

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

KAMYLLA GUIMARÃES GARCIA

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE GEL CLAREADOR CONTENDO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO E FLUORETO
SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE: ESTUDO *IN VITRO***

RIBEIRÃO PRETO

2021

Kamylla Guimarães Garcia

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE GEL CLAREADOR CONTENDO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO E FLUORETO
SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle Danelon

RIBEIRÃO PRETO

2021

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Garcia, Kamylla Guimarães, 1993.

G216a Avaliação de uma nova formulação de gel clareador contendo peróxido de hidrogênio, glicerofosfato de cálcio e fluoreto sobre as propriedades mecânicas do esmalte: estudo *in vitro* / Kamylla Guimarães Garcia. - - Ribeirão Preto, 2021.

421 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcelle Danelon.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Odontologia, área de concentração: Endodontia. Ribeirão Preto, 2021.

1. Clareamento dental. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Fosfato.

I. Título.

CDD 617.6342

KAMYLLA GUIMARÃES GARCIA

**“AVALIAÇÃO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE GEL CLAREADOR
CONTENDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO
E FLUORETO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE:
ESTUDO IN VITRO”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

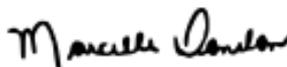
Orientadora: Profa. Dra. Marcelle Danelon

Área de concentração: Endodontia

Data de defesa: 14 de maio de 2021

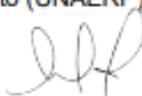
Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



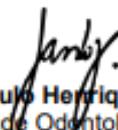
Profa. Dra. Marcelle Danelon

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) – Presidente



Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)



Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos

Professor Associado da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA - UNESP)



Este estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP, em parceria com o Laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com apoio financeiro da PROSUP/CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo: 2020/14770-6).

Dedico este trabalho

Em primeiro lugar à **Deus**, por ter iluminado meu caminho e por ter dado força e discernimentos necessários para concluir esta jornada.

Aos meus pais, **Carlos Alberto Garcia Cabral** e **Elba Borges Guimarães**, por serem os melhores pais do mundo, ampararem com muita dedicação os meus estudos, servirem como exemplo de vida e acreditarem no meu potencial, tornar alicerce para a realização dos meus sonhos. Sou grata por tudo o que vocês fizeram e fazem pela minha vida, para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia. Amo muito vocês!

À minha **Família**, a qual sou extremamente grata por fazer parte. Por me apoiarem em toda a trajetória de vida, com incentivos, palavras e força para seguir em frente e aguentar todas as dificuldades que surgiram em meu caminho.

Ao meu esposo, **Mário Célio Guimarães Filho**, por toda a paciência, cumplicidade e companherismo em me acompanhar em todos os meus sonhos e desejos, sei que todo esforço no final valeu a pena para o meu conhecimento adquirido. Obrigada por estar ao meu lado sempre em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marcelle Danelon**, que acreditou em mim, que com muita paciência compreendeu todas as minhas dificuldades e com amor dedicou a me ensinar todo o universo da pesquisa, compartilhando o seu vasto conhecimento científico e experiência. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua pessoa, um exemplo de seriedade e competência, por toda a dedicação, inspiração, disponibilidade, paciência, carinho, amizade, pela humildade e pela atenção. Todo o meu carinho por você que é muito mais que uma professora é um ser iluminado a ensinar todos a sua volta. Tenho muito a agradecer pela a oportunidade de ser sua orientada, pela dedicação, pelo conhecimento e compreensão em me ajudar de todas as formas. Desejo que Deus continue te abençoando e iluminando para que cada dia mais consiga transmitir seus conhecimentos e aprendizagem a mais pessoas, foi uma honra estar ao seu lado e compartilhar os meus sonhos. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lucia O. Bonini**, personalidade constante e pioneira na educação nacional.

À Coordenadora da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Souza**, por ter me recebido como aluna no curso de Pós-Graduação (Mestrado), compartilhando comigo seus conhecimentos, idéias e filosofias.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) pela oportunidade de conviver, dividir conhecimentos e experiências. Muito obrigada.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, ao Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, pelo auxílio e desenvolvimento da fase experimental, ao Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem pela imensa contribuição na colaboração da fase experimental da pesquisa.

Ao Doutorando **Gabriel Pereira Nunes**, por toda a paciência, disponibilidade e ajuda dentro e fora do laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Obrigada por ter me recebido de braços abertos, com muito carinho, um profissional exemplar e dedicado.

Às pessoas que diariamente dividiram comigo tudo aquilo que somente uma pós-graduanda sabe o que é, e que tornaram essa jornada especial: Meus amigos e colegas de turma da Pós- Graduação em Odontologia UNAERP.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto UNAERP, pelo acolhimento e excelência de seus professores e funcionários.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP)** pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: Processo: 2020/14770-6)** pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto, a aluna de graduação Helena Fujisaka Robles.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

“O importante mesmo na vida é sempre tentar, perdendo ou ganhando, persistir sempre. Os grandes vencedores, não foram aqueles que sempre ganharam as batalhas, mas os que nunca desistiram de lutar.”

Adrian Gras

RESUMO

O clareamento dental é considerado um tratamento não invasivo, entretanto, estudos demonstram que pode levar a alterações no esmalte. A adição de íons cálcio, fosfato e fluoreto nas formulações dos géis clareadores tem sido benéfica para a proteção do esmalte dentário. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a adição do glicerofosfato de cálcio (CaGP) e fluoreto de sódio (NaF) ao peróxido de hidrogênio a 35% sobre as propriedades mecânicas do esmalte. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm x 2 mm, n = 60) foram selecionados através da dureza de superfície inicial (SHI) e divididos em cinco grupos (n = 12), de acordo com os tratamentos: 1) Gel Peróxido de hidrogênio a 35% (PH); 2) Gel PH + 0,1% NaF (PH/F); 3) Gel PH + 0,25% CaGP (PH/CaGP); 4) Gel PH + 0,1% NaF + 0,25% CaGP (PH/F/CaGP) e 5) Gel HP Blue 35% (FGM - Produtos Odontológicos: HP Blue, contendo 2% de gluconato de cálcio à 2% (CaGlu)). Os géis foram aplicados uma única vez, durante 3 sessões de 40 minutos/sessão, a cada 7 dias, totalizando 21 dias. Entre as sessões de tratamento, os blocos permaneceram em saliva artificial a qual foi trocada diariamente. Em seguida, foram determinadas a dureza de superfície final (SHF), porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), dureza integrada (IH), rugosidade de superfície (Ra) antes e após procedimento clareador e análise morfológica pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os dados foram submetidos à ANOVA (1 e 2 critérios) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). A associação de PH/NaF/CaGP no gel clareador reduziu a %SH em 57%, 46% e 58% quando comparado ao tratamento com os géis PH, PH/NaF e HP Blue, respectivamente ($p < 0,001$). A dureza integrada (IH) apresentou maior valor quando o gel clareador PH/NaF/CaGP foi aplicado, sendo 14% mais elevada quando comparada aos grupos PH, PH/CaGP e HP Blue, e 11% maior em relação ao grupo PH/NaF ($p < 0,001$). Na análise da rugosidade de superfície inicial, não foi observada diferença estatística ($p > 0,001$) entre os grupos previamente ao procedimento clareador; entretanto, após os tratamentos todos apresentaram alteração na rugosidade de superfície ($p < 0,001$), sendo a menor alteração observada para o grupo PH/NaF/CaGP ($p < 0,001$). Além disso, os blocos tratados com PH/NaF/CaGP apresentaram uma superfície mais lisa e plana e menos erodida, em relação aos demais tratamentos. Conclui-se que a adição de NaF e CaGP ao gel de peróxido de hidrogênio à 35% foi eficaz em reduzir a desmineralização do esmalte dentário e rugosidade, levando à um maior efeito protetivo durante a terapia clareadora.

Palavras-Chave: Clareamento dental, esmalte, dureza, peróxido de hidrogênio, fosfato.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in vitro the calcium glycerophosphate (CaGP) and sodium fluoride (NaF) addition to 35% hydrogen peroxide on enamel mechanical properties. Blocks of bovine enamel (4 mm x 4 mm, n = 60) were selected by initial surface hardness (SHI) and divided into five groups (n = 12) according to the treatments: 1) Gel 35% Hydrogen Peroxide (PH); 2) Gel PH + 0.1% NaF (PH/F); 3) Gel PH + 0.25% CaGP (PH/CaGP); 4) Gel PH + 0.1% NaF + 0.25% CaGP (PH/F/CaGP) and 5) Gel HP Blue 35% (FGM - Dental Products: HP Blue). The gels were applied only once, during 3 sessions of 40 minutes/session, every 7 days, totaling 21 days. The blocks remained in artificial saliva between the treatment sessions, which was changed daily. Then, the final surface hardness (SHF), percentage of surface hardness loss (%SH), integrated hardness (IH), surface roughness (Ru) and morphological analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) were determined. The data were submitted to ANOVA (one-way and two-way) followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). The association of PH/NaF/CaGP in the bleaching gel reduced the %SH by 57%, 46% and 58% when compared to treatment with PH, PH/NaF and HP Blue gels, respectively ($p < 0.001$). The integrated hardness (IH) showed higher value when the PH/NaF/CaGP bleaching gel was applied, being 14% higher when compared to the PH, PH/CaGP and HP Blue groups, and 11% higher compared to the PH/NaF group ($p < 0.001$). In the analysis of initial surface roughness, no statistical difference ($p > 0.001$) was observed between the groups before the bleaching procedure, however, after the treatments, all groups showed changes in surface roughness ($p < 0.001$), with the minor change observed for the PH/NaF/CaGP group ($p < 0.001$). Moreover, the blocks treated with PH/NaF/CaGP showed a smoother and flatter surface, and less eroded, compared to the other treatments. We conclude that the addition of NaF and CaGP to the 35% hydrogen peroxide gel was effective in reducing tooth enamel demineralization and roughness, leading to a greater protective effect during bleaching therapy. Thus, this association of active agents can be used as a promising strategy to reduce mineral alterations that occurred during the bleaching procedure.

