



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

BRUNA GUERRA SILVA

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DO ESMALTE,  
QUANDO SUBMETIDO AO CLAREAMENTO DENTAL  
CASEIRO COM DIFERENTES ESPESSANTES: ESTUDO *IN*  
*SITU*”

**"EVALUATION OF THE PHYSICAL PROPERTIES OF  
ENAMEL, WHEN SUBMITTED TO AT-HOME BLEACHING  
WITH DIFFERENT THICKENERS: AN *IN SITU* STUDY"**

Piracicaba

2017

BRUNA GUERRA SILVA

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DO ESMALTE, QUANDO SUBMETIDO AO CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO COM DIFERENTES ESPESSANTES: ESTUDO *IN SITU*”

**"EVALUATION OF THE PHYSICAL PROPERTIES OF ENAMEL SUBMITTED TO AT-HOME BLEACHING WITH DIFFERENT THICKENERS: AN *IN SITU* STUDY"**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Dentística.

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Dental Clinic in Operative Dentistry Area.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA BRUNA  
GUERRA SILVA E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. DÉBORA ALVES NUNES  
LEITE LIMA.

Piracicaba

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38a Silva, Bruna Guerra, 1992-  
Avaliação das propriedades físicas do esmalte, quando submetido ao clareamento dental caseiro com diferentes espessantes : estudo *in situ* / Bruna Guerra Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Debora Alves Nunes Leite Lima.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Estética dentária. 2. Dentes - Clareamento. 3. Espessantes. 4. Carbopol. 5. Natrosol. I. Lima, Debora Alves Nunes Leite, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the physical properties of enamel submitted to at-home bleaching with different thickeners : an *in situ* study

**Palavras-chave em inglês:**

Esthetics, dental

Teeth - Bleaching

Thickeners

Carbopol

Natrosol

**Área de concentração:** Dentística

**Titulação:** Mestra em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Debora Alves Nunes Leite Lima [Orientador]

Milena Maria Pierre Santos Caldeira

Vanessa Cavalli Gobbo

**Data de defesa:** 15-02-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata BRUNA GUERRA SILVA aprovada.

PROFª. DRª. DEBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

PROFª. DRª. MILENA MARIA PIERRE SANTOS CALDEIRA

PROFª. DRª. VANESSA CAVALLI GOBBO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Elizabeth Guerra, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, por sonhar os meus sonhos e tornar possível à realização de todos eles, pelo carinho e amor com suas filhas, pela compreensão e amizade. Por ser meu porto seguro, minha inspiração. Sem a senhora não seria possível chegar aonde cheguei e conquistar tudo que já conquistei até hoje. Meu amor pela senhora não tem dimensão!

Ao meu pai, Vicente Silva, que por mais distante sempre esteve a postos para me ajudar, sempre me tirou boas risadas e que me faz compreender que não importa a distancia o amor sempre nos traz para perto um do outro.

Ao meu padrasto, Sérgio de Siqueira, por toda a dedicação à família que formamos. Por todo carinho, amor, por trazer tanta alegria para nossa família e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

## **Agradecimentos**

**À Deus...**

**...meu guia**

Pela ajuda e força em todos os momentos da minha vida.

## **Agradecimentos**

### **À minha orientadora**

Professora Débora Alves Nunes Leite Lima, pela oportunidade de orientação. Pelo convívio e aprendizado, pelos ensinamentos diários, por acreditar e confiar no meu trabalho e na minha pessoa. O nosso convívio me trouxe uma enorme admiração por você e agregou muitas coisas em minha vida, não só profissional como também pessoal. Agradeço pelas inúmeras vezes que você foi como uma mãe, me aconselhando e me guiando! Você é incrível!

## **Agradecimentos**

### **À minha família...**

As minhas fantásticas irmãs Aline e Camila, por me apoiarem durante todos os anos, sempre me impulsionando a seguir em frente e a conquistar os meus sonhos. Por todo amor, carinho e amizade. Amo vocês e sou eternamente grata a Deus por me conceder vocês. Vocês são minha vida.

Aos meus avós Lucia e Guerrinha, por todos os exemplos de vida que me passaram, por todo amor e carinho e por compreenderem minha ausência frente aos percalços da vida. Vocês são especiais e estarão sempre em meus pensamentos e em meu coração.



## **Agradecimentos**

### **Às minhas amigas...**

Queridas amigas: Marília, Heloisa e Marina, que com certeza serão amigas para a vida toda. A amizade de vocês conforta meu coração e torna os fardos mais leves. Cada uma de vocês me completa de forma especial e única.

À Ana Eliza Faria. Você foi peça fundamental em minha vida durante os cinco anos que moramos juntas. Queria eu poder ser um pedacinho de você, que é cheia de qualidades e que eu me espelho e tenho tanto orgulho de chamar de amiga. Agradeço por me permitir entrar na sua vida, por compartilhá-la comigo e por sempre oferecer seu ombro amigo e me confortar com suas sábias palavras. Por me trazer o chão quando ele se vai e por sempre me tirar um sorriso quando não estou bem. Você foi meu alento, meu suporte. E você na verdade não é só amiga, você é irmã e você se tornou parte da minha família!

À Renata Pereira, você que tem um coração maior que o mundo, um caráter e uma inteligência admirável, que sempre compartilha dos meus pensamentos, que nunca coloca obstáculos para me ajudar quando preciso e que sempre estende as mãos para mim. Você tornou esses dois anos de Pós-Graduação muito mais leves. Obrigada por estar comigo em todos os momentos. Sem palavras para agradecer à sua amizade e ao seu carinho.

À Luisa, minha amiga desde a graduação. Sem palavras para expressar o quanto sua amizade é importante para mim. Compartilhamos descobertas, novas experiências, medos, alegrias, conhecimento, anseios e conquistas. Você é uma amiga incrível e mesmo com a distância você se faz sempre presente. Minha saudade diária.

### **Aos meus amigos de pós-graduação...**

À Thayla, por me conduzir durante o Mestrado. Você foi como um anjo nesses dois anos, sempre me guiando, me orientando e me acrescentando conhecimento e experiências. Obrigada por dedicar tanto do seu tempo à mim, e por sempre me fazer acreditar que sou capaz. Torço muito por você!

Aos amigos da turma do mestrado, pela convivência durante esses anos, pela cumplicidade, partilha de sonhos, anseios e conquistas. Cada um, com seu jeitinho especial, me conquistaram e serão sempre lembrados com muito carinho.

Ao Waldemir e Jéssica por sempre estares dispostos a me ajudar quando precisei. Sem palavras para agradecê-los.

**Aos meus amigos...**

**... voluntários de pesquisa**

Aos amigos que se dispuseram a participar da minha pesquisa, com o único objetivo de enriquecer o meu trabalho. Sem palavras para agradecer por terem me ajudado, pela paciência com o meu estudo e por se empenharem para que ele desse certo. Muito obrigada!

## **Agradecimentos**

### **Ao meu namorado...**

A você, Rafael, pelo companheirismo, pela nossa amizade, pelo apoio incondicional, pela cumplicidade, atenção e pelo amor que tem por mim. Você, que chegou quando eu menos esperava, que em tão pouco tempo me trouxe tanta felicidade e que me transborda. Você que é calma em meio à tempestade. Sou muito grata por me permitir caminhar ao seu lado e por ser tão presente em minha vida. É muito bom ter alguém para compartilhar os sonhos, para planejar um futuro e para amar!

## **Agradecimentos**

### **Aos mestres...**

À minha co-orientadora de iniciação científica, Vanessa Cavalli Gobbo, que me inspirou com sua inteligência, paciência, dedicação e amor pelo que faz, a iniciar a Pós-graduação. A você, toda minha admiração e respeito.

Ao professor Marcelo Gianinni pela oportunidade de trabalhar com você e pela experiência adquirida durante a iniciação científica.

Aos professores Luiz Alexandre Maffei Sartini Paulillo, Giselle Maria Marchi e Flávio Henrique Baggio Aguiar, pelo conhecimento agregado ao meu trabalho no exame de qualificação.

À todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP.

À professora Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pelos conhecimentos de estatística compartilhados.

## **Agradecimentos**

**À Faculdade de Odontologia de Piracicaba...**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

À Coordenadoria Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar in situ a influência do peróxido de carbamida 10%(PC) contendo diferentes espessantes (carbopol, carbopol+glicerina e natrosol) sobre as características físicas do esmalte dental, como: cor, microdureza e rugosidade. Oitenta e quatro blocos de esmalte e dentina ( $4 \times 4 \times 2,5$  mm) obtidos a partir de dentes bovinos foram manchados com chá preto, divididos em sete grupos (n=12) e fixados em dispositivos intra-buciais palatinos utilizados por 12 voluntários. Os espécimes foram submetidos a diferentes tratamentos: PC+carbopol (FGM), PC+carbopol+glicerina (Ultradent), PC+natrosol (Gel experimental), apenas com o gel de carbopol, apenas com o gel de glicerina+carbopol, apenas com gel de natrosol e sem nenhum tratamento (grupo controle). As propriedades físicas testadas foram cor ( $\Delta E$ ), rugosidade média (Ra) e microdureza Knoop (KHN). A morfologia da superfície de esmalte foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial com tratamento adicional ( $2 \times 3 + 1$ ), teste de Tukey e teste Dunnet. Como todos os pacientes receberam todos os tratamentos, o efeito “voluntário” foi inserido na análise de variância. Foi considerado o nível de significância de 5%. Entre as propriedades físicas avaliadas, quando avaliada a alteração de cor, todos os grupos apresentaram alteração, exceto o grupo não clareado com espessante carbopol, o qual foi semelhante ao grupo controle. Os grupos tratados com o espessante natrosol tiveram uma maior alteração na cor, apresentando-se mais claro que os demais. Com relação à microdureza, houve diminuição da mesma para os grupos tratados apenas com o gel de carbopol e com o gel de carbopol+glicerina, os quais diferiram do grupo controle. Para a rugosidade, houve aumento em todos os grupos clareados quando comparado com o grupo controle, porém o grupo PC+natrosol apresentou menor aumento. Dessa forma, pode-se concluir que a utilização de géis de clareadores contendo espessante natrosol promoveu menores alterações no esmalte do que géis clareadores com espessante carbopol e carbopol+glicerina, além de permitir um clareamento eficaz.

