 µm, both from buccal surface. Paired t-test was done for analyses of each structural parameter. Results: There was no statistical difference among surface treatments to ΔE, R_a and R_{sm}. Immediately after bleaching (1h) occured highest L* increase and decrease of surface gloss which remained until 7 days. Deproteinized agent applied on bovine tooth not emphasized enamel gloss reduction, but the CPP-ACP has resulted in a higher gloss reduction and roughness increase (R_t parameter) after 7 days. Deproteinized agent application previous to in-

office bleaching observed a smooth surface, without structural parameters changes. There is a greater calcium quantity, forming a cover mantle after CPP-ACP application around enamel prisms, St.Th increase of 4,1μm, less spacing between hydroxyapatite crystals and reductions of St.Sp of 0,8 μm and Fr.I of 0,01 on ROI-1 after 7 days. Conclusion: Application of deproteinized agent does not change bovine enamel color, gloss and human enamel inorganic ultrastructure. CPP-ACP application after in-office bleaching does not contribute to color change, but decrease gloss of bovine enamel and change human enamel outermost ultrastructure portion after 7 days.

Keywords: Bleaching. Micro-CT. Color changes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 ESMALTE HUMANO: TECIDO DENTÁRIO E BARREIRA DE DIFUSÃO.....19
2.2 PERÓXIDOS.....23
2.2.1 Peróxido de carbamida......24
2.2.2 Peróxido de hidrogênio.....26
2.3 DESPROTEINIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTAL E AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS OXIDATIVAS NA MATRIZ ORGÂNICA.....27
2.3.1. Hipoclorito de sódio.....28
2.4 USO DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA PARA ESTUDO E ANÁLISE DE DENTES CLAREADOS: UTILIZAÇÃO DE PARÂMETROS ESTRUTURAIS.....30
2.4.1 Parâmetros estruturais.....34
2.4.2 Métodos de análise ultraestrutural da superfície do esmalte 36
2.5 REMINERALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE COM ACP-CPP: INTERESSE CLÍNICO EM SESSÕES PÓS-CLAREAMENTO.....37
2.5.1 Fosfato de cálcio – forma cristalina.....39
2.5.2 Fosfato de cálcio amorfo não estabilizado 39
2.5.3 Fosfato de cálcio amorfo estabilizado..........40
2.5.4 Fosfato de cálcio amorfo estabilizado por fosforopeptídeo de caseína (ACP-CPP).....41
3 PROPOSIÇÃO 43
4 MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE COR, BRILHO E RUGOSIDADE EM DENTES BOVINOS 45
4.1.1 Preparo da amostra..... 45
4.1.2 Avaliação de cor.....46
4.1.3 Brilho de superfície.....47
4.1.4 Rugosidade superficial.....47
4.1.5 Análise estatística.....47

4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM DENTES HUMANOS *IN-VITRO*..... 47
4.2.1 Análise por FEG, MEV e EDS.....48
4.2.1.1 Preparo da amostra.....48
4.2.2 Parâmetros estruturais.....49
4.2.2.1 Preparo da amostra e posicionamento.....49
4.2.2.2 Energia dos raios-X.....50
4.2.2.3 Feixe de endurecimento (Beam hardening).....51
4.2.2.4 Intensidade.....51
4.2.2.5 Tamanho do voxel e resolução da imagem.....52
4.2.2.6 Região de interesse (ROI).....52
4.2.2.7 Análise dos parâmetros estruturais.....53
5 RESULTADOS.....54
5.1 AVALIAÇÃO DE COR, BRILHO E RUGOSIDADE EM DENTES BOVINOS.....54
5.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM DENTES HUMANOS *IN-VITRO*.....55
6 DISCUSSÃO 66
7 CONCLUSÕES 81
ANEXOS …… ..82
REFERÊNCIAS..... 83

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de clareamento vêm sendo largamente utilizadas e diversificadas para satisfazer à expectativa dos pacientes em clarear os dentes escurecidos e/ou pigmentados. As principais necessidades dos pacientes são: melhor aparência estética, menor tempo de tratamento e baixo preço. No entanto, nenhum protocolo utilizado pode ainda garantir ausência de sensibilidade ou de alteração da microestrutura do dente. Os cirurgiões dentistas cada vez mais têm se preocupado em relação à integridade do esmalte e à busca de novos mecanismos que possibilitem a remineralização e a redução da sensibilidade. Estes aspectos são muito relevantes clinicamente, pois o primeiro tecido dental a entrar em contato com o agente clareador é o esmalte e sensibilidade dental é a sintomatologia clínica mais freqüente (1).

Dentre as diversas técnicas para clarear os dentes, o clareamento realizado em consultório utiliza agentes oxidantes em maior concentração e se observa um rápido efeito aparente de clareamento imediatamente após sua aplicação (2). Por outro lado, existem relatos de que alterações microestruturais, tais como erosões superficiais, rearranjos dos cristais de hidroxiapatita (3) e degradação de materiais orgânicos constituintes ou não (pigmentos intrínsecos) do esmalte (4, 5) possam estar presentes.

Além de utilizar um agente oxidante, o peróxido de hidrogênio em alta concentração, várias alternativas têm sido utilizadas para acelerar o efeito clareador e, consequentemente, aumentar a difusão das espécies reativas oxidantes. Dentre as mais utilizadas está a associação de alta concentração, luz e temperatura (aquecimento) que muitas vezes sem seguir um protocolo seguro e confiável, embasado em ciência, pode resultar em alteração pulpar (6).

Devido à necessidade de se encontrar técnicas mais seguras, que possibilitem um aumento de difusão e/ou de remineralização do esmalte, agentes pré e pós-clareamento podem ser utilizados. Apesar da técnica de clareamento de consultório não criar defeitos macroscópicos visíveis, alterações microscópicas podem causar efeitos indesejáveis. A redução do brilho da superfície e o aumento de rugosidade podem predispor a um machamento extrínseco (7), adesão bacteriana (8), maturação da placa (9) e conseqüente pior aparência estética. Além do mais, alterações no esmalte, como da morfologia da estrutura, do conteúdo

orgânico e/ou inorgânico influem para a redução da translucidez, pelo espalhamento de luz, conferindo maior opacidade ao dente (10,11). Portanto, há a necessidade de se conhecer os seus efeitos na superfície do esmalte e nas propriedades ópticas para se obter uma melhor aparência clínica.

Como resultado da reação de oxi-redução, decorrente da aplicação de substâncias altamente oxidativas na superfície o esmalte, ocorre a quebra dos pigmentos orgânicos do esmalte e da dentina em moléculas menos complexas, removendo elétrons destes pigmentos e eliminando-os por difusão, conferindo o aspecto de dente mais claro (12). Uma combinação da luz incidida na superfície do esmalte e a sua interação com a estrutura dental permitem a leitura da cor pelos olhos do observador, que pode ser avaliada laboratorialmente por um colorímetro de acordo com CIElab (Comission Internationale de l'Eclairage, L*, a*, b*) (13,14). Como resultado clínico, o efeito de branqueamento é observado pelas mudanças na luminosidade (aumento do L*) e redução do amarelado (diminuição do b*) (15).

Poros encontrados nos prismas do esmalte ou entre eles e a matriz orgânica são os principais responsáveis para a difusão do agente clareador (16) do esmalte para a dentina subjacente, cujo processo é tempo dependente (17). Alguns autores relatam que a remoção de parte da matriz orgânica do esmalte pode facilitar a difusão do agente clareador (18, 19) e proporcionar maior efeito de clareamento, entretanto esta técnica necessita da utilização de um equipamento com alto custo (1).

Como alternativa a esta técnica, pode ser utilizado o hipoclorito de sódio – NaOCl. Este é um agente proteolítico bem conhecido, comprovado cientificamente, barato e efetivo em remover componentes orgânicos de tecidos dentários em concentrações de 0,5% a 5% (20-22).

O emprego do agente desproteinizante poderia facilitar a difusão do peróxido em camadas mais profundas, mas por outro lado, poderia deixar a superfície mais externa do esmalte susceptível à entrada de pigmentos. Após o clareamento há a necessidade do uso de agentes remineralizadores que vedem a superfície para impedir a entrada de pigmentos conferindo maior estabilidade do clareamento e substitua por componentes inorgânicos a matriz orgânica que são removidas pela ação oxidante do peróxido e ao agente desproteinizante.

Usualmente é recomendada a aplicação de flúor durante ou após o clareamento. O flúor pode atuar como agente remineralizador, formando uma camada de fluoreto de cálcio na superfície do esmalte (23). Para minimizar a perda da matriz orgânica e as alterações minerais decorrentes da técnica de clareamento podem ser utilizados outros agentes pós-clareamento, como o fosforopetídeo de caseína (CPP) e o fosfato de cálcio amorfo (ACP) derivados da proteína do leite (24, 25). Teoricamente ocorre a precipitação de cristal de fosfato de cálcio na superfície do esmalte substituindo a matriz orgânica que foi eliminada, trocando a parte orgânica por uma nova porção inorgânica (26, 27). A sua aplicação após clareamento poderia remineralizar e promoveria maior vedamento da superfície. Sua aplicação pode diminuir a entrada de pigmentos, garantindo maior estabilidade de cor (28).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESMALTE HUMANO: TECIDO DENTÁRIO E BARREIRA DE DIFUSÃO

O esmalte humano é um substrato predominantemente inorgânico, sólido, constituído de um complexo de cristais finos e longos de hidroxiapatita, cercados de matriz orgânica e água, além de porosidades. O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado, e, portanto, o mais duro do corpo humano (29). Sua espessura em dentes permanentes pode variar nas superficiais mesiais e distais, a até mais de 2,3 mm nas pontas das cúspides. Os poros podem estar nos núcleos do prisma, ou entre os prismas, dependendo do arranjo destes cristais (5). Os poros maiores são relacionados aos espaços nas regiões interprismáticas e os poros menores são provavelmente espaços dentro dos prismas (30,31). O tamanho dos poros no esmalte apresenta uma distribuição bimodal (30) variando de 1 – 14ηm de diâmetros (5,32) com dois picos em 4 e 10 ηm (5,33). O esmalte do canino tem poros do tamanho de 0,7 e 1,3ηm, menores do que os dos incisivos e molares (1,0 e 2,5ηm) (31). O esmalte não possui uma estrutura de poros homogênea (16). Existem constrições nos poros do esmalte dental que podem ser de prismas que cruzam ou canais de interconexão de diferentes diâmetros (30,31).

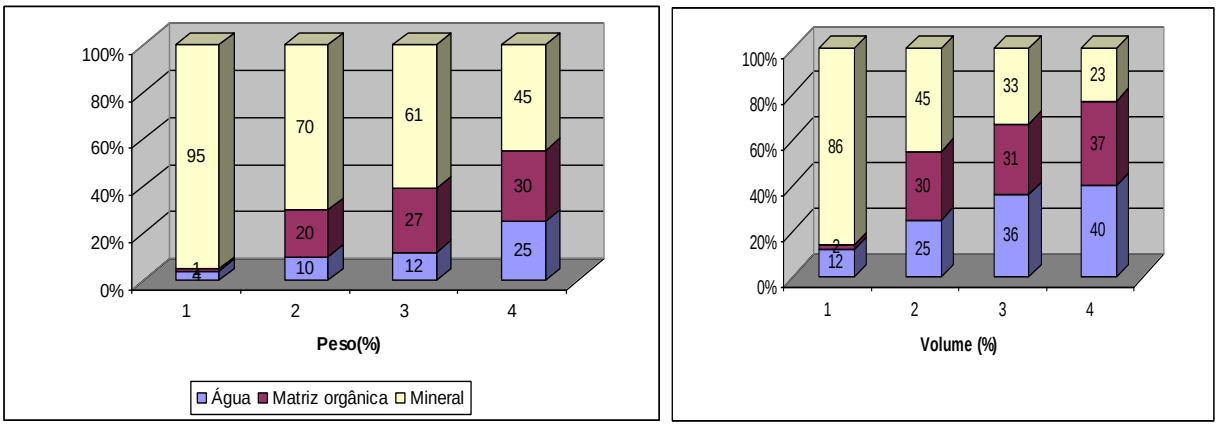
O esmalte se comporta como uma membrana semipermeável e a presença de matéria orgânica permite a microcirculação de fluidos (34). Os canais de difusão do esmalte são ocupados por uma rede macromolecular de material orgânico que controla a sua difusão (16). O volume dos espaços presentes no esmalte é de aproximadamente 0,2% (35). A difusão no esmalte possui uma elevada variação dentro de um mesmo dente, indicando anisotropia, propriedade física que varia com a direção, ou caminhos preferenciais (36). Linden demonstrou que a difusão primeiramente ocorre nos espaços interprismáticos (37). Por outro lado, Burke e Moreno concluíram que os poros não contribuem para o processo de difusão, devido às constrições dos mesmos e aos caminhos preferenciais (36).

A difusão no esmalte varia de 10^{-7} a 10^{-9} cm^2/s (36, 38, 39). A região superficial apresenta baixa difusão (~30%) quando comparada com as camadas mais profundas, próximas à junção amelodentinária. Do esmalte até a junção amelodentinária há um aumento de matriz orgânica, água (40), nível de porosidades (41), e capacidade de sorção de água (31). Na camada externa há menor quantidade de água, 2,7% do volume, enquanto que o restante do esmalte possui 3,7% em volume (40). Há duas fases distintas de difusão, possivelmente devido ao sistema de poros de duplo compartimento (39), ou distribuição de poro bimodal (30). A primeira (97,6 ±3,1% do total da difusão) conhecida como fase rápida, ocorre nos primeiros segundos. Por outro lado, a segunda, denominada de fase lenta, ocorre num tempo relativamente mais longo (16).

A barreira na região superficial do esmalte pode estar relacionada à deposição de proteínas salivares e moléculas grandes incapazes de se difundirem em camadas mais profundas (42). Outra possível explicação pode ser a matriz orgânica que deixa a região superficial menos porosa e menos permeável (16). O escurecimento dos dentes com a idade ocorre devido às alterações estruturais, e, apesar de ocorrer adição de matéria orgânica, também está relacionado com a diminuição da espessura do esmalte, permitindo observar a dentina através da fina espessura de esmalte. Ao passar dos anos o esmalte se torna menos permeável, ao passo que os poros diminuem pela aquisição de íons pelos cristais (43). Os pacientes jovens, em torno de 20 anos de idade, apresentam o dobro da permeabilidade comparado aos pacientes entre 40 e 60 anos (34).

O componente orgânico e a água podem corresponder de 09 a 11% em peso (44), dependendo da idade e do tipo de dente (30). A matriz orgânica ocupa preferencialmente os espaços interprismáticos (37,45). Sua natureza é proteica, com agregado de polissacarídeo, e em sua composição química não há participação do colágeno, característica que a distingue da matriz de outros tecidos mineralizados (46). Basicamente, há dois principais grupos de proteínas, as amelogeninas e as não amelogeninas. Dependendo do tipo de proteína, esta pode ser encontrada em maior ou menor quantidade em certas regiões do esmalte. As amelogeninas são proteínas instáveis, sensíveis ao pH, com peso molecular de aproximadamente 25 kilodaltons (kDa), localizadas entre os cristais de sais minerais, sem estar ligadas a eles. Dentro do grupo das não amelogeninas, as enamelinas, uma fosfoproteína acídica glicolisada, são proteínas estáveis, hidrofílicas, com alto

peso molecular, cerca de 56kDa. Estão localizadas na periferia dos cristais formando as proteínas de superfície, e representam 2-3% da matriz orgânica do esmalte.



1= esmalte 2= dentina 3= cemento 4= osso

Figura 2.1 – Percentual em peso e volume da composição do esmalte, dentina, cemento e osso (44)

Além das amelogeninas e das não amelogeninas existem também as ameloblastinas, ou amelinas, proteínas localizadas nas camadas mais superficiais do esmalte e na periferia dos cristais. Constituem 5% do componente orgânico. As tufelinas (proteínas dos tufos), de 50 a 70kDa, localizam-se na região amelodentinária, no componente do processo de formação do esmalte e constituem 1-2% do componente orgânico (44,46). Sua denominação se deve a aparência semelhante a tufos de grama, regiões finas e curtas com ondulações. Originam-se na região amelodentinária, alcançando um terço da espessura do esmalte. Portanto, apesar da baixa porcentagem de matriz orgânica do esmalte, há diversos tipos de proteínas localizadas tanto nas camadas superficiais do esmalte quanto na periferia dos cristais.

Matriz Orgânica	**Peso Molecular (kDa)**
. Amelogeninas	25
. Não amelogeninas Fosfoproteínas glicosiladas acídicas	
Enamelina	143
Tufelina	60
. Glicoproteínas sulfatadas Ameloblastina	62
Amelina	40
Bainhalina	13-17

Tabela 2.2 - Constituintes da matriz orgânica do esmalte com seu peso molecular (47)

Na estrutura do esmalte existem áreas de maior conteúdo orgânico, de grande interesse no estudo da difusão, como lamelas e tufos. A quantidade de matriz orgânica não se apresenta de maneira uniforme por toda a espessura do esmalte. O maior conteúdo orgânico está localizado no terço mais interno, próximo a região amelodentinária. Os tufos do esmalte são áreas hipomineralizadas que contêm a proteína tufelina. Já as lamelas são regiões hipomineralizadas que chegam até a superfície externa do dente, parecendo verdadeiras rachaduras no dente. São melhores visualizadas em cortes transversais, pois tanto as lamelas, quanto os tufos seguem a direção dos prismas (47).

A presença das estrias de Retzius, buracos focais, fissuras e outras irregularidades contendo proteínas de origem da formação do esmalte, juntamente com os espaços intercristalinos, atuam como caminhos para difusão do esmalte (29)

A composição de aminoácidos da matriz orgânica na área externa do esmalte e na região próximo aos tufos é a seguinte:

Aminoácidos	**superfície**	**próximo Tufos**
ácido aspártico	54	79
threonina	42	52
serina	119	82
ácido glutâmico	106	136
prolina	137	81
glicina	193	62
alanina	53	69
cisteína	4	20
valina	32	52
metionina	34	22
isoleucina	19	23
leucina	66	111
tirosina	23	51
fenilalanina	33	49
histidina	19	27
lisina	26	40
arginina	28	36

Tabela 2.3 - Os dados aparecem como número de aminoácidos em um total de 1000 aminoácidos. (47,48)

A fluidez através do esmalte está relacionada à permeabilidade. É importante correlacionar a permeabilidade do esmalte com a idade (49). O conteúdo

de água na camada externa reduz com a idade. Após a erupção, a maturação reduz a permeabilidade do esmalte, principalmente devido às zonas de permeabilidade ao longo das periquemácias, que são localizadas em estruturas profundas do esmalte dental em pacientes idosos (50).

A difusão é um processo tempo dependente – a quantidade de um elemento que é transportado no interior de outro elemento está em função do tempo. Muitas vezes é necessário saber o quão rápida ocorre a difusão, ou seja, a taxa de transferência de massa (fluxo de difusão). O cálculo é feito pela seguinte fórmula considerando pressão atmosférica:

$$J= M/ At$$

J= fluxo de difusão M= massa A= área t= tempo

Caso o fluxo difusivo não varie com o tempo, pode-se calcular a massa do componente em difusão por unidade de volume do sólido (Kg/m^3 ou g/cm^3). Esta equação muitas vezes é chamada de 1ª lei de Fick (51).

$$J= -D\ dc/dx$$

D= coeficiente de difusão dc = concentração de A - concentração de B

Dx= distância entre A e B no interior do sólido

No caso do dente há provavelmente variação do fluxo difusivo devido à estrutura anisotrópica do dente e aos caminhos de difusão não serem uniformes ao longo de toda a estrutura do esmalte. Isso não faz com que ele entre num regime não estacionário por completo, já que podemos assumir que na superfície a concentração é constante assim como a pressão de difusão.

2.2 PERÓXIDOS

Vários tipos de peróxidos estão presentes no meio ambiente. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos mais representativos dos peróxidos pois

usualmente se encontra em solução aquosa. Ele também é a fonte material usada para produção de outros peróxidos orgânicos e inorgânicos. Além da aplicação na indústria, também é um popular agente antisséptico. O H_2O_2 também é um metabólito intermediário de vários organismos, incluindo os homens. Na Odontologia, vários peróxidos são usados em diversos procedimentos. Peróxido de benzoíla que é capaz de se decompor em baixas temperaturas e liberar radicais livres é o iniciador da reação de polimerização mais comumente utilizado em materiais resinosos. Além do uso do H_2O_2 como agente antisséptico, o peróxido de carbamida também foi utilizado na terapia endodôntica, em soluções orais para redução de placa bacteriana e para o tratamento de doenças periodontais (52). Outra aplicação odontológica dos peróxidos está no clareamento dental.

Os agentes clareadores mais utilizados são o peróxido de hidrogênio ou um precursor dele, o peróxido de carbamida. Ambos apresentam como produto final da reação de degradação na superfície dental radicais oxidantes (HO_2^-, H^* + $^*OOH$, 2 *OH etc) que atuam na clivagem dos cromóforos. H_2O_2 em concentrações de até 40% tem sido utilizado no clareamento de consultório. No início da década de 90, produtos de autoaplicação tornaram-se populares usando o peróxido na forma de gel em concentrações contendo de 1 a 10% H_2O_2, ou de 10 a 22% de peróxido de carbamida aplicados em moldeiras. Mais recentemente produtos contendo peróxidos começam a ser vendidos em farmácias, muitas vezes sem supervisão profissional (53).