Key-words: Tooth bleaching, enamel, hardness, hydrogen peroxide, calcium glycerophosphate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo geral e hipótese nula.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.2 PREPARAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	18
3.3 COMPOSIÇÃO E TRATAMENTO COM OS GÉIS CLAREADORES.....	19
3.4 ANÁLISE DE DUREZA DO ESMALTE.....	22
3.5 ANÁLISE DE RUGOSIDADE DO ESMALTE (Ra).....	22
3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO ESMALTE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	24
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais a valorização da estética está mais presente na sociedade moderna. Apresentar um sorriso alinhado com dentes claros é sinônimo de saúde e beleza (GRAZIOLI et al., 2018), logo os meios de clareamento são cada vez mais procurados e solicitados pelos pacientes em clínicas odontológicas (FIORILLO et al., 2019). Para isto, o profissional deve ter o conhecimento de qual o melhor produto e técnica a serem utilizados no procedimento clareador, assim como esclarecer ao paciente as suas vantagens e desvantagens (BRAUN et al., 2007). O grande desafio do tratamento clareador é oferecer ao paciente uma técnica segura, rápida, confortável e com resultados satisfatórios (JOINER et al., 2006; BRAUN et al., 2007). Os procedimentos de clareamento dental podem ser executados em consultórios odontológicos, ou serem desempenhados em casa pelo próprio paciente (BORGES et al., 2015; KOTHARI et al., 2020). Em casos de uma busca acelerada para o clareamento dos dentes são propostos protocolos de combinação das técnicas de clareamento, a fim de obter resultados melhores em menor tempo (KOTHARI et al., 2020).

Os agentes clareadores são compostos a base de peróxido de hidrogênio (BORGES et al., 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2019), na sua forma ativa ou a base de peróxido de carbamida como fonte de peróxido de hidrogênio, ambas em diferentes concentrações, podendo ser utilizados tanto na técnica de clareamento de consultório quanto na técnica caseira para dentes vitais (ITO; OTSUKI; TAGAMI, 2019). A ação dos agentes clareadores ocorre basicamente por meio de oxidação e, segundo relatos da literatura, essa oxidação quebra macromoléculas que estão pigmentadas por liberação de oxigênio, transformando-se em hidroxilas de menor proporção, e desse modo os pigmentos ficam por vezes menores e mais fáceis de serem eliminados (BORGES et al., 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Embora o clareamento dental seja considerado um tratamento estético conservador e não invasivo, muitos pacientes relatam apresentar sensibilidade dental temporária durante e/ou pós-clareamento e em muitas situações, dependendo do grau de sensibilidade, impedindo alguns pacientes de darem continuidade ao tratamento clareador. Na literatura científica, os estudos são controversos quanto à ação do agente clareador sobre a estrutura dental (TRENTINO et al., 2015; ALMASSRI et al., 2019; PINTO et al., 2019). Alguns estudos relatam que o clareamento pode causar uma perda mineral nos dentes clareados, assim como diminuição na dureza do esmalte (MAGALHÃES et al., 2012; KIMYAI et al., 2017; JUREMA et al., 2018).

Com objetivo de minimizar os efeitos adversos dos agentes clareadores, estudos

mostraram que a adição de fluoreto ao produto leva a redução da perda mineral sem alterar a eficiência do clareamento dental (BORGES et al., 2009; TORRES et al., 2019; VIEIRA et al., 2020). Sabendo-se que o processo de remineralização depende da presença de íons cálcio e fosfato presentes na saliva (TAKESHITA et al., 2016; NAGATA et al., 2017; DANELON et al., 2019), uma estratégia importante para se reduzir a desmineralização do esmalte clareado seria fornecer uma fonte extra desses íons. Alguns estudos têm demonstrado a eficácia de fosfatos orgânicos em fornecer íons adicionais ao meio, interferindo diretamente na desmineralização do esmalte dentário. Akabane et al. (2021) e Júnior et al. (2021) demonstraram que a associação de trimetafosfato de sódio (TMP) e fluoreto de sódio (NaF) reduziu significativamente a desmineralização do esmalte clareado quando comparado ao peróxido de hidrogênio a 35%. Além do TMP, o glicerofosfato de cálcio (CaGP) tem sido amplamente estudado em formulações dentifrícias no controle a cárie dentária (do AMARAL et al., 2013; NAGATA et al., 2017). Estudos anteriores (WINTER et al., 1989; ZAZE et al., 2014a; ZAZE et al., 2014b) mostraram que o uso de derivados de fosfato e cálcio favorece o processo de remineralização dentária, uma vez que, estes íons reduzem a solubilidade do esmalte (NAGATA et al., 2017).

Vários mecanismos foram propostos para explicar/esclarecer as propriedades cariostáticas do CaGP, incluindo a interação direta com esmalte, o tamponamento do pH do biofilme, modificação do metabolismo bacteriano e a elevação dos níveis de Ca e/ou P no biofilme (WHITFORD et al., 2005; LYNCH; TEN CATE, 2006; TENUTA et al., 2009). Ainda, o estudo de do Amaral et al. (2013) avaliou um dentifrício contendo 500 ppm F (NaF) + 0,25% de CaGP sobre a desmineralização do esmalte e variáveis do biofilme, concluindo que o uso dos dentifrícios contendo 500 ppm F + 0,25% de CaGP resultou em concentrações semelhantes de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte e no biofilme dentário, similar ao dentifrício contendo 1100 ppm F. Já o estudo realizado por Zaze et al. (2014b) avaliou a adição de CaGP na concentração de 0,25% em um dentifrício com 500 ppm F (nas formas de NaF e monoflúorofosfato-MFP) sobre o processo de remineralização de lesões iniciais de cárie, concentração de cálcio (Ca) e fluoreto (F). Foi observado que a associação 500 ppm F (NaF) + 0,25% de CaGP, além de apresentar remineralização superior ao dentifrício contendo 1100 ppm F, proporcionou maior concentração de F no esmalte após remineralização.

Diante dos bons resultados obtidos da associação de NaF e CaGP em dentifrícios fluoretados sobre o processo de des/remineralização, é promissor avaliar a associação de CaGP (0,25%) e NaF (500 ppm F; 0,1% NaF) a um gel clareador de uso profissional e verificar seus efeitos sobre as propriedades mecânicas do esmalte durante a terapêutica clareadora.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL e HIPÓTESE NULA

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a adição do glicerofosfato de cálcio (CaGP) e fluoreto de sódio (NaF) ao peróxido de hidrogênio a 35% sobre as propriedades mecânicas do esmalte. A hipótese nula deste estudo foi a de que não existiria diferença na dureza e rugosidade do esmalte exposto à terapia com o glicerofosfato de cálcio e fluoreto de sódio quando comparado ao peróxido de hidrogênio à 35%.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

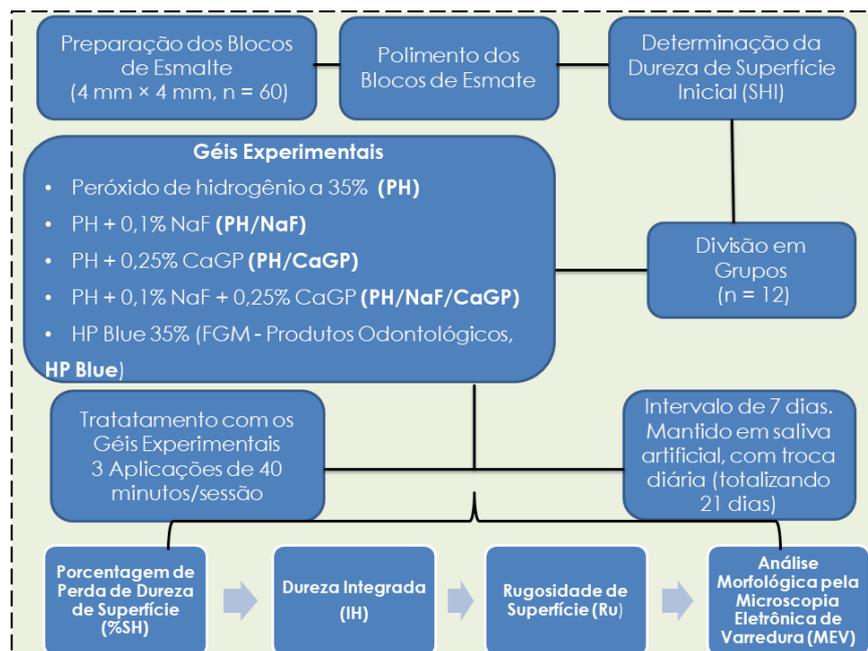
- Determinar qual agente clareador resulta em menor alteração das propriedades mecânicas (durezas superficial, profundidade e rugosidade) do esmalte dentário.
- Compreender o mecanismo de ação da associação do PH/NaF/CaGP sobre as propriedades mecânicas do esmalte dentário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do estudo, blocos de esmalte (4 mm × 4 mm × 2 mm, n = 60) foram obtidos de dentes incisivos bovinos (n=160) e mantidos em solução de timol 0,1% pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental (DELBEM; CURY, 2002). Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida sequencialmente, com lixas de diferentes granulações, o que permitiu a seleção através da determinação da dureza de superfície inicial (SHI: 320-380 KHN) e divisão em cinco grupos (n = 12), de acordo com os tratamentos: 1) Gel Peróxido de hidrogênio a 35% (PH); 2) Gel PH + 0,1% NaF (PH/F); 3) Gel PH + 0,25% CaGP (PH/CaGP); 4) Gel PH + 0,1% NaF + 0,25% CaGP (PH/F/CaGP) e 5) Gel HP Blue 35% (FGM - Produtos Odontológicos: HP Blue). Os géis foram aplicados uma única vez, durante 3 sessões de 40 minutos/sessão, a cada 7 dias, totalizando 21 dias (AKABANE et al., 2021; JÚNIOR et al., 2021). Entre as sessões de tratamento os blocos permaneceram em saliva artificial a qual foi trocada diariamente. Em seguida foram determinadas a dureza de superfície final (SHF) para o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), dureza integrada (IH), rugosidade de superfície (Ra) inicial e final e análise morfológica pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 1).

Figura 1: Etapas do delineamento experimental.



Fonte: Autor

3.2 PREPARAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas de dentes incisivos centrais inferiores. Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura \pm 2 mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada (\pm 3 cm de diâmetro por \pm 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Cera kota[®], EUA), com a superfície dentinária voltada para cima, sendo este conjunto levado à politriz BETA - grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA). Para o desgaste da dentina foi utilizado lixa de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), peso de 2 lbs, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, os blocos foram removidos e fixados com a superfície do esmalte voltada para cima e polidos de acordo com a seguinte sequência: lixas de granulação 600, 800 e 1200, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultrassom (BRANSON 2210), em água deionizada durante 2 minutos. Na sequência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER 40-7618) e suspensão de diamante (METADI Diamond Suspension 1 micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 4 lbs, 1 minuto. A seguir, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada durante 30 segundos e submetidos ao ultrassom (BRANSON 2210), durante 2 minutos, imersos em solução de limpeza (ULTRAMET Sonic Cleaning Solution, BUEHLER) diluída na proporção 20:1 em água destilada. Este protocolo de polimento leva a remoção da camada externa do esmalte ao redor de 120 μ m (VIEIRA et al., 2005). Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com soro fisiológico e armazenados à temperatura de 20 °C (Figura 2). A seguir determinou-se a dureza de superfície inicial (SHI).