Palavras chave: Estética. Clareamento dental. Espessante. Carbopol. Natrosol.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate *in situ* the influence of carbamide peroxide 10% (PC) containing different thickeners on the physical characteristics of dental enamel, such as: color, microhardness and enamel roughness. Eighty-four blocks of enamel and dentin ( $4 \times 4 \times 2.5$  mm) obtained from bovine teeth were divided into seven groups ( $n = 12$ ) fixed in palatal intraoral devices used by 12 volunteers. The specimens were submitted to different treatments: PC + carbopol (FGM), PC + carbopol + glycerin (Ultradent), PC + natrosol (experimental gel), with carbopol gel only, with glycerin + carbopol gel, only with Natrosol gel and without any treatment (control group). The physical properties tested were color ( $\Delta E$ ), roughness (Ra) and Knoop microhardness (KHN). The morphology of the enamel surface was evaluated with atomic force microscopy (AFM). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) in a factorial scheme with additional treatment ( $2 \times 3 + 1$ ), Tukey's test and Dunnett test. As all patients received all treatments, the "voluntary" effect was inserted in the analysis of variance. The level of significance was set at 5%. Among the physical properties evaluated, when the color change was evaluated, all the groups presented alteration, except the group treated only with carbopol thickener, which was similar to the control group. The groups treated with the thickener natrosol had a greater color change, being clearer than the others. Regarding the microhardness, there was a decrease in the same for the groups treated with carbopol gel and carbopol + glycerin gel, which differed from the control group. For roughness, there was an increase in all bleached groups when compared to the control group, but the PC + natrosol group presented a smaller increase. In this way it can be concluded that the use of bleaching gels containing natrosol thickener was less deleterious to the enamel than bleaching gels with carbopol thickeners and carbopol + glycerin, in addition to allowing an effective bleaching.

Keywords: Aesthetics. Dental bleaching. Thickener. Carbopol. Natrosol.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. ARTIGO.....	20
3. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS*.....	35
APÊNDICE.....	38
ANEXO 1 .....	50
ANEXO 2.....	51



## 1.INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos produtos clareadores e o aperfeiçoamento das técnicas de clareamento permitiram que o tratamento clareador se tornasse comprovadamente eficaz (Nutter et al., 2013; Joiner A., 2006). O tratamento clareador consiste em tornar os dentes mais claros, podendo se dar a partir da técnica de clareamento de consultório, com géis de alta concentração de peróxido de hidrogênio, na qual o Cirurgião-dentista realiza o procedimento no seu consultório, ou de clareamento caseiro, com géis de baixa concentração de peróxido de hidrogênio, na qual o paciente utiliza uma moldeira personalizada e pode realizar o procedimento em casa sob a orientação do Cirurgião-dentista. Porém, alguns estudos indicam que o clareamento pode causar alterações nos tecidos dentais, o que o torna relativamente seguro (Marson FC et al., 2015; Tredwin CJ et al., 2006), como: alteração na superfície do esmalte, podendo ter aumento da rugosidade e diminuição da microdureza (Zeczkowski M et al., 2015; Sa Y et al., 2013; Basting RT et al., 2005; Potocnik I et al., 2000; Bistey T et al., 2007) e da dentina (Jiang T et al., 2007; Kawamoto e Tsujimoto, 2004; Chng et al., 2005).

O mecanismo de ação dos géis clareadores ainda não é um consenso na literatura; porém, a teoria dominante é a teoria da oxidação das moléculas cromógenas, que se dá através de um radical livre de oxigênio (Eimar *et al*, 2012), que é liberado na dissociação do peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio está presente tanto no gel clareador de consultório quanto no caseiro. Já que, mesmo o gel de clareamento caseiro sendo à base de peróxido de carbamida, quando em contato com os tecidos moles ou saliva em temperatura bucal, dissocia-se e um dos produtos da sua dissociação é o peróxido de hidrogênio (Ben-Amar A et al., 1995).

O peróxido de hidrogênio é capaz de penetrar profundamente nos primas de esmalte, alcançando a dentina devido ao seu baixo peso molecular (Lima, DA et al., 2011), onde se degrada liberando radicais livres de oxigênio (Haywood & Heymann, 1991) que interage com os pigmentos que causam a coloração no dente (Kawamoto & Tsujimoto, 2004). Esses pigmentos são cadeias de alto peso molecular, que através de reações de oxirredução são quebradas, decompondo-se em moléculas menores e menos pigmentadas (Plotino *et al.*, 2008; Toledano *et al.*, 2011). A alteração no tamanho e

pigmentação das moléculas cromógenas após a oxidação produzida pelos radicais livres altera a absorção de luz do espectro visível pela molécula, de maior para menor comprimento de onda, resultando em compostos mais claros (Haywood & Heymann, 1991; So Ran Kwon & Philip W. Wertz, 2015, Sulieman M 2004)

As alterações de microdureza do esmalte e da dentina são provocadas devido à reação dos radicais livres de peróxido de hidrogênio, que por não serem específicos e serem altamente instáveis, podem reagir não só com as moléculas cromógenas dos pigmentos, os anéis de carbono pigmentados, como também com as moléculas orgânicas dos tecidos dentais, para atingir estabilidade (Basting et al., 2005; Kawamoto & Tsujimoto, 2004). Contudo, estudos vêm mostrando que as alterações na microdureza do esmalte e da dentina podem não estar relacionadas somente aos radicais livres de peróxido, mas com outros constituintes presentes na formulação do produto clareador, como os espessantes (Basting et al., 2003).

Os espessantes dos géis clareadores são substâncias químicas que têm como função aumentar sua viscosidade, permitindo assim uma maior retenção do gel na superfície dentária e com isso um tempo prolongado para a liberação de íons de oxigênio (McCracken e Haywood, 1996; Rodrigues JA et al., 2007). Um dos espessantes mais comumente utilizado na composição dos géis clareadores caseiros é o carbopol, um polímero carboxipolimetileno, iônico, de natureza ácida, derivado de um ácido carboxílico. Porém, tem sido relatado que o carbopol pode ser capaz de reduzir a microdureza do esmalte e da dentina, devido a sua elevada capacidade de se ligar ao cálcio (van der Reijden et al., 1997), que leva a uma inibição da incorporação dos cristais de hidroxiapatita.

Além do carbopol, outro espessante utilizado é a glicerina, que, no entanto, devido à capacidade de atuar como barreira para adsorção de saliva e consequente remineralização do esmalte, pode também diminuir a microdureza do esmalte (Basting RT et al, 2005).

Sendo assim, esse estudo se propôs a substituir os espessantes presentes no mercado por um espessante bastante utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, denominado natrosol (hidroxietil celulose), que apresenta características opostas ao carbopol, principalmente por ser não iônico; além disso, o natrosol pode ser utilizado com substâncias ácidas, como o gel clareador, por apresentar estabilidade na variação de

pH (Gouveia TH et. al., 2016). Estudos que avaliem os efeitos dos géis clareadores sobre a estrutura dental são extremamente necessários, visto que, apesar de ser um tratamento conservador, o clareamento pode causar danos na estrutura dental. Assim, o objetivo desse estudo *in situ* foi avaliar o efeito de géis clareadores contendo diferentes espessantes nas propriedades físicas do esmalte dental, como cor, microdureza e rugosidade superficial.

## 2. ARTIGO

### **"Evaluation of the physical properties of enamel submitted to at-home bleaching with different thickeners: an *in situ* study"**

#### **ABSTRACT**

**Objective:** of this *in situ* study was to evaluate the influence of carbamide peroxide 10% (CP) in combination with different thickeners, on the physical characteristics of dental enamel. **Methodology:** Eighty-four blocks of enamel and dentin ( $4 \times 4 \times 2.5$  mm) obtained from bovine teeth were divided into seven groups ( $n = 12$ ), fixed in palatal intraoral devices, and submitted to different treatments: CP + carbopol (FGM), CP + carbopol + glycerin (Ultradent), CP + natrosol (experimental gel), carbopol gel, carbopol + glycerin gel, Natrosol gel, whitout treatment (control group). The physical properties tested were color ( $\Delta E$ ), average roughness (Ra) and Knoop microhardness (KHN). Additionally, the enamel surface was evaluated by atomic force microscopy (AFM). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA), Tukey's test and Dunnet test ( $\alpha=0.05$ ). **Results:** All groups presented significant color variation, except the not bleached group with carbopol thickener. The groups treated with the natrosol and carbopol+glycerin thickener had a satisfactory color change, being clearer than the others. Groups not bleached with carbopol and carbopol + glycerin presented decreased values of Microhardness when compared to control group. Roughness was increased in all bleached groups when compared to the control group, but the CP +natrosol group had a statistical increase lower than PC+carbopol. **Conclusion:** the use of bleaching gel with natrosol thickener allowed effective bleaching and was less deleterious to enamel. **Clinical significance:** enamel physical characteristics alteration during at-home bleaching with differents thickners.

#### **INTRODUCTION**

The development of new products and the improvement of whitening techniques have promoted the effectiveness of bleaching treatments [1,2]. However,

some studies report that bleaching treatment may cause alterations in dental tissues which make it relatively safety [3,4], for instance changes in enamel surface involving reduction of microhardness and increased roughness [5-9].

The mechanism of action of bleaching gels relies on oxygen free radicals [10] released from the decomposition of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide is present in the office bleaching gel and in at-home bleaching gels. Although some home-bleaching gel are based on carbamide peroxide, when in contact with saliva at mouth temperature, the carbamide peroxide dissociates and one of the products of its dissociation is hydrogen peroxide [11].