2.2.1 Peróxido de carbamida

A concentração mais utilizada para procedimentos de clareamento é peróxido de carbamida a 10% e ainda é considerada a formulação com maior comprovação científica. O peróxido de carbamida se decompõe em 6,5% de uréia e 3,5% de peróxido de hidrogênio. A uréia, decompõe-se em amônia e dióxido de carbono. Já o peróxido se decompõe em água e oxigênio via catalase e enzimas peroxidases. O polímero de polimetileno carboxi conhecido como carbopol é

adicionado a vários clareadores para aumentar a viscosidade, tempo de contato e aumentar a liberação lenta de oxigênio.

O peróxido de carbamida, também é conhecido como “peróxido de uréia”, aplicado em moldeira, além do efeito de clareamento, é um agente que reduz a formação de placa bacteriana e eleva os valores de pH, contribuindo para o controle da cárie. Vários produtos têm utilizado para clareamento, no entanto, a técnica com moldeiras tem sido a mais utilizada. O peróxido de carbamida foi muito utilizado na década de 1960 com finalidade de controlar a inflamação e para manter a saúde gengival. Somente à partir de 1989 que começou a ser empregado para clarear os dentes. Desde esse período, é o método de clareamento mais efetivo e seguro (52).

A eficiência do tratamento clareador depende principalmente da concentração do agente clareador, do tempo de contato com o substrato envolvido, do tipo de seus radicais livres a base de oxigênio, da taxa de liberação desses radicais, de suas capacidades de permeação através dos tecidos dentais mineralizados, de suas habilidades em reagir com as moléculas cromóforas e do número de vezes em que estão em contato com os pigmentos que escurecem o dente (57).

Inúmeras alternativas vêm sendo utilizadas para otimizar a ação dos agentes clareadores, sendo a associação de luz e calor a mais utilizada (58).

Alguns estudos relacionados à adesão na estrutura dental relatam dificuldade em se conseguir certos padrões de esmalte após o condicionamento com ácido fosfórico (H_3PO_4) na superfície do esmalte. Apenas 2% da superfície do esmalte se apresenta idealmente condicionada após o uso de H_3PO_4 (59, 60). Isto se deve à “rede de proteínas” que permanece intacta, resultante da desmineralização superficial do esmalte, dificultando a ação e penetração dos sistemas adesivos. Esta matriz orgânica é constituída das duas principais proteínas: a amelogenina e a enamelina, presentes em uma proporção de 2:1 entre si. Apesar do esmalte ser constituído aproximadamente de 2% em peso de matriz orgânica, se verifica que esta porcentagem em volume é bem superior (11 a 14%) (20, 21, 61).

Assim, como essa “rede de proteínas” atua como uma barreira a ação do condicionamento ácido, poderá também atuar negativamente para uma maior difusão do agente clareador, tanto na superfície quanto em direção às camadas mais profundas.

2.2.2 Peróxido de hidrogênio

Relatos de uso de peróxidos, geralmente combinados com vários ácidos ou outros agentes para remover manchas, podem ser encontrados a mais de séculos. O uso do peróxido de hidrogênio foi sugerido desde 1882 por Harlan, embora não tenha sido utilizado como clareador, mas como coadjuvante em tratamentos endodônticos. Por possuir baixa massa molecular e habilidade para desnaturar proteínas ele tem a capacidade de se difundir profundamente nos tecidos dentários (54).

O peróxido de hidrogênio é um líquido incolor completamente miscível com água. Na tabela 2.1, a seguir, algumas propriedades importantes do peróxido de hidrogênio e da água são comparadas. À medida que se aumenta a temperatura há uma diminuição da densidade relativa e da viscosidade. Tais reduções auxiliam na difusão do peróxido de hidrogênio na estrutura dental em regiões mais profundas em direção a polpa. Este aumento de temperatura ocorre quando o peróxido é associado a alguns tipos de fontes de luz. A decomposição é dependente do pH, da temperatura e das impurezas de sua composição.

Propriedade	**Peróxido de hidrogênio**	**Água**
Ponto de ebulição(^{o}C)	150,2	100
Densidade relativa (g cm^{-3})		
0 ^{o}C	1, 47	0,9998
20 ^{o}C	1,45	0,998
25 ^{o}C	1,44	0,9971
Viscosidade (mPa s)		
0 ^{o}C	1,819	1,792
20 ^{o}C	1,249	1,002
Índice de refração ($\eta^{20}{}_{D}$)	1,41	13,330

Tabela 2.1 - Propriedades gerais do peróxido de hidrogênio e da água (Fonte do livro applications of Hydrogen peroxides and derivatives[55])

A decomposição do peróxido de hidrogênio, quando ativado direta ou indiretamente por diferentes substâncias, pode derivar inúmeros oxidantes, tais como
HOO^-, OH^+, $HO^\cdot$, H_2SO_5, R(CO)OOH, dentre outros *(55).*

Em meio alcalino o peróxido de hidrogênio dissocia-se da seguinte forma:

$$H_2O_2 \rightleftarrows H^+ + HO_2^- \quad pK_a = 11,6$$

Em condições extremamente ácidas o peróxido de hidrogênio pode ser protonado ou convertido em algo equivalente ao cátion hidroxilado:

$$H_2O_2 + H^+ \rightleftarrows H_3O_2^+$$

$$H_2O_2 + HA \rightleftarrows H_3O_2^+ + A^-$$

O –OH é o oxidante mais forte dos radicais oxi e interage com as ligações duplas das insaturações presentes no esmalte e na dentina. O radical –OH degrada os pigmentos (substâncias orgânicas poliméricas) em substâncias de baixo peso molecular incolores. Em meio alcalino O–OH também é catalisado, ao contrário do que ocorre em meio ácido. No meio alcalino o peróxido de hidrogênio dissocia-se em – OH e –HOO, que são alguns dos radicais responsáveis no processo de clareação dental (56).

Além destas condições, sob radiação UV, a 254ηm, cada mol de peróxido de hidrogênio pode gerar dois radicais hidroxilas. Os radicais hidroxilas também podem ser gerados com a associação de íons metálicos. O mais comum é o Ferro (II), sendo esta combinação conhecida como reação de Fenton.

2.3 DESPROTEINIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTAL E AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS OXIDATIVAS NA MATRIZ ORGÂNICA

2.3.1 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito apresenta uma série de propriedades, tais como: atividade antimicrobiana, solvente de matéria orgânica, desodorizante, clareadora, lubrificante e baixa tensão superficial. É também detergente, porque promove a saponificação dos lipídios (62). A forma de apresentação do hipoclorito de sódio somente existe em solução. Neste estado ele origina hidróxido de sódio (base forte) e ácido hipocloroso (ácido fraco), de acordo com a reação abaixo:

$$NaOCl + H_2O \leftrightarrow NaOH + HOCl$$

Dependendo do pH do meio, o HOCl pode se encontrar ionizado (meio alcalino, pH > 9 ou não-ionizado, meio ácido, pH < 5,5).

$$\underset{\text{Ácido Hipocloroso}}{HOCl} \leftrightarrow \underset{\text{hipoclorito}}{OCl^-} + \underset{\text{hidrogênio}}{H^-}$$

O NaOH é uma base forte, estando praticamente 100% dissociada.

$$NaOH \longrightarrow Na^+ OH^-$$

O hipoclorito de sódio é um composto instável, por ser oxidante, pode ser estabilizado em função da alcalinidade cáustica, por duas vias:

. direta: O NaOH em excesso neutraliza ácidos, em especial ácido carbônico, presente quase sempre sob a forma de CO_2, transformando-o em carbonato de sódio.

. indireta: a alcalinidade que eleva o valor do pH próximo a 13,5, retarda a reação auto-redox do hipoclorito, a formação de clorato ($3\ ClO^- \longrightarrow 2Cl^- + ClO_3$). A velocidade da reação é mínima e valores alcalinos. Assim a solução de hipoclorito conterá sempre pequenas concentrações de clorato (63). Quanto maior o teor de carbonato mais instável estará a solução de hipoclorito de sódio.

As soluções de NaOCl obtidas por meio de processo eletrolítico apresentam concentrações variáveis de 10 a 17%, Normalmente a diluição desta origina diversas soluções cloradas, que geralmente são usadas em Endodontia, assim como as diversas marcas de águas sanitárias (64). O ácido hipocloroso se encontra 100% não ionizado em pH próximo a 5,5 e 100% ionizado em pH próximo a 10. Daí a importância do pH na ação microbiana do cloro. Com a baixa do pH da solução de hipoclorito de sódio com valores de pH de 9 para 5, forma-se progressivamente o ácido hipocloroso. Este ácido é facilmente dissociado em meio alcalino.

Nas soluções fortemente ácidas com pH inferior a 5, o cloro elementar constitui a forma predominante na reação :

$$HOCl + H^{+} + Cl^{-} \longleftrightarrow Cl_2 + H_2O$$

Todavia, o pH alcalino (acima de 10) mantém a estabilidade das soluções de NaOCl. Por isso, o pH das soluções cloradas deve chegar às condições de acidez unicamente no momento do uso com a liberação do cloro nascente em meio ácido.

Existem vários fatores que influenciam a capacidade das soluções cloradas em dissolver tecido orgânico, tais como: relação entre o volume da solução e a massa de tecido orgânico; superfície de contato entre o tecido e a solução de hipoclorito; tempo de ação; temperatura da solução; agitação mecânica; concentração da solução e freqüência da renovação da solução (65-67).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é empregado na desproteinização da dentina (19, 68-72). Poucos estudos existem quanto ao emprego de hipoclorito de sódio em concentração de 5,25% (equivalente a 52.500 ppm) para desproteinização do esmalte (73-76). O processo para obtenção ocorre a partir da eletrólise de uma solução de cloreto de sódio. Dependendo das condições poderá fornecer além do hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, cloro, hidróxido de sódio e ácido clorídrico (77). A capacidade de dissolução tecidual permite a fragmentação, facilitando assim a remoção. A capacidade de dissolução se deve ao efeito combinado do hidróxido de sódio e do ácido hipocloroso. O hidróxido de sódio reage com ácidos graxos (óleo e gorduras) presentes na matéria orgânica, formando sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool). (equação I). Sua reação faz com que ocorra a diminuição da concentração dos íons de hidroxila (^{-}OH), promovendo a redução do potencial hidrogeniônico. Reage também com aminoácidos das proteínas, formando sal e

água (reação de neutralização) (equação II). O ácido hipocloroso reage com o grupamento amina dos aminoácidos, das proteínas, formando cloraminas e água (equação III) (78, 79).

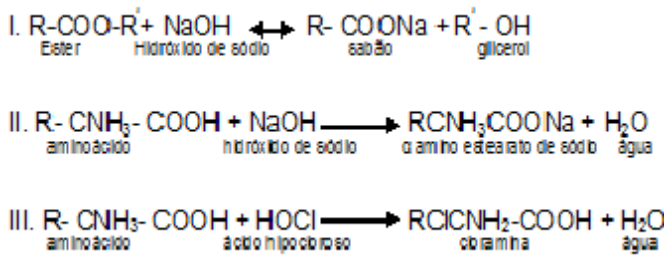


Figura 2.2- Dissolução tecidual pela ação do hipoclorito de sódio

2.4 USO DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA PARA ESTUDO E ANÁLISE DE DENTES CLAREADOS: UTILIZAÇÃO DE PARÂMETROS ESTRUTURAIS

Desde a invenção dos raios-X em 1895 por Roetgen, este representa grande avanço na área de diagnóstico, tornando-se possível visualizar estruturas internas do corpo de maneira não invasiva (80). O primeiro relato de microtomografia por raios-X foi publicado em 1954 (81), e desde esta época este método é utilizado em diversas áreas da ciência, como análise de osso, mineralogia, biologia, ciência dos materiais e engenharia. No final dos anos 80 a primeira pesquisa com micro-CT foi publicada no campo da Odontologia, mas somente nos últimos anos vem ganhando importância na pesquisa odontológica (82). O micro-CT é utilizado somente em experimentos laboratoriais. Apesar disso, existem novos sistemas de tomografia digital volumétrica para diagnóstico em clínicas odontológicas. Entretanto, a qualidade de imagem e resolução dos sistemas digitais odontológicos é inferior ao micro-CT.

Na Medicina, o emprego do micro-CT é utilizado em grande parte em análises quantitativas em ossos. Algumas limitações decorrentes das formas geométricas simples em análises 2D podem ser superadas na análise por micro-CT (83). Na técnica de micro-CT as imagens são obtidas em vários ângulos e reconstruídas produzindo uma distribuição espacial em três dimensões da densidade

dos materiais envolvidos, que no caso são estruturas que constituem o dente (84). Micro-CT utiliza-se da atenuação do feixe de raios-X para caracterizar a distribuição espacial da densidade do material. Ao observar uma radiografia convencional esta se limita a somente duas dimensões que representam a atenuação do material ao longo do caminho dos raios-X, enquanto que os escaneamentos por CT produzem imagens compostas de elementos volumétricos de $1mm^3$ (voxels).

Micro-CT é derivado da tomografia computadorizada axial (TCA), muito aplicada laboratorialmente. É uma técnica não destrutiva, que permite alta resolução espacial de estruturas internas (85). Dependendo da fonte de raios-X e a forma do scanner, a resolução linear do micro-CT é de aproximadamente 2-100µm, o que permite avaliar estruturas finas com pequenos micrometros, como as estruturas do esmalte e da dentina (86). Os dados podem ser registrados em duas ou três dimensões e usados para análise qualitativa ou quantitativa (87).

O micro-CT é uma miniatura do escaner de tomografia computadorizada axial (TCA). As diferenças do micro-CT e da tomografia computadorizada axial são as seguintes: Primeiro, as diferentes projeções na tomografia computadorizada médica se devem à fonte de raios-X e detector que se move ao redor do objeto (paciente), causando vibrações mecânicas. Para o estudo dos materiais, é possível rotacionar o objeto, reduzindo a vibração e aumentando a resolução. A segunda diferença é o tamanho da fonte de raios-X que é de 5-10 µm em microfocus da tomografia computadorizada comparado com milímetros da utilizada na área médica. Este menor tamanho aumenta a precisão da projeção, reduzindo penumbra, ganhando também em resolução (82).

Micro-CT é uma variação dos métodos de atenuação de raios-X, que tem sido utilizada para estudar áreas desmineralizadas. Atenuação significa diminuição gradual do fluxo de radiação devido ao processo de espalhamento e absorção da radiação. Em ambos os processos, o fóton dos raios-X interage com os átomos do material. No espalhamento, o fóton dos raios-X continua com a mudança de direção, com ou sem perda de energia. Na absorção, a energia do fóton dos raios-X é completamente transferida para os átomos do material. A lei fundamental de atenuação, também chamada lei de Beer-Bouguer-Lambert, estabelece que o processo de atenuação é linear na intensidade da radiação e na quantidade de matéria, o estado físico (por exemplo a composição) é mantido constante. O

coeficiente de atenuação é uma propriedade inerente, depende do número atômico do objeto, densidade e intensidade da energia dos raios-X (88).

O princípio da absorção do micro-CT consiste na reconstrução do coeficiente de atenuação linear, dentro de um objeto de medidas de feixe de atenuação de raios-X que passam através da amostra em diferentes ângulos de visão (89).

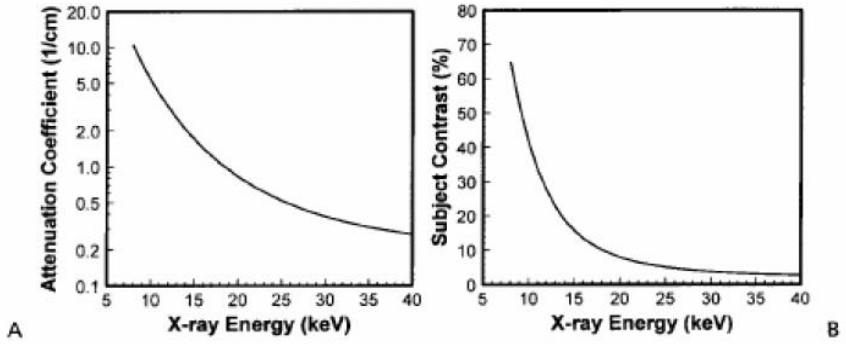
O espectro de energia do micro-CT está relacionado com a penetrabilidade dos raios-X. Maior energia penetra mais eficientemente, mas pode ser menos sensível às mudanças da densidade do material e da composição. O espectro de energia gerado usualmente é descrito em pico de energia de raios-X (kVp). Já o nível de intensidade máxima é menos do que metade do pico (keV). A intensidade dos raios-X diretamente afeta a intensidade do ruído e também a claridade da imagem (82).

Os detectores mais utilizados são as câmeras CCD *(charge-couple-device).* A imagem projetada pelo conjunto de lentes no CCD é convertida em um sinal elétrico quantitativo.

A análise por micro-CT de dentina mostra um menor grau de mineralização. O menor conteúdo mineral se deve a maior quantidade e diâmetro dos túbulos dentinários, assim como a maior porção de água e fase orgânica. Estes fatores reduzem a atenuação dos raios-X da junção amelodentinária até as camadas internas da dentina (82, 90).

Um dos parâmetros de interesse para auxiliar na avaliação da perda mineral é a determinação do coeficiente de atenuação linear. O coeficiente de atenuação linear, ou extinção (μ), é uma carga monocromática, relacionada à atenuação da radiação, associada ao feixe monocromático, de acordo com a lei de Beer-Bouguer-Lambert. No caso de não ocorrer espalhamento, se refere como coeficiente de absorção linear e, no caso de não absorver, é também chamado de coeficiente de espalhamento linear (91). Basicamente, a absorbância é proporcional à concentração das moléculas que absorveram a radiação.

O coeficiente de atenuação linear (μ) é a probabilidade de um fóton de raios-X ou de raio gamma interagir com o material. Por unidade de comprimento é normalmente descrito em unidade de cm^{-1} e depende da energia do fóton, composição química e densidade física do material.



retirada da tese de Tatiana Luedemann, 2007(82)

Figura 2.3 - O valor do coeficiente de atenuação linear aumenta à medida que a energia do raios-X diminui; **B**: O contraste da amostra em função da energia do raios-X. Diminuindo a energia do raios-X, aumenta o valor do coeficiente de atenuação linear, este aumenta o contraste da amostra.

Diferenças dos coeficientes de atenuação linear entre tecidos são responsáveis pelo contraste da imagem de raios-X. No esmalte há maior atenuação dos feixes de raios-X quando comparado com a dentina.

Devido esta relação inversamente proporcional dose/coeficiente de atenuação linear, há dificuldade na análise comparativa do coeficiente de atenuação linear entre diferentes trabalhos de micro-CT.

O micro-CT na Odontologia tem sido utilizado satisfatoriamente em análises quantitativas e tri-dimendionais dos materiais (92, 93).

Existem inúmeras vantagens no uso de micro-CT:

. permite medir diretamente em 3D a morfologia da estrutura, como a espessura estrutural e separação;

. criar modelo de elementos finitos;

. maior volume de interesse da amostra pode ser analisado;

. medidas podem ser analisadas mais rapidamente;

. a morfologia da estrutura pode ser escaneada pelo método não destrutivo;

. o micro-CT pode estimar a mineralização do tecido pela comparação da atenuação do dente com padrões de hidroxiapatita; e

. os dados de densidade mineral com a morfologia em alta resolução do dente escaneado pelo micro-CT permite criar um modelo de elementos finitos para estimar o comportamento mecânico (94).

A utilização de micro-CT para análise de dentes clareados permite que amostras possam ser preservadas e analisadas depois de realizar diferentes

procedimentos em um mesmo estudo. Há otimização do tempo por não precisar de preparo de amostras. Além do mais não necessita uso de corantes no objeto, o que pode afetar a organização da estrutura investigada. A grande vantagem é analisar as estruturas internas com alta resolução espacial tri-dimensional e sem destruição das amostras (82). Em análises de ossos encontrou-se uma alta correlação de análises histomorfométrica em 2D com medidas morfológicas em 3D, confirmando a alta reprodutibilidade e precisão nas medidas morfológicas (95, 96).

Vários trabalhos têm utilizado parâmetros de microarquitetura na avaliação do trabeculado ósseo (95, 97-100), como por exemplos, microtomografia por raios-X, micro RMI, síncrotron também permitindo medida 3D da microarquitetura estrutural em amostras ósseas pelo ensaio não-destrutivo. Com a introdução da mensuração em 3D por técnicas de microscopia, tornou-se possível obter descrição completa de estruturas espaciais complexas. Como conseqüência, novos métodos em 3-D são utilizados para estimar parâmetros morfométricos, tais como volume, área de superfície e conectividade pelo processamento direto de imagens em 3-D.

2.4.1 Parâmetros estruturais

A origem da análise da microarquitetura óssea se deve ao naturalista escocês, John Hunter (1728-1793), ao examinar mandíbulas de animais, identificando áreas de destruição e aposição óssea (101).

Em 1980, ocorreu um maior impulso após o modelo matemático para microarquitetura óssea proposto por Michael A. Parfitt, reconhecendo a importância da anisotropia. Parfitt propôs técnicas assumindo que todo trabeculado possui a forma de placas ou hastes (“the plate and rod” model) (101).

Atualmente os parâmetros de histomorfometria usado para descrever o trabeculado ósseo são baseados nos princípios de Parfitt do modelo “plate and Rod”. Alguns descritores da microarquitetura são: espessura estrutural – *structural thickness* (St.Th, em micrometros), mais exatamente medida da densidade estrutural, separação estrutural – *structural separation* (St.Sp, em micrometros), índice de fragmentação – *fragmentation index* (Fr.I). Nesse estudo foram utilizados

estes parâmetros empregados no estudo de estruturas ósseas para se avaliar a estrutura dental.