Figura 2: Preparação dos blocos de esmalte.



Fonte: Autor.

3.3 COMPOSIÇÃO E TRATAMENTOS COM GÉIS CLAREADORES

A manipulação dos géis clareadores experimentais foi realizada a cada período experimental, uma vez que, os mesmos não apresentavam estabilizantes, e para que não ocorresse nenhuma reação perdida previamente à aplicação. Os compostos sólidos: Carbopol (15% Carbopol 960, Farmácia Apothicario, Araçatuba, Brasil), fluoreto de sódio (NaF: Merck, Darmstadt, Germany) e CaGP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) - tiveram suas quantidades pré-determinadas por estudos pilotos realizados no laboratório de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP. Foram pesados em balança de precisão (Adventurer, Ohaus, Parsippany, NJ, EUA) e colocados em frascos plásticos com tampa de pressão, de acordo com seu grupo. Após a pesagem foi pipetado o composto líquido correspondente (PH 35% - Farmácia Apothicario, Araçatuba, Brasil). Os compostos foram misturados manualmente com auxílio de espátulas e em seguida o pH foi ajustado com solução de NaOH a 4 mol/L (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando tiras indicadoras de pH (Merck, Darmstadt, Alemanha), até atingir um pH final de aproximadamente 7,0, exceto para o HP Blue 35% (FGM - Produtos Odontológicos), o qual segundo as especificações do fabricante, apresentava pH

neutro (Tabela 1).

Os grupos experimentais foram:

- 1) Peróxido de hidrogênio a 35%: PH
- 2) PH + 0,1% NaF: PH/NaF
- 3) PH + 0,25% CaGP: PH/CaGP
- 4) PH + 0,1% NaF + 0,25% CaGP: PH/NaF/CaGP
- 5) HP Blue 35%-FGM - Produtos Odontológicos: HP Blue

Tabela 1: Composição dos géis clareadores experimentais e pH

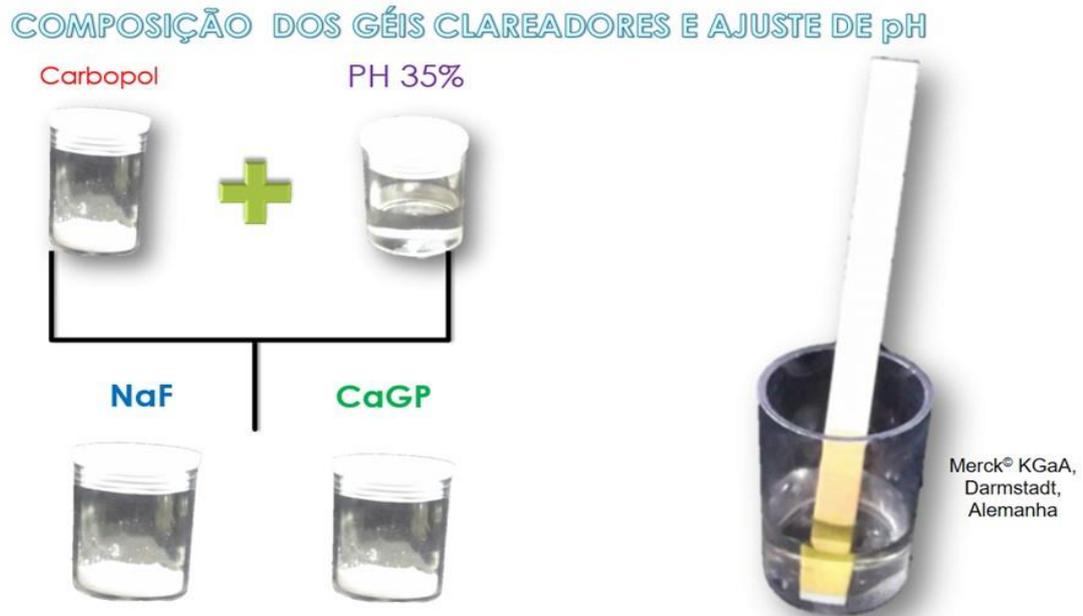
Géis clareadores experimentais	Composição	pH
35% H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio 35%, Carbopol, e NaOH a 4 mol/L (para ajuste do pH)	≅ 7
PH/NaF	Peróxido de hidrogênio 35%, Carbopol, 0,1% NaF e NaOH a 4 mol/L (para ajuste do pH)	≅ 7
PH/CaGP	Peróxido de hidrogênio 35%, Carbopol, 0,25% CaGP e NaOH a 4 mol/L (para ajuste do pH)	≅ 7
PH/NaF/CaGP	Peróxido de hidrogênio a 35%, Carbopol, 0,1% NaF, 0,25% CaGP e NaOH a 4 mol/L (para ajuste do pH)	≅ 7
HP Blue	Peróxido de hidrogênio a 35%, espessante de carboxipolimetileno, pigmento violeta inerte, agente neutralizante, 2% de gluconato de cálcio, glicol e água deionizada (Whiteness HP Blue, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Santa Catarina, Brasil, Lote No.111019)	≅ 7

Abreviação: Peróxido de Hidrogênio, PH. Fluoreto de Sódio, NaF. Glicerofosfato de Cálcio, CaGP.

Após a determinação da SHI, os géis foram aplicados sobre a superfície do esmalte, por 40 minutos. O clareamento foi aplicado a cada 7 dias durante 21 dias totalizando 3 sessões. Para remoção dos géis, após o período de tratamento, foi utilizado gaze e lavagem com água deionizada por 30 segundos a fim de remover qualquer resíduo sobre os blocos. Em seguida foram armazenados em frascos individuais contendo 4 mL de saliva artificial (MORETTO et al., 2010) cada, mantidos em estufa a 37 °C até o dia seguinte, para novamente realizar a troca de saliva. A composição da saliva artificial foi: 1,5 mmol/L Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,9 mmol/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150 mmol/L KCl, 0,1 mol/L Tris buffer, 0,03 ppm F, pH 7,0 (VIEIRA et al., 2005) (Figura 3 e Figura 4).

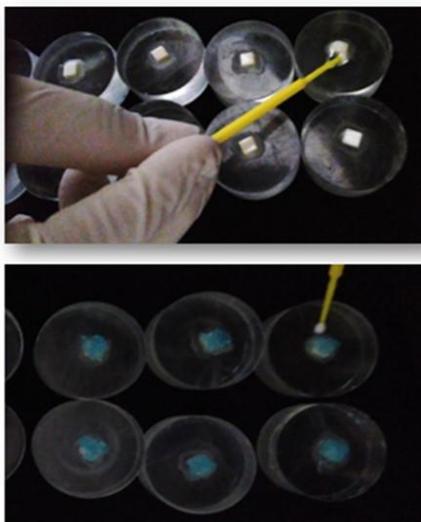
Figura 3: Composição dos géis clareadores e ajuste de pH.



Fonte: Autor.

Figura 4: Tratamento das amostras.

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS



- 3 sessões
- Intervalo de 7 dias
- Totalizando 21 dias



Fonte: Autor.

3.4 ANÁLISE DE DUREZA DO ESMALTE

A dureza de superfície foi determinada com o uso do microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), penetrador do tipo knoop, carga de 25 g por 10 s. Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 µm, foram realizadas na região central de cada bloco (SHI). Após o período experimental, novamente outras cinco impressões foram efetuadas para determinação da dureza de superfície final (SHF) distantes a 100 µm das impressões de SHI. A seguir, determinou-se a porcentagem de perda de dureza de superfície %SH através da seguinte fórmula: [%SH = ((SHF– SHI/SHI)*100]. Para a análise da dureza em secção longitudinal, uma secção foi realizada no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Foi utilizado microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 15 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 µm da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos (BERGER et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2015). A área integrada acima da curva (KHN × µm) foi calculada utilizando os valores de dureza pela regra trapezoidal nas profundidades de 5-180 µm, na parte interior do esmalte, e nomeou a área de dureza integrada (IH) (CONCEIÇÃO et al., 2015) (Figura 5).

3.5 ANÁLISE DE RUGOSIDADE DO ESMALTE (Ra)

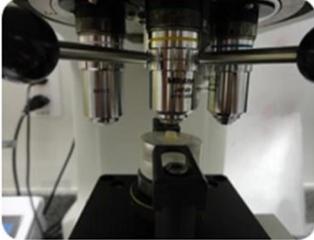
A rugosidade da superfície (Ra) foi mensurada antes e após o procedimento clareador, usando um perfilômetro (modelo SJ-401, Mitutoyo, Kawasaki, Japão) calibrado previamente as leituras. Cada uma de um total de cinco medições foram obtidas após a rotação da amostra em 120°, usando um ponto de corte de 0,25 mm, carga de 5 N e uma velocidade de 0,1 mm/s. A média aritmética (µm) foi calculada das medições realizadas antes e após os procedimentos de clareamento (FERNANDES et al., 2020) (Figura 6).

Figura 5: Análise da dureza de superfície inicial, final e dureza integrada (SHI, SHF e IH).

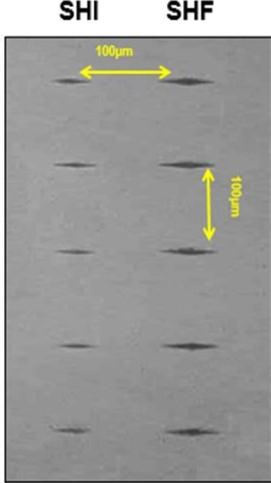
ANÁLISE DA DUREZA DA SUPERFÍCIE INICIAL E FINAL (SHI e SHF)



Microdurômetro Buehler



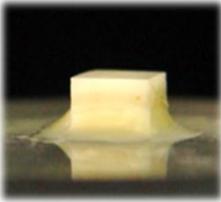
Carga 25 gramas
Tempo 10 segundos



SHI SHF

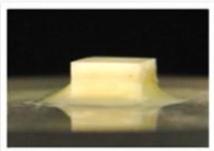
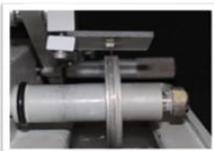
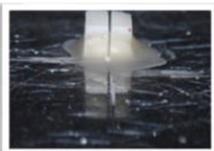
100µm

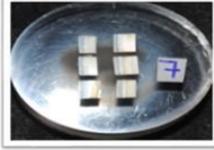
100µm

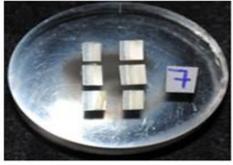


Porcentagem de perda de dureza de superfície
 $%SH = ((SHF - SHI) / SHI) * 100$

DUREZA INTEGRADA (IH)

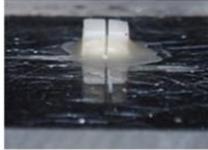





Microdurômetro Buehler

Carga 5g
Tempo 10 seg.