The free radicals responsible for the whitening effect are also accountable for the changes in dental physical properties, such as reduction of enamel microhardness. Because of their highly unstable nature and non-specific reactivity, they can interact not only with chromogenic molecules, but also with other organic and inorganic molecules of dental tissues, to achieve stability [7,12]. The acidic pH of bleaching gels can also cause changes in tooth structure [13]. Nevertheless, studies have shown that in addition to free radicals and pH, changes in tooth structure may also be related to other constituents present in the bleaching product formulation, such as thickeners [14].

Thickeners are chemical substances that have the function of increasing the viscosity of bleaching gels, thus allowing a greater retention on the dental surface and prolonging the exposure time to active compounds [15,16]. The most commonly used thickeners in the composition of at-home bleaching gels are carbopol and glycerin. However, these thickeners are capable of interacting with the dental structure, leading to structural changes such as reduced microhardness and altered roughness [7]. In this context, the present study evaluates currently marketed thickeners in bleaching gels in comparison to Natrosol, a thickener widely used in the pharmaceutical and cosmetic industry. Natrosol has the advantages of being non-ionic and having wide-range pH stability (2.0-12.0) [17], which means it can be combined to acidic substances like bleaching formulations. As this thickener is less viscous than carbopol, gels containing natrosol were manipulated with addition of silica-based filler particles (SiO) to increase the viscosity of the material, as well as to improve the thermal resistance, since

according to the manufacturer these products are to be kept refrigerated and will experience frequent temperature changes with the cycles of use.

The present *in situ* study investigated the effects of an experimental Natrosol-containing bleaching gel on the properties and morphology of enamel, evaluating its color, microhardness and surface roughness. The hypotheses tested were: 1) that the experimental bleaching gel with natrosol thickener would show the same efficacy of the commercial bleaching agents with carbopol and glycerin, and 2) that the experimental bleaching gel would not change the microhardness and roughness of the enamel.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was approved by the Institutional Ethics Committee (53165116.1.0000.5418)

### **Sample Preparation**

Newly collected bovine incisors that did not have stains or enamel fractures were selected and stored in 0.1% Thymol at 4° C until use. Enamel/dentin blocks measuring 4 x 4 x 2.5 mm, with 1 mm of enamel and 1.5 mm of dentin were obtained from the middle third of the vestibular region of the crown, using a diamond disk (Extec Dia. Wafer Blade 102 x 0.3 x 12.7 mm) coupled to a metallographic cutter (Isomet 1000, Buehler Ltda. Lake Buff, IL, USA). For grinding, regularization and polishing, decanting silicon carbide sanding discs were used (# 1200, # 2500 and # p4000 - Isomet, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) to level the height of the blocks; then felts with metallographic diamond pastes and specific lubricant (6 µm - TOP, 3 µm - RAM, 1 µm - SUPRA - Arotec, Cotia, São Paulo, SP, Brazil) were used for polishing. Between polishing steps and at the end of the procedure, all samples were placed for 10 minutes on ultrasound (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) to remove residual smear particles. Each specimen was labeled on the side face with diamond drill bit # 1012 (KG Sorensen), to standardize sample position for spectrophotometry. The samples were stained for 6 days by immersion in black tea solution (Lion Junior SA, Curitiba, PR, Brazil), which was changed every 24 hours. The stain was stabilized by placing the specimens in artificial saliva, exchanged every 24 hours, for 14 days. The specimens were sterilized with ethylene oxide and stored in water at 4 ° C until use.

***In situ settings***

Twelve volunteers (six males and six females), aged 24-28 years, participated in the study after signing a free and informed consent form. All of these volunteers were selected by the inclusion criteria (normal salivary flow, measured through sialometry, and absence of caries and/or periodontal disease), without violating the exclusion criterion (use of medicine that interfere with salivary flow, smoking habits, and the presence of orthodontic device, fixed or removable prosthesis). The use of fluoride by the volunteers was not permitted during the whole timespan of the study. For each volunteer, a molding in alginate (Hydrogum - Zhermack, Badia Polesine, Italy) of the upper arch was obtained, from which the palatal devices were made of acrylic resin containing 7 reservoirs (25 mm<sup>2</sup> wide and 3 mm deep). Seven specimens (enamel/dentin blocks) were attached to each palatal device using sticky wax. The specimens were randomly placed in the twelve palatal intraoral devices, taking into account the position relative to the parotid salivary gland. The intraoral devices remained for one day in the volunteers' mouths before the beginning of the bleaching sessions, for the formation of acquired film.

**Treatment / Gel Treatment Application**

A total of 14 daily treatment sessions were carried out as follows: devices were removed from the volunteers' mouths and dried with absorbent paper; six of the seven specimens contained in each of the twelve devices were submitted to gel application (according to the assigned experimental group), whereas the seventh, control specimens did not receive any treatment. The volunteers were instructed about gels handling and application, which were applied according to the manufacturer's recommendations on the enamel surface, remaining for 4 hours at room temperature. To prevent dehydration of specimens, devices were kept in a humidified environment, however carefully avoiding contact of the gel-containing surfaces with water. After each session, the gel was removed with cotton-tipped flexible rods, specimens were washed with water, dried with absorbent paper, and the devices returned to the volunteers' mouth.

**Color Analysis**

The color reading of each specimen was performed in ambient light condition (GTI MiniMatcher MM 1, GTI Technology, New York, NY, USA) using a spectrophotometer (CM 700D, Minolta, Osaka, Japan). The spectral distribution was measured based on the CIE system  $L^* a^* b^*$ , used in Color software (Konica Minolta), in which the  $L^*$  axis represents the brightness intensity of the specimen and ranges from 0 (black) to 100 (white); the coordinate  $a^*$  represents the intensity of green / red color; and the coordinate  $b^*$  represents the intensity of blue / yellow color. Prior to measurements, the spectrophotometer was calibrated using white and black reflectance standards, according to the manufacturer's protocol.

The difference between initial (baseline) and final (24 hours after completion of the treatment)  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  values were obtained ( $\Delta L$ ,  $\Delta a$ , and  $\Delta b$ ) and any color change was calculated using the following equation:  $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ .

#### **Microhardness Analysis (KHN)**

The enamel surface microhardness (KHN) was analyzed using a Knoop penetrator with a 50 g load and a 5-second time in a microhardness tester (HNV-2000, Shimadzu, Tokyo, Japan). After the treatment, five penetrations were made in each specimen at 100  $\mu\text{m}$  each, and the mean was calculated to determine the Knoop hardness value (KHN). The post-treatment surface microhardness values of experimental groups were compared to each other and to the control group.

#### **Roughness Analysis (Ra)**

Surface roughness (Ra) was analyzed using a profilometer (Surf-Corder 1700, Kosaka, Tokyo, Japan) at two time-points: initial (baseline) and 24 hours after completion of treatment. Three different and equidistant directions were measured on the surface of each sample, with a cut-off point of 0.25 mm, a reading length of 1.25 mm and a velocity of 0.1 mm / s. Results are expressed as the difference between the two time-points ( $\Delta\text{Ra}$ ).

#### **Atomic Force Microscopy (AFM)**

For quantitative analysis of the surface, two samples from each group were randomly chosen and analyzed by AFM after the treatment. Three-dimensional



topographic images (20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ ) were obtained using an atomic force microscope (MultiMode 3; Digital Instruments Bruker, Santa Barbara, CA, USA) with a rectangular silicon cantilever, a constant of approximately 70 N / m, and resonance frequency of 320 KHz. The microscope was operated in intermittent contact mode (touch mode), with a scanning frequency of 0.7 Hz per line and a 2 micron scale. The images were processed using Nanoscope III 5.12b43 software.

### Statistical Analyses

After exploratory analysis, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) in a factorial scheme with additional treatment (2 x 3 +1), and Tukey test. The comparisons with the control group were performed by the Dunnett test. Because all volunteers received all treatments, the "volunteer effect" was accounted for during these analyses. The level of significance was set at 5%.

## RESULTS

### Color ( $\Delta E$ )

The values presented in Table 1 refer to the color change ( $\Delta E$ ) of each experimental group and control.

Table 1. Mean (and standard deviation) of the color change ( $\Delta E$ ) as a function of bleaching treatment and thickener.

Thickener	Carbamide Peroxide 10%	
	With	Without
Carbopol	*5.87(1.25) Ab	2.39(0.79) Bb
Carbopol + Glycerin	*6.74(1.71) Aab	*2.95(1.14) Bab
Natrosol	*6.83(1.24) Aa	*3.28(1.32) Ba
Control	1.68 (0.60)	

\* indicates statistical difference from the control group ( $p \leq 0.05$ ). Values followed by different letters (upper case horizontally; lower case vertically) differ from each other ( $p \leq 0.05$ )

All groups presented higher  $\Delta E$  values than control group except for carbopol treated group. All groups treated with CP bleaching showed a higher  $\Delta E$  than the respective non-bleached groups, independent of the thickener used. The groups with natrosol as thickener had the highest  $\Delta E$  values, both among bleaching and non-

bleaching treatments, while those with carbopol thickener presented the lowest  $\Delta E$  values; differences between natrosol and carbopol groups were statistically relevant. Groups treated with carbopol + glycerin gel (both in the presence or absence of CP) yielded results which were intermediate, being statistically equivalent to both natrosol- and carbopol-treated groups.

### Microhardness (KHN)

The results of microhardness measurements are shown in Table 2.

Table 2. Mean (and standard deviation) of Knoop microhardness values (KHN) as a function of bleaching treatment and thickener.