Com a evolução dos computadores e o interesse em realizar análises no campo tridimensional, vários métodos têm sido propostos para estudar o trabeculado ósseo, independente da superfície e das medidas do perímetro, como por exemplo, no modelo placa ou hastes (plate and Rod model).

Espessura estrutural - *structural thickness* (St.Th, em micrometros), é um método que estima a espessura local pela adaptação de esferas em cada ponto da estrutura.

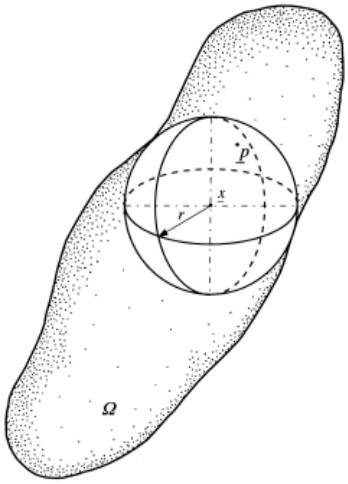


Figura 2.5 – Método de mensuração da espessura estrutural por adaptação de esferas. Retirado do artigo T. Hildebrand; 1995 (102)

Este método é baseado na determinação da espessura direta através do volume. É definida espessura local em determinado ponto na estrutura como sendo o diâmetro da esfera mais larga que inclui o ponto e que se adapta completamente dentro da estrutura. Este método não depende do valor absoluto do coeficiente de atenuação linear.

– índice de fragmentação – *fragmentation index* (Fr.I): é o método proposto por Hahn et al. (103), que se baseia no fato de que em uma estrutura perfeitamente conectada, superfícies côncavas são abundantes, enquanto convexas são a minoria. Por outro lado, em uma estrutura desconectada as superfícies côncavas se tornam menos abundantes e as superfícies convexas mais numerosas. Praticamente este método é realizado por análise da imagem, realizando uma dilatação da imagem original da rede de trabeculado e medindo perímetros e áreas

de superfície antes e após a dilatação. Quando uma rede estrutural está altamente desconectada, as superfícies convexas aumentam e o processo de dilatação aumenta drasticamente, enquanto a área é moderadamente afetada. Isto permite baixos valores de índice de fragmentação em uma estrutura altamente conectada e altos valores quando a estrutura esta desconectada (98).

2.4.2 Método (s) de análise ultraestrutural da superfície do esmalte

Uma ferramenta muito utilizada para avaliar a superfície do dente é o microscópio eletrônico de varredura (MEV). Desenvolvido por M.Von Anrdenne em 1940, o seu início só foi em 1948, com os desenvolvimentos do Prof. C. W. Oatley (Universidade de Cambridge) com resolução de 50ηm e um aumento máximo de 8.000x (104).

Em 1968, foi vendido pela firma DUPONT o primeiro MEV comercial (Stereoscan/Cambridge). O microscópio eletrônico é composto de um canhão eletrônico (lente eletrostática) onde se localiza o filamento emissor de elétrons, de uma coluna composta de lentes eletromagnéticas por onde passam os elétrons originados do aquecimento do filamento pela passagem de uma corrente conveniente (emissão termiônica) e acelerados por lente eletrostática por uma diferença de potencial que pode variar desde 5 a 1000 kV, dependendo se é um microscópio eletrônico de varredura ou de transmissão.

A função principal das lentes é a focalização e alinhamento do feixe de elétrons; que passa no interior das lentes. Há a necessidade de se ter vácuo no interior das mesmas para que os gases ou moléculas não interfiram no caminho dos elétrons e nem diminuam a densidade dos mesmos.

A principal razão da utilização do MEV é a possibilidade em se observar amostras espessas, ou seja, não transparentes a elétrons. A alta resolução pode ser atingida na ordem de 100Ǎ e a grande profundidade de foco pode ser atingida na ordem de 300 vezes melhor que o microscópio ótico. Pode-se obter magnificações de 10 a 100.000x. São obtidas informações topográficas utilizando-se elétrons de baixa energia, da ordem de 50eV. Informações sobre o número atômico ou orientação são obtidas utilizando elétrons de alta energia (104).

Outra importante característica do MEV é a possibilidade de se obter imagens tridimensionais da amostra, que é resultado da larga profundidade de foco.

Outra forma de operação do microscópio eletrônico de varredura é a detecção de raios-X característicos correspondentes a um determinado elemento químico conhecido.

Em microanálise de raios-X, a análise é realizada na faixa de 0,185 a 26keV, onde se encontra pelo menos uma linha útil das famílias K, L ou M para os elementos da tabela periódica. Assim, os sinais fracos correspondentes à baixas concentrações de elementos são difíceis de se detectar.

Há dois tipos de espectrometria por raios-x:

a) Por dispersão de energia (Energy Dispersion Spectrometry – EDS);
b) Por dispersão de comprimento de onda (Wavelength Dispersion Spectrometry – WDS).

O espectrômetro EDS trabalha com o princípio de que a energia de um fóton está relacionada com a frequência de onda. Assim, os fótons com energias correspondentes a todos espectros de raios-X atingem o detector EDS quase simultaneamente. Sendo o processo de medida rápido (segundos), é possível analisar os comprimentos de onda simultaneamente (104).

Apesar da eficiência na coleta de raios-X neste tipo de detector, uma janela de berílio com espessura de 8μm, usada para isolar o cristal de detecção (geralmente de silício dopado com lítio) é suficiente para absorver praticamente todos os raios-X com energia abaixo de 0,75 keV, impossibilitando a análise de elementos com números atômicos menores que 10.

No EDS o tempo de análise é aproximadamente de um minuto e apresenta uma precisão relativa de em torno de 5% (105).

2.5 REMINERALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE COM ACP-CPP: INTERESSE CLÍNICO EM SESSÕES PÓS-CLAREAMENTO

O uso de agentes remineralizadores na Odontologia moderna está direcionado às lesões cariosas iniciais (manchas brancas) ou alterações superficiais

não invasivas para prevenir a progressão, melhorar a estética, a resistência e a função. A remineralização consiste em qualquer reparo dos cristais do esmalte pelo ganho de mineral em regiões subsuperficiais. Esse processo não abrange os casos em que ocorrem a simples precipitação de mineral na superfície.

Esta capacidade de remineralizar superfícies de esmalte se deve principalmente aos íons de cálcio e fosfato. No entanto, a precipitação das fases de cálcio e fosfato presentes na saliva normalmente não ocorrem devido à presença de proteínas salivares, especificamente a estaterina. Isso ocorre porque segmentos das proteínas se unem aos aglomerados de cálcio e fosfato, prevenindo o crescimento do aglomerado de íon ao tamanho crítico necessário para precipitação e transformação em fase cristalina (106).

O flúor pode ser agente remineralizador se estiver disponível na saliva íons de cálcio e fosfato suficientes quando o flúor for aplicado. Para formar fluorapatita ou fluorhidroxiapatita, íons de cálcio e fosfato são necessários, assim como íons de flúor. A remineralização do esmalte *in-situ* e a retenção de flúor na placa é dependente dos íons de cálcio disponíveis (107). Para cada 2 íons de flúor, são necessários 10 íons de cálcio e 6 íons de fosfato para formar uma unidade de fluorapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$]. Na aplicação tópica de íons de flúor, a disponibilidade de íons de cálcio e fosfato pode ser fator limitante para ocorrer a remineralização de esmalte, e isso pode ser exarcerbado em condições de xerostomia (108).

Os sistemas de remineralização devem fornecer cálcio, fosfato e íons de flúor em regiões subsuperficiais do que somente uma deposição na camada superficial. A grande dificuldade clínica na aplicação de sistemas remineralizadores que contêm cálcio e fosfato está na baixa solubilidade dos fosfatos de cálcio, particularmente na presença de íons de flúor. Nenhum sistema remineralizador possui baixa concentração de cálcio e fosfato, além do mais, não são efetivos em localizar íons na superfície do esmalte e promover a remineralização subsuperficial do esmalte em estudo *in-vivo* (109). O flúor também não protege o esmalte contra erosão em pH muito ácido como 1,2 (110). Por isso é necessário buscar novos agentes remineralizadores contra a ação erosiva de substâncias na superfície dos dentes. Razão pela qual surgiram sistemas de alta concentração de cálcio e fosfato que podem ser categorizados em 3 diferentes tipos: cristalina, amorfo instável ou amorfo estabilizado.

2.5.1 Fosfato de cálcio – forma cristalina

Embora os tratamentos clareadores ofereçam uma melhora na estética, o efeito destes agentes na estrutura dental ainda continua a ser discutido. O clareamento afeta diretamente a fase orgânica (proteínas) do dente, mas também altera a fase mineral, resultando em alterações morfológicas da superfície do dente (111).

A aplicação de vidros bioativos pode reverter estes danos (112). Eles possuem a capacidade de unir quimicamente aos tecidos duros e seus componentes são óxidos de cálcio, sódio, fósforo e sílica. Estudos *in vivo* demonstraram suas capacidades de formar uma camada de hidroxiapatita na superfície (113, 114).

O problema da utilização do material cristalino na cavidade oral está na baixa solubilidade das fases de fosfato de cálcio, íons de cálcio e fosfato não estão disponíveis para remineralização. A faixa de pH da saliva faz com que as fases cristalinas não se dissolvam (115). Alguns exemplos são a bruxita, fosfato tricálcio (TCP), vidros bioativos adicionados a alguns produtos odontológico, mas sem eficácia comprovada quanto a remineralização *in vivo* (116).

2.5.2 Fosfato de cálcio amorfo não estabilizado

O fosfato de cálcio amorfo (ACP) é um sistema não estabilizado de cálcio e fosfato, que foi desenvolvido comercialmente onde o sal de cálcio (ex. sulfato de cálcio) e sal de fosfato (ex. fosfato de potássio) são fornecidos separadamente (ex. compartimento de câmara-dupla). Quando os sais se misturam na saliva, eles se dissolvem liberando íons de cálcio e fosfato para produzir uma atividade iônica que excede a solubilidade de uma precipitação imediata do ACP. No meio oral as fases de ACP são potencialmente muito instáveis e podem rapidamente transformar-se em uma fase cristalina termodinamicamente estável (ex. hidroxiapatita). Entretanto, antes da transformação de fase, íons de cálcio e fosfato devem estar disponíveis para promover a remineralização da subsuperfície do esmalte (116).

A conversão do ACP é complexa e depende da composição dos ACPs e das condições clínicas em que se encontra. A hidrólise do ACP puro em apatita, em pH de 7,4 e 37°C, é rápida, ocorrendo dentro de 6 minutos (117). O processo de conversão é afetado por íons inorgânicos como flúor, carbonato, magnésio e estrôncio, assim como compostos orgânicos, tais como proteínas e espécies biomoleculares presentes no meio oral.

Compostos de fosfato de cálcio amorfo (ACP) têm as mais altas taxas de formação e dissolução dentre todos os fosfatos de cálcio. O ACP hidrolisa para formar a apatita, semelhante à apatita carbonatada, um mineral do dente (118).

2.5.3 Fosfato de cálcio amorfo estabilizado

Caseína é o maior grupo de proteínas encontradas no leite, estando em torno de 80% do total de proteínas (119). No leite, caseína existe em micelas que estabilizam os íons de cálcio e fosfato. A capacidade de estabilizar os íons de cálcio e fosfato se deve à liberação de pequenos peptídeos (fosforopeptídeos de caseína) por digestão enzimática. Com isso se deu o desenvolvimento do fosfato de cálcio amorfo estabilizado por fosforopetídeo de caseína (ACP-CPP) tecnologia chamada comercialmente de Recaldent (120). Estes complexos têm sido incorporados em gomas de mascar sem açúcar [Trident Xtra Care (Americas), Recaldent (Japão) e cremes dentais [Tooth mousse e tooth mousse plus (Europa e Australia), MI Paste e MI Paste Plus (Japão e América)]. Alguns cremes dentais adicionaram flúor ao ACP-CPP, como por exemplo MI Paste Plus.

MI Paste Plus é um produto que contém 900 ppm de flúor, sendo que, apesar de sua capacidade de aumentar a remineralização *in vitro* através da deposição de precipitados de cálcio contendo flúor, nenhum trabalho foi publicado mostrando sua eficácia *in vivo*. No entanto, o flúor potencialmente pode interagir com o componente ACP do complexo de caseína e precipitar em fluoreto de cálcio, fornando componentes inorgânicos com nenhuma ação específica (118). Os sistemas biológicos regulam a solubilidade dos íons de cálcio e fosfato pelas proteínas. As conseqüências da regulação desse sistema podem resultar em

calcificação patológica, como a existência de cálculos. Dentre as proteínas estabilizadoras incluem caseínas do leite (121) e estaterina da saliva (106). Os sistemas de remineralização que replicam as propriedades da caseína do leite e estaterina da saliva são os fosforopeptídeos de caseína (CPP).

2.5.4 Fosfato de cálcio amorfo estabilizado por fosforopetídeo de caseína (ACP-CPP)

Os fosforopeptídeos de caseína (CPPs) são aproximadamente 10% em peso da proteína de caseína. Os quatro maiores CPPs contêm a sequência –Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu onde Ser(P) representa um resíduo do fosfoseril, sendo usado para estabilizar altas concentrações de cálcio e fosfato em pHs ácidos e básicos (122, 123). Esta interação previne o crescimento de aglomerados de cálcio e fosfato a tamanhos críticos necessários para nucleação ou transformação de fase (124). Estas propriedades são similares a estaterina encontrada na saliva, no entanto a capacidade dos CPPs é significantemente superior devido à maior quantidade de fosfoseril e outros resíduos ácidos.

O ACP-CPP tem raio hidrodinâmico de 1.53±0.04ηm (124). Pelo seu tamanho e eletroneutralidade dos nanocomplexos, é esperado que entre nas porosidades da subsuperfície do esmalte e se difunda em diferentes gradientes de concentração (123). Os CPPs têm grande afinidade por apatita (124), ao entrar no cristal se unem provavelmente à sua superfície mais favorecida. O potencial de difusão em camadas mais profundas pode ser devido ao íon $CaHPO_4$ (122, 123). A medida que o par de íon neutro se difunde no esmalte vai se dissociando ao longo do caminho, produzindo íons de cálcio e fosfato capazes de se depositarem nos espaços dos cristais, promovendo crescimento dos mesmos. Além de se unir à superfície do dente, é capaz de se unir à placa gengival, o que contribui para a elevação dos níveis de cálcio e fosfato disponíveis (109).

Há inúmeras evidências científicas demonstrando a ação do ACP-CPP em promover a remineralização de lesões subsuperficiais do esmalte em estudos laboratoriais, *in situ*, evidências clínicas e revisões sistemáticas (123, 125-128).

Apesar de vários trabalhos de pesquisa avaliando a participação do fosforopeptídio de caseína e fosfatos de cálcio nos processos de mineralização, não há evidência clínica suficiente (quantitativa, qualitativa, ou ambas) em longo prazo quanto ao uso de CPP-ACP em relação à técnica de clareamento e tratamento de hipersensibilidade (129). Devido a dificuldade técnica e metodológica a maioria dos trabalhos são conduzidos laboratorialmente.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo é avaliar novo método de clareamento de consultório seguro e conservador. Avaliar o esmalte dental clareado com peróxido de hidrogênio a 35%, associando tratamento de desproteinização com hipoclorito de sódio, e remineralização com o complexo ACP-CPP. Para tal serão avaliadas alterações na cor, no brilho e na ultraestrutura da superfície do esmalte. As hipóteses testadas são as seguintes:

1) A desproteinização do esmalte com NaOCl pode otimizar o brilho e clareação ao longo do tempo em dentes bovinos;

2) A desproteinização do esmalte com NaOCl não altera a rugosidade superficial em dentes bovinos;

3) A desproteinização do esmalte com NaOCl não altera a ultraestrutura inorgânica em dentes humanos;

4) A associação de ACP-CPP após clareamento de consultório pode reduzir a clareação e a rugosidade em dentes bovinos;

5) A associação de ACP-CPP após clareamento de consultório pode recuperar alterações estruturais ao longo do tempo em dentes humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos de superfície, assim como os respectivos protocolos, estão listados na tabela a seguir.

GRUPO	PRODUTO / Fabricante/Lote	PROTOCOLOS CIÍNICOS*
GC **(Controle + Consultório)**	**35% H_2O_2** (Pola-Office®, SDI, Australia) 083122	Aplicação do gel clareador em 4 sessões de 8 min cada
GE1 **(Primer+Consultório)**	**NaClO 5,25% + 35% H_2O_2** (Center Fórmula, Brazil); (Pola-Office®, SDI, Australia)	Aplicação do agente desproteinizante ativamente na superfície por 1 min,seguido do protocolo do GC
GE2 **(Consultório+ACP-CPP)**	**35% H_2O_2 + Ca^{+2} PO_4^- pasta** (Pola-Office®, SDI, Australia); (MI Paste®, GC America, Japan) 070	Similar ao GC, seguido de aplicação por 5 min de ACP-CPP na superfície clareada e depois lavado com água destilada. O protocolo ACP-CPP foi repetido diariamente, durante 7 dias.

Tabela 4.1 – Caracterização dos tratamentos na superfície do esmalte

*Todos protocolos clínicos são baseados nas recomendações dos fabricantes

4.1 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE COR, BRILHO E RUGOSIDADE EM DENTES BOVINOS

4.1.1 Preparo da amostra

Os fatores analisados foram tratamento superficial antes e imediatamente após o clareamento, listados na tabela 4.1.

Foram utilizados 15 dentes incisivos bovinos sem cárie, trincas ou defeitos. Foram seccionados na junção cemento-esmalte e vestíbulo-lingual usando uma máquina de corte com disco de diamantes (Isomet 1000; Buehler Ltd, Lake Buff, Il, EUA) separando a raiz da porção coronária e a porção mesial da distal obtendo assim 30 fragmentos. Os espécimes foram aleatoriamente submetidos aos diferentes tratamentos (n=10). As variáveis analisadas foram alteração de cor (ΔE), parâmetros l* e b*, e rugosidade superficial (R_a, R_t, R_{Sm}). Os fragmentos de esmalte e dentina foram planificados sob irrigação em uma máquina de polimento (Struers A/S Rodovre, Dinamarca) com lixas de Al_2O_3 com granulações 600 e 1200.

Para remover resíduos decorrentes do polimento, os dentes foram colocados em ultrasom (Thorton, T14 , Brasil) com água deionizada por 10 minutos. Os espécimes foram armazenados a 37±0.5ºC em umidade relativa de 100% mantidos até a utilização num dos grupos experimentais.

4.1.2 Avaliação de cor

Instrumentos como colorímetros têm sido utilizados na indústria e na pesquisa para medir cor de uma larga variedade de materiais e substratos. Colorímetros têm filtros de cor que aproximam a função espectral de um observador padrão e geralmente são utilizados para medir cor em X, Y, Z, ou nos parâmetros do CIELab.

As medidas de cor foram realizadas com um colorímetro (Minolta CR-221, Osaka, Japão) de acordo com CIELab com uma fonte de luz padrão D65. O

parâmetro CIE L* corresponde ao grau de luminosidade e escurecimento, onde a* e b* correspondem às coordenadas vermelho ou verde e amarelo ou azul (+b*= amarelo, -b*= azul,) respectivamente. O colorímetro calibrado com padrão branco, área de medida de 3 mm de diâmetro e usa um ângulo de iluminação de 45º e um ângulo de visão 0º.

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

Onde ΔL^*, Δa^*e Δb^* são as diferenças respectivamente do antes (baseline) e os diferentes períodos (imediatamente após, 4 dias e 7 dias).

Os parâmetros mais analisados foram ΔE e parâmetro b* porque um estudo anterior não detectou alteração no eixo vermelho-verde depois de utilizar peróxido de hidrogênio 30% por 1 dia (4).

As medidas foram todas sempre realizadas numa mesma sala, com mesma iluminação.

4.1.3 Brilho de superfície

O brilho de superfície foi medido em um ângulo de incidência e reflexão de 60º usando um glossímetro calibrado (Novo Curve,Thopoint, Bexhill-on-Sea, Inglaterra). O glossímetro foi calibrado antes de cada sessão de leitura com amostra padrão fornecida pelo fabricante com valor de brilho conhecido. O instrumento mede a intensidade do feixe de luz refletida depois de colidir com a superfície e compara com valor de referência. O equipamento tem uma janela com abertura de 2 X 2 mm, local onde o espécime era colocado e coberto com recipiente de filme fotográfico para evitar a exposição pela luz durante a medida. As médias das cinco medidas foram registradas para cada espécime.

O brilho superficial foi avaliado no início, imediatamente após (1h), 4 dias e 7 dias após os tratamentos.

4.1.4 Rugosidade superficial

Um perfilômetro de contato *Stylus* foi utilizado para medir a rugosidade superficial. A ponta de diamante tem um raio de 5 µm, ângulo de 90º a uma velocidade de 1 mm/s através da superfície com força de 6 mN. Seis linhas de escaneamento foram realizadas por superfície de espécime, três na horizontal e três na perpendicular. A distância *cut-off* foi de 0,25 mm e a distância de medida 2 mm. Os parâmetros de rugosidade medidos foram: (1) parâmetro R_a de amplitude (média aritmética dos afastamentos em relação à linha média), (2) parâmetro R_T de amplitude (a máxima altura de pico ao vale do perfil no caminho percorrido), (3) R_{sm} parâmetro de espaçamento (o espaçamento médio entre o perfil do pico na linha média, medido dentro do caminho percorrido).

A rugosidade superficial (R_a, R_t e R_{Sm}) foi realizada antes, depois dos tratamentos GC e GE1. Para GE2 foram realizadas medidas de rugosidades após 7 dias, depois da aplicação da *MI Paste*.