- 5 µm
- 10 µm
- 15 µm
- 20 µm
- 25 µm
- 30 µm
- 40 µm
- 50 µm
- 60 µm
- 80 µm
- 100 µm
- 120 µm
- 140 µm
- 160 µm
- 180 µm



Fonte: Autor.

Figura 6: Análise de rugosidade do esmalte (Ra).

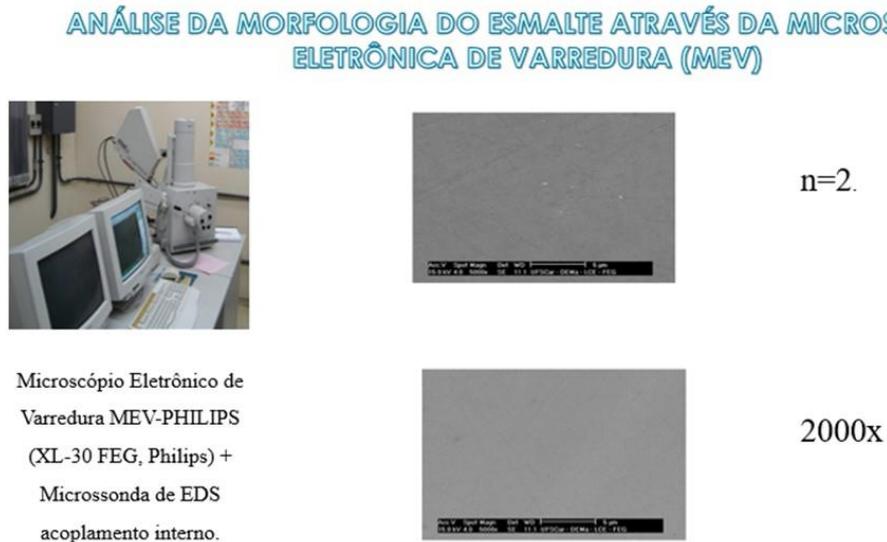


Fonte: Autor.

3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO ESMALTE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Blocos de esmalte ($n = 2$) antes e após procedimento clareador foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com magnificação de 2000x para obtenção de imagens da superfície do esmalte. Todos os blocos foram desidratados gradualmente em uma série de etanol ascendente (50, 60, 70, 80 e 100%) e banhados a ouro (Quorum - Q150T E). O modo de operação de elétrons secundários (SE) foi utilizado para identificar a morfologia dos blocos de esmalte após os tratamentos com os géis clareadores. O instrumento utilizado foi um MEV-PHILIPS (XL-30 FEG, Philips, Amsterdã, Holanda) equipado com EDS (Energy dispersive spectroscopy). Esta análise foi conduzida no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Materiais localizado na UFSCar, São Carlos, SP (LCE-UFSCar/DEMa) (Figura 7).

Figura 7: Análise da morfologia do esmalte através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Autor.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram considerados como variáveis de resposta os valores da %SH, IH e Ra inicial e final; e como fator de variação o tipo de tratamento. As imagens obtidas pelo MEV foram consideradas como dados qualitativos. Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%. As variáveis apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogêneas (teste de Cochran) e foram submetidas a análise de variância (ANOVA-1 critério (%SH e IH) e ANOVA-2 critérios (Ru inicial e final), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

4 RESULTADOS

Todos os géis experimentais e comercial apresentaram um pH final de aproximadamente 7,0. A Média (\pm dp) de SHI considerando todos os blocos foi de 365,2 (5,4) KHN. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de tratamentos após a distribuição ($p = 0,932$).

O gel PH/NaF reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em $\sim 20\%$ quando comparado ao tratamento com PH, sendo semelhante ao gel HP Blue ($p = 0,300$). Quando o CaGP foi adicionado ao gel contendo PH (PH/CaGP), essa redução foi de $\sim 8\%$ ($p < 0,001$). A associação de PH/NaF/CaGP no gel clareador reduziu a %SH em 57%, 46% e 58% quando comparado ao tratamento com os géis PH, PH/NaF e HP Blue respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 2).

A dureza integrada (IH) apresentou maior valor quando o gel clareador PH/NaF/CaGP foi aplicado em esmalte ($p < 0,001$), sendo 14% mais elevada em relação aos grupos PH, PH/CaGP e HP Blue, e 11% em relação ao grupo PH/NaF ($p < 0,001$; Tabela 2). Os tratamentos com PH, PH/NaF, PH/CaGP e HP Blue apresentaram resultados similares de IH ($p > 0,001$) (Tabela 2). Os perfis de dureza em secção transversal dos diferentes géis clareadores estão representados na Figura 2. Os valores de dureza em função da profundidade foram menores para os grupos tratados PH, PH/NaF, PH/CaGP e HP Blue, sendo esse valores mais baixos e evidentes na profundidade de 5-40 μm no esmalte (Figura 2). É possível observar que o gel clareador PH/NaF/CaGP atuou com maior intensidade na redução da desmineralização em profundidade, nas distâncias de 5-40 μm e 40-180 μm .

A rugosidade superficial das amostras de esmalte expressas em Ra (μm) são mostradas na Tabela 2. Na análise da rugosidade de superfície inicial, não foi observada diferença estatística ($p > 0,001$) entre os grupos previamente ao procedimento clareador, entretanto, após os tratamentos todos apresentaram alteração na rugosidade de superfície final em relação a inicial ($p < 0,001$). Após o procedimento clareador, os grupos PH e HP Blue apresentaram similar rugosidade ($p > 0,001$), sendo a menor alteração de rugosidade observada para o grupo PH/NaF/CaGP ($p < 0,001$).

A morfologia da superfície do esmalte pré e pós-tratamento de acordo com os géis experimentais é mostrada por MEV (Figura 3A-3F). Os blocos tratados com PH/NaF/CaGP apresentaram uma superfície mais lisa e plana e menos erodida, em relação aos demais tratamentos. Além disso, mesmo na presença de NaF e CaGP as superfícies também se mostraram rugosas, porém em menor grau do que no grupo PH.

Table 2. Média ($\pm dp$) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os Géis Experimentais.

Géis Experimentais	%SH (KHN)	IH (KHN x μm)	Ra Inicial (μm)	Ra Final (μm)
PH	19,9 ^a (1,6)	18.754,2 ^a (1269,9)	0,023 ^{a,A} (0,01)	0,060 ^{a,B} (0,01)
PH/NaF	16,0 ^b (1,4)	19.231,1 ^a (896,2)	0,018 ^{a,A} (0,03)	0,049 ^{b,B} (0,01)
PH/CaGP	18,4 ^c (0,7)	18.787,8 ^a (1202,0)	0,022 ^{a,A} (0,02)	0,047 ^{b,B} (0,01)
PH/NaF/CaGP	8,6 ^d (1,9)	21.370,0 ^b (604,7)	0,029 ^{a,A} (0,03)	0,038 ^{c,B} (0,01)
HP Blue	20,5 ^a (1,3)	18.789,3 ^a (1357,2)	0,019 ^{a,A} (0,01)	0,061 ^{a,B} (0,01)

Letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças entre grupos entre linhas e letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre colunas. (ANOVA-1 critério (%SH e IH) e ANOVA-2 critérios (Ra inicial e final), teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$). Porcentagem de Perda de Dureza de Superfície (%SH); Dureza Integrada (IH); Rugosidade Inicial (Ra Inicial); Rugosidade Final (Ra Final).

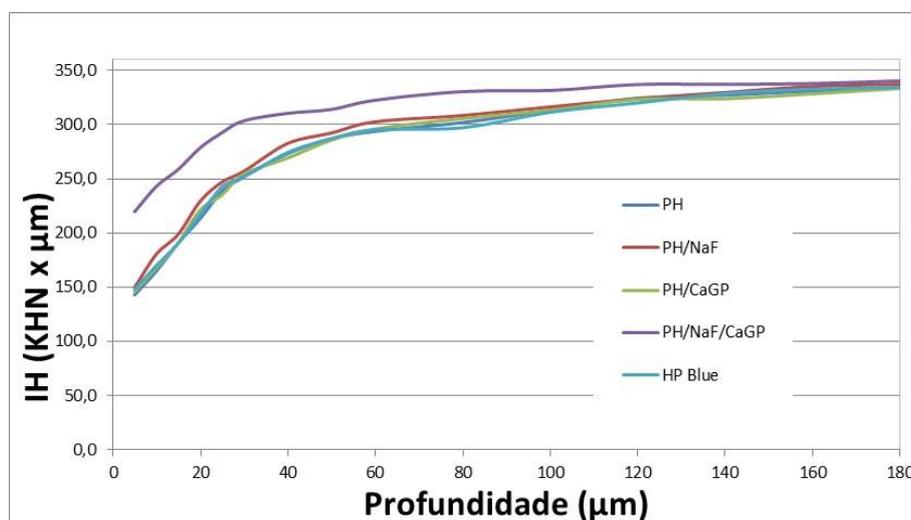


Figura 2: Perfis de dureza transversal em diferentes profundidades no esmalte ($n = 12$) de acordo com os géis clareadores.