Thickener	Carbamide Peroxide 10%	
	With	Without
Carbopol	310.01(20.92) Aa	*249.69(30.25) Bb
Carbopol + Glycerin	309.34(13.60) Aa	*260.29(37.81) Bb
Natrosol	318.72(27.16) Aa	307.57(15.26) Aa
Control	322.28 (16.58)	

\* indicates difference from the control group ( $p \leq 0.05$ ). Values followed by different letters (upper case horizontally; lower case vertically) differ from each other ( $p \leq 0.05$ )

The experimental treatments did not cause significant changes in microhardness compared to the control, except for the groups treated with carbopol and carbopol + glycerin in the absence of bleaching. When comparing bleached *versus* not-bleached groups for each thickener, only the natrosol-treated groups showed no statistical differences in KHN values. However, it is noteworthy that the groups treated with Carbopol or Carbopol + glycerin gel in the absence of bleaching had lower microhardness values.

### Roughness (Ra)

The effects of experimental treatments on surface roughness are shown in Table 3.

Table 3. Mean (and standard deviation) of the roughness parameter variation ( $\Delta Ra$ ) as a function of bleaching treatment and thickener.

Thickener	Carbamide Peroxide 10%	
	With	Without
Carbopol	*0.043(0.008) Aa	0.014(0.005) Ba
Carbopol + Glycerin	*0.042(0.008) Aab	0.011(0.006) Ba
Natrosol	*0,034(0.009) Ab	0.011(0.009) Ba
Control	0.012 (0.006)	

\* indicates difference from the control group ( $p \leq 0.05$ ). Values followed by different letters (upper case horizontally; lower case vertically) differ from each other ( $p \leq 0.05$ )

Only groups treated in the presence of CP significantly differed in roughness from the untreated control group. When comparing bleached *versus* not-bleached groups, the former presented higher roughness variation levels, regardless of the thickener used. When the different thickeners were compared, no statistical differences were observed among the not-bleached groups. On the other hand, among the groups treated in the presence of CP, the use of natrosol thickener yielded the lowest values of  $\Delta Ra$ , significantly different from the values obtained with carbopol as thickener, whereas the group treated with carbopol + glycerin had intermediate values (not statistically different from either one of the other two groups).

### Atomic Force Microscopy

The 3D images of the enamel surface representative of the control group (Figure 1), and groups treated in the presence or absence of CP (Figures 2 and 3, respectively) were comparatively analyzed regarding the peak-valley distances (peak heights) measured by AFM. Morphological changes could be observed in all the bleached groups (Figure 2) compared to the control, regardless of the thickener used. This result was evidenced by the larger peak heights measured on the surface of these samples. In the not-bleached groups (Figure 3), the peak heights measured by AFM were similar to the ones found in the control image, independent of the thickener used.

Importantly, within the bleached specimens, the group treated with natrosol as a thickener (Figure 2.C) presented a less pronounced surface alteration when compared with the group treated with carbopol (Figure 2.A), as demonstrated by the smaller difference in peak-valley measurements on the enamel surface. The group bleached using carbopol + glycerin as thickener (Figure 2.B) presented intermediate morphological changes.

Figure 1: Image obtained by atomic force microscopy representative of the untreated control group

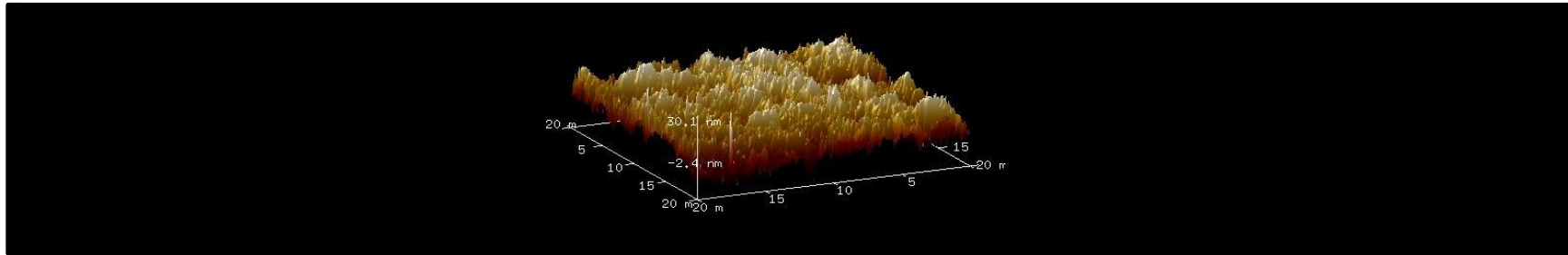


Figure 2: Images obtained by atomic force microscopy representing the groups treated in the presence of bleaching and different thickeners A) CP + carbopol, B) CP + carbopol + glycerin, and C) CP + natrosol

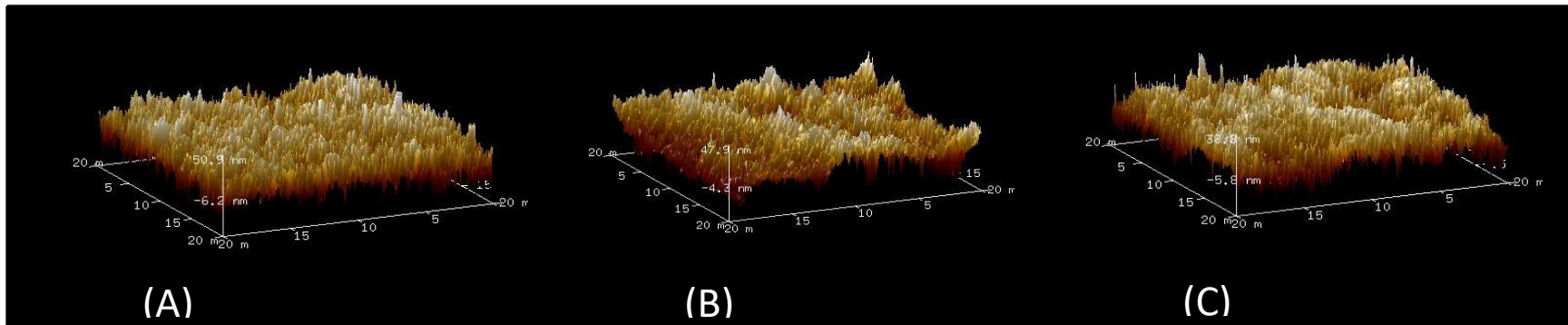
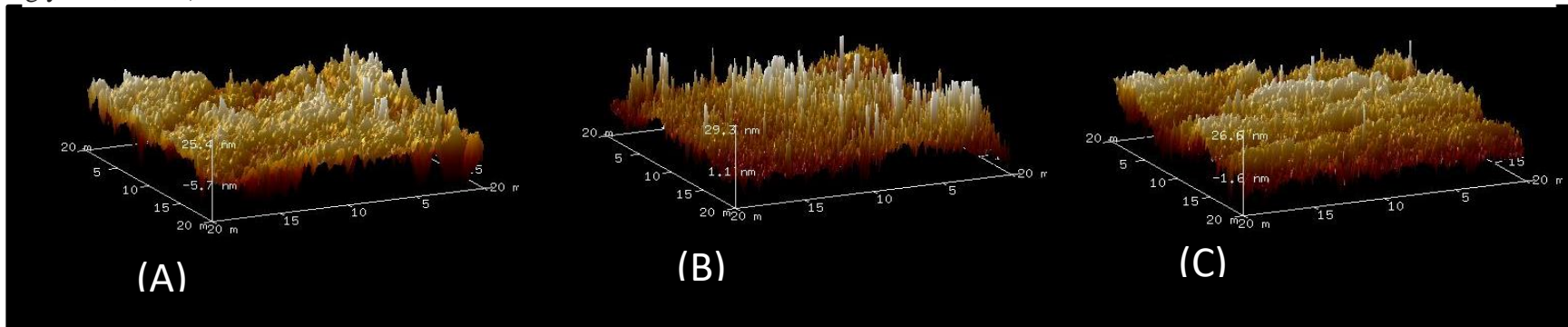


Figure 3: Images obtained by atomic force microscopy representing groups treated in the absence of bleaching A) carbopol, B) carbopol + glycerin, and C) natrosol



## DISCUSSION

The results presented in this study allow a comparative assessment of different thickeners in the formulation of gels for at-home bleaching treatment. The color variation of specimens was evaluated in accordance with the CIELab system, which measures color variation ( $\Delta E$ ). When  $\Delta E = 0-2$ , the color variation is not clinically noticeable;  $\Delta E = 2-3$  color variation is slightly noticeable;  $\Delta E > 3-8$  color variation is moderately noticeable and  $\Delta E > 8$ , color variation is highly noticeable [18]. The data showed that, whereas the control group presented a clinically unnoticeable color variation, all groups treated with natrosol as a thickener presented color variation classified as mildly detectable ( $\Delta E > 3$ ). However, for groups treated with carbopol and carbopol + glycerin in the absence of bleaching the variation was less noticeable. Color analyses were performed before the beginning of treatment and 24 hours after the process was completed, always with hydrated samples to avoid interference. It stands out that, in addition to the bleaching activity of CP in whitening gels via interaction of oxygen free radicals [10] with chromogenic molecules on the tooth structure, the natrosol and glycerin seem to have also interacted with the enamel surface, possibly removing pigments and thereby justifying the increased color change effect when compared with carbopol-only thickener. However, such hypothesis demands further studies in order to be properly verified and better understood.

Natrosol (Hidroxietilcelulose) is a cellulose-based polymer, highly used in a variety of materials such as latex emulsions, water-soluble resins, surface-active agents and detergents, anti-caking agents, plasticizers agents and organic solvents. It has an excellent compatibility with different types of composites and differs from carbopol mainly due to its non-ionic nature [17]. In addition, natrosol can be associated to acidic substances in whitening gels, due to its remarkable stability to pH variation (2,0-12,0). Carbopol, in turn, a thickener commonly used in at-home bleaching gels [19], is a carboxypolymethylene polymer, ionic and acidic in nature, being a carboxylic acid derivative. Due to its strong calcium binding ability [20], it has been reported that carbopol can reduce enamel microhardness and dentin, since it causes inhibition of hydroxyapatite crystals incorporation. In addition to carbopol, other thickener also already used in whitening gels is glycerin, which because of its ability to act as a barrier for adsorption of saliva and consequent remineralization of enamel, can also affect the microhardness of enamel surfaces [7].