4.1.5 Análise Estatística

Os resultados de ΔE, brilho e rugosidade foram avaliados separadamente por ANOVA de dois fatores vinculados e teste de comparação de Tukey (p=0.05). Se o teste de significância estatística for maior que 0.05, pode-se assumir igualdade das variâncias.

4.2 - ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM DENTES HUMANOS *IN VITRO*

Após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FR-306987/Protocolo 169/2009)(Anexo A), sessenta dentes pré-molares superiores ou inferiores foram limpos com pedra-pomes e água por 10 segundos em cada face e em seguida foram armazenados em solução de azida de sódio a 0,02%.

A solução de NaOCl a 5,25% foram utilizadas soluções o mais próximo da data de fabricação e armazenadas em vidro âmbar, protegendo da luz e do calor para não perder sua eficiência.

Para obtenção dos blocos de esmalte humano foi seccionado a porção radicular. As coroas foram fixadas com cera pegajosa em bases de resina acrílica devidamente planificada para secção da porção palatina da coroa utilizando disco diamantado (Extec Corp, Enfield, CT, EUA) sob refrigeração com água destilada montada em máquina de corte de precisão Isomet 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, Il, EUA) para evitar trincas no esmalte. Logo após, foi realizado novo corte no sentido vestibulo-lingual, sob refrigeração, formando 4 blocos de esmalte de cada dente.

4.2.1 Análise por FEG, MEV e EDS

4.2.1.1 Preparo da amostra

Os dentes pré-molares humanos foram secos a 37ºC em recipiente com sílica gel de acordo com o protocolo usado por Bem-Amar e colaboradores (131). Todos os dentes utilizados nesse estudo são irrupcionados e foram provenientes do Banco de Dentes Humanos.

Os fragmentos de dentes humanos foram desidratados em escala de concentração ascendente de etanol (20 minutos a 25%, a 50%, a 75%; 30 minutos a 95% e 60 minutos a 100%), e secagem química final pela imersão em 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, EUA) 10 ml por 10 minutos e secos à temperatura ambiente no interior de uma capela de exaustão (132). Após secagem, os espécimes foram armazenados em dessecador com sílica para serem analisados. Os espécimes foram recobertos com platina (MED 020, Bal-Tec Balzers, Liechtenstein), analisados no microscópio eletrônico de varredura (Stereoscan 440, LEO Electron Microscopy, Oberkochen, Alemanha) para quantificação de elementos químicos por EDS *(energy dispersive spectroscopy)* O, Mg, P, Cl, Ca, Mn e por emissão de campo (Quanta 600 FEG, FEI) em alto vácuo. As imagens foram obtidas utilizando detector de elétrons secundários (Everhart-

Thornley), distância de trabalho em torno de 10 mm, voltagem de 10 kV e sonda de 500 Ă com magnificações de 3.000 a 100.000x.

4.2.2 Parâmetros estruturais

Apesar de não ter estudo avaliando os parâmetros estruturais em dentes humanos, a maioria da literatura baseia-se na análise da morfologia óssea. As terminologias utilizadas nesse estudo são relacionadas à área de estudo de ossos adotadas pela *Journal of Bone and Mineral Research,* que são as mesmas recomendadas pelo Comitê de Nomenclatura de Histomorfometria da Sociedade Americana de osso e pesquisa Mineral (101).

Para aquisição das imagens foi necessário realizar as seguintes etapas:

- Preparo da amostra e posicionamento;
- Determinar energia dos raios-X utilizada;
- Utilização de feixe de endurecimento, filtros etc;
- Intensidade;
- Calibração;
- Tamanho do voxel e resolução da imagem;
- Determinar região de interesse (ROIs);
- Análise dos parâmetros estruturais

4.2.2.1 Preparo da amostra e posicionamento

Os fragmentos de dentes foram armazenados em água destilada a 37°C. A face em que se realizou o corte para exposição de dentina foi coberta com material para isolamento gengival, deixando somente a face vestibular exposta. Foram realizados os escaneamentos dos grupos experimentais antes (0h) e imediatamente após (1h) para todos os grupos experimentais. No grupo G3 também foi realizado o escaneamento 7 dias após a aplicação diária de ACP-CPP.

O micro-CT (Modelo 1072, *Skyscan*, Kontich, Belgica) foi utilizado para escaneamento do fragmento do dente pré-molar. Este equipamento é um

microtomógrafo computadorizado de Raios-X por escaneamento acoplado à estação de trabalho. O *hardware* usado para processamento dos dados neste estudo foi um Dell Precision workstation PWS 450 Intel® Xeon (4 Gb CPU, 3.06 GHz), que tem um software para micro-XCT (SkyScan 1072® software, *Skyscan*, Belgium); e uma estação de trabalho Dell Precision PWS 390 Intel® Core (4 Gb CPU, 2.13 GHz) com TView® e NRecon® (*Skyscan*, Belgium). A partir do Nrecon® as imagens obtidas em formato Bitmap (BMP) foram selecionadas para realizar fatias no sentido horizontal ou vertical.

As primeiras etapas de aquisição das imagens envolvem o preparo e posicionamento da amostra no suporte. Foi utilizada uma silicona para registro oclusal Fit Checker –II (GC America, Tokyo, Japão) por ser um material de baixa densidade e pouca atenuação. Este material além da baixa atenuação possui a vantagem de orientar no posicionamento da amostra antes e após do escaneamento. O fragmento do dente foi posicionado com a base da dentina voltada para o suporte e sobre a silicona para garantir que a amostra ficasse fixa durante o escaneamento da amostra e garantisse a mesma posição antes e após o escaneamento.

Durante todo o processo de escaneamento, todas as amostras foram umedecidas para evitar que a desidratação pudesse afetar suas estruturas.

4.2.2.2 Energia dos raios – X

Geralmente os sistemas de micro-CT operam na faixa de 20 a 100kVp (133) e a atenuação dos fótons de raios-x quando passa pelo material pode causar absorção ou espalhamento, dependendo da energia. A facilidade em se diferenciar esmalte e dentina é melhor em baixas energias, entretanto, devido à atenuação total dos raios-X que aumentou, somente pequenos objetos podem ser medidos com baixa energia, caso contrário ruídos tornam-se elevados para realizar análises quantitativas (94).

Neste estudo, devido ao tamanho das amostras foi ajustado para escanear todos os fragmentos com feixe de aceleração de 102kVp.

4.2.2.3 Feixe de endurecimento (*Beam hardening*)

Na maioria dos sistemas de micro-CT a energia de raios-X incidente é equivalente a energia de raios-X que sai pela amostra. A baixa energia do feixe é preferencialmente bloqueada, por outro lado, porções de alta energia passam mais facilmente. Esta diferença entre absorção de baixa e alta energia é o que se chama de feixe de endurecimento. A energia do feixe pode ser aumentada se for utilizado filtro de fótons de baixa energia.

4.2.2.4 Intensidade

O número de fótons de cada projeção durante um escaneamento depende da corrente do tubo (μA) e o tempo de integração de cada projeção (ms), também o número de vezes que cada projeção é repetida - *frame averaging.* Foi utilizado raios-X com feixe de corrente de 96 μA e *frame averaging* de 1023. Duas captações de imagem foram tomadas pela rotação de 180° por ângulo de tomada 0,45º e tempo de exposição de 4s por captação.

4.2.2.5 Tamanho do voxel e resolução da imagem

Um *voxel* é uma unidade do volume escaneado que é resultado da reconstrução do tomógrafo. É a representação em volume (3D) das duas dimensões dentro da fatia. Geralmente os voxels das imagens de micro-CT têm as três dimensões iguais e são descritos como *voxels* isotrópicos. Idealmente, o menor tamanho de *voxel* disponível deve ser realizado para todos os escaneamentos. Foi realizado o escaneamento com resolução de 11,24μm^3. São encontrados nos diversos estudos de micro-CT diferentes tamanhos de voxel. Diferenças entre 10 e

20 μm tem pequena relevância em estruturas com grande espessura, como por exemplo, com 100 a 200 μm (100).

4.2.2.6 Região de interesse (ROI)

Ao realizar o escaneamento deve-se ter uma quantidade suficiente de amostras para que os dados sejam os mais confiáveis e reprodutíveis. Foram realizadas análises de oito amostras para cada grupo.

Inicialmente, usando o software SkyScan 1072 , um total de 207 *Tag Image File Format* (TIFF) 16-bit foram obtidos, com resolução vertical e horizontal de 1336 dpi e tamanho de arquivo de 2Mb. Foi utilizado o software NRecon®, a região de interesse (ROI) foi selecionada e definida baseado na região a ser contornada e o tamanho de interesse, gerando camadas horizontais da estrutura interna do dente (cortes transversais) com resolução de 11,24 x 11,24μm, cada uma em arquivo bitmap com 1Mb .

Foram selecionadas duas diferentes ROIs para análise nas profundidades estudadas contendo somente esmalte:

.ROI-1 =0 μm 56,2 μm

.ROI-2= 56,2 μm a 110,2 μm

O topo do ROI foi definido como sendo a primeira imagem no eixo Z de cada amostra. A primeira imagem foi determinada como sendo 0 μm, considerada assim como topo da análise. Como cada fatia tem espessura de 11,24 μm, foram selecionadas cinco fatias para ROI -1 e dez fatias para ROI-2.

Os arquivos foram organizados no mesmo diretório e verificados usando o TView®. A reconstrução 3D foi possível utilizando o NRecon® para checar se existem algumas áreas com artefatos e/ou defeitos que precisam se removidos ou não, selecionados para a próxima etapa.

4.2.2.7 Análise dos parâmetros estuturais

Foram avaliados espessura estrutural (St.Th.) - média da espessura estrutural utilizando métodos 3D direto (μm); separação estrutural (St.Sp) – média da distância entre as estruturas, utilizando métodos 3D direto (μm) e índice de fragmentação (Fr.I.) – que determina a maior ou menor conectividade da estrutura.

O método de medida é conhecido como adaptação de esferas – *fitting method*, onde é medido o diâmetro da esfera que se adapta ao objeto e a separação, determina qual o maior diâmetro possível que a esfera pode se adaptar em cada *voxel* que contenha completamente o objeto (ou a separação, fundo) e depois realiza a média dos diâmetros.

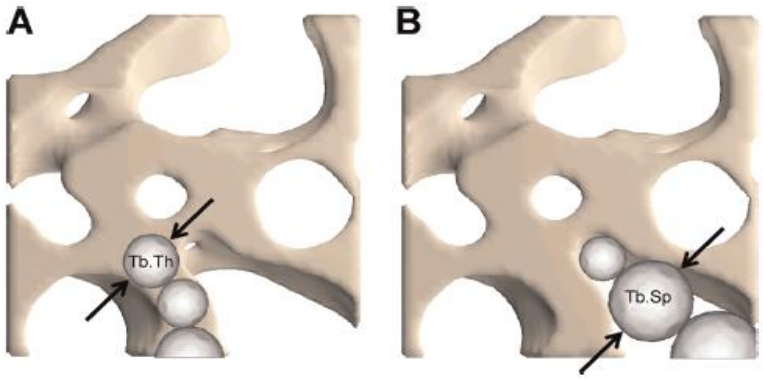


Figura 4.1 Representação esquemática do algoritmo usado para método direto em 3D para calcular espessura trabecular (espessura estrutural) (A) e separação (B). Distâncias em 3D são computadas pela adaptação de esferas dentro da estrutura ou dentro do espaçamento fundo branco. A média do diâmetro das esferas representa a espessura do objeto.

Os dados foram sumetidos a análise estatística. O teste-t pareado foi utilizado para determinar se as alterações observadas foram significativas em nível de 95% de confiança.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DE COR, BRILHO E RUGOSIDADE EM DENTES BOVINOS

Em relação ao ΔE, não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos de superfície (p= 0,48) e entre os períodos (p = 0,20). Foi encontrada diferença estatística entre a interação (p = 0,04) somente na Análise de Variância, não sendo detectada no teste de Tukey. Há uma tendência a maior alteração de ΔE em uma avaliação imediata após o clareamento do tratamento GE2 (6,32 ± 2,25) quando comparado com os demais tratamentos GC (3,43 ± 1,19) e GE1 (3,77 ± 2,47).

Em relação ao parâmetro L, houve diferença estatística quanto aos diferentes períodos avaliados (p < 0,001). O maior aumento do L* ocorreu na avaliação imediata (71,97 ± 4,67), após 4 dias ocorreu uma queda do L* (64,81 ± 6,78) e 1 semana após ao tratamento ocorreu novo aumento (70,47 ± 3,62), como pode ser visto na Tabela 5.1. Não houve significância em relação ao tratamento de superfície (p = 0,11) e a interação (p = 0,46).

Em relação ao parâmetro b, o fator período foi significante (p < 0,001). Houve uma queda significativa 4 dias após o clareamento, não havendo diferença após 1 semana. Não houve diferença estatística em relação ao tratamento de superfície (p=0,99) e interação (p=0,09).

Em relação ao brilho, o fator período (p<0,001) e tratamento de superfície (p=0,008) foram significantes. Houve uma queda do brilho imediatamente após o clareamento, mantendo-se constante a perda de brilho até a 7ª semana, independente do tratamento de superfície realizado. A condição experimental em que foi aplicado ACP houve maior redução do brilho quando comparado aos demais tratamentos de superfície. Não houve diferença estatística entre a interação tratamento de superfície e período de avaliação (p=0,13).

Os tratamentos de superfície não alteraram os valores de rugosidade (R_a e R_{Sm}) nos diferentes tratamentos e períodos analisados. Houve um aumento nos valores de rugosidade após 7 dias do parâmetro R_t, do grupo in-office ACP quando comparado com a avaliação imediatamente após do grupo in-office, primer+in-office e in-office + ACP.

5.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM DENTES HUMANOS IN-VITRO

Em GC nota-se superfícies com esboço dos prismas de esmalte e erosões nas regiões de prismas de esmalte. Em GE1, com a aplicação do agente desproteinizante previamente ao clareamento, observa-se uma superfície mais lisa. Há uma formação de um manto de recobrimento no grupo consultório + ACP em torno dos prismas de esmalte e um menor espaçamento entre os cristais de hidroxiapatita.

O percentual em peso analisado da superfície do esmalte por EDS demonstra estatisticamente um aumento na quantidade de cálcio em GE2 após 7 dias quando comparado com os demais grupos experimentais ($p < 0,01$). Há estatisticamente uma maior quantidade de fósforo quando comparado com o grupo sem tratamento ($p < 0,05$). O elemento químico manganês foi encontrado em todos os grupos, exceto no grupo em que não foi realizado tratamento. Não há variação na quantidade de cloro e magnésio nos grupos tratados.

Na análise dos parâmetros estruturais utilizando a técnica de micro-CT, não foi observada nenhuma diferença estatística na alteração da espessura estrutural (St.Th) e a separação estrutural (St.Sp) do esmalte antes ou imediatamente após os diferentes tratamentos de superfície para os diferentes ROIs analisados. No grupo em que foi realizado somente o tratamento de consultório ocorreu diferença estatística ($p<0,01$) do índice de fragmentação (Fr.I) após o tratamento no ROI-1 correspondente a espessura de 56,2 μm. Ocorreu um aumento médio de 0,01 μm. No ROI-2, na espessura de 110,2 μm não foi detectada nenhuma diferença estatística antes e após o clareamento. Nos demais tratamentos não foram detectadas diferenças estatísticas dos valores de Fr.I antes e após os tratamentos para cada ROI analisado.

No grupo em que foi aplicado ACP diariamente e avaliado os diferentes parâmetros estruturais após 7 dias foi observado aumento da espessura estrutural de 4,1μm ($p = 0,03$), redução da separação estrutural de 0,8 μm ($p = 0,04$) e redução do índice de fragmentação 0,011 ($p = 0,01$) no ROI-1 após o tratamento realizado. Nenhuma alteração foi observada em camadas mais profundas correspondente ao

ROI-2 no avaliar da espessura, separação estrutural e índice de fragmentação após 7 dias do tratamento com ACP.

Tabela 5.1 – Médias e desvio padrão do brilho e parâmetros de cor

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	Brilho	ΔE	L*	b*
0	Antes	59,73 ± 5 [a]	-	68,4 ± 4,1 [b]	6,2 ±1,8 [a]
1	Imediatamente após	44,06 ± 6.8 [b]	4,5 ± 2,4 [a]	72,0 ± 4,7 [a]	5,3 ± 2,2 [a]
96	Depois de 04 dias Do clareamento	47,36 ± 5,7 [b]	5,7 ± 2,6 [a]	64,8 ± 6,8 [c]	3,0 ± 2,1 [b]
168	Depois de 7 dias do clareamento	46,62 ± 5,2 [b]	5,3 ± 2,7 [a]	70,5 ± 3,6 [ab]	4,0 ± 1,6 [b]

Os valores de ΔE e brilho são relacionados ao início
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p<0.05$).

Tabela 5.2- Médias e desvios padrão do parâmetro R_a (μm)

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	GC	GE1	GE2
0	Antes	0,105 ± 0,02Aa	0,112 ± 0.03 Aa	0,112 ± 0,02 Aa
1	Imediatamente após	0,104 ± 0,01Aa	0,100 ± 0,02 Aa	0,121 ± 0,02 Aa
168	Depois de 7 dias do clareamento	0,102 ± 0,02 Aa	0,100 ± 0,01 Aa	0,115 ± 0,03 Aa

Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os períodos
Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos

Tabela 5.3- Médias e desvios padrão do parâmetro R_t (µm)

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	GC	GE1	GE2
0	Antes	0,871± 0,2 Aa	0,916 ± 0,2Aa	0,991 ± 0,3 Aa
1	Imediatamente após	0,971 ± 0,3 Aa	0,897 ± 0,2 Aa	1,009 ± 0,3 Aa
168	Depois de 7 dias do clareamento	0,974 ±0,5 Ab	0,895 ±0,1 Ab	1,093 ± 0,4 Aa

Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os períodos
Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos

Tabela 5.4- Médias e desvios padrão do parâmetro R_{Sm} (µm)

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	GC	GE1	GE2
0	Antes	97,51±8,6Aa	99,67± 15,4 Aa	105,44± 18,4 Aa
1	Imediatamente após	101,54±13,5Aa	103,11± 14,3Aa	101,77± 15,0 Aa
168	Depois de 7 dias do clareamento	101,51±9 Aa	103,2±11,1 Aa	110,58 ± 8,1 Aa

Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os períodos
Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos

Tabela 5.5- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de cor

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	GC			GE1			GE2		
		ΔE	L	b	ΔE	L	b	ΔE	L	b
0	Antes	*	71,3 ±2,3	7,1 ±1,9	*	69,7 ±2,7	5,4 ±1,1	*	66,3 ±1,4	6,5 ±0,7
1	Imediatamente após	3,7 ±0,9Aa	72,1 ±3	5,4 ±1,9	3,1 ±1,3Aa	71,1 ±3.3	4,2 ±1,1	5,7 ±1,4Aa	74,2 ±2,4	5,7 ± 1,6
96	Depois de 4 dias do clareamento	5,6 ±1,7Aa	68,4 ± 4,5	2,2 ±1	6,1 ±2,8Aa	67,1 ±4	3,13 ±1,2	4,2 ±1,6Aa	65,6 ±3,5	1,9 ± 1,2
168	Depois de 7 dias do clareamento	4,7 ±1,9Aa	70,2 ±3,1 A	3,3 ±1	3,8 ±0,9Aa	71,5 ±3	3,99 ±1.5	5,6 ± 1,5Aa	72,1 ±2,9	3,4 ±1

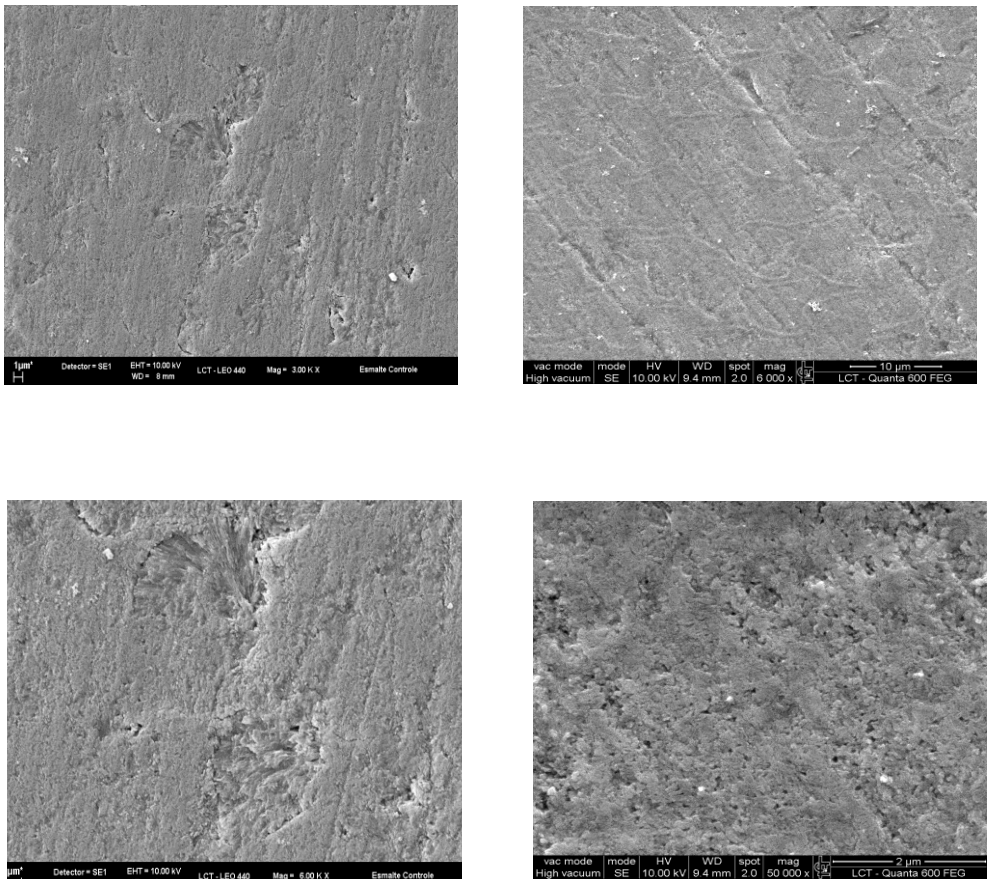
**Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) relacionados a antes do clareamento*
Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os períodos
Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos