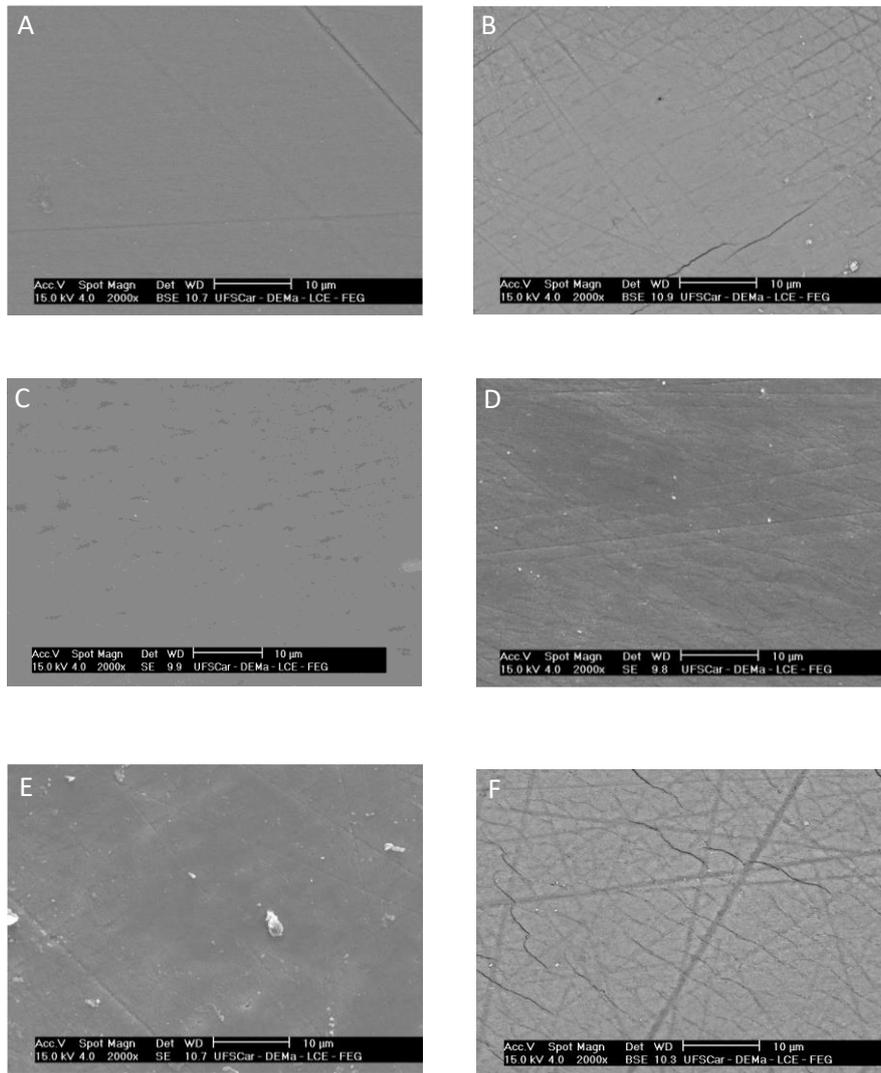


Figura 3: Imagens do esmalte obtidas através do MEV antes (A-Hígido) e após tratamento com: (B) PH; (C) PH/NaF; (D) PH/CaGP; (E) PH/NaF/CaGP; (F) HP Blue ($\times 2000$).

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio podem causar efeitos adversos na composição e estrutura dentária (EACHEMPATI et al., 2018; EPPLE et al., 2019). Dessa forma, a adição de agentes remineralizantes como íons cálcio (Ca^{+2}), fosfato (PO_4^{-3}) e fluoreto (F^- , na forma de NaF) em agentes clareadores, tem sido uma estratégia promissora visando reduzir a desmineralização do esmalte dentário e a sensibilidade, sem alterar o efeito clareador (PIEROTE et al., 2020; JÚNIOR et al., 2021; AKABANE et al., 2021). O presente estudo mostrou que a aplicação de um gel clareador contendo NaF e CaGP reduziu significativamente a desmineralização do esmalte em superfície e em profundidade, levando a um efeito protetivo durante a terapia clareadora, dessa forma a hipótese nula foi rejeitada.

Tem sido discutido que os agentes clareadores podem produzir uma perda significativa na dureza do esmalte independentemente da concentração de peróxido, pH (de MORAES et al., 2015; CRASTECHINI; BORGES; TORRES, 2019) ou tempo de exposição (de ABREU et al., 2011; JUREMA et al., 2018) e esta perda também está relacionada ao efeito oxidativo dos radicais livres (TORRES et al., 2019) e da composição dos géis no que diz respeito à presença ou ausência de íons como o Ca^{+2} e F^- (BORGES et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2012). Estudos prévios demonstraram que géis clareadores altamente concentrados e de pH ácido causam alterações na composição química do esmalte, perda de cálcio, desmineralização e redução da dureza (SA et al., 2013; TORRES et al., 2019). Entretanto, outros estudos evidenciaram que géis com pH neutro, apresentam capacidade de promover alterações morfológicas na superfície do esmalte dentário (ALEXANDRINO et al., 2014; GOUVEIA et al., 2020; JÚNIOR et al., 2021). Estas alterações foram caracterizadas pelo aumento da porosidade superficial, degradação da matriz orgânica e perda de Ca^{+2} e PO_4^{-3} , resultando na redução da dureza superficial (SOUZA et al., 2010; CAKIR et al., 2011; GOUVEIA et al., 2020). Neste estudo, todos os géis experimentais e comercial apresentavam um pH próximo ao neutro, todavia houve uma diminuição significativa da dureza para todos os grupos tanto em superfície (%SH: inferior a 20%, quando comparado ao PH-controle positivo) como em profundidade (IH), no entanto, dentro do limite aceitável pela norma ISO 28399.29. Com base nos resultados existentes na literatura, além do efeito oxidante não específico, a baixa concentração de Ca^{+2} e PO_4^{-3} na formulação do gel clareador torna-o subsaturado em relação à hidroxiapatita, promovendo a desmineralização do esmalte independentemente do pH (MAGALHÃES et al., 2012; AKABANE et al., 2021; JÚNIOR et al., 2021).

Por outro lado, os radicais livres de oxigênio instáveis e não específicos libertados pelos géis de PH atuam não só sobre os grupos cromóforos das moléculas, mas também sobre a estrutura orgânica do esmalte, oxidando as proteínas presentes em sua composição (amelogeninas e enamelinas) (SANTOS et al., 2016). Isto induz alterações estruturais na matriz proteica localizada entre os cristais de esmalte, interferindo com a estrutura cristalina e, conseqüentemente, tornando-a mais susceptível ao impacto mecânico, tais como reduções na dureza e resistência à fratura. Dessa forma, é possível considerar que a perda mineral, observada em nosso estudo, foi causada pela liberação de íons H^+ durante a decomposição do PH (dissociação aniônica) causando a dissolução do esmalte e mudanças estruturais, como observado em outros estudos (EACHEMPATI et al., 2018; EPPLE et al., 2019; KARAARSLAN et al., 2019).

Com o objetivo de simular condições intraorais, particularmente no que diz respeito à composição iônica e pH, a saliva artificial foi utilizada no presente estudo (VIEIRA-JUNIOR et al., 2016; FURLAN et al., 2017). Neste sentido, a saliva aumenta a dureza do esmalte clareado através do fornecimento de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F^- , mas o processo de remineralização pode não ocorrer de maneira completa (CAVALLI et al., 2018). Estudos anteriores relataram que a adição de NaF ao gel clareador torna-o supersaturado em relação ao F^- , permitindo a sua incorporação na estrutura do esmalte na forma de apatita fluoretada (LI et al., 2014). Além disso, a porosidade do esmalte pode aumentar após o clareamento, resultando em um maior número de sítios de retenção e uma melhor difusão de F^- , e conseqüentemente, aumentando a sua deposição (CAVALLI et al., 2010; ATTIN et al., 2006). Ainda, a adição de NaF ao gel clareador pode contribuir para a reparação microestrutural de defeitos no esmalte desmineralizado durante a aplicação do gel, uma vez que, os íons F^- diminuem a dissolução do esmalte e aumentam o crescimento cristalino (CAVALLI et al., 2018). Esses achados corroboram com os encontrados em nosso estudo, quando o esmalte foi tratado com géis contendo PH/NaF e PH-NaF-CaGP (Tabela 1, Figura 2 e 3), mostrando uma redução significativa da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH: ~ 20% e 56%). Em relação ao observado para o grupo contendo apenas PH (Tabela 2 e Figura 1), corroborou com estudos prévios, que constataram que a adição de NaF foi benéfica, promovendo a remineralização e reduzindo a desmineralização da superfície do esmalte submetido ao clareamento (CRASTECHINI; BORGES; TORRES, 2019; TORRES et al., 2019; JÚNIOR et al., 2021). É importante ressaltar que no presente estudo, o efeito do F^- em baixas concentrações e sem a presença do cálcio (0,1% NaF), levou a um maior efeito em superfície, e menor em subsuperfície (IH) (Tabela 2, Figura 2). Uma possível explicação para este achado, remete a

deposição de grandes quantidades de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície devido à disponibilidade de cálcio do esmalte desmineralizado resultante da ação do agente clareador (BURGMAIER; SCHULZE; ATTIN., 2002). Seguindo esta lógica, quando o esmalte foi imerso em saliva artificial, tais depósitos de CaF_2 aumentaram a precipitação de íon cálcio e fosfato, principalmente nas camadas superficiais do esmalte (Figura 2).

Sabe-se que os minerais que compõem o esmalte e dentina são à base de cálcio e fosfato. Quando em contato com géis subsaturados em relação a estes íons, pode ocorrer a dissolução da hidroxiapatita. No entanto, quando em contato com géis supersaturados, pode ocorrer precipitação mineral ou remineralização (SHELLIS et al., 2014). Assim, a suplementação com Ca^{+2} e PO_4^{-3} nos produtos clareadores visa criar um gel supersaturado em relação a estes íons, evitando e/ou reduzindo a dissolução da hidroxiapatita. No presente estudo, foi utilizado duas fontes de cálcio, a saber: gluconato de cálcio (CaGlu: fonte de Ca^{+2}) e glicerofosfato de cálcio (CaGP) (fonte de Ca^{+2} , representado pela classe dos fosfatos cíclicos) com o intuito de potencializar o efeito na redução da desmineralização do esmalte dentário. O CaGlu é utilizado para suplementar géis clareadores como resultado da sua elevada solubilidade em termos das condições requeridas para a formulação do gel (BORGES et al., 2016). No entanto, foi observado na literatura uma escassez de informações sobre a concentração ideal de Ca^{+2} durante os procedimentos clareadores. O estudo conduzido por Torres et al. (2019), mostrou que a adição de 0,5% de CaGlu ao gel de PH a 35% não foi capaz de evitar a desmineralização do esmalte, semelhante ao encontrado em nosso estudo, onde o gel contendo 2% de CaGlu não inibiu a desmineralização do esmalte dentário, nem mesmo reduziu a desmineralização em relação ao PH. Outro estudo semelhante desenvolvido por De Moraes et al. (2015), ressaltou que a manutenção da concentração de íons Ca provavelmente é devido ao efeito protetor da saliva, que pode intervir na perda mineral, tanto através da sua capacidade tamponante como pela adição de íons cálcio e fosfato. Foi observado que a saliva manteve um equilíbrio entre a desmineralização e remineralização do esmalte, mas não inibindo por completo a desmineralização do esmalte dentário (do AMARAL et al., 2012; de ARRUDA et al., 2012). Destaca-se ainda que muitos estudos evidenciaram que agentes clareadores contendo 2% de CaGlu não exerceram um efeito positivo sobre o esmalte (BASTING et al., 2003; da COSTA SOARES et al., 2013; AKABANE et al., 2021; JÚNIOR et al., 2021), principalmente para produtos contendo PH em baixas concentrações (FURLAN et al., 2017). Os resultados do presente estudo confirmam achados anteriores que saturar o meio com uma fonte de cálcio nem sempre garante um efeito positivo e adicional. De acordo com estudos anteriores (BASTING et al., 2015; CAVALLI et al., 2018), o CaGlu é incompatível com agentes oxidantes fortes e

não pode ser liberado durante a decomposição do clareamento, explicando os nossos achados.