Previous studies have reported a decrease in enamel microhardness after whitening treatment with CP [8,21], often associated to demineralization effect of free

radicals resulting from dissociation of CP [15], and low pH [22]. In the present study, only the groups treated with carbopol carbopol + glycerin in the absence of CP presented a decreased microhardness. This suggests that interaction of oxygen free radicals with enamel may not be the only cause for decreased microhardness in dental structures [14,23]. Interestingly, natrosol used either alone or in association with CP, did not cause changes in microhardness of enamel, since no statistically significant differences were found in comparison to the control group.

The *in situ* approach of the present study proposed a controlled analysis of whitening treatments, aiming to simulate a clinic protocol considering that human saliva can influence the effectiveness of bleaching, in contrast to other types of setups *in vitro* [5]. When in buccal cavity, human saliva acts in the formation of acquired film that can prevent reductions in enamel microhardness by avoiding direct contact of teeth with acidic substances, such as the whitening gel, acting as a barrier for the diffusion of calcium and phosphate [24]. Also, the human saliva has a variety of proteins such as proline-rich proteins, histatins, phosphatases, and statherin, which participate in calcium and phosphate homeostasis by controlling deposition of these minerals on the teeth [25,26], and can account for a diminished mineral loss when compared with studies *in vitro*.

Regarding roughness, the changes in physical properties can occur due to effects of demineralization and remineralization. Demineralization can be caused by the diffusion of hydrogen peroxide after the dissociation of CP, and by the acidic pH of whitening products [27,28] and thickeners. Remineralization of the treated surface takes place when bleached enamel is in contact with human saliva, because of deposition of minerals such as calcium and phosphate [29]. However, this process takes place in an irregular way inducing a reorganization of the enamel prisms that can cause an increase of roughness, as observed in the present study. Given the different pH values of the different thickeners, more acidic compounds can be responsible for greater demineralization effect. Consequently, during remineralization, there would be a more extensive repositioning of enamel prisms due to mineral deposition on demineralized surface. This is in accordance to our observation that groups treated with carbopol, a more acidic compound than natrosol, presented a greater increase in roughness.

Hence, in the current state of knowledge, the results of the present study highlight the demand for new approaches to redesign the composition of at-home dental whitening products, carefully considering the effects of carbamide peroxide, as well as different components of the gels, on the physical properties of enamel [14,15].

## CONCLUSION

The changes on physical properties of enamel by bleaching treatment varied depending on the thickener used. The replacement of carbopol or carbopol+ glycerin by natrosol allowed the preservation of enamel microhardness caused lesser changes on surface roughness surface, at the same time yielding an effective whitening result.

## Acknowledgement

The collaboration between Drogal manipulation, FGM dentistry products and ACECIL sterilization.

## REFERENCE

- [1] Nutter BJ, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy of light activated in-surgery whitening versus in-surgery whitening without light activation. *Journal of Dentistry* 2013 Nov;41 Suppl 5:e3-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.03.004.
- [2] Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *Journal of Dentistry* 2006; **34**(7):412-9.
- [3] Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, Briso AL. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Operative Dentistry* 2015; **40**(1):72-9.
- [4] Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issue. *British Dental Journal* 2006; **200**(7):371-6.
- [5] Zeczkowski M, Tenuta LM, Ambrosano GM, Aguiar FH, Lima DA. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. *Journal of Dentistry* 2015; **43**(9):1154-61.
- [6] Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, 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. *Operative Dentistry* 2013; **38**(1):100-10.
- [7] Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effect 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Operative Dentistry* 2005; **30**(5):6008-16.



- [8] Potocnik I, Kosec I, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel Microhardness microstructure, and mineral content. *Journal of Endodontics* 2000; **26**(4):2003-6.
- [9] Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *Journal of Dentistry* 2007; **35**(4):325-30.
- [10] Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *Journal of Dentistry* 2012; 40 Suppl 2:e25-33. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.008.
- [11] Ben-Amar A, Lieberman R, Gorfil C, Bernstein Y. Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. *American Journal of Dentistry* 1995; **8**(1):29-32.
- [12] Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *Journal of Endodontics* 2004; **30**(1):45-50.
- [13] Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, & Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide *Journal of Dentistry* 2011; **39**(10) 686-692.
- [14] Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *Journal of the American Dental Association* 2003; **134**(10):1335-42.
- [15] McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *Journal of Dentistry* 1996; **24**(6):395-8.
- [16] Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Brazilian Oral Research* 2007; **21**(2):170-5.
- [17] Gouveia TH, Públio JC, Ambrosano GM, Paulillo LA, Aguiar FH, Lima DA. Evaluation of physical properties of a nanocomposite after aging, bleaching and staining. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 2016; **14**(3):e256-65.
- [18] Janda R, Roulet JF, Latta M, Steffin G, Rüttermann S. Color stability of resin-based filling materials after aging when cured with plasma or halogenlight. *European Journal of Oral Sciences* 2005; **113**(3):251-7.
- [19] Soares JC, Silva NR, Quagliatto PS, Campos RE. Tooth bleaching clinical evaluation with industrialized and drugstore manipulated carbamide peroxide gel. *Revista de Odontologia da UNESP* 2006;35:69-74.

- [20] van der Reijden WA, Buijs MJ, Damen JJ, Veerman EC, ten Cate JM, Nieuw Amerongen AV. Influence of polymers for use in saliva substitutes on de- and remineralization of enamel in vitro. *Caries Research* 1997; **31**(3):216-23.
- [21] Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence International* 1993; **24**(1):39-44.
- [22] Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: an in situ vs. in vitro study. *Journal of Dentistry* 2012; 40 Suppl 1:e26-34. doi: 10.1016/j.jdent.2012.02.010
- [23] Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dental Materials* 2005; **21**(11):1059-67.
- [24] Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira L. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of Oral Biology* 2014; **59**(6):631-8.
- [25] Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. EP-GP and the lipocalin VEGh, two different human salivary 20-kDa proteins. *Journal of Dental Research* 1995; **74**(9):1543-50.
- [26] Gibson J, Beeley JA. Natural and synthetic saliva: a stimulating subject. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 1994; 12:39-61.
- [27] Tezel H, Ertaş OS, Ozata F, Dalgar H, Korkut ZO. Effect of bleaching agents on calcium loss from the enamel surface. *Quintessence International* 2007; **38**(4):339-47.
- [28] Kleinberg I. SensiStat. A new saliva-based composition for simple and effective treatment of dentinal sensitivity pain. *Dentistry Today* 2002; **21**(12):42-7.
- [29] Humphrey & Williamson. A review of saliva: normal composition, flow and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2001; **85**(2):162-9.

### 3. CONCLUSÃO

1. A substituição do carbopol ou carbopol+glicerina por natrosol proporcionou a manutenção da microdureza do esmalte após o clareamento, menor alteração da rugosidade superficial.

2. O espessante natrosol permitiu um resultado clareador eficaz.

## REFERÊNCIAS\*

Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc.* 2003 Oct;134(10):1335-42.

Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effect 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Oper Dent* 2005 Sep-Oct;30(5):6008-16.

Ben-Amar A, Lieberman R, Gorfil C, Bernstein Y. Effect of mouth guard bleaching on enamel surface. *Am J Dent.* 1995;8(1):29-32.

Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *J Dent.* 2007 Apr;35(4):325-30.

Chng HK, Ramli HN, Yap AU, Lim CT. Effect of hydrogen peroxide on intertubular dentine. *J Dent.* 2005 May;33(5):363-9.

Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent.* 2012 Dec;40 Suppl 2:e25-33. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.008.

Gouveia TH, Públio JC, Ambrosano GM, Paulillo LA, Aguiar FH, Lima DA. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2016 Jul 26;14(3):e256-65. doi: 10.5301/jabfm.5000294. Evaluation of physical properties of a nanocomposite after aging, bleaching and staining.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991 Jul;22(7):515-23.

Jiang T et al., 2007: Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. *J Dent Res.* 2007 Nov;86(11):1040-5.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent.* 2006 Aug;34(7):412-9.

Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004 Jan;30(1):45-50

Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. Influence of chemical or physical catalysts on high concentration bleaching agents. *Eur J Esthet Dent.* 2011 Winter;6(4):454-66.

Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, Briso AL. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent.* 2015 Jan-Feb;40(1):72-9. doi: 10.2341/13-270-L.

McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent.* 1996 Nov;24(6):395-8.

Nutter BJ, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy of light activated in-surgery whitening versus in-surgery whitening without light activation. *J Dent.* 2013 Nov;41 Suppl 5:e3-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.03.004.

Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F. Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. *J Endod.* 2008 Apr;34(4):394-407. doi: 10.1016/j.joen.2007.12.020.

Potocnik I, Kosec I, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel Microhardness microstructure, and mineral content. *J Endod* 2000 Apr: 26(4):2003-6

Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Braz Oral Res.* 2007 Apr-Jun;21(2):170-5.

Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, 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.* 2013 Jan-Feb;38(1):100-10. doi: 10.2341/11-173-L.

So Ran Kwon & Philip W. Wertz, 2015: Kwon SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent*. 2015 Sep-Oct;27(5):240-57. doi: 10.1111/jerd.12152.

Sulieman M. An overview of bleaching techniques: I. History, chemistry, safety and legal aspects. *Dent Update*. 2004 Dec;31(10):608-10, 612-4, 616.

Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Bleaching agents increase metalloproteinases-mediated collagen degradation in dentin. *J. Endod*. 2011 Dec;37(12):1668-72. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.003.

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Chng HK Br Dent J*. 2006 Apr 8;200(7):371-6.

van der Reijden WA, Buijs MJ, Damen JJ, Veerman EC, ten Cate JM, Nieuw Amerongen AV. Influence of polymers for use in saliva substitutes on de- and remineralization of enamel in vitro. *Caries Res*. 1997;31(3):216-23.