Tabela 5.6- Valores médios e desvio padrão do brilho

Tempo (h)	Procedimento Laboratorial	GC	GE1	GE2
0	Antes	62,3 ±5,6 Aa	57,5 ±5,7 Aa	59,3 ±2,3 Aa
1	Imediatamente após	46,2 ±9,2 Ab	46,6 ±2,6 Ab	39,3 ±4,8 Ab
96	Depois de 4 dias do clareamento	47,1 ±3,5 Ab	50,7 ±7,2 Ab	44,3 ±4,2 Ab
168	Depois de 7 dias do clareamento	49,2 ±5,9 Ab	47,1 ±4,4 Ab	43,7 ±4 Ab

Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos
Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre períodos

Figura 5.1 – Microscopia eletrônica de varredura do esmalte sem tratamento coluna esquerda MEV (3000, 6000 e 10.000X) e direita FEG (6000, 50.000 e 100.000x)



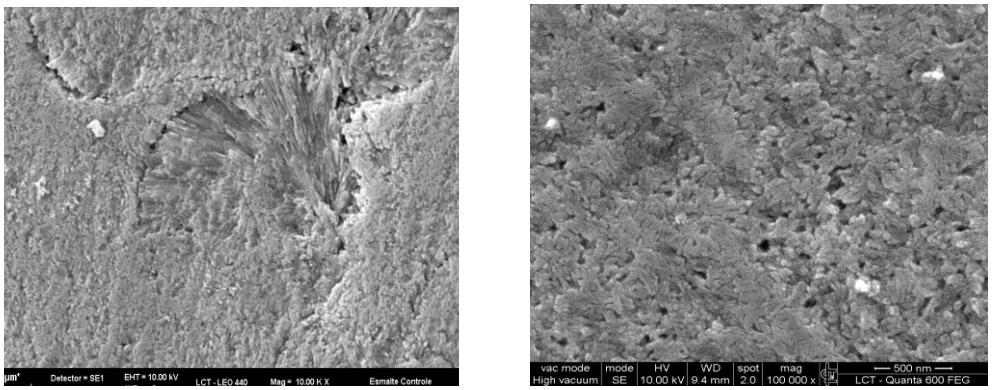
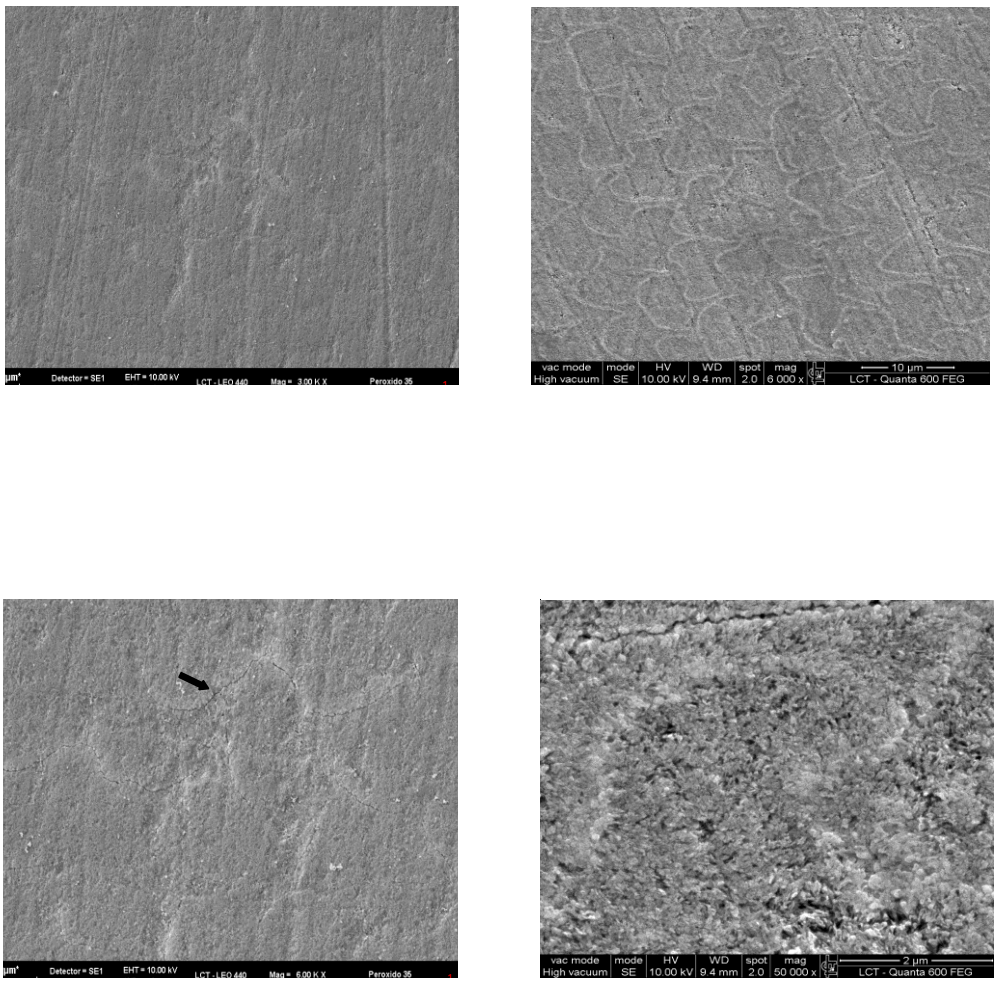
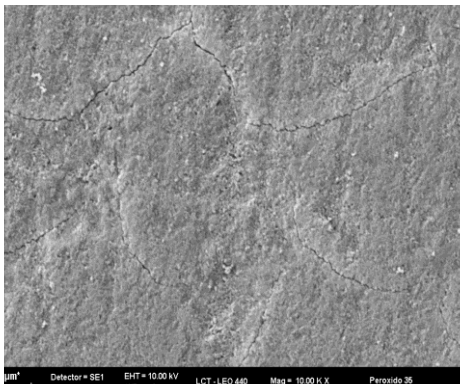


Figura 5.2 - GC coluna esquerda MEV (3000, 6000 e 10.000X) e direita FEG (6000, 50.000 e 100.000x)





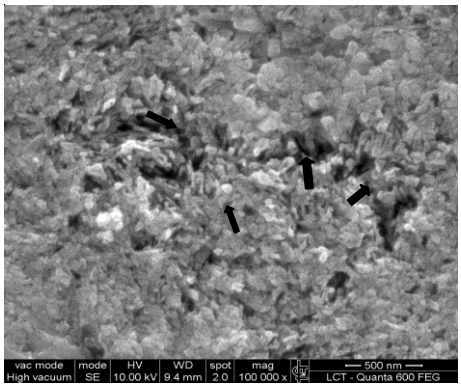
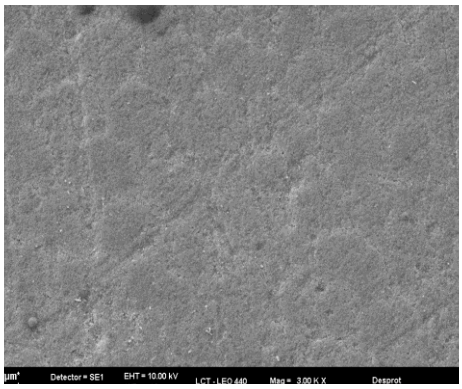
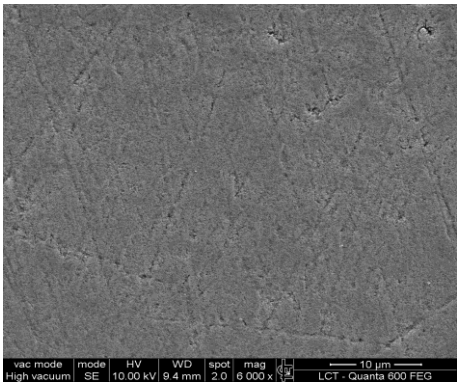
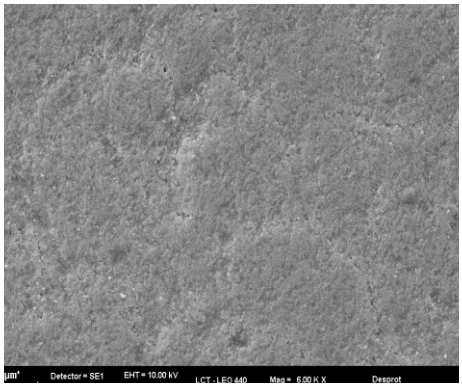
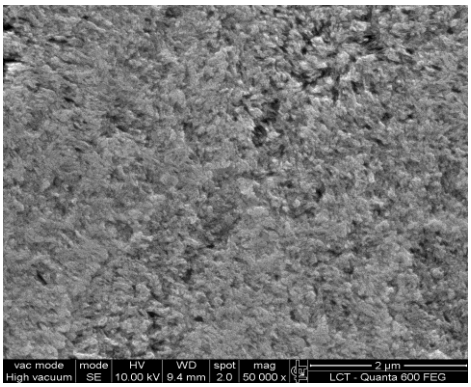


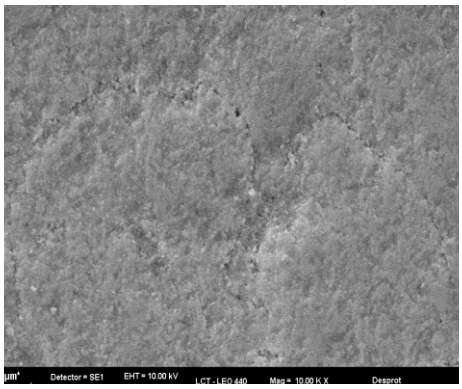
Figura 5.3- GE1 MEV (3000, 6000 e 10.000X) e direita FEG (6000, 50.000 e 100.000x)











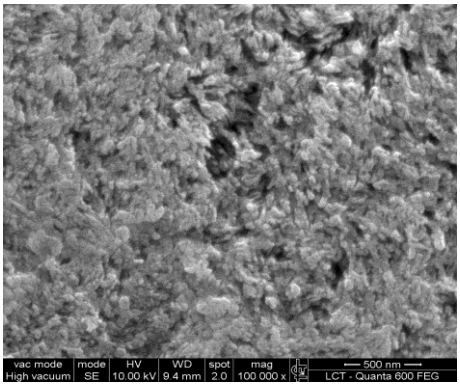
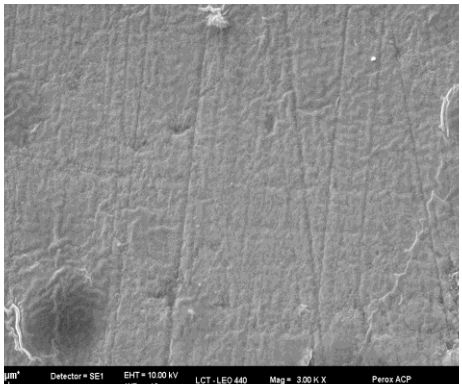
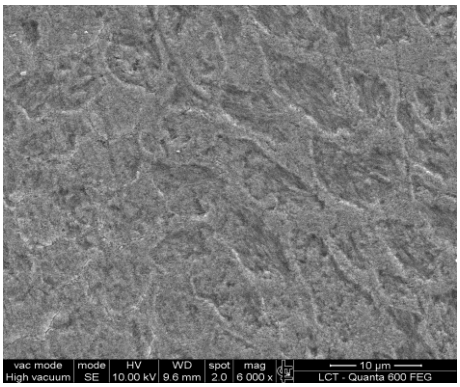
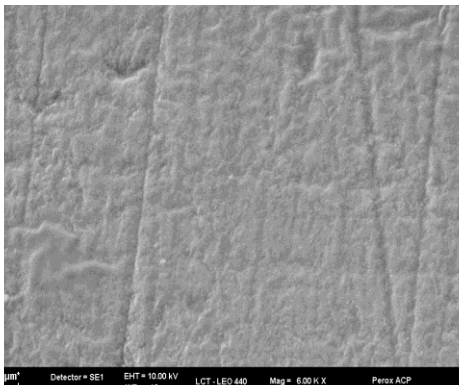
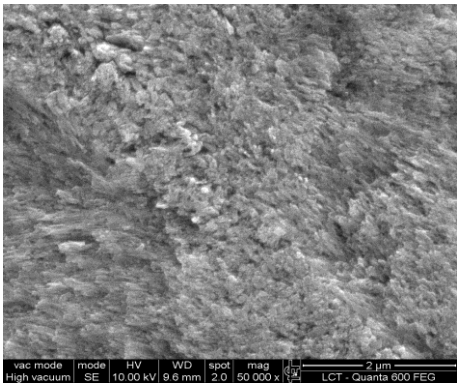


Figura 5.4 – GE2 após 07 dias coluna esquerda MEV (3000, 6000 e 10.000X) e direita FEG (6000, 50.000 e 100.000x)









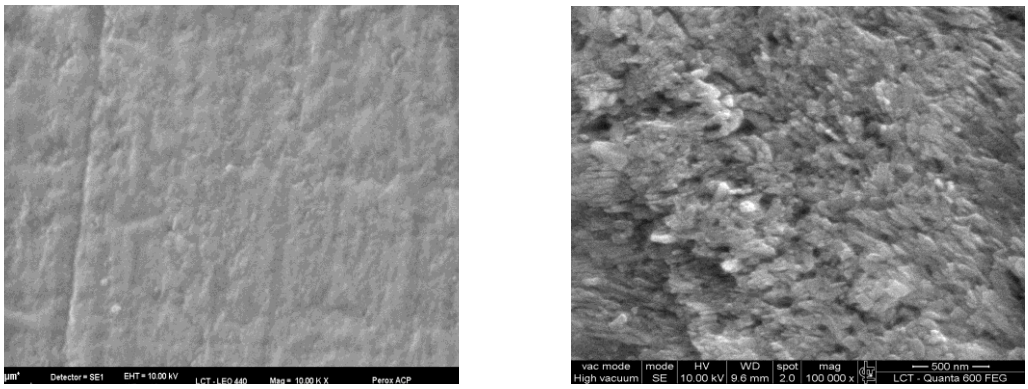
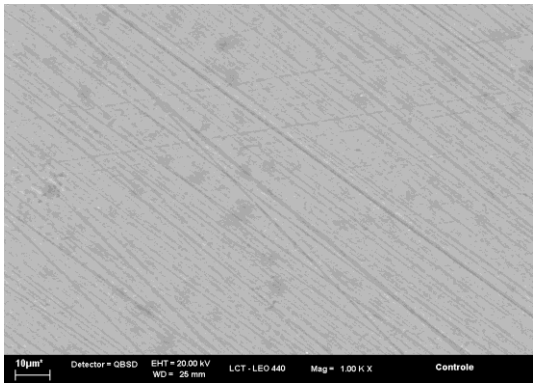
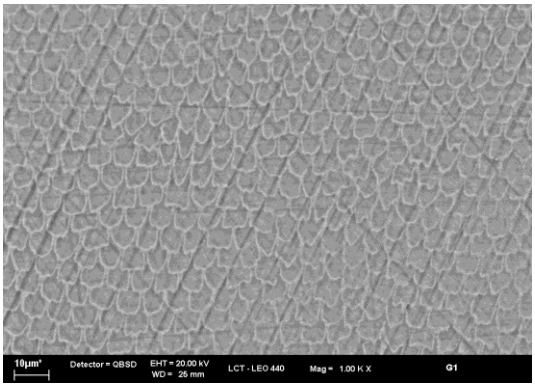


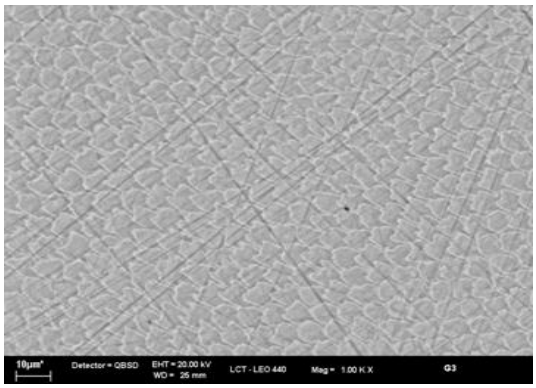
Figura 5.5 - Imagens da superfície do esmalte dos grupos experimentais por retroespalhamento em aumento de 1000x

Sem Tratamento

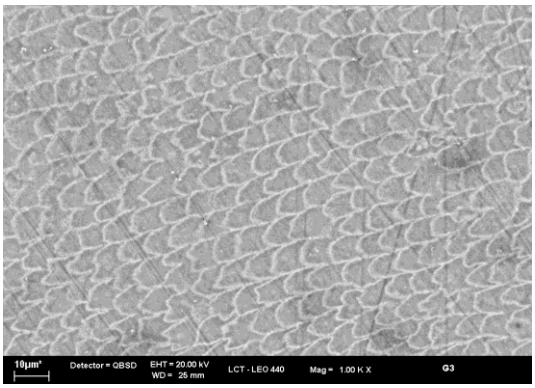


GC





GE1



GE2-7dias

Tabela 5.7 - Percentual dos elementos químicos na superfície do esmalte na análise por EDS

	O	Mg	P	Cl	Ca	Mn
Sem Tratamento	42,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1	18,3 ± 0,2[b]	0,5 ± 0,1	37,8 ± 0,3[b]	0
GC	41,8 ± 0,5	0,2 ± 0,1	18,5 ± 0,2[ab]	0,7 ± 0,1	38 ± 0,3[b]	0,5 ± 0,1
GE1	42,06 ± 0,3	0,2 ± 0	18,5 ± 0,1[ab]	0,7 ± 0,1	37,8 ± 0,3[b]	0,4 ± 0,1
GE2-7dias	41,2 ± 0,4	0,2 ± 0	18,5 ± 0,2[a]	0,7 ± 0,1	38,4 ± 0,3[a]	0,5 ± 0,1

[x] *Letras diferentes significam diferenças estatísticas (p<0.05)*

Tabela 5.8 - Espessura estrutural antes e após os diferentes tratamentos de superfície (µm)

	GC		GE1		GE2	
ROI	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ROI - 1	30,1[a]	4,7	33,7[a]	3,6	29,7[a]	5,7
	29,7[d]	4	30,1[d]	5,3	31,1[d]	5,8
ROI - 2	66,9[a]	4,8	70,3[a]	5,2	65,7[a]	7,5
	66,7[d]	6,2	65,4[d]	5,9	68,3[d]	6,5

D.P.: Desvio Padrão
[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)
[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)

Tabela 5.9 - Teste - t pareado (p = 0,05) para os diferentes tratamentos para espessura estrutural (µm)

		GC		GE1		GE2	
Par	Diferença	Média	p	Média	p	Média	p
Par 1	ROI1[a]-ROI1[d]	0,49	0,58	3,7	0,18	-1,4	0,53
Par 2	ROI2[a]-ROI2[d]	0,23	0,88	4,9	0,13	-2,6	0,17

D.P.: Desvio Padrão
[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)
[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)
[x] Diferença significante (P<0,05)

Tabela 5.10 - Separação estrutural antes e após os diferentes tratamentos de superfície (μm)

	GC		GE1		GE2	
ROI	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ROI - 1	64,4[a]	1,6	64,5[a]	1,2	64,9[a]	1,6
	64,3[d]	1,8	64,9[d]	1,6	64,7[d]	1,6
ROI - 2	98,6[a]	3,9	101,1[a]	3,2	102,3[a]	4,2
	100,9[d]	5,5	101,3[d]	2,5	101,2[d]	3,7

D.P.: Desvio Padrão
[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)
[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)

Tabela 5.11 - Teste - t pareado (p = 0,05) para os diferentes tratamentos para separação estrutural

		GC		GE1		GE2	
Par	Diferença	Média	p	Média	p	Média	p
Par 1	ROI1[a]-ROI1[d]	0,1	0,83	-0,4	0,27	0,2	0,63
Par 2	ROI2[a]-ROI2[d]	-2,3	0,55	-0,2	0,88	1,1	0,28

D.P.: Desvio Padrão
[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)
[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)
[x] Diferença significante (P<0,05)

Tabela 5.12 – Índice de fragmentação antes e após os diferentes tratamentos de superfície

	GC		GE1		GE2	
ROI	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ROI - 1	0,062[a]	0,018	0,056[a]	0,014	0,07[a]	0,022
	0,072[d]	0,022	0,076[d]	0,027	0,06[d]	0,020
ROI - 2	0,028[a]	0,032	0,018[a]	0,010	0,022[a]	0,006
	0,018[d]	0,007	0,019[d]	0,008	0,02[d]	0,010

D.P.: Desvio Padrão
[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)
[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)

Tabela 5.13 - Teste - t pareado (p = 0,05) para os diferentes tratamentos para o índice de fragmentação

		GC		GE1		GE2	
Par	Diferença	Média	p	Média	p	Média	p
Par 1	ROI1[a]-ROI1[d]	-0,011	0,01[X]	-0,019	0,11	0,011	0,01[x]
Par 2	ROI2[a]-ROI2[d]	0,010	0,55	0,000	0,86	0,001	0,51

D.P.: Desvio Padrão

[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)

[d] Valores obtidos depois da aplicação do clareador (n=8)

[x] Diferença significante (P<0,05)

Tabela 5.14- Parâmetros estruturais antes e após 7 dias de clareamento no GE2

	Espessura estrutural (μm)		Separação estrutural (μm)		Índice de fragmentação	
ROI	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ROI - 1	29,7[a]	5,7	64,9[a]	1,6	0,07[a]	0,022
	33,8[s]	3,8	64[s]	1,9	0,06[s]	0,020
ROI - 2	65,7[a]	7,5	102,3[a]	4,2	0,022[a]	0,006
	69,8[s]	5,4	101,2[s]	2,1	0,02[s]	0,010

D.P.: Desvio Padrão

[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)

[s] Valores obtidos depois de 7 dias (1 semana) de clareamento (n=8)

Tabela 5.15 - Teste - t pareado (p=0,05) para os diferentes tratamentos após 7 dias em GE2

		Espessura estrutural		Separação estrutural		Índice de fragmentação	
Par	Diferença	Média	p	Média	p	Média	P
Par 1	ROI1[a]-ROI1[s]	-4,1	0,03[x]	0,8	0,04[X]	0,0114	0,01[x]
Par 2	ROI2[a]-ROI2[s]	-4,1	0,11	1,1	0,53	0,0011	0,51

D.P.: Desvio Padrão

[a] Valores obtidos antes da aplicação do clareador (n=8)

[s] Valores obtidos depois de 7 dias (1 semana) de clareamento (n=8)

[x] Diferença significante (P<0,05)

6 DISCUSSÃO

Ressaltando a importância de se aumentar a efetividade do clareamento de consultório com o mínimo de dano à estrutura dental, agentes pré e pós clareamento foram utilizados nesse estudo na técnica de clareamento de consultório.