Os ciclofosfatos (como TMP e CaGP) são agentes que em associação com o NaF, apresentam grande potencial em reduzir a desmineralização do esmalte dentário, como já demonstrado em estudos anteriores (AMARAL et al., 2018; AKABANE et al., 2021; JÚNIOR et al., 2021). O TMP quando combinado com NaF em formulações clareadoras (AKABANE et al., 2021; JÚNIOR et al., 2021), mostrou um efeito benéfico em relação às formulações que continham apenas NaF na composição e/ou PH, PH/Ca. Um estudo recente conduzido por Júnior et al. (2021), avaliou os efeitos do gluconato de cálcio à 2% (CaGlu), fluoreto de sódio à 0,05% (NaF), trimetafosfato de sódio à 0,25% (TMP), e NaF/TMP adicionado a um gel clareador a base de peróxido de hidrogênio (PH) a 35% na redução da desmineralização do esmalte *in vitro*. O tratamento com o gel contendo PH + NaF + TMP reduziu significativamente a %SH, além de contribuir para uma menor perda mineral em subsuperfície (IH), semelhante aos achados de nosso estudo, o que também corrobora com os achados de Akabane et al. (2021).

Semelhante ao TMP, o CaGP é um fosfato orgânico rico em Ca^{+2} e PO_4^{-3} . A ligação entre os grupos Ca^{+2} e PO_4^{-3} da estrutura CaGP é considerada como a parte mais instável da molécula (INOUE et al., 1992), sugerindo que esta instabilidade favorece a liberação de Ca^{+2} , deixando os grupos de fosfato aniônico livres. Além disso, a ligação entre glicerol e PO_4^{-2} é a parte mais estável da molécula (INOUE et al., 1992). Assim, o CaGP não doa íons fosfato ao meio (SIDI & WILSON, 1991). Dessa forma, especula-se que o aumento do teor de PO_4^{-3} no esmalte pode estar relacionado com a maior disponibilidade de Ca^{+2} no meio, capacidade de adsorção de CaGP do esmalte e interação do esmalte com F^- quando aplicado a uma razão molar apropriada, uma vez que, após a liberação de Ca^{+2} , a superfície apresenta mais sítios doadores de elétrons, o que pode favorecer a nucleação de Ca^{+2} e PO_4^{-3} para o esmalte, resultando em um ambiente supersaturado com estes íons. Outrossim, na presença de NaF também ocorre a formação de CaF_2 que além de precipitar na superfície do esmalte, contribuiu para reduzir a difusão dos produtos derivados da degradação do PH, reduzindo com maior intensidade a desmineralização do esmalte, e conseqüentemente, a agressão à polpa (AKABANE et al., 2021). Entretanto, dois aspectos importantes devem ser levados em consideração em relação à adição de CaGP/NaF a agentes clareadores: a) apesar de semelhantes efeitos de clareamento que foram visualmente observados para todos os géis, a análise de cor estabelecida pela Comissão Internacional de l'Eclairage (CIE) (ALEXANDRINO et al., 2014; CINTRA et al., 2016) deve ser realizada a fim de determinar os efeitos reais das composições clareadoras, e alteração sobre o efeito clareador; b) o efeito do CaGP/NaF sobre a difusão do PH, e derivados de sua degradação através dos tecidos duros devem ser verificados, mediante a ensaios

citotóxicos e/ou penetração trans-amelodentinária.

Até o presente momento, na literatura só é possível observar estudos com formulações dentifrícias (TENUTA et al., 2009; do AMARAL et al., 2013; ZAZE et al., 2014a; ZAZE et al., 2014b; NAGATA et al., 2017) que associaram o CaGP ao NaF avaliando seu efeito no controle à cárie dentária, evidenciando sua eficácia e efetividade no controle da doença (ZAZE et al., 2014b; NAGATA et al., 2017). Nenhum estudo avaliou a associação do CaGP com o NaF em géis clareadores, sendo este trabalho de grande relevância, uma vez que, diante dos efeitos adversos que o clareamento dental pode provocar na estrutura dentária, e bons resultados obtidos com o uso de CaGP e NaF, torna-se uma estratégia promissora investigar seu efeito quando em associação ao PH à 35%. Vale destacar que as concentrações de NaF e CaGP foram baseadas em estudos prévios (do AMARAL et al., 2013; ZAZE et al., 2014a e ZAZE et al., 2014b; NAGATA et al., 2017), onde os autores constataram que quando ambos os agentes ativos estão associados em proporção molar ideal (CaGP:NaF), apresentavam um efeito sinérgico, levando a melhora na redução da desmineralização. De acordo com Grenby e Bull (1980), CaGP e NaF não partilham do mesmo mecanismo de ação, mas os seus efeitos podem ser cumulativos. Este achado foi encontrado em nosso estudo, uma vez que a associação de NaF/CaGP ao PH, levou à menor desmineralização em relação aos tratamentos com PH/CaGP, PH/NaF e HP Blue (Tabela 2, Figura 2).

Embora a rugosidade do esmalte possa estar associada à perda mineral, alteração topográfica, ou modificação da reflexão de luz (VIEIRA-JUNIOR et al., 2018), os valores de rugosidade foram considerados relativamente baixos quando comparados previamente ao clareamento (Tabela 2). Esta variação de rugosidade é possivelmente irrelevante do ponto de vista clínico, embora, seja necessário estudar os efeitos do clareamento clínico na estrutura dentária. Sabe-se que a alteração da rugosidade pode ser restaurada pela saliva humana ou durante um tempo mais longo de armazenamento na saliva artificial (representado pelo presente estudo). Foi possível observar que a presença de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} reduziu a desmineralização do esmalte durante a terapia clareadora (ZECZKOWSKI et al., 2015). Além da saliva, a presença do CaGP e NaF, propiciou maior formação dos íons acima mencionados e a formação de CaF_2 , participando ativamente na redução da desmineralização. As imagens obtidas por MEV revelaram alterações morfológicas na superfície do esmalte após o procedimento clareador para todos os tratamentos (Figura 3 A-E). Estes achados vão ao encontro com o estudo de Dionysopoulos et al. (2017), o qual revelou vários graus de alterações superficiais em termos de rugosidade, porosidade e depressões, semelhante aos achados do presente estudo (Tabela 2, Figura 3). Para o tratamento com PH/NaF/CaGP foi possível observar precipitados na superfície

do esmalte, sugerindo formação de fosfato de cálcio (FAVRETTO et al., 2018; NEVES et al., 2018). Em contrapartida dos resultados obtidos no presente trabalho, alguns autores não reportaram alterações morfológicas após o clareamento dentário in-office (DANIEL et al., 2011; ACUÑA et al., 2019; FERNANDES et al., 2020). Esta discrepância pode ser atribuída à diferentes técnicas de clareamento, composição de agentes clareadores ou substrato dental (POLYDOROU et al., 2018). É importante mencionar que a redução da dureza, rugosidade e as alterações na morfologia do esmalte que foram observadas em nosso estudo são superficiais e referem-se a um nível microscópico.

Embora a desmineralização a partir do clareamento não seja clinicamente detectada, é essencial para diminuir a perda mineral do substrato dentário, o que pode causar um aumento na permeabilidade e aumentar a sensibilidade dentária, normalmente relatados pelos pacientes durante e após o tratamento (MOUNIKA et al., 2018; MARTINI et al., 2020). Mais investigações sobre esta nova formulação de gel clareador contendo NaF/CaGP devem ser realizadas para diminuir efetivamente o efeito secundário do tratamento clareador e aumentar a segurança do procedimento. Além disso, estudos incluindo: (i) avaliação de cor para determinar os efeitos reais da mudança de composição dos géis sobre o clareamento e (ii) testes citotóxicos e/ou penetração trans-amelodentinária, avaliando o efeito do NaF/CaGP sobre a penetração de produtos de degradação do PH devem ser levados em consideração.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de NaF e CaGP ao gel de peróxido de hidrogênio à 35% foi eficaz em reduzir a desmineralização do esmalte dentário e rugosidade, levando à um maior efeito protetivo durante a terapia clareadora. Dessa forma, essa associação de agentes ativos pode ser utilizada como uma estratégia promissora na redução de alterações minerais ocorridas durante o procedimento clareador.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, E. D.; PARREIRAS, S. O.; FAVORETO, M. W.; CRUZ, G. P.; GOMES, A.; BORGES, C. P. F.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. In-office bleaching with a commercial 40% hydrogen peroxide gel modified to have different pHs: Color change, surface morphology, and penetration of hydrogen peroxide into the pulp chamber. **J. Esthet. Restor. Dent.**, p.1-6, 2019.
- AKABANE, S. T. F.; DANELON, M.; NUNES, G. P.; GRUBA, A. S.; SOUZA-COSTA, C. A.; DUQUE, C. C. O.; GALLINARI, M. O.; BRISO, A. L. F.; DELBEM, A. C. B. Evaluation of the aesthetic effect, enamel microhardness and trans-amelodentinal cytotoxicity of a new bleaching agent for professional use containing trimetaphosphate and fluoride. **J. Mech. Behav. Biomed.**, v.114, p.1-9, 2021.
- ALEXANDRINO, L.; GOMES, Y.; ALVES, E.; COSTI, H.; ROGEZ, H.; SILVA, C. Effects of a bleaching agent with calcium on bovine enamel. **Eur. J. Dent.**, v.8, n.3, p.320-325, 2014.
- ALMASSRI, H. N. S.; ZHANG, Q.; YANG, X.; WU, X. The effect of oral anti-inflammatory drugs on reducing tooth sensitivity due to in-office dental bleaching: A systematic review and meta-analysis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.150, n.10, p.145-157, 2019.
- AMARAL, J. G.; PESSAN, J. P.; SOUZA, J. A. S.; MORAES, J. C. S.; DELBEM, A. C. B. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. **Biomater. J. Biomed Mater. Res. B Appl**, v.106, p.2553-2564, 2018.
- ATTIN, T.; ALBRECHT, K.; BECKER, K.; HANNIG, C.; WIEGAND, A. Influence of carbamide peroxide on enamel fluoride uptake. **J. Dent.**, v.34, n.9, p.668-675, 2006.
- BASTING, R. T.; RODRIGUES, A. L.; SERRA, M. C. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.134, n.10, p.1335-1342, 2003.
- BASTING, R. T.; ANTUNES, E. V. G.; TURSSI, C. P.; do AMARAL, F. L. B.; FRANCA, F. M. G.; FLORIO, F. M. In vitro evaluation of calcium and phosphorus concentrations in enamel submitted to an in-office bleaching gel treatment containing calcium. **Gen. Dent.**, v.63, n.5, p.52-56, 2015.