Zeczkowski M, Tenuta LM, Ambrosano GM, Aguiar FH, Lima DA. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. *J Dent*. 2015. Sep;43(9):1154-61. doi: 10.1016/j.jdent.2015.06.004.

## APÊNDICE

### Detalhamento das metodologias

#### 1. Delineamento Experimental

Unidades experimentais: 84 fragmentos de dentes bovinos

Fatores em estudo: Agentes clareadores/espessantes

-> Clareamento Caseiro (Peróxido de Carbamida 10% - FGM)

-> Clareamento Caseiro (Peróxido de Carbamida 10% - Ultradent)

-> Clareamento Caseiro (Peróxido de Carbamida 10% + Natrosol – (Gel experimental – Drogal))

-> Carbopol (Drogal)

-> Carbopol+Glicerina (Drogal)

-> Natrosol (Drogal)

-> Sem Tratamento

Variável de resposta:

->Cor

->Rugosidade superficial

->Microdureza

->Microscopia de Força Atômica

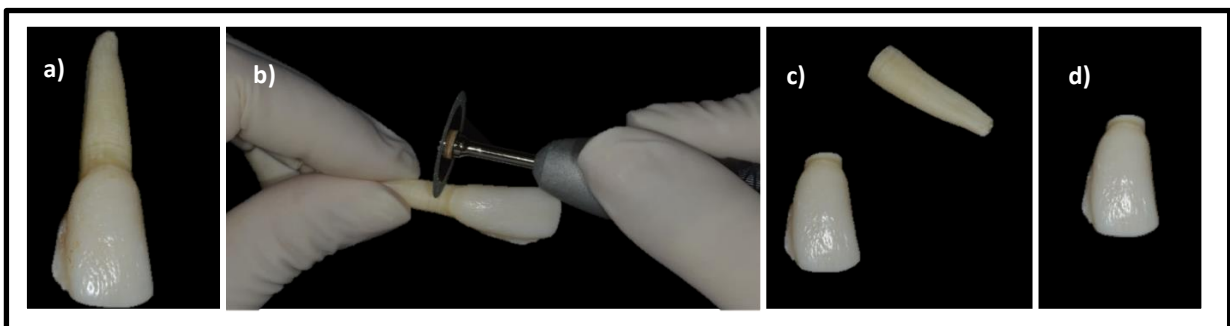
**Tabela I.** Grupos de estudo:

Grupos	Tratamentos
G1	<b>Peróxido de Carbamida 10% - FGM</b>
G2	<b>Peróxido de Carbamida 10% - Ultradent</b>
G3	<b>Peróxido de Carbamida 10% + Natrosol (Gel experimental – Drogal)</b>
G4	<b>Carbopol (Drogal)</b>
G5	<b>Carbopol+Glicerina (Drogal)</b>
G6	<b>Natrosol (Drogal)</b>
G7	<b>Sem tratamento (grupo controle)</b>

## 2. Preparo dos espécimes:

Para a realização desse estudo, foram utilizados dentes bovinos (84) que, após a sua extração foram armazenados em solução aquosa (água destilada) de timol 0,1% (Dinâmica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) tamponado. Após a desinfecção, os dentes foram submetidos à raspagem manual com cureta periodontal para remoção de debris orgânicos e profilaxia com taças de borracha, e pasta de pedra-pomes (Maquira Dental Products, Maringá, PR, Brasil) e água. Os dentes foram examinados sob lupa (Zeiss- Carl Zeiss do Brasil) com aumento de quatro vezes para verificar presença de trincas, rachaduras ou manchamento, que eventualmente poderiam influenciar nos resultados deste estudo. Em seguida, esses dentes foram armazenados, em água destilada sob refrigeração, até o momento da sua utilização. Após a seleção dos dentes, a coroa foi separada da raiz com uso de disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) acoplado a contra ângulo em baixa rotação sob irrigação constante, à 2 mm da junção cimento-esmalte (Figura 1).

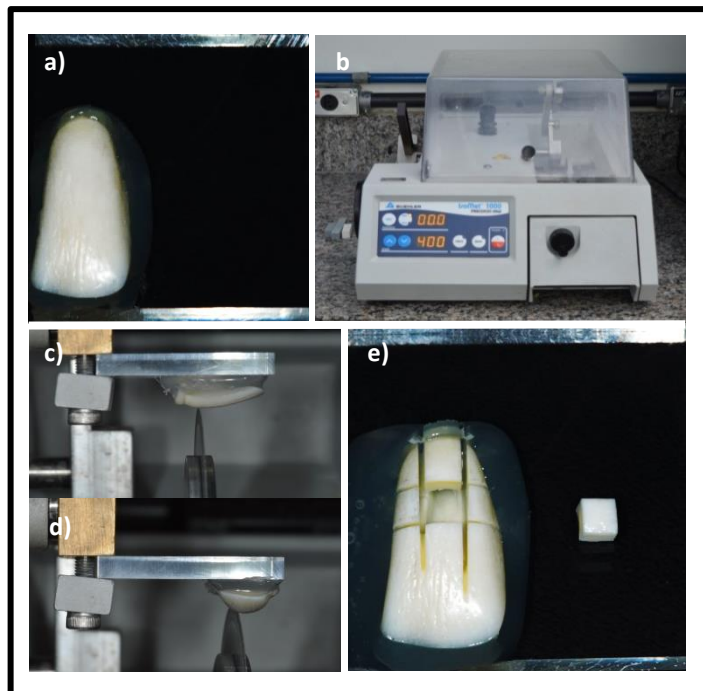
Figura 1: a) dente bovino; b) separação coroa/raiz; c) coroa e raiz separada e d) coroa



### 3.Confecção dos espécimes:

Para obtenção dos espécimes, a porção coronária foi fixada na placa de acrílico com cola quente (Figura 2.a) e foram obtidos blocos de dentes através de um disco de corte diamantado (Extec Dia. Wafer Blade 102 x 0,3 x 12,7mm) acoplado em uma Cortadeira Metalográfica (Isomet 1000, Buehler Ltda. Lake Buff, IL, USA) (Figura 2.b). As amostras foram seccionadas em dois cortes no sentido méso-distal (Figura 2.c) e dois cortes no sentido cervicoincisal (Figura 2.d), obtendo-se 1 bloco de cada dente da região mesio-cervical da coroa (Figura 2.e). Sendo assim, foram obtidos, das superfícies vestibulares dos dentes bovinos, blocos com 16 mm<sup>2</sup>.

**Figura 2:** a) coroa fixada em placa de acrílico; b) cortadeira; c) corte mesiodistal; d) corte cervicoincisal e e) bloco 4x4mm confeccionado.



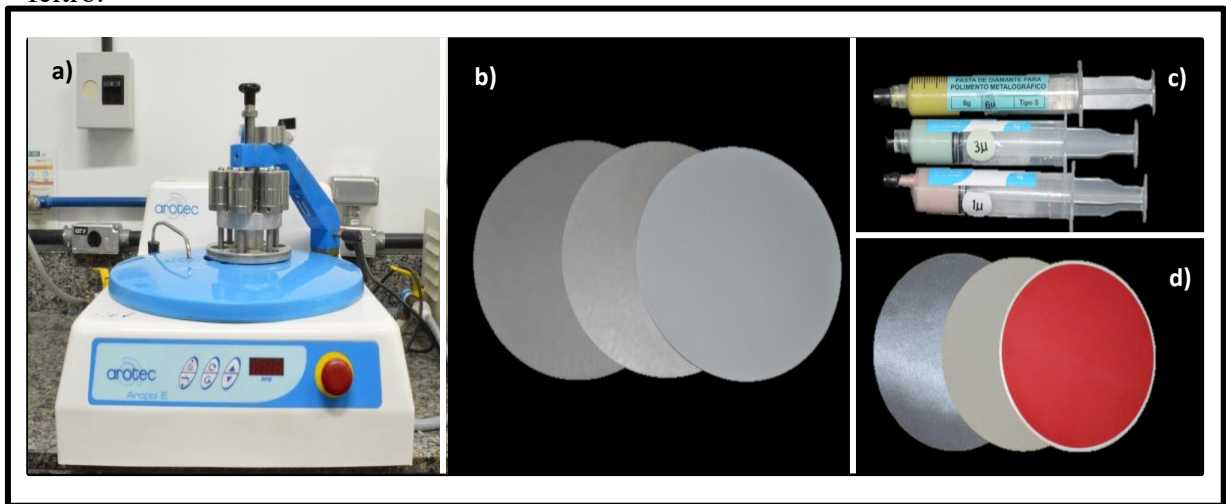
Para planificação, regularização e polimento da superfície de esmalte, os espécimes foram posicionados em discos de acrílico de forma que a superfície do esmalte ficou paralela à base do disco, permitindo assim, o posicionamento do conjunto (espécime e disco de acrílico) paralelamente à superfície da lixa ou feltro utilizado.

Para essa etapa, foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação decrescente (#1200, #2500 e #4000 – Carborundum Abrasivos, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3.b) acoplados à politriz (Arotec Ind. Com., Cotia, SP, Brasil) (Figura 3.a), sob



constante refrigeração com água, até se obter a altura do bloco, e feltros (TOP, RAM e SUPRA - Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3.d), associados às pastas diamantadas metalográficas (6  $\mu\text{m}$  – TOP, 3  $\mu\text{m}$  – RAM, 1  $\mu\text{m}$  – SUPRA - Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3.c), juntamente com o lubrificante específico (Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil), também acoplados a politriz giratória (Aropol E, Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil). Entre cada etapa de planificação e polimento, bem como ao final desta etapa, as espécimes foram lavadas com água destilada em cuba ultrassônica (Figura 4) (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) para que fossem removidos quaisquer debris presentes na superfície de esmalte.