O agente desproteinizante hipoclorito de sódio 5,25% aplicado ativamente em esmalte durante 1 minuto não foi efetivo para otimização da ação do peróxido de hidrogênio a 35% na técnica de clareamento de consultório. O uso de pasta a base de ACP-CPP permitiu deposição de material inorgânico e alteração superficial na microestrutura do esmalte após o clareamento de consultório sem influenciar no brilho e na cor do dente clareado.

Esmaltes humano e bovino têm suas estruturas parecidas (134). Uma parte desse estudo foi conduzida usando amostra de dentes bovinos. Dentes bovinos têm sido utilizados nos experimentos como substituto dos dentes humanos devido à similaridade das propriedades físicas, como a composição, e química (135, 136). O tamanho do dente bovino permite uma maior área de superfície nos ensaios para se comparar a condição antes e após os tratamentos (137). Além do mais, a composição dos dentes bovinos apresenta menor variação de composição e padronização das condições testadas em comparação ao dente humano (135). A estrutura química do esmalte bovino e as reações decorrentes da ação erosiva dos agentes químicos são comparáveis ao esmalte humano. Fatores como dieta oral e hábitos, os quais foram submetidos os espécimes, podem influenciar na irregularidade superficial do esmalte (138)(139).

A difusão do agente clareador no dente depende de vários fatores, como a integridade dos tecidos dentários, o estado de desenvolvimento e maturação do dente, a região (34), tempo após extração e o meio de armazenagem dos dentes usados nas pesquisas (140).

Há uma maior alteração de cor no dente bovino extraído devido a falta de fluido dentinário, que permite uma maior penetração do agente clareador (141). Os dentes bovinos não são geralmente tão velhos quanto as amostras de dentes humanos, na maioria dos experimentos. Geralmente estes dentes são limpos e próximos do branco, portanto diferentes da condição clínica.

Deve ser ressaltado que as superfícies foram planificadas antes do clareamento. Este procedimento é necessário para os ensaios, mas também conduz a remoção do esmalte aprismático superficial, que é geralmente mais mineralizado que a subsuperfície e mais resistente à desmineralização (142). Os resultados obtidos nesse estudo são mais severos do que a condição clínica devido à remoção desta superfície protetora mais mineralizada. Clinicamente as regiões aprismáticas são freqüentes nas superfícies oclusais, que são gradualmente desgastadas durante a mastigação (143).

Além do mais, nem todos os grupos foram armazenados em saliva ou outra solução salina antes da avaliação, o que significa que o esmalte não foi remineralizado para minimizar os efeitos dos agentes clareadores (144-146). Todas as amostras, tanto de dente bovino quanto de dente humano, foram armazenadas em água destilada para manutenção da matéria orgânica do esmalte e observar isoladamente o efeito do agente remineralizador utilizado pós-clareamento (147).

A maioria dos trabalhos avalia a superfície do esmalte com microscopia eletrônica de varredura que tem resolução óptica limitada pelo aquecimento dos cátodos de tungstênio e as altas voltagens do feixe de elétrons, com isso a imagem possui resolução em escala micrométrica. Nas últimas décadas com o desenvolvimento do microscópio eletrônico por emissão de campo caracterizado pela presença de cátodo com reduzido aquecimento e feixe de elétrons mais estável permitiu observar as superfícies com maiores detalhes do que o microscópio convencional, permitindo maior visualização em escala nanométrica (148).

As mudanças ocorridas na superfície do esmalte encontradas nesse estudo são menos severas *in-vivo* devido à ação remineralizadora da saliva (149-151).

1) A desproteinização do esmalte com NaOCl pode otimizar o brilho e clareação ao longo do tempo em dentes bovinos

Dentre as hipóteses propostas nesse estudo, a primeira hipótese foi negada. A desproteinização do esmalte com NaOCl à 5,25% não otimizou o brilho e a clareação ao longo do tempo em dentes bovinos.

O uso de agente desproteinizante antes do clareamento, com o intuito de permitir maior passagem do peróxido de hidrogênio a 35% não correspondeu à maior interação de agentes oxidantes com os pigmentos, o que se esperava resultar em maior alteração de cor.

Existem alguns fatores limitantes quanto ao preparo da amostra para avaliação de cor. Os instrumentos que são utilizados para leitura necessitam de superfícies planas, sendo os dentes frequentemente convexos e arredondados com irregularidades na superfície vestibular. Os instrumentos de leitura de cor apresentam pequena abertura que pode acarretar em possíveis erros. A translucidez de materiais cerâmicos necessita de um fundo padrão para minimizar os efeitos de espalhamento de luz, que também foi utilizado nesse estudo (14, 152).

Existem outros fatores que interferem diretamente na aparência do dente como: cor, translucidez, brilho etc. A simples especificação de três parâmetros de cor fornecidos por um instrumento para uma determinada iluminação e observador são dados insuficientes para determinar a aparência de um material translúcido, como o dente (153).

Ultimamente há uma tendência em buscar a otimização da ação dos agentes oxidantes com a ação de agentes químicos ou alteração do substrato, no caso, a estrutura dental (18,154). Mudanças estas como a remoção parcial da matriz orgânica do esmalte ou o uso de íons metálicos para aumentar a formação de radicais oxidantes são algumas possíveis alternativas para a técnica de clareamento.

Para que o peróxido de hidrogênio consiga aumentar sua penetração na estrutura dental, além de facilitar sua entrada na estrutura de esmalte com o uso de agentes desproteinizantes é necessário superar forças que atuam no sentido contrário. Primeiramente o peróxido tem que passar pelas porosidades do esmalte e atingir a junção amelodentinária – região de grande permeabilidade. A partir da junção amelodentinária seu caminho se torna facilitado devido à presença de túbulos dentinários, cuja permeabilidade aumenta em direção a polpa. O peróxido de hidrogênio ao entrar nos túbulos, devido ao molhamento, gera uma força, atuando no sentido de aspirar o gel. A força cria uma tensão de cisalhamento na interface entre o líquido e o túbulo que depende da área da interface. A força de molhamento é constante, mas a área de interface aumenta com o tempo. Com isso ocorre uma diminuição da velocidade da fluidez com o tempo e diminuição da entrada do peróxido de hidrogênio (155). Em condição clínica, outro fator que contribui para

redução da velocidade da fluidez seria a pressão intrapulpar que atua em direção contrária a penetração do agente clareador limitando ainda mais a difusão (156).

A região superficial do esmalte apresenta baixa difusão, aproximadamente 30%, quando comparada com as camadas mais profundas próximas à junção amelodentinária. Do esmalte até a junção amelodentinária há um aumento de matriz orgânica, água (40), nível de porosidades (41) e capacidade de sorção de água (31). Talvez o pequeno tempo de contato, tanto no grupo do peróxido de hidrogênio quanto o uso da solução desproteinizante, não foi suficiente para detectar diferença de cor do substrato dental.

O processo de difusão do agente clareador para as camadas mais internas se baseia em algumas características reológicas tais como: osmose, coeficiente de penetração, fluidez capilar, etc. A partir do aumento do coeficiente de penetração do sistema, seria possível reduzir o tempo de aplicação do gel clareador, pois menos tempo seria necessário para atingir as camadas mais profundas da estrutura dental, onde está localizada a maior quantidade de pigmentos.

O coeficiente de penetração inclui não somente o gel clareador, mas a interação com o substrato (esmalte e dentina). Ao remover parte da matriz orgânica com o uso do agente desproteinizante no esmalte dental, implica em alteração de molhamento, energia de superfície do substrato, alteração do ângulo de contato e energia de superfície. Tais mudanças não foram efetivas para que ocorresse um maior efeito de branqueamento desejado.

Provavelmente, neste estudo o reduzido tempo de aplicação do agente desproteinizante e o curto tempo de contato do peróxido de hidrogênio com a superfície do esmalte (4 x 8 minutos = 32 minutos) não permitiu que a ação do agente desproteinizante influenciasse na técnica empregada. Provavelmente o uso de agente desproteinizante, associado ao clareamento de autoaplicação com peróxido de hidrogênio ou carbamida, poderia apresentar resultados significantes devido ao tempo de contato maior comparado à técnica de consultório.

O efeito de branqueamento e satisfação relatados pelos pacientes estão mais relacionados com mudanças no parâmetro b* do que nos parâmetros L^* ou a^*. Tais mudanças na escala do amarelo-azul são de primordial importância no uso de produtos de clareamento para dentes vitais (157). Valores de alteração de cor (ΔE) abaixo de 1 não podem ser visualmente detectados, no entanto valores acima de 3,3 já conseguem ser percebidos visualmente (158).

Em relação ao brilho, independente do uso do agente desproteinizante, ocorreu a queda do brilho imediatamente após e permaneceu até o período de 1 semana após aplicação do agente clareador.

Brilho é um fenômeno óptico ao avaliar a aparência de uma superfície. Ao avaliar o brilho descreve-se a capacidade da superfície refletir a luz direcionada. Portanto, ao clarear o dente, além do aspecto de dentes mais claros se deseja maior reflexão de luz. Uma avaliação visual de brilho permite que ocorram muitas interferências e erros por critérios subjetivos. Portanto, para que seja objetivo, é necessário medir o brilho do dente em dispositivo que mede os valores de brilho também. Estas diferenças de alto, médio e baixo brilho podem ser determinadas pelo glossímetro. O aparelho mede a quantidade de luz refletida da superfície de um objeto. O feixe de luz é direcionado para o objeto, neste estudo a superfície do dente, e a quantidade de luz refletida é transformada em uma escala numérica de 0 a 100. Superfícies de cor mais claras poderão ter valores mais elevados, mas não necessariamente ocorrerá por maior reflexão superficial.

Para avaliar uma superfície quanto ao brilho, existem glossímetros de diferentes ângulos de iluminação: 20º superfícies com alto brilho, 60º superfícies com brilho intermediário e 85º superfícies foscas (159). Brilho tem sido relacionado com rugosidade superficial em estudos com resinas compostas (160-162). O ângulo de iluminação afeta a quantidade de luz refletida (163). De acordo com Silikas *et al,* um ângulo de incidência de 60° é considerado mais confiável por uma perspectiva clínica, pois é uma percepção próxima do brilho do dente, visto por um observador (164).

A percepção do brilho é influenciada por vários fatores: (1) propriedades de superfície (material, perfil da superfície, transparência e substrato), (2) tipo da iluminação e (3) observador. Neste estudo, as superfícies foram preparadas em condições padrão. O ângulo de iluminação foi fixo em 60° e constante. Não houve observador.

O espalhamento de luz pode estar relacionado com uma superfície mais rugosa ou por alterações morfológicas subsuperficiais que propiciam maior espalhamento de luz e a superfície fica com aparência fosca (159). A maioria dos estudos da literatura avalia a perda de brilho de materiais resinosos onde a aparência estética é de grande importância (159, 165-171). Apesar da técnica de

clareamento ser considerada um tratamento estético, nenhum estudo existe a respeito da ação do agente clareador de consultório no brilho do esmalte.

Brilho de superfície influencia a aparência e vitalidade do dente. A morfologia de superfície do dente afeta a quantidade e tipo de reflexão – uma superfície rugosa ou áspera permite maior difusão da luz incidente enquanto uma superfície plana permite uma reflexão especular (172).

Para poder realizar a leitura de brilho todas as amostras foram acabadas e polidas superficialmente para obter uma superfície plana. Portanto, a superfície de dente bovino neste estudo tem uma reflectância diferente da condição clínica de dentes humanos. Estes fatores afetam os valores de brilho.

2) A desproteinização do esmalte com NaOCl não altera a rugosidade superficial em dentes bovinos;

Essa hipótese foi aceita. Quando é avaliado o efeito dos agentes clareadores na superfície do dente nota-se que imediatamente após o clareamento ocorre um aumento de luminosidade observado pelo aumento do parâmetro L. No entanto, este aumento se deve não necessariamente por um maior aumento na reflexão de luz e consequentemente maior brilho. Durante o processo de clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% ocorre um rearranjo dos cristais de hidroxiapatita como observado por Tanaka e colaboradores (3) da camada subsuperficial do esmalte que provavelmente acarreta alterações ópticas. Sugere-se que esta alteração seja a causa da redução do brilho, pois alterações superficiais que poderiam ser detectadas devido a mudanças na rugosidade superficial (R_a, R_t e R_{Sm}) não foram observadas quando realizada análise em dente bovino nos grupos consultório e primer+consultório. O aspecto esbranquiçado semelhante a giz branco, na verdade deixa o dente com aspecto branco, que aumenta o parâmetro L, mas não aumenta a reflexão da luz incidente.

Imediatamente após o clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% em estudo *in-vitro* nota-se um aumento do volume mineral de regiões com baixa mineralização de 2500 a 2700mg/cm^3. As regiões mais externas do esmalte com densidade de 3100 à 3200mg/cm^3 permanecem inalteradas. Esse aumento de

regiões de baixa mineralização implica diretamente na avaliação de cor. Clinicamente se observa após o clareamento de consultório aspecto branco opaco. Como em nosso estudo, esta é uma explicação para o aumento imediato do parâmetro L e também para a redução do brilho. Isso provavelmente se deve a remoção dos pigmentos, mas também a essa nova redistribuição de minerais do esmalte. O aumento de cristais de hidroxiapatita em camadas mais profundas reduz aumenta a opacidade do esmalte. Esse efeito é minimizado um dia após, ao armazenar o dente em saliva, quando ocorre um aumento de deposição de minerais nessas camadas profundas devido ao processo de remineralização. A cinética da energia de absorção provavelmente favorece a deposição de minerais em camadas mais profundas (173). Como em nosso estudo não foi armazenado em saliva, a deposição de minerais ocorreu somente no grupo em que o composto ACP-CPP foi aplicado.

Assim, alterações superficiais e profundas provavelmente influenciam nas alterações de cor, brilho e das demais propriedades ópticas da estrutura dental. Ao avaliar a cor do dente não se pode estar analisando somente a capacidade do peróxido em clivar os pigmentos, deve-se levar em conta a alteração microestrutural que ocorre desta interação peróxido e estrutura dental.

3) A desproteinização do esmalte com NaOCl não altera a ultraestrutura inorgânica em dentes humanos.

Esta hipótese foi aceita. Em relação às alterações estruturais, ocorreu exposição dos prismas de esmalte semelhante à técnica de consultório. À medida que o peróxido interage com a estrutura do esmalte o nitrogênio e o oxigênio se decompõem e penetram no esmalte mais rapidamente na fase orgânica. As conexões entre os cristais se perdem e os poros são visíveis (4).

Ao avaliar a superfície do esmalte com peróxido de hidrogênio a 35% notou-se áreas de erosão, áreas lisas e mistura de áreas rugosas com lisas, sendo a porosidade da superfície não uniforme. A remoção da camada superficial revelou uma grande quantidade de processo de Tomes quando comparado com o grupo controle que não fez clareamento. Esse aumento de porosidades e a exposição do

processo de Tomes pode sugerir a causa do aumento de sensibilidade. Em dentes humanos há um aumento de porosidade superficial, caracterizado por maior quantidade de depressões terminais dos prismas, maior aplainamento superficial, bem como áreas de erosão superficial após a aplicação do peróxido de hidrogênio a 35% (54).

Como a distribuição da fase orgânica não é uniforme na superfície do esmalte,existem algumas áreas que apresentam dissolução parcial da superfície, enquanto que em outras a dissolução é mais evidente. Em torno de 2% do constituinte do esmalte é composto de água, cujos elementos químicos são basicamente hidrogênio e oxigênio, os mesmos elementos básicos das proteínas. O uso de substâncias oxidantes leva a um aumento da profundidade entre os prismas de esmalte *(rod shealths)* quando observado por microscopia de força atômica. A condição não clareada apresenta uma profundidade de 8 ± 2ηm e após clareamento profundidade de 15±3ηm. Tem sido hipotetizado por observações utilizando microscopia de força atômica que o uso de agentes oxidantes afeta a fase orgânica (111)(174). Ocorre uma perda parcial do material orgânico próximo aos prismas, resultando em um aumento do espaço entre os prismas de esmalte. Apesar da quantidade de proteína constituir a menor parte do esmalte, ela corresponde aos espaços entre os cristais minerais, servindo como “cola” entre os cristalitos. É razoável assumir que a degradação desta “cola” pode levar à redução da microdureza do esmalte (175).

Uma aplicação do agente desproteinizante e do agente clareador por tempo mais prolongado talvez pudesse evidenciar de forma mais acentuada alterações morfológicas da superfície do esmalte. A aplicação do hipoclorito como agente desproteinizante poderia conferir à superfície do esmalte um aspecto mais liso devido a ação proteolítica na remoção do conteúdo proteico da superfície do esmalte. Como não é recomendada a utilização de hipoclorito de sódio em concentrações mais elevadas que 5,25 % uma alternativa a ser pesquisada laboratorialmente seria aumentar o tempo e a forma de aplicação sem comprometer demasiadamente o tempo clínico da técnica de clareamento.

Apesar de tais alterações de superfície, não houve diferença em relação à quantidade dos elementos químicos principais, como o cálcio e o fósforo. Outros estudos relatam que o peróxido, ao interagir com esmalte, permite a liberação de oxigênio e nitrogênio do esmalte, aumentando a quantidade destes elementos

químicos (4,176). Tal fato não foi observado pela técnica de microscopia de varredura por emissão de campo em atmosfera em vácuo.

As espécies oxidativas reativas provenientes da decomposição do hipoclorito de sódio, ou da decomposição do agente clareador, conduzem à oxidação de todos os aminoácidos (177), incluindo metionina, que juntamente com a cisteína e triprofano, pertencem aos aminoácidos mais fáceis de serem oxidados (178). Geralmente essas proteínas modificadas não são reparadas e são removidas pela degradação proteolítica (179). A degradação proteolítica é a principal responsável pela redução do conteúdo proteico e à oxidação dos aminoácidos. Decorrente desta interação dos radicais oxidantes com os aminoácidos há alteração da estrutura secundária da proteína de β-folha para bobina aleatória no esmalte clareado, afetando assim componentes inorgânicos. Além das proteínas, polissacarídeos são provavelmente afetados pelos radicais livres formados durante o clareamento; embora ocorra uma diminuição do conteúdo de polissacarídeos.

O componente mineral do esmalte consiste de nanocristais de bioapatita envoltos por uma matriz orgânica. A matriz controla as propriedades dos nanocristais e biominerais como um conjunto (99). Entretanto, a perda dramática de mineral no clareamento em consultório ocorre pelas mudanças de concentração e estrutura da matriz orgânica já mencionadas. Procedimentos de clareamento em consultório causam mais alterações que no clareamento caseiro (180).

Nos parâmetros estruturais do esmalte avaliados em micro-CT não ocorreu diferença do uso prévio de desproteinizante quando comparado com o grupo clareado. A espessura, separação estrutural e índice de fragmentação foram semelhantes tanto na profundidade de 56,2 μm quanto na de 110,2 μm. A ação do agente desproteinizante na matriz orgânica não foi suficiente para que ocorresse maior atenuação do feixe de raios-X ou que favorecesse a maior desmineralização do componente mineral em profundidade. Há uma tendência na camada mais externa de 56,2 μm à redução de espessura estrutural, aumento da separação estrutural e índice de fragmentação no grupo em que o agente desproteinizante foi aplicado. Essas características estruturais são correspondentes a uma estrutura mais desconectada.

As alterações de superfície em esmalte clareado e após a aplicação do agente desprotenizante não ocorrem em camadas profundas. Quando o agente clareador é aplicado e espécies reativas oxidantes são formadas, o radical livre tem

uma meia vida de somente alguns microssegundos nos sistemas biológicos; como conseqüência a difusão de tais espécies são locais, não menos que 100 ηm (181). Com isso, pode-se assumir que a porção externa do esmalte é muito mais susceptível do que a dentina. Esta é a razão de se utilizar somente as regiões mais externas do esmalte para análise. É necessário tempo para o agente clareador conseguir penetrar em direção às camadas mais internas (141).