BERGER, S. B.; CAVALLI, V.; AMBROSANO, G. M. B.; GIANNINI, M. Changes in surface morphology and mineralization level of human enamel following in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide and light irradiation. **Gen. Dent.**, v.58, n.2, p.74-79, 2010.

BORGES, A. B.; SAMEZIMA, L. Y.; FONSECA, L. P.; YUI, K. C. K.; BORGES, A. L. S.; TORRES, C. R. G. Influence of potentially remineralizing agents on bleached enamel microhardness. **Oper. Dent.**, v.34, n.5, p.593-597, 2009.

BORGES, A. B.; ZANATTA, R. F.; BARROS, A. C. S. M.; SILVA, L. C.; PUCCI, C. R.; TORRES, C. R. G. Effect of hydrogen peroxide concentration on enamel color and microhardness. **Oper. Dent.**, v.40, n.1, p.96-101, 2015.

BORGES, A. B.; SANTOS, L. F. T. F.; AUGUSTO, M. G.; BONFIETTE, D.; HARA, A. T.; TORRES, C. R. G. Toothbrushing abrasion susceptibility of enamel and dentin bleached with calcium-supplemented hydrogen peroxide gel. **J. Dent.**, v.49, p.54-59, 2016.

BRAUN, A.; JEPSEN, S.; KRAUSE, F. Spectrophotometric and visual evaluation of vital tooth bleaching employing different carbamide peroxide concentrations. **Dent. Mater. J.**, v.23, n.2, p.165-169, 2007.

BURGMAYER, G. M.; SCHULZE, I. M.; ATTIN, T. Fluoride uptake and development of artificial erosions in bleached and fluoridated enamel in vitro. **J. Oral Rehabil.**, v.29, n.9, p.799-804, 2002.

CAVALLI, V.; RODRIGUES, L. K. A.; PAES-LEME, A. F.; BRACALION, M. L.; ARRUDA, M. A. Z.; BERGER, S. B. GIANNINI, M. Effects of bleaching agents containing fluoride and calcium on human enamel. **Quintessence Int.**, v.41, n.8, p.e157-e165, 2010.

CAVALLI, V.; ROSA, D. A.; SILVA, D. P.; KURY, M.; LIPORONI, P. C. S.; SOARES, L. E. S.; MARTINS, A. A. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. **J. Appl. Oral Sci.**, v.26, n.4, p.1-11, 2018.

CAKIR, F. Y.; KORKMAZ, Y.; FIRAT, E.; OZTAS, S. S.; GURGAN, S. Chemical analysis of enamel and dentin following the application of three different at-home bleaching systems. **Oper. Dent.**, v.36, n.5, p.529-536, 2011.

CINTRA, L. T. A.; BENETTI, F.; FERREIRA, L.L.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; GALLINARI, M. O.; RAHAL, V.; BRISO, A. L. F. et al. Penetration capacity, color alteration and biological response of two in-office bleaching protocols. **Braz. Dent. J.**, v.27, n.2, p.169-175, 2016.

CONCEIÇÃO, J. M.; DELBEM, A. C. B.; DANELON, M.; CAMARA, D. M.; WIEGAND, A.; PESSAN, J. P. Fluoride gel supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel erosive wear in situ. **J. Dent.**, v.43, n.10, p.1255-1260, 2015.

CRASTECHINI, E.; BORGES, A. B.; TORRES, C. Effect of Remineralizing Gels on Microhardness, Color and Wear Susceptibility of Bleached Enamel. **Oper. Dent.**, v.44, n.1, p.76-87, 2019.

da COSTA SOARES, M. U. S.; ARAÚJO, N. C.; BORGES, B. C. D.; SALES, W. S.; SOBRAL, A. P. V. Impacto fremineralizingagentson enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. **Acta Odontol. Scand.**, v.71, n.2, p.343-348, 2013.

DANELON, M.; GARCIA, L. G.; PESSAN, J. P.; PASSARINHO, A.; CAMARGO, E. R.; DELBEM, A. C. B. Effect of Fluoride Toothpaste Containing Nano-Sized Sodium Hexametaphosphate on Enamel Remineralization: An in situ Study. **Caries Res.**, v.53, n.3, p.260-267, 2019.

DANIEL, C. P.; SOARES, D. G. S.; ANDREETA, M. R. B.; HERNANDES, A. C.; HEBLING, J.; COSTA, C. A. S. Effects of Different Tooth Bleaching Systems on the Roughness and Superficial Morphology of Enamel and a Restorative Composite Resin. **Rev. Odontol. Bras. Central**, v.20, n.52, 2011.

de ABREU, D. R.; SASAKI, R. T.; AMARAL, F. L. B.; FLÓRIO, F. M.; BASTING, R. T. Effect of home-use and in-office bleaching agents containing hydrogen peroxide associated with amorphous calcium phosphate on enamel microhardness and surface roughness. **J. Esthet Restor. Dent.**, v.23, n.3, p.158-168, 2011.

de ARRUDA, A. M.; dos SANTOS, P. H.; SUNDFELD, R. H.; BERGER, S. B.; BRISO, A. L.F. Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the de-remineralization process: an in situ study. **Oper. Dent.**, v.37, n.5, p.518-525, 2012.

de MORAES, I. Q. S.; SILVA, L. N. B.; PORTO, I. C. C. M.; NETO, C. F. L.; dos SANTOS, N. B.; FRAGOSO, L. S. M. et al. Effect of in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide with and without addition of calcium on the enamel surface. **Microsc. Res. and Tech.**, v.78, n.11, p.975-981, 2015.

DELBEM, A. C. B.; CURY, J. A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. **Am. J. Dent.**, v.15, n.3, p.169-172, 2002.

DIONYSOPOULOS, D.; STRAKAS, D.; KOLINIOTOU-KOUMPIA, E.; KOUMPIA, E. Effect of Er,Cr:YSGG laser irradiation on bovine enamel surface during in-office tooth bleaching ex vivo. **Odontology**, v.105, n.3, p.320-328, 2017.

do AMARAL, F. L. B.; SASAKI, R. T.; da SILVA, T. C. R.; FRANÇA, F. M. G.; FLÓRIO, F. M.; BASTING, R. T. The effects of home-use and in-office bleaching treatments on calcium and phosphorus concentrations in tooth enamel: an in vivo study. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.143, n.6, p.580-586, 2012.

do AMARAL, J. G.; SASSAKI, K. T.; MARTINHON, C. C. R.; DELBEM, A. C. B. et al. Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization in situ. **Am. J. Dent.**, v.26, n.2, p.75-80, 2013.

EACHEMPATI, P.; NAGRAJ, S. K.; KRISHANAPPA, S. K. K.; GUPTA, P.; YAYLALI, I. E. Home-based chemically-induced whitening (bleaching) of teeth in adults. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.12, n.12, 2018.

EPPLE, M.; MEYER, F.; ENAX, J. A critical review of modern concepts for teeth whitening. **Dent. J.**, v.7, n.3, p.79-91, 2019.

FAVRETTO, C. O.; DELBEM, A. C. B.; MORAES, J. C. S.; CAMARGO, E. R.; de TOLEDO, P. T. A.; PEDRINI, D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. **Clin. Oral Investig.**, v.22, n.9, p.3021-3029, 2018.

FERNANDES, R. A.; STRAZZI-SAHYON, H. B.; SUZUKI, T. Y. U.; BRISO, A. L. F.; dos SANTOS, P. H. Effect of dental bleaching on the microhardness and surface roughness of sealed composite resins. **Restor. Dent. Endod.**, v.45, n.1, 2020.

FIORILLO, L.; LAINO, L.; de STEFANO, R.; D'AMICO, C.; BOCCHIERI, S.; AMOROSO, G.; ISOLA, G.; CERVINO, G. Dental Whitening Gels: Strengths and Weaknesses of an Increasingly Used Method. **Gels**, v.5, n.35, p.3-12, 2019.

FURLAN, I.S.; BRIDI, E. C.; do AMARAL, F. L. B.; FRANÇA, F. M. G.; TURSSI, C. P.; BASTING, R. T. Effect of high- or low-concentration bleaching agents containing calcium and/or fluoride on enamel microhardness. **Gen. Dent.**, v.65, n.3, p.66-70, 2017.

GOUVEIA, T. H. N.; de SOUZA, D. F. S.; AGUIAR, F. H. B.; AMBROSANO, G. M. B.; LIMA, D. A. N. L. Effect of ammonium acryloyldimethyltaurate copolymer on the physical and chemical properties of bleached dental enamel. **Clin. Oral Investig.**, v.24, n.8, p.2701-2711, 2020.

GRAZIOLI, G.; VALENTE, L. L.; ISOLAN, C. P.; PINHEIRO, H. A.; DUARTE, C. G.; MÜNCHOW, E. A. Bleaching and enamel surface interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels. **Arch. Oral Biol.**, v.87, p.157-162, 2018.

GRENBY, T. H.; BULL, J. M. Chemical studies of the protective action of phosphate compounds against the demineralization of human dental enamel in vitro. **Caries Res.**, v.14, n.4, p.210-220, 1980.

INOUE, M.; IN, Y.; ISHIDA, T. Calcium binding to phospholipid: structural study of calcium glycerophosphate. **J. Lipid Res.**, v.33, n.7, p.985-994, 1992.

ITO, Y.; OTSUKI, M.; TAGAMI, J. Effect of pH conditioners on tooth bleaching. **Clin. Exp. Dent. Res.**, v.5, n.3, p.212-218, 2019.