**Figura 3:** a) Politriz; b) lixas de carbetto de silício; c) pastas diamantadas e d) discos de feltro.



**Figura 4:** Cuba ultrassônica para lavagem dos espécimes



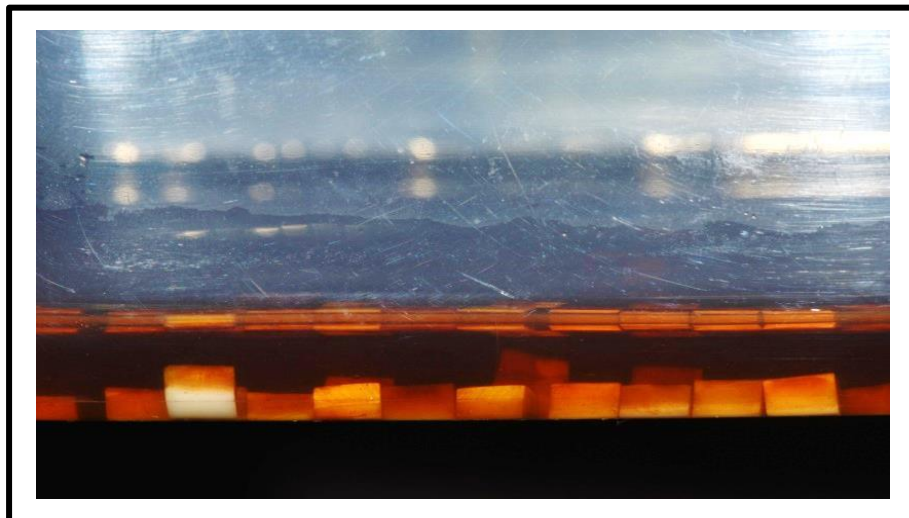
Figura 5: Espécimes após planificação e polimento.



#### 4. Protocolo para manchamento:

O manchamento dos espécimes foi realizado através de imersão dos mesmos em solução de chá preto (Figura 6), a qual foi trocada a cada 24 horas, por 6 dias, permanecendo em contato com o esmalte e a dentina durante todo o tempo. A solução de chá foi produzida a partir de 100 ml de água destilada fervida por 5 minutos, em seguida, misturada a 1,6g de chá preto (Leão Junior S.A., Curitiba, PR, Brasil) em infusão por 5 minutos. Após os 6 dias de imersão na solução, as amostras foram armazenadas em saliva artificial, na qual foi trocada todos os dias por 14 dias até a estabilização de cor das amostras.

Figura 6: Espécimes imersos em solução de chá preto.



Após finalizar a estabilização de cor, cada espécime recebeu uma marcação, com broca esférica nº 1012 (KG Sorensen) em uma das suas faces laterais, para padronizar o posicionamento da amostra durante a leitura com o espectrofotômetro.

### **5. Esterilização dos espécimes:**

Por ser um estudo *in situ*, os espécimes foram esterilizados (Figura 7) com óxido de etileno, pela empresa Acecil - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, previamente à confecção dos dispositivos intra-bucais.

Figura 7: Espécimes esterilizados.



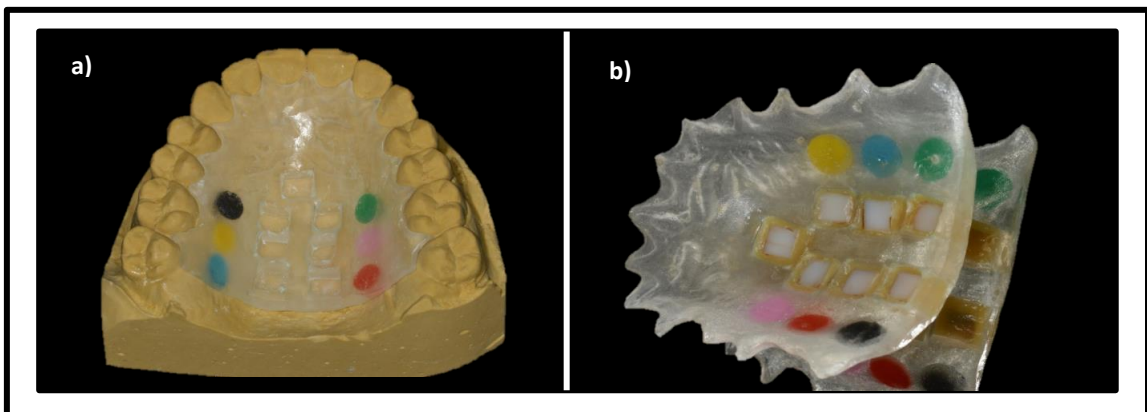
### **6. Seleção dos voluntários:**

Doze voluntários, seis do sexo feminino e seis do sexo masculino, com faixa etária estimada de 24-28 anos, estudantes de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/Unicamp foram convidados para participar da pesquisa, tanto para utilizarem o dispositivo intrabucal. Os critérios de inclusão foram: fluxo salivar normal, medido através de sialometria, e ausência de cárie e/ou doença periodontal. Os critérios de exclusão foram: paciente sem uso de dispositivos ortodônticos, em uso de medicamentos que interferem no fluxo salivar, pacientes fumantes e com presença de prótese fixa ou removível. Todos os detalhes sobre o estudo foram esclarecidos pelos pesquisadores previamente à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## 7. Confeção do dispositivo intrabucal:

Os voluntários tiveram a arcada dental superior moldada com alginato (Hydrogum – Zhermack, Badia Polesine, Itália) e os modelos foram confeccionados em gesso-pedra Tipo IV (Asfer – Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP) (Figura 8.a). Os dispositivos intrabucais palatinos foram confeccionados em resina acrílica autopolimerizável (Figura 8.b). Durante a confecção do aparelho, foram posicionados no modelo de gesso, blocos de silicone (4 mm x 4 mm x 2,5 mm) a fim de proporcionar as lojas necessárias à inserção dos blocos dentários. Cada placa continha nichos para 7 blocos, que foram utilizados para um bloco de cada grupo que foi submetido à exposição da salivar, sendo que os grupos ficaram em posições diferentes em cada paciente, devido a localização dos ductos salivares da glândula parótida. Os espécimes foram fixados com cera pegajosa (ASFER – Indústria Química Ltda). As placas foram adaptadas em cada voluntário, de forma que a superfície de cada corpo de prova ficasse em contato com o ambiente bucal.

Figura 8: a) Modelo de gesso com dispositivo intra oral e b) dispositivo intra oral



Previamente ao início desta etapa experimental *in situ*, foram realizadas profilaxia e instrução de higiene oral ao voluntário e para cada um, foi distribuído uma escova dental (Oral-B Indicator) e um dentífrício (Colgate), que foram usados durante todo o experimento. O dispositivo foi utilizado pelos pacientes durante todo o dia, retirando-o apenas durante as refeições, ingestão de líquidos (exceto água) e higienização. Durante esse período, os dispositivos foram armazenados em recipiente com gaze embebida em água, que foram fornecidas aos voluntários. Os voluntários foram orientados a não submeter o dispositivo com os espécimes em soluções contendo flúor nem escovar os espécimes com escova dental e

dentífrício. Os dispositivos foram higienizados a cada 12 horas, durante todo o experimento, com água e escova dental sem dentífrício.

### **8. Protocolo do clareamento dental:**

O dispositivo intrabucal permaneceu durante um dia na boca do voluntário, previamente aos inícios dos tratamentos clareadores, para a formação de película adquirida.

Removido o dispositivo da boca do voluntário e seco com papel absorvente, os espécimes foram submetidos ao tratamento clareador à base de peróxido de carbamida a 10% com carbopol (FGM), peróxido de carbamida 10% com carbopol e glicerina (Ultradent), peróxido de carbamida a 10% com natrosol (Gel experimental), apenas com o gel de carbopol, com o gel de carbopol+glicerina e apenas com gel de natrosol (Figura 9) e sem nenhum tratamento. Foi realizada uma sessão de tratamento clareador por dia, durante 14 dias. Os voluntários foram calibrados para a aplicação do gel, e o mesmo foi aplicado, de acordo com as recomendações do fabricante, na superfície de esmalte (Figura 10.a) e permaneceu em contato com o mesmo por 4 horas, em temperatura ambiente. O dispositivo foi mantido em um aparato contendo água, durante o tratamento, para os espécimes não sofrerem desidratação, porém, sem contato com a superfície que contém o gel. Após cada aplicação, foi feita a remoção do gel com hastes flexíveis com ponta de algodão (Figura 10.b), e em seguida eles foram lavados com água (Figura 10.c) e o dispositivo retornou a boca do paciente (Figura 11).

Figura 9: Géis utilizados para aplicação nos espécimes





Figura 10: a) Aplicação do gel com aplicador descartável; b) Remoção do gel com hastes flexíveis de algodão e c) Lavagem dos espécimes em água corrente.

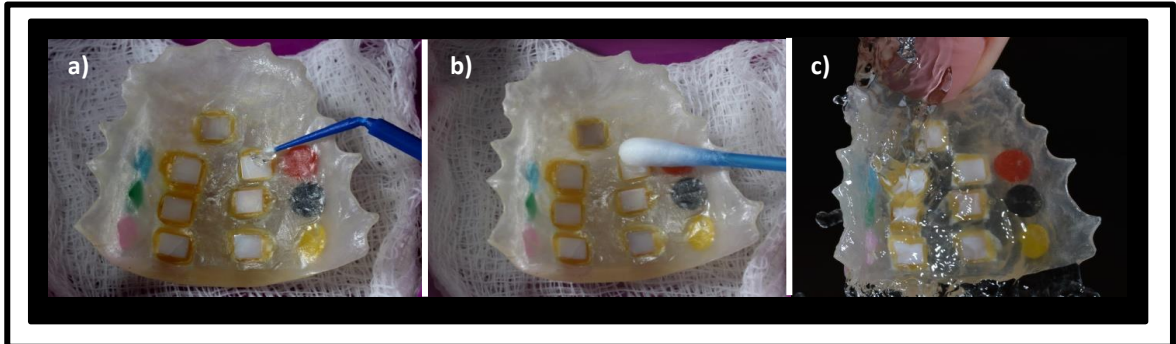


Figura 11: Dispositivo sendo colocado na boca do voluntário.