Em relação à rugosidade, não foi detectado nenhum aumento significativo nos parâmetros estudados devido ao uso do hipoclorito de sódio. Parâmetros de amplitude (R_a e R_t) e de espaçamento (R_{sm}) ocorreram de forma semelhante ao grupo somente clareado. Independente do tratamento de superfície realizado, o uso de peróxido de hidrogênio a 35% parece criar porosidades na superfície enquanto ocorre a degradação de materiais orgânicos responsáveis pela descoloração do esmalte. Valores de R_a diminuem em relação à condição inicial após clareamento com peróxido de hidrogênio a 38% aplicado por 15 minutos por semana, durante 3 semanas (182). No entanto, outros autores encontraram aumento na rugosidade superficial do esmalte bovino ao tratar a mesma superfície com peróxido de hidrogênio a 30% por 30min. O aumento de tempo de contato do peróxido na superfície propicia a um maior aumento na rugosidade (183). Em nosso estudo, o tempo de contato foi pequeno, 4 aplicações de 8 minutos, o que não foi suficiente para detectar a alteração para estes parâmetros de rugosidade.

Os espaços entre os prismas devem ocorrer devido a uma ruptura das proteínas da matriz do esmalte e consequente perda das mesmas sob ação dos produtos oxidativos (4). Quando o agente desproteinizante é usado, provavelmente aumenta as porosidades porque o hipoclorito de sódio atua em conjunto com as espécies reativas oxidativas derivadas da decomposição do peróxido de hidrogênio. A liberação de oxigênio e nitrogênio, elementos básicos das proteínas, aumenta, enquanto o peroxido de hidrogênio interage com a composição orgânica do esmalte (176). Estas alterações, encontradas na literatura, relacionadas à matriz orgânica não aumentaram os valores de rugosidade. A ação do agente desproteinizante na superfície do esmalte poderia ter permitido que a ação do peróxido de hidrogênio no componente inorgânico ocorresse de forma mais agressiva. O aumento da rugosidade poderia implicar em uma maior susceptibilidade do esmalte ao acúmulo de placa bacteriana, que favoreceria ao manchamento extrínsico da superfície (184).

A tentativa de se remover o conteúdo proteico do esmalte para aumentar a difusão dever ser realizada com cautela. Sabe-se que um dos mecanismos tenacificadores do esmalte são justamente as proteínas entre os prismas do esmalte. Existem duas estruturas que são envoltas por proteínas: a região interprismática com prismas de 3,7 a 8,8 μm e a intraprismática com fibras de apatita de 50 ηm de diâmetros, envoltos aproximadamente por camada de 1 a 2 ηm de camada orgânica em dentes bovinos (185). A região interprismática, por possuir maior quantidade de matriz orgânica quando comparada com a região intraprismática, é menos resistente e mais susceptível à fratura. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar o comportamento mecânico do esmalte desproteinizado.

4) A associação de ACP-CPP após clareamento de consultório pode reduzir a clareação e a rugosidade em dentes bovinos

A hipótese foi negada. Em relação à alteração de cor, não ocorreu influência da aplicação de ACP-CPP após o tratamento com peróxido de hidrogênio a 35%. Há uma tendência a menor alteração de cor após 04 dias de aplicação, devido a uma maior queda do parâmetro b após 04 dias. No entanto, esta tendência não foi detectada estatisticamente.

Compostos a base de cálcio aplicados previamente à técnica de clareamento não impedem a ação clareadora do peróxido de hidrogênio, mesmo ocorrendo a redução da difusão do mesmo na penetração pulpar (186). O uso de compostos a base de ACP-CPP parece ser uma alternativa interessante, tanto previamente reduzindo a entrada de agentes oxidantes sem diminuir o efeito clareador, quanto posteriormente ao tratamento de clareamento pela deposição principalmente nos espaços interprismáticos de minerais em regiões que o peróxido de hidrogênio se difundiu e removeu parte da matriz orgânica.

Em GE2, há uma tendência a uma perda mais acentuada do brilho em relação aos demais grupos ao longo dos períodos avaliados. Isso se deve provavelmente a alteração superficial observada no MEV e no FEG pela deposição na superfície do esmalte de ACP-CPP que poderia favorecer ao maior espalhamento

de luz e com isso, reduzir os valores de brilho. No entanto, não houve diferença estatística que comprovasse tal alteração do comportamento óptico.

Em estudo *in-vitro* foi demonstrada a capacidade do ACP-CPP em prevenir a desmineralização tanto do esmalte, quanto da dentina. A superfície de esmalte bovino apresentou menores alterações morfológicas superficiais quando observada por microscopia eletrônica de transmissão por emissão de campo em relação ao grupo controle, que sofreu a ação da solução desmineralizante. A presença do ACP-CPP na superfície ajuda a manter um estado de supersaturação pela supressão da desmineralização e aumento da remineralização (187, 188).

Nesse estudo ocorreu aumento dos valores de rugosidade após 7 dias do parâmetro de amplitude R_T do GE2. Outros autores encontraram um aumento na rugosidade superficial após aplicação do ACP-CPP (143). Rugosidade superficial é uma propriedade clínica importante a ser investigada, pois pode influenciar tanto na estética, quanto na saúde do paciente (189).

Dos parâmetros utilizados, os mais empregados são R_a (média aritmética do perfil de rugosidade) e R_t (faixa que compreende do ponto máximo do perfil ao ponto mínimo, correspondendo à distância entre eles). Nesse estudo não se detectou alteração em relação ao parâmetro R_{sm}. Por ser um parâmetro de espaçamento, pode-se sugerir que a deposição de cálcio e de fósforo na superfície segue o espaçamento semelhante ao dos cristais de hidroxiapatita, condição do grupo consultório, que foi somente aplicado o peróxido de hidrogênio a 35%.

5) A associação de ACP-CPP após clareamento de consultório pode recuperar alterações estruturais ao longo do tempo em dentes humanos.

Essa hipótese foi aceita. Em GE2 foi notada uma maior deposição de mineral na superfície, há maior deposição de íons de cálcio, 38,4% na superfície, obliterando os espaços interprismáticos e recobrindo áreas de depressões. Outros autores encontraram deposição de mineral ao utilizar agentes oxidantes para clareamento de auto-aplicação, tanto em esmalte quanto em dentina (190). A ação protetora da superfície causa a formação de uma camada que preenche as cavidades interprismáticas e parcialmente cobre os prismas (143). O processo de

remineralização ainda não é totalmente compreendido, mas provavelmente ocorre um reparo por deposição de mineral nas zonas porosas do que um novo crescimento de cristal (191).

Íons de cálcio e fosfato são a base para o processo de remineralização, e são encontrados na saliva. O grau de saturação desses íons varia de pessoa para pessoa, entre glândulas salivares e a taxa de secreção. A dissolução e precipitação de minerais no dente depende do pH e da concentração de íons na fase fluida (192). Atualmente, o ACP-CPP tem se utilizado como fonte de suplemento para perda de cálcio e fosfato no meio oral.

Os nanocomplexos de ACP-CPP e outros ingredientes da pasta com uma consistência pegajosa (por exemplo, glicerol, d-sorbitol, propileno glicol, e goma) protegem a superfície do desgaste. As proteínas da pasta de ACP-CPP (por exemplo, caseína) também precisam ser investigadas porque a fase de proteína pode modificar mecanicamente as propriedades do esmalte. Recentemente, Swain e colaboradores observaram que a fase de proteína entre os cristais de apatita ajuda a distribuir as tensões de cisalhamento, na deflexão e na propagação de trincas e a sustentar carregamentos cíclicos de contato (193-195).

É muito difícil realizar comparação dos valores obtidos na técnica de micro-CT na literatura devido as diferentes metodologias utilizadas há uma grande variação do método e parâmetros de escaneamento. Fatores como emprego de filtros, diferentes amperagens, equipamento dentre outros influi no valor quantitativo obtido. Portanto nesse estudo os parâmetros estruturais tem maior relevância qualitativa pelas alterações dos padrões morfométricos encontrados.

Em relação a mudanças estruturais o uso de ACP-CPP imediatamente após o clareamento não se observou mudanças nos parâmetros estruturais a 56,2μm (ROI-1) e 110,2 μm (ROI-2). No entanto, após 07 dias foram detectadas mudanças na espessura, separação estrutural e índice de fragmentação somente no ROI-1, região mais superficial. O aumento da espessura, redução do índice de fragmentação e diminuição da separação estrutural indica uma estrutura mais compacta. Tais resultados estão de acordo com as imagens obtidas por MEV e FEG. Os resultados encontrados na técnica de micro-CT confirmam que não ocorre simplesmente uma deposição, mas também uma remineralização devido às alterações encontradas na subsuperfície, camada correspondente ao ROI-1.

A distribuição da concentração mineral ou densidade mineral dos tecidos duros pode ser medida tanto por métodos diretos (ex. análise química da estrutura) ou indiretos (ex. microradiografia) (196). O uso mais recente de micro-CT para quantificar a concentração mineral tem uma precisão melhor do que 1% e uma resolução entre 5 e 30µm. Há uma grande vantagem da técnica de micro-CT em escanear a amostra sem danificá-la, obter uma espessura de corte constante e evitar irregularidades devido ao corte físico. As fatias de micro-CT podem ser muito mais finas do que uma máquina de corte (88).

O efeito do peróxido de carbamida em diferentes concentrações foi avaliado com o uso do micro-CT. Foi aplicado peróxido de carbamida 10 e 35% em fatias de dentes humanos por diferentes tempos. Os resultados demonstraram que a aplicação de peróxido de carbamida a 10% causa uma desmineralização do esmalte em profundidade de 50 µm abaixo da superfície do esmalte. No entanto, ao utilizar peróxido de carbamida a 35% ocorreu uma significativa redução do conteúdo mineral do esmalte a uma profundidade de 250 µm, a redução mineral foi maior, principalmente na área mais próxima da superfície. Entretanto, em dentina nenhuma alteração ocorreu em conseqüência do clareamento (197, 198).

Em estudo de Ushigome e colaboradores em 2009, o esmalte bovino foi imerso em peróxido de hidrogênio a 30% durante 30 e 180 min, afetou somente 5 µm abaixo da superfície mais externa. O padrão de erosão é seletivo, localizado em torno dos prismas em esmalte tratado com peróxido de hidrogênio a 30%. Alteração de morfologia estão limitadas à profundidade de 50 µm abaixo da superfície mais externa (183).

Baseado nesses estudos anteriores em micro-CT em dentes humanos e alterações morfológicas encontradas em dentes bovinos foi determinada a área de interesse na análise de nosso estudo dos ROIs nas espessuras de 56,2 µm (ROI-1) e 110,2 µm (ROI-2) (197,198). Não há na literatura estudo com micro-CT utilizando peróxido de hidrogênio a 35% e tempo de 32 minutos simulando o tempo utilizado na clínica odontológica como recomendado pelo fabricante.

Há variabilidade na literatura de estudo com micro-CT com diferentes parâmetros que podem levar a diferenças de resultados: alto tempo de exposição, o posicionamento da amostra que pode facilitar ou dificultar o feixe a atravessar a amostra, e particularmente a redução do tamanho da amostra devido à eliminação de áreas densas. Devido a esta diversidade de fatores não dá para definir quais

destes é o maior responsável em afetar o sinal do feixe. Em regra geral a energia dos raios X deve ser maior se a amostra é mais espessa ou densa (201). Até o presente momento, não há nenhum estudo que utiliza os parâmetros estruturais na análise de dentes clareados.

Há tentativas em se desenvolver agentes remineralizantes a base de fosfato de cálcio para complementar ou substituir a efetividade clínica do flúor. Faltam evidências clínicas independentes para que o uso de ACP-CPP seja recomendado no uso clínico. A deposição de material na superfície do esmalte e formação de uma estrutura na superfície mais compacta é uma evidência laboratorial da eficácia da pasta a base de ACP-CPP, como foi encontrado nesse estudo. A maioria das evidências do potencial do ACP-CPP como agente cariogênico se deve a estudos *in-vitro* ou *in-situ* conduzidos principalmente por um grupo da Universidade de Melbourne, na Austrália (108,109,120,122,187). O complexo ACP-CPP rapidamente precipita na estrutura desmineralizada e transforma em apatita estável, que é resistente a ação dos ácidos produzidos pelas bactérias e desafios erosivos, promovendo benefício ao meio e contribuindo juntamente com a saliva na ação remineralizadora.

No estudo de DT. Zero de 2009 (202) são questionados alguns trabalhos *in-situ* publicados pelo grupo da Austrália. Algumas falhas metodológicas foram reportadas de estudos prévios *in-situ* publicado por Reynolds *et al*. (1999) (109) e Shen et. al (2001) (125).

Recente metanálise a respeito do uso de ACP-CPP para prevenção de cárie concluiu que, baseado nos estudos *in-situ,* o seu uso tem a ação remineralizadora em curto prazo. Dos trabalhos *in-vivo* em pesquisas clínicas, mostra resultados promissores do uso prolongado para prevenção de cárie (128).

Poucos estudos correlacionam o uso de ACP-CPP com a técnica de clareamento dental. A maioria dos estudos estão relacionados à remineralização após o processo de cárie.. A susceptibilidade ao manchamento não pode ser relacionada somente à rugosidade do esmalte. A composição do esmalte, maior absorção de água, alterações de permeabilidade e irregularidades provenientes de superfícies de esmalte clareados podem favorecer ao acúmulo de pigmentos (134, 203). Recentemente foi verificado *in-vitro* que o uso de ACP-CPP pode ser um efetivo coadjuvante na redução de absorção de pigmentos após clareamento, prevenindo o manchamento conferindo maior estabilidade de cor (28).

7 CONCLUSÕES

Para a avaliação de cor e brilho em dentes bovinos incisivos pode-se concluir que o uso de agente desproteinizante à base de hipoclorito de sódio à 5,25% aplicado ativamente por um minuto na superfície do esmalte bovino não otimiza a alteração de cor e o brilho da superfície. A aplicação de ACP-CPP por cinco minutos de forma passiva na superfície do esmalte bovino contribui para maior redução de brilho imediatamente após ao clareamento. Para a avaliação de rugosidade em dentes bovinos, o uso de agente desproteinizante ou a aplicação de ACP-CPP não altera rugosidade superficial.

Para a avaliação da ultraestrutura em dentes humanos pré-molares, o uso de agente desproteinizante não otimiza a alteração da ultraestrutura inorgânica na superfície e em profundidade do esmalte dental humano. A aplicação de ACP-CPP após a técnica de clareamento de consultório altera a ultraestrutura do esmalte dental humano após sete dias.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 306987
Protocolo 169/2009

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Desproteinização do esmalte associado à técnica de remineralização em dentes clareados em consultório",** de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Maurício Neves Gomes, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Carlos Eduardo Francci.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de fevereiro de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof.Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7825
Impresso no S.D.O.

REFERÊNCIAS

1. Kugel G, Ferreira S, Sharma S, Barker ML, Gerlach RW. Clinical trial assessing light enhancement of in-office tooth whitening. J Esthet Restor Dent. 2009;21(5):336-47.

2. Leonard RH, Sharma A, Haywood VB. Use of different concentrations of carbamide peroxide for bleaching teeth: an in vitro study. Quintessence Int. 1998 Aug;29(8):503-7.

3. Tanaka R, Shibata Y, Manabe A, Miyazaki T. Micro-structural integrity of dental enamel subjected to two tooth whitening regimes. Arch Oral Biol. Apr;55(4):300-8.

4. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. J Oral Rehabil. 2002 May;29(5):473-7.

5. Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. J Dent. 2004 Jan;32(1):41-6.

6. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Apr;109(4):e59-64.

7. Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. J Oral Rehabil. 2004 Feb;31(2):155-9.

8. 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 Nov;31(8):543-8.

9. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol. 1995 Jan;22(1):1-14.

10. Fu B, Hoth-Hannig W, Hannig M. Effects of dental bleaching on micro- and nano-morphological alterations of the enamel surface. Am J Dent. 2007 Feb;20(1):35-40.

11. Markovic L, Jordan RA, Lakota N, Gaengler P. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. J Endod. 2007 May;33(5):607-10.

12. Riehl HN, M.F. As fontes de energia luminosa são necessárias na terapia de clareamento dental?. Sao Paulo: Editora Santos; 2007.

13. Tung FF, Goldstein GR, Jang S, Hittelman E. The repeatability of an intraoral dental colorimeter. J Prosthet Dent. 2002 Dec;88(6):585-90.

14. van der Burgt TP, ten Bosch JJ, Borsboom PC, Kortsmit WJ. A comparison of new and conventional methods for quantification of tooth color. J Prosthet Dent. 1990 Feb;63(2):155-62.

15. Furuse AY, Gordon K, Rodrigues FP, Silikas N, Watts DC. Colour-stability and gloss-retention of silorane and dimethacrylate composites with accelerated aging. J Dent. 2008 Nov;36(11):945-52.

16. Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser (Part 2). Organic matrix. J Dent. 2007 Oct;35(10):794-9.

17. Dietschi D, Rossier S, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. Quintessence Int. 2006 Jul-Aug;37(7):515-26.

18. Lee HW, Kim GJ, Kim JM, Park JK, Lee JK, Kim GC. Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. J Endod. 2009 Apr;35(4):587-91.

19. Mountouris G, Silikas N, Eliades G. Effect of sodium hypochlorite treatment on the molecular composition and morphology of human coronal dentin. J Adhes Dent. 2004 Autumn;6(3):175-82.

20. Sakae T, Mishima H, Kozawa Y. Changes in bovine dentin mineral with sodium hypochlorite treatment. J Dent Res. 1988 Sep;67(9):1229-34.

21. Tanaka J, Nakai H. Application of root canal cleaning agents having dissolving abilities of collagen to the surface treatment for enhanced bonding of resin to dentin. Dent Mater J. 1993 Dec;12(2):196-208.

22. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod. 1988 Mar;14(3):125-7.

23. Featherstone JD, Cutress TW, Rodgers BE, Dennison PJ. Remineralization of artificial caries-like lesions in vivo by a self-administered mouthrinse or paste. Caries Res. 1982;16(3):235-42.

24. Giniger M, Macdonald J, Ziemba S, Felix H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. J Am Dent Assoc. 2005 Mar;136(3):383-92.

25. Milnar FJ. Considering biomodification and remineralization techniques as adjuncts to vital tooth-bleaching regimens. Compend Contin Educ Dent. 2007 May;28(5):234-6, 8-40.

26. Yates R, Owens J, Jackson R, Newcombe RG, Addy M. A split-mouth placebo-controlled study to determine the effect of amorphous calcium phosphate in the treatment of dentine hypersensitivity. J Clin Periodontol. 1998 Aug;25(8):687-92.

27. Mathew M, Takagi, S Structures of biological minerals in dental research. J Res Natl Inst Stand Technol. 2001;106(6):1035-44.

28. Singh RD, Ram SM, Shetty O, Chand P, Yadav R. Efficacy of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to prevent stain absorption on freshly bleached enamel: An in vitro study. J Conserv Dent. Apr;13(2):76-9.

29. Mjor IAF, O. Embriologia e histologia oral humana. Panamericana, editor. Sao Paulo; 1990.

30. Moreno EC, Zahradnik RT. The pore structure of human dental enamel. Arch Oral Biol. 1973 Aug;18(8):1063-8.

31. Structural features of human dental enamel as revealed by isothermal water vapour sorption. Arch Oral Biol. 1975 May-Jun;20(5-6):317-25.

32. Orams HJ, Phakey PP, Rachinger WA, Zybert JJ. Visualisation of micropore structure in human dental enamel. Nature. 1974 Dec 13;252(5484):584-5.

33. Waters NE. Electrochemical properties of human dental enamel. Nature. 1968 Jul 6;219(5149):62-3.

34. Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. Br Dent J. 1947 Nov 21;83(10):205-14.

35. Gwinnett AJ. Normal enamel. I. Quantitative polarized light study. J Dent Res. 1966 Jan-Feb;45(1):120-7.

36. Burke EJ, Moreno EC. Diffusion fluxes of tritiated water across human enamel membranes. Arch Oral Biol. 1975 May-Jun;20(5-6):327-32.

37. Linden LA. Microscopic observations of fluid flow through cementum and dentine. An in vitro study on human teeth. Odontol Revy. 1968;19(4):367-81.

38. Borggreven JM, van Dijk JW, Driessens FC. A quantitative radiochemical study of ionic and molecular transport in bovine dental enamel. Arch Oral Biol. 1977;22(8-9):467-72.

39. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. Caries Res. 1993;27(2):81-6.

40. Dibdin GH, Poole DF. Surface area and pore size analysis for human enamel and dentine by water vapour sorption. Arch Oral Biol. 1982;27(3):235-41.

41. Brudevold F, Tehrani A, Cruz R. The relationship among the permeability to iodide, pore volume, and intraoral mineralization of abraded enamel. J Dent Res. 1982 May;61(5):645-8.

42. Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. J Dent Res. 1990 Feb;69 Spec No:575-80; discussion 634-6.

43. Ten Cate AR. Oral histology: development structure and function. 5 ed. St. Louis: Mosby; 1998.

44. Berkovitz BKB. Handbook of microscopic anatomy (Teeth). Springer-Verlag ed. London; 1989.

45. Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. Arch Oral Biol. 1965 Sep-Oct;10(5):775-83.

46. Ferraris MEGM, A C. Histologia e embriologia bucodental. Panamericana, editor. Argentina; 2005.

47. Arana EKV. Histologia e Embriologia Oral. 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.

48. Shroeder HE. Oral Structural Biology. New York: Thieme Medical Publishers; 1991.

49. Kotsanos N, Darling AI. Influence of posteruptive age of enamel on its susceptibility to artificial caries. Caries Res. 1991;25(4):241-50.