JÚNIOR, R. A. T. P.; DANELON, M.; PESSAN, J. P.; EMERENCIANO, N. G.; CUNHA, R. F.; SHINOHARA, M. S.; DELBEM, A. C. B. Effect of daily use of fluoridated dentifrice and bleaching gels containing calcium, fluoride, or trimetaphosphate on enamel hardness: an in vitro study. **Clin. Oral Investig.**, v.25, n.3, p.883-889, 2021.

JUREMA, A. L. B.; de SOUZA, M. Y.; TORRES, C. R. G.; BORGES, A. B.; CANEPPELE, T. M. F. Effect of pH on whitening efficacy of 35% hydrogen peroxide and enamel microhardness. **J. Esthet. Dent.**, v.30, n.2, p.E39-E44, 2018.

JOINER, A. The bleaching of teeth: a review of the literature. **J. Dent.**, v.34, n.7, p.412-419, 2006.

KARAARSLAN, E. S.; ÖZMEN, Z. C.; AYTAC, F.; BICAKCI, A. A.; BULDUR, M.; AYDOGAN, L.; HOLOGLU, F.; ÖZKOCAK, B. Evaluation of biochemical changes in dental tissues after different office bleaching methods. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 38, n.4, p.389-397, 2019.

KIMYAI, S.; BAHARI, M.; NASER-ALAVI, F.; BEHBOODI, S. Effect of two different tooth-bleaching techniques on microhardness of giomer. **J. Clin. Exp. Dent.**, v.9, n.2, p.e249-e253, 2017.

KOTHARI, S.; JUM'AH, A. A.; GRAY, A. R.; LYONS, K. M.; YAP, M.; BRUNTON, P. A. A randomized clinical trial investigating three vital tooth bleaching protocols and associated efficacy, effectiveness and participants' satisfaction. **J. Dent.**, v.95, p.103322, 2020.

LI, X.; WANG, J.; JOINER, A.; CHANG, J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. **J. Dent.**, v.42, n.1, p.S12-S20, 2014.

LYNCH, R. J.; TEN CATE, J. M. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. **Caries Res.**, v.40, n.2, p.142-147, 2006.

MAGALHÃES, J. G.; MARIMOTO, A. R. K.; TORRES, C. R. G.; PAGANI, C.; TEIXEIRA, S. C.; BARCELLOS, D. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. **Acta Odontol. Scand.**, v.70, n.2, p.122-126, 2012.

MARTINI, E. C.; PARREIRAS, S. O.; SZESZ, A. L.; COPPLA, F. M.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. Bleaching-induced tooth sensitivity with application of a desensitizing gel before and after in-office bleaching: a triple-blind randomized clinical trial. **Clin. Oral Investig.**, v.24, n.1, p.385-394, 2020.

MORETTO, M. J.; MAGALHÃES, A. C.; SASSAKI, K. T.; DELBEM, A. C. B.; MARTINHON, C. C. R. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. **Caries Res.**, v.44, n.2, p.135-140, 2010.

MOUNIKA, A.; MANDAVA, J.; ROOPESH, B.; KARRI, G. Clinical evaluation of color change and tooth sensitivity with in-office and home bleaching treatments. **Indian J. Dent. Res.**, v.29, n.4, p.423-427, 2018.

NAGATA, M. E.; DELBEM, A. C. B.; HALL, K. B.; BUZALAF, M. A. R.; PESSAN, J. P. Fluoride and calcium concentrations in the biofilm fluid after use of fluoridated dentifrices supplemented with polyphosphate salts. **Clin. Oral Investig.**, v.21,n.3, p.831-837, 2017.

NEVES, J. G.; DANELON, M.; PESSAN, J. P.; FIGUEIREDO, L. R.; CAMARGO, E. R.; DELBEM, A. C. B. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. **Arch. Oral Biol.**, v.90, p.108-112, 2018.

POLYDOROU, O.; SCHEITZA, S.; SPRAUL, M.; VACH, K.; HELLWING, E. The effect of long-term use of tooth bleaching products on the human enamel surface. **Odontology**, v.106, n.1, p.64-72, 2018.

PIEROTE, J. J. A.; PRIETO, L. T.; DIAS, C. T. S.; CÂMARA, J. V. F.; LIMA, D. A. N. L.; AGUIAR, F. H. B.; PAULILLO, L. A. M. S. Effects of desensitizing products on the reduction of pain sensitivity caused by in-office tooth bleaching: a 24-week follow-up. **J. Appl. Oral Sci.**, v.28, 2020.

PINTO, A. V. D.; CARLOS, N. R.; BOTELHO, F. L. A.; FRANCA, F. M. G.; TURSSI, C. P.; BASTING, R. T. At-home, In-Office and Combined Dental Bleaching Techniques Using Hydrogen Peroxide: Randomized Clinical Trial Evaluation of Effectiveness, Clinical Parameters and Enamel Mineral Content. **Am. J. Dent.**, v.32, n.3, p.124-132, 2019.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.; VALIENTE, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. Tooth whitening: From the established treatments to novel approaches to prevent side effects. **J. Esthet. Dent.**, v.31, n.5, p.431-440, 2019.

SA, Y.; SUN, L.; WANG, Z.; MA, X.; LIANG, S.; JIANG, T.; WANG, Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human enamel: An in situ and in vitro study. **Oper. Dent.**, v.38, n.1, p.100-110, 2013.

SANTOS, L. F. T. F.; TORRES, C. R. G.; CANEPPELE, T. M. F.; MAGALHÃES, A. C.; BORGES, A. B. Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nanohydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility. **Acta Odontol. Scand.**, v.74, n.2, p.121-126, 2016.

SIDI, A. D.; WILSON, R. F. Fluoride, calcium and inorganic phosphorus concentrations in approximal plaque collected from young adults 1 and 24 h after toothbrushing with fluoride

toothpastes. **Caries Res.**, v.25, n.5, p.330-334, 1991.

SOUZA, R. O. A.; LOMBARDO, G. H. L.; PEREIRA, S. M. B.; ZAMBONI, S. C.; VALERA, M. C.; ARAUJO, M. A. M.; OZCAN, M. Analysis of tooth enamel after excessive bleaching: A study using scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray spectroscopy. **Int. J. Prosthodont.**, v.23, n.1, p.29-32, 2010.

SHELLIS, R. P.; FEATHERSTONE, J. D.; LUSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr. Oral Sci.**, v.25, p.163-179, 2014.

TAKESHITA, E. M.; EXTERKATE, R. A. M.; DELBEM, A. C. B.; TEN CATE, J. M. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. **Caries Res.**, v.45, n.5, p.494-497, 2011.

TAKESHITA, E. M.; DANELON, M.; CASTRO, L.P.; CUNHA, R. F.; DELBEM, A. C. B. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. **Caries Res.**, v.50, n.6, p.571-578, 2016.

TENUTA, L. M. A.; CENCI, M. S.; CURY, A. A. D. B.; PEREIRA-CENCI, T.; TABCHOURY, C. P. M.; MOI, G. P.; CURY, J. A. et al. Effect of a calcium glycerophosphate fluoride dentifrice formulation on enamel demineralization in situ. **Am. J. Dent.**, v.22, n.5, p.278-282, 2009.

TORRES, C. R. G.; ZANATTA, R. F.; SILVA, T. J.; BORGES, A. B. Effect of Calcium and Fluoride Addition to Hydrogen Peroxide Bleaching Gel On Tooth Diffusion, Color, and Microhardness. **Oper. Dent.**, v.44, n.4, p.424-432, 2019.

TRENTINO, A. C.; SOARES, A. F.; DUARTE, M. A. H.; ISHIKIRIAMA, S. K.; MONDELLI, R. F. L. Evaluation of pH Levels and Surface Roughness After Bleaching and Abrasion Tests of Eight Commercial Products. **Photomed. Laser Surg.**, v.33, n.7, p.372-377, 2015.

VIEIRA, A. E. M.; DELBEM, A. C. B.; SASSAKI, K.T.; CURY, J. A.; CUNHA, R. F. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, v.39, n.6, p.514-520, 2005.

VIEIRA, I.; VIEIRA-JUNIOR, W. F.; PAULI, M. C.; THEOBALDO, J.D.; AGUIAR, F. H. B.; LIMA, D. A. N. L.; LEONARDI, G. R. Effect of in-office bleaching gels with calcium or

fluoride on color, roughness, and enamel microhardness. **J. Clin. Exp. Dent.**, v.12, n.2, p.e116-e122, 2020.

VIEIRA-JUNIOR, W. F.; LIMA, D. A. N. L.; TABCHOURY, C. P. M.; AMBROSANO, G. M. B.; AGUIAR, F. H. B.; LOVADINO, J. R. Effect of toothpaste application prior to dental bleaching on whitening effectiveness and enamel properties. **Oper. Dent.**, v.41, n.1, p.E29-E38, 2016.

VIEIRA-JUNIOR, W. F.; VIEIRA, I.; AMBROSANO, G. M. B.; AGUIAR, F. H. B.; LIMA, D. A. N. L. Correlation between alteration of enamel roughness and tooth color. **J. Clin. Exp. Dent.**, v.10, n.8, p.e815-e820, 2018.

VIEIRA-JUNIOR, W. F.; FERRAZ, L. N.; PINI, N. I. P.; AMBROSANO, G. M. B.; AGUIAR, F. H. B.; TABCHOURY, C. P. M.; LIMA, D. A. N. L. Effect of Toothpaste Use Against Mineral Loss Promoted by Dental Bleaching. **Oper. Dent.**, v.43, n.2, p.190-200, 2018.

WINTER, G. B.; HOLT, R. D.; WILLIAMS, B. F. Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. **Int. Dent. J.**, v.39, n.4, p.227-235, 1989.

WHITFORD, G. M.; BUZALAF, M. A. R.; BIJELLA, M. F. B.; WALLER, J. L. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. **Caries Res.**, v.39, n.2, p.100-107, 2005.

ZAZE, A. C. S. F.; DIAS, A. P.; SASSAKI, K. T.; DELBEM, A. C. B. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. **Clin. Oral Investig.**, v.18, n.6, p.1619-1624, 2014a.

ZAZE, A. C. S. F.; DIAS, A. P.; AMARAL, J. G.; MIYASAKI, M. L.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A. C. B. In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. **Clin. Oral Investig.**, v.42, n.12, p.1621-1625, 2014b.

ZECZKOWSKI, M.; TENUTA, L. M. A.; AMBROSANO, G. M. B.; AGUIAR, F. H. B.; LIMA, D. A. N. L. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. **J. Dent.**, v.43, n.9, p.1154-1161, 2015.