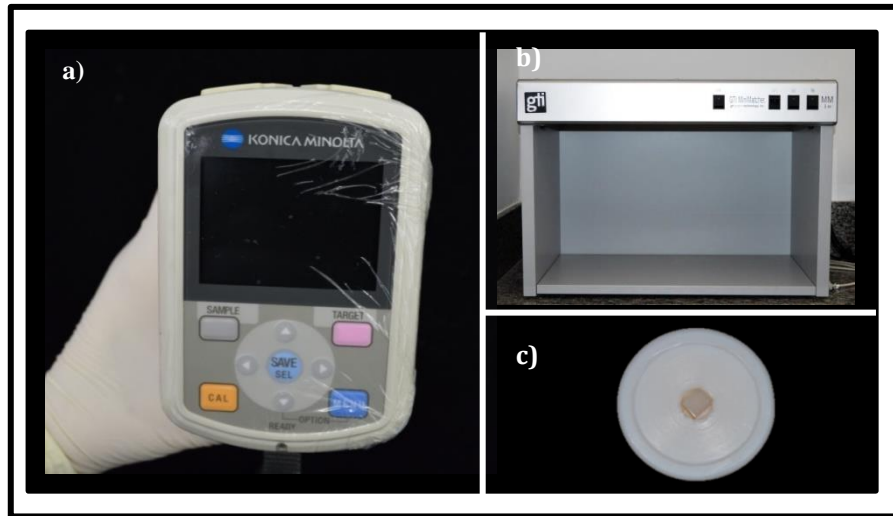


## 9. Análises:

### 9.1. Cor:

Para a realização das leituras de cor, os espécimes foram posicionados em um dispositivo de teflon (porta amostra) (Figura 12.c) dentro de uma Câmara de luz (GTI, Newburgh, NY, USA) (Figura 12.b), com o intuito de padronização do ambiente. O equipamento utilizado para a leitura de cor foi um espectrofotômetro (Konica Minolta CM-700d) (Figura 12.a) previamente calibrado. As leituras foram realizadas nos tempos: inicial e 24 horas após o final do tratamento.

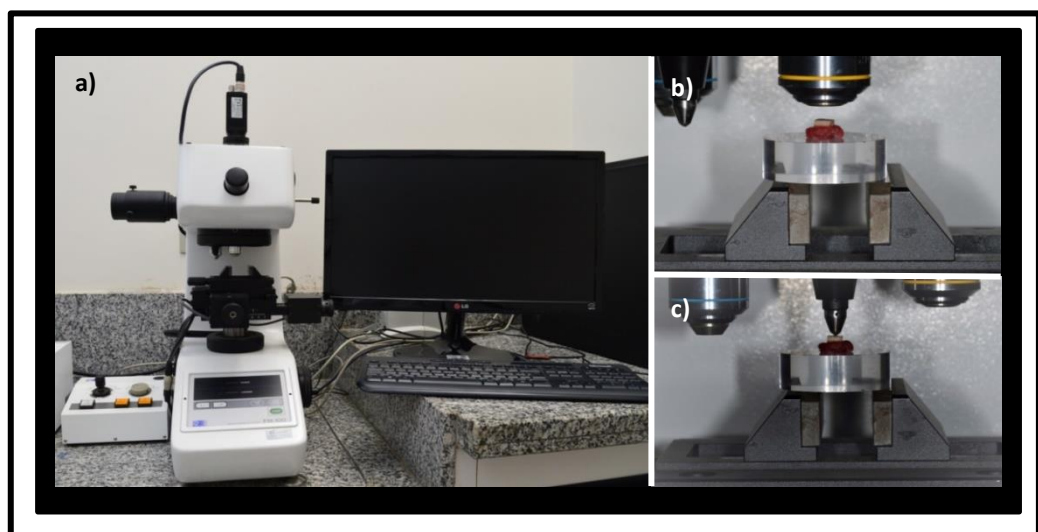
Figura 12: a) Espectrofotômetro; b) Câmara de luz e c) Espécime posicionado dispositivo de teflon para leitura de cor.



## 9.2. Microdureza:

A análise de microdureza superficial do esmalte foi realizada por meio de microdurômetro com indentador Knoop (Shimadzu HMV-2000, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) (Figura 13-a), com carga estática de 50 gramas por 5 segundos. Foram realizadas cinco indentações com distância 100  $\mu\text{m}$  entre elas, na região central dos espécimes (Figura 13.b-c). As leituras foram realizadas após tratamento.

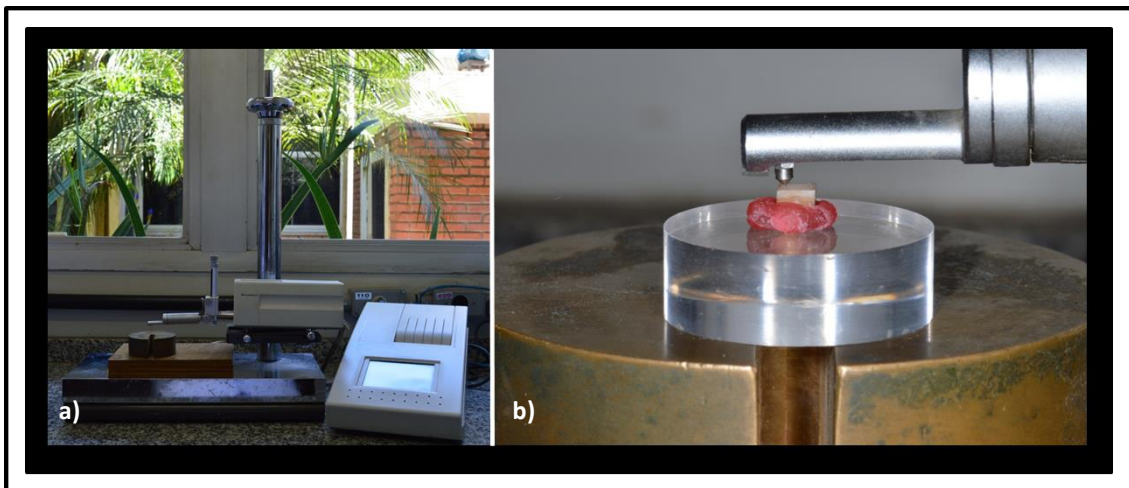
Figura 13: a) Microdurômetro; b) Posicionamento do espécime em lente objetiva e c) Espécime posicionado para leitura.



### 9.3. Rugosidade:

A análise da rugosidade superficial foi avaliada através de um rugosímetro Mitutoyo Surftest 211 (São Paulo Brasil) (Figura 14.a). Foram realizadas três leituras em diferentes direções em cada espécime de cada grupo nos tempos: inicial e após o tratamento. Os valores obtidos foram calculados a partir da média das três leituras, da seguinte forma: o rugosímetro devidamente calibrado para a leitura no padrão Ra, realizou 3 leituras. Os espécimes foram marcados em três pontos equidistantes para a leitura da rugosidade. Essas três leituras foram efetuadas sempre com a ponta do rugosímetro passando pelo centro geométrico do espécime, estando ela em três posições diferentes (Figura 14.b). Assim a média das três leituras foi considerada a rugosidade média (Ra) de cada superfície.

Figura 14: a) Rugosímetro; b) Espécime posicionado para leitura.



### 9.4. Microscopia de Força Atômica:

Para análise qualitativa da superfície, duas amostras de cada grupo foram escolhidas aleatoriamente após cada tratamento. Para tanto, as amostras foram lavadas em banho ultrassônico e secadas em papel absorvente. Em seguida, as amostras foram fixadas com auxílio de cera utilidade e acoplada no microscópio de força atômica (Easy Scan 2, Nano surf, Boston, MA, EUA) (Figura 15). Assim, imagens topográficas em 3D de tamanho  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  foram obtidas para cada grupo.



Figura 15: Microscópio de Força Atômica



## ANEXO 1

	<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> <b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</b> <b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b>	
<h2>CERTIFICADO</h2>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação das propriedades físicas do esmalte, quando submetido ao clareamento dental caseiro com diferentes espessantes: estudo in situ", <b>CAAE – 53165116.1.0000.5418</b>, dos pesquisadores <b>BRUNA GUERRA SILVA</b> e <b>DÉBORA ALVES NUNES LEITE LIMA</b>, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 08/03/2016.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "Evaluation of enamel physical properties when submitted to at-home tooth bleaching with different thickeners: in situ study", <b>CAAE – 53165116.1.0000.5418</b>, of <b>BRUNA GUERRA SILVA</b> and <b>DÉBORA ALVES NUNES LEITE LIMA</b>, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Mar 08, 2016.</p>		
 <b>Prof. Jacks Jorge Junior</b> Coordenador CEP/FOP/UNICAMP		
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.          Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>		

## ANEXO 2

### COMPROVANTE DE ENCAMINHAMENTO DO ARTIGO

**De:** "Journal of Dentistry" <[eeserver@eesmail.elsevier.com](mailto:eeserver@eesmail.elsevier.com)>

**Assunto:** Submission Confirmation for Journal of Dentistry

**Data:** 13 de janeiro de 2017 22:25:29 BRST

**Para:** [dalima@unicamp.br](mailto:dalima@unicamp.br)

**Responder A:** "Journal of Dentistry" <[JoD@elsevier.com](mailto:JoD@elsevier.com)>

Dear Dr. Lima,

Your submission entitled "Evaluation of the physical properties of enamel submitted to at-home bleaching with different thickeners: an in situ study" has been received by the Journal of Dentistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jjod/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Dentistry