50. Bertacci A, Chersoni S, Davidson CL, Prati C. In vivo enamel fluid movement. Eur J Oral Sci. 2007 Jun;115(3):169-73.

51. Callister WDC. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. 5 ed. Sons JW, editor.; 2000.

52. Lazarchik DA, Haywood VB. Use of tray-applied 10 percent carbamide peroxide gels for improving oral health in patients with special-care needs. J Am Dent Assoc. Jun;141(6):639-46.

53. Li Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. Food Chem Toxicol. 1996 Sep;34(9):887-904.

54. Spalding M, Taveira LA, de Assis GF. Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. J Esthet Restor Dent. 2003;15(3):154-64; discussion 65.

55. Jones CW. Applications of hydrogen peroxides and Derivatives. 1 ed. York: Royal Society of Chemistry; 1999.

56. Ito Y, Momoi Y. Bleaching using 30% hydrogen peroxide and sodium hydrogen carbonate. Dent Mater J.30(2):193-8.

57. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):292-304.

58. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. J Dent. 2006 Mar 25.

59. Hobson RS, Rugg-Gunn AJ, Booth TA. Acid-etch patterns on the buccal surface of human permanent teeth. Arch Oral Biol. 2002 May;47(5):407-12.

60. Hobson RS, Crotty T, Thomason JM, Jepson NJ. A quantitative study of enamel acid etch patterns on surfaces used for retention of resin-bonded fixed prostheses. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2005 Sep;13(3):123-8.

61. Miles AEW. Structural and chemical organization of teeth. 1967.

62. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. J Appl Bacteriol. 1979 Feb;46(1):65-73.

63. Parks LM. Inorganic chemistry in pharmacy. Filadélfia:Company L, editor.; 1949.

64. Lebeau PJ, MM. Traité de pharmacie Quimique. Paris: Masson & Cie ed.; 1956.

65. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980 Feb;49(2):175-7.

66. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod. 1978 Feb;4(2):60-4.

67. The SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1979 Jun;47(6):558-61.

68. Fattibene P, Carosi A, De Coste V, Sacchetti A, Nucara A, Postorino P, *et al*. A comparative EPR, infrared and Raman study of natural and deproteinated tooth enamel and dentin. Phys Med Biol. 2005 Mar 21;50(6):1095-108.

69. Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteination: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. J Endod. Dec;36(12):2008-11.

70. Sauro S, Mannocci F, Tay FR, Pashley DH, Cook R, Carpenter GH, e*t al*. Deproteinization effects of NaOCl on acid-etched dentin in clinically-relevant vs prolonged periods of application. A confocal and environmental scanning electron microscopy study. Oper Dent. 2009 Mar-Apr;34(2):166-73.

71. Toledano M, Perdigao J, Osorio E, Osorio R. Influence of NaOCl deproteinization on shear bond strength in function of dentin depth. Am J Dent. 2002 Aug;15(4):252-5.

72. Ghousia S, Sathyajith NN, Reddy VV. Spectrophotometric analysis on bleaching efficacy of blood stained demineralized and deproteinized dentin--an in vitro study. J Clin Pediatr Dent. Summer;34(4):303-8.

73. Sonmez IS, Aras S, Tunc ES, Kucukesmen C. Clinical success of deproteinization in hypocalcified amelogenesis imperfecta. Quintessence Int. 2009 Feb;40(2):113-8.

74. Espinosa R, Valencia R, Uribe M, Ceja I, Saadia M. Enamel deproteinization and its effect on acid etching: an in vitro study. J Clin Pediatr Dent. 2008 Fall;33(1):13-9.

75. Ahuja B, Yeluri R, Baliga S, Munshi AK. Enamel deproteinization before acid etching--a scanning electron microscopic observation. J Clin Pediatr Dent. Winter;35(2):169-72.

76. Espinosa R, Valencia R, Uribe M, Ceja I, Cruz J, Saadia M. Resin replica in enamel deproteinization and its effect on acid etching. J Clin Pediatr Dent. Fall;35(1):47-51.

77. Lopes HPSJ, J.F. Endodontia biologia e técnica. 2 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2004.

78. Cruickshank Rea. Medical microbiology. 12º ed. Edinburgh: Livingstone C, editor.; 1973.

79. Spanó J. Estudo in vitro das propriedades fisico-químicas das soluções de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, antes e após a dissolução de tecido pulpar bovino [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1999.

80. Dunn PM. Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2001 Mar;84(2):F138-9.

81. Lindblom K. On microtomography. Acta radiol. 1954 Dec;42(6):465-8.

82. Luedemann TNRC. Micro-computed tomography in caries research. Munique: Universidade de Munique; 2007.

83. Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. J Endod. 1987 Aug;13(8):375-7.

84. Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. Br J Radiol. 1973 Dec;46(552):1016-22.

85. Stock SR, Barss J, Dahl T, Veis A, Almer JD. X-ray absorption microtomography (microCT) and small beam diffraction mapping of sea urchin teeth. J Struct Biol. 2002 Jul;139(1):1-12.

86. Wong FS, Elliott JC, Davis GR, Anderson P. X-ray microtomographic study of mineral distribution in enamel of mandibular rat incisors. J Anat. 2000 Apr;196 (Pt 3):405-13.

87. Mercer CE, Anderson P, Davis GR. Sequential 3D X-ray microtomographic measurement of enamel and dentine ablation by an Er:YAG laser. Br Dent J. 2003 Jan 25;194(2):99-104; discussion 89.

88. Davis GR, Wong FS. X-ray microtomography of bones and teeth. Physiol Meas. 1996 Aug;17(3):121-46.

89. Anderson P, Elliott JC, Bose U, Jones SJ. A comparison of the mineral content of enamel and dentine in human premolars and enamel pearls measured by X-ray microtomography. Arch Oral Biol. 1996 Mar;41(3):281-90.

90. Hayakawa T, Mishima H, Yokota I, Sakae T, Kozawa Y, Nemoto K. Application of high resolution microfocus X-ray CT for the observation of human tooth. Dent Mater J. 2000 Mar;19(1):87-95.

91. IN S. Basic radiometric quantities. The Beer-Bouguer-Lambert law. Concepts of
extinction (scattering plus absorption) and emission.Schwarzschild's equation http://irina.eas.gatech.edu/EAS8803Fall2005/Lecture3.pdf.; 2005.

92. Wakabayashi K, Sohmura T, Nakamura T, Kojima T, Kinuta S, Takahashi J, *et al*. New evaluation method by microfocus radiograph CT for 3D assessment of internal adaptation of all-ceramic crowns. Dent Mater J. 2005 Sep;24(3):362-7.

93. Sohmura T, Wakabayashi K, Lowmunkong R, Hojo H, Kusumoto N, Okuda H, *et al*. 3D shape measurement of dental casts using medical X-ray CT. Dent Mater J. 2004 Jun;23(2):121-8.

94. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. Jul;25(7):1468-86.

95. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. J Orthop Res. 1990 Nov;8(6):833-42.

96. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, *et al*. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. Bone. 1998 Jul;23(1):59-66.

97. Marwan N, Kurths J, Thomsen JS, Felsenberg D, Saparin P. Three-dimensional quantification of structures in trabecular bone using measures of complexity. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2009 Feb;79(2 Pt 1):021903.

98. Chappard DM-FB, E. Legrand, M. Audran. Trabecular bone microarchitecture. A review. Morphologie. 2008;92:162-70.

99. Brik A, Haskell E, Brik V, Scherbina O, Atamanenko O. Anisotropy effects of EPR signals and mechanisms of mass transfer in tooth enamel and bones. Appl Radiat Isot. 2000 May;52(5):1077-83.

100. Muller R, Koller B, Hildebrand T, Laib A, Gianolini S, Ruegsegger P. Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional mu-tomography. Technol Health Care. 1996 Apr;4(1):113-9.

101. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, *et al*. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 1987 Dec;2(6):595-610.

102. Hildebrand T. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. J Micro. 1995;185 PT1:67-75.

103. Hahn M VM, Pompesius - Kempa M, Delling G. . Trabecular bone pattern factor - a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. Bone. 1992;13:327-30.

104. Monteiro WA. Caracterização de materiais por métodos físicos - Técnicas experimentais e aplicações práticas. In: Briso SJ, editor. IPEN; 2008. p. 153.

105. Monteiro WAB, S J. Caracterização de materiais por métodos físicos - Técnicas experimentais e aplicações práticas. Sao Paulo: IPEN - USP; 2008 Contract No.: Document Number|.

106. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. J Biol Chem. 1977 Mar 10;252(5):1689-95.

107. Vogel GL, Schumacher GE, Chow LC, Takagi S, Carey CM. Ca pre-rinse greatly increases plaque and plaque fluid F. J Dent Res. 2008 May;87(5):466-9.

108. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. Adv Dent Res. 2009;21(1):25-9.

109. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. J Dent Res. 2003 Mar;82(3):206-11.

110. Willumsen T, Ogaard B, Hansen BF, Rolla G. Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid. Acta Odontol Scand. 2004 Oct;62(5):278-81.

111. 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 Sep;27(7):509-15.

112. Gjorgievska E, Nicholson J. Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste. Aust Dent J. Jun;56(2):193-200.

113. Yli-Urpo H, Narhi M, Narhi T. Compound changes and tooth mineralization effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4), an in vivo study. Biomaterials. 2005 Oct;26(30):5934-41.

114. Yli-Urpo H, Vallittu PK, Narhi TO, Forsback AP, Vakiparta M. Release of silica, calcium, phosphorus, and fluoride from glass ionomer cement containing bioactive glass. J Biomater Appl. 2004 Jul;19(1):5-20.

115. Larsen MJ, Pearce EI. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. Arch Oral Biol. 2003 Apr;48(4):317-22.

116. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. J Dent Res. Aug 25.

117. Eanes E. Amorphous calcium phosphate: thermodynamic and kinetic consideations.Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems. In Amjad Z e, editor. Boston, Mass: Kluver Academic Publishers; 1997.

118. Tung MS, Eichmiller FC. Amorphous calcium phosphates for tooth mineralization. Compend Contin Educ Dent. 2004 Sep;25(9 Suppl 1):9-13.

119. Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. J Nutr. 2004 Apr;134(4):989S-95S.

120. Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, *et al*. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. J Dent Res. 1995 Jun;74(6):1272-9.

121. Holt C. Structure and stability of bovine casein micelles. Adv Protein Chem. 1992;43:63-151.

122. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. J Dent Res. 1997 Sep;76(9):1587-95.

123. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. Caries Res. 2008;42(2):88-97.

124. Cross KJ, Huq NL, Palamara JE, Perich JW, Reynolds EC. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. J Biol Chem. 2005 Apr 15;280(15):15362-9.

125. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. J Dent Res. 2001 Dec;80(12):2066-70.

126. Bailey DL, Adams GG, Tsao CE, Hyslop A, Escobar K, Manton DJ, *et al*. Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. J Dent Res. 2009 Dec;88(12):1148-53.

127. Llena C, Forner L, Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. J Contemp Dent Pract. 2009;10(3):1-9.

128. Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. Acta Odontol Scand. 2009 Aug 21:1-12.

129. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. J Am Dent Assoc. 2008 Jul;139(7):915-24; quiz 94-5.

130. Allan JH. Investigations into the mineralization pattern of human dental enamel. J Dent Res. 1959 Nov-Dec;38:1096-128.

131. Ben-Amar A, Liberman R, Gorfil C, Bernstein Y. Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. Am J Dent. 1995 Feb;8(1):29-32.

132. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. J Biomed Mater Res. 1995 Sep;29(9):1111-20.

133. Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. Annu Rev Biomed Eng. 2004;6:185-208.

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

135. Urabe I, Nakajima S, Sano H, Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. Am J Dent. 2000 Jun;13(3):129-35.

136. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. J Dent Res. 1992 Apr;71 Spec No:913-9.

137. Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. J Dent. 2008 Sep;36(9):718-25.

138. Leonard RH, Jr., Eagle JC, Garland GE, Matthews KP, Rudd AL, Phillips C. Nightguard vital bleaching and its effect on enamel surface morphology. J Esthet Restor Dent. 2001;13(2):132-9.

139. Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence Pub. Co.; 1995.

140. Goodis HE, Marshall GW, Jr., White JM. The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro. Arch Oral Biol. 1991;36(8):561-6.

141. Kugel G, Petkevis J, Gurgan S, Doherty E. Separate whitening effects on enamel and dentin after fourteen days. J Endod. 2007 Jan;33(1):34-7.

142. Whittaker DK. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. Arch Oral Biol. 1982;27(5):383-92.

143. Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. J Dent. 2009 Dec;37(12):949-54.

144. Attin T, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. Caries Res. 2000 Jan-Feb;34(1):48-52.

145. Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. J Oral Rehabil. 1997 Apr;24(4):282-6.

146. Attin T, Kocabiyik M, Buchalla W, Hannig C, Becker K. Susceptibility of enamel surfaces to demineralization after application of fluoridated carbamide peroxide gels. Caries Res. 2003 Mar-Apr;37(2):93-9.

147. Fejerskov O, Josephsen K, Nyvad B. Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. Caries Res. 1984;18(4):302-14.

148. Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. Field emission in-lens SEM study of enamel and dentin. J Biomed Mater Res. 1999 Sep 5;46(3):315-23.

149. Maia E, Baratieri LN, Caldeira de Andrada MA, Monteiro S, Jr., Vieira LC. The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in situ study. J Dent. 2008 Jan;36(1):2-7.

150. Araujo Fde O, Baratieri LN, Araujo E. In situ study of in-office bleaching procedures using light sources on human enamel microhardness. Oper Dent. Mar-Apr;35(2):139-46.

151. Attin T, Schmidlin PR, Wegehaupt F, Wiegand A. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: a review. Dent Mater. 2009 Feb;25(2):143-57.

152. Bolt RA, Bosch JJ, Coops JC. Influence of window size in small-window colour measurement, particularly of teeth. Phys Med Biol. 1994 Jul;39(7):1133-42.

153. Johnston WM, Kao EC. Assessment of appearance match by visual observation and clinical colorimetry. J Dent Res. 1989 May;68(5):819-22.

154. Travassos AC, Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. Oper Dent. May-Jun;35(3):287-94.

155. Darvell B. Master Science for Dentistry. 7 ed. Kong UoH, editor. Hong Kong; 2002.

156. Cohen SC. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. J Endod. 1979 May;5(5):134-8.

157. 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 Jun(29):S22-8; quiz S42-3.

158. Seghi RR, Johnston WM, O'Brien WJ. Performance assessment of colorimetric devices on dental porcelains. J Dent Res. 1989 Dec;68(12):1755-9.

159. Keyf F, Etikan I. Evaluation of gloss changes of two denture acrylic resin materials in four different beverages. Dent Mater. 2004 Mar;20(3):244-51.

160. Heintze SD, Forjanic M, Rousson V. Surface roughness and gloss of dental materials as a function of force and polishing time in vitro. Dent Mater. 2006 Feb;22(2):146-65.

161. Lee YK, Lu H, Oguri M, Powers JM. Changes in gloss after simulated generalized wear of composite resins. J Prosthet Dent. 2005 Oct;94(4):370-6.

162. O'Brien WJ, Johnston WM, Fanian F, Lambert S. The surface roughness and gloss of composites. J Dent Res. 1984 May;63(5):685-8.

163. Silikas N, Kavvadia K, Eliades G, Watts D. Surface characterization of modern resin composites: a multitechnique approach. Am J Dent. 2005 Apr;18(2):95-100.

164. Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N. Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. J Mater Sci Mater Med. 2007 Jan;18(1):155-63.

165. Anagnostou M, Chelioti G, Chioti S, Kakaboura A. Effect of tooth-bleaching methods on gloss and color of resin composites. J Dent.38 Suppl 2:e129-36.

166. Ardu S, Braut V, Uhac I, Benbachir N, Feilzer AJ, Krejci I. Influence of mechanical and chemical degradation on surface gloss of resin composite materials. Am J Dent. 2009 Oct;22(5):264-8.

167. Barucci-Pfister N, Gohring TN. Subjective and objective perceptions of specular gloss and surface roughness of esthetic resin composites before and after artificial aging. Am J Dent. 2009 Apr;22(2):102-10.

168. da Costa J, Adams-Belusko A, Riley K, Ferracane JL. The effect of various dentifrices on surface roughness and gloss of resin composites. J Dent.38 Suppl 2:e123-8.

169. Da Costa J, Ferracane J, Paravina RD, Mazur RF, Roeder L. The effect of different polishing systems on surface roughness and gloss of various resin composites. J Esthet Restor Dent. 2007;19(4):214-24; discussion 25-6.

170. Miyasaka M, Miura H, Nagatomi H, Yoshimine M. The effects of various finishing materials on the gloss and the color change of indirect prosthetic resin composites. J Med Dent Sci. 2008 Mar;55(1):1-6.

171. Paravina RD, Roeder L, Lu H, Vogel K, Powers JM. Effect of finishing and polishing procedures on surface roughness, gloss and color of resin-based composites. Am J Dent. 2004 Aug;17(4):262-6.

172. Redmalm G, Johannsen G, Ryden H. Lustre changes on teeth. The use of laser light for reflexion measurements on the tooth surface--in vivo. Swed Dent J. 1985;9(1):29-35.

173. Tanaka R, Shibata Y, Manabe A, Miyazaki T. Micro-structural integrity of dental enamel subjected to two tooth whitening regimes. Arch Oral Biol. Mar 23.

174. 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 Jan-Feb;13(1):014019.

175. Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. J Dent. 2008 Nov;36(11):907-14.

176. Ruse ND, Smith DC, Torneck CD, Titley KC. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. J Dent Res. 1990 Sep;69(9):1610-3.

177. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev. 2000 Aug-Nov;32(3-4):307-26.

178. Milzani A, Rossi R, Di Simplicio P, Giustarini D, Colombo R, DalleDonne I. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. Protein Sci. 2000 Sep;9(9):1774-82.

179. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci. 2000;899:191-208.

180. Severcan F, Gokduman K, Dogan A, Bolay S, Gokalp S. Effects of in-office and at-home bleaching on human enamel and dentin: an in vitro application of Fourier transform infrared study. Appl Spectrosc. 2008 Nov;62(11):1274-9.

181. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J. 1984 Aug 15;222(1):1-15.

182. Faraoni-Romano JJ, Da Silveira AG, Turssi CP, Serra MC. Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: effect on dental microhardness and roughness. J Esthet Restor Dent. 2008;20(6):395-402; discussion 3-4.

183. Ushigome T, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface--cross-sectional analysis. Dent Mater J. 2009 May;28(3):315-23.

184. Cadenaro M, Breschi L, Nucci C, Antoniolli F, Visintini E, Prati C, *et al*. Effect of two in-office whitening agents on the enamel surface in vivo: a

morphological and non-contact profilometric study. Oper Dent. 2008 Mar-Apr;33(2):127-34.

185. Ang SF, Schulz A, Pacher Fernandes R, Schneider GA. Sub-10-micrometer toughening and crack tip toughness of dental enamel. J Mech Behav Biomed Mater. Apr;4(3):423-32.

186. Wong RH, editor. Penetration of bleaching agents in Tooth Mousse treated bovine incisors. IADR; 2010; Barcelona.

187. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. Spec Care Dentist. 1998 Jan-Feb;18(1):8-16.

188. Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, Inage H, Watanabe T, Irokawa A, *et al*. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. J Oral Sci. 2007 Jun;49(2):115-20.

189. Moraes RR, Marimon JL, Schneider LF, Correr Sobrinho L, Camacho GB, Bueno M. Carbamide peroxide bleaching agents: effects on surface roughness of enamel, composite and porcelain. Clin Oral Investig. 2006 Mar;10(1):23-8.

190. Pinheiro HB. Influencia de cinco geis clareadores e de um gel remineralizante sobre a ultra-estrutura e microdureza do esmalte e da dentina de dentes humanos. Sao Paulo: Universidade de Sao Paulo; 2009.

191. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. Caries Res. 2001 May-Jun;35(3):211-5.

192. Lambrou D, Larsen MJ, Fejerskov O, Tachos B. The effect of fluoride in saliva on remineralization of dental enamel in humans. Caries Res. 1981;15(5):341-5.

193. Guidoni G, Swain M, Jager I. Enamel: From brittle to ductile like tribological response. J Dent. 2008 Oct;36(10):786-94.

194. He LH, Swain MV. Enamel - a "metallic-like" deformable biocomposite. J Dent. 2007 May;35(5):431-7.

195. He LS, MV. Contact induced deformation of enamel. Appl Phys Lett. 2007;90.

196. Wong FS, Anderson P, Fan H, Davis GR. X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. Arch Oral Biol. 2004 Nov;49(11):937-44.

197. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. J Dent. 2005 Aug;33(7):561-7.

198. Efeoglu N, Wood DJ, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. Dent Mater. 2007 Jul;23(7):900-4.

199. Xue J, Li W, Swain MV. In vitro demineralization of human enamel natural and abraded surfaces: a micromechanical and SEM investigation. J Dent. 2009 Apr;37(4):264-72.

200. Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL, Jr., Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. J Dent Res. 1999 Jul;78(7):1326-35.

201. Bonse U BF. X-ray computed microtomography using synchroton radiation (SR). Prog Biophys Mol Bio 1996;65(1-2):133-69.

202. Zero DT. Recaldent--evidence for clinical activity. Adv Dent Res. 2009;21(1):30-4.

203. Titley K, Torneck CD, Smith D. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphology of human tooth enamel. J Endod. 1988 Feb;14(2):69-74.