

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE AGENTES CLAREADORES
EXTERNOS EM SUBSTRATO DENTAL BOVINO E HUMANO**

LISIANE MARTINS FRACASSO

Porto Alegre
2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE AGENTES CLAREADORES EXTERNOS
EM SUBSTRATO DENTAL BOVINO E HUMANO**

LISIANE MARTINS FRACASSO

Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota

Materiais Dentários

Porto Alegre

2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE AGENTES CLAREADORES EXTERNOS
EM SUBSTRATO DENTAL BOVINO E HUMANO**

LISIANE MARTINS FRACASSO

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração em Materiais Dentários, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Materiais Dentários

Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota

Porto Alegre

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Eloi e Sonia**, por me ensinarem que só existe um
caminho que merece ser seguido: o que faz feliz;

Às minhas irmãs e melhores amigas **Anelise e Laís**, por estarem
sempre ao meu lado;

Ao meu marido, **Renato Roncato Filho**, meu grande
incentivador, por me apoiar em todas as minhas escolhas.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota**, por todos esses anos de ensinamentos. Agradeço pelos conselhos, incentivo, disponibilidade e amizade.

Admiro-te pela dedicação e amor à Odontologia
Muito obrigada por tudo.

Às minhas colegas e amigas, **Laura Smidt Nunes** e **Camila Francine Maia**, por terem dividido comigo muitos e muitos momentos de sangue, suor e risadas. Vocês foram e sempre serão muito especiais para mim.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Reitor, Prof. Dr. Joaquim Clotet.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Spohr.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores do programa de pós-graduação, Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber, Prof^a. Dr^a. Maria Martha Campos, Prof^a. Dr^a. Rosemary Sadami Arai Shinkai, Prof. Ari Tietzmann e Prof. Dr. Luiz Henrique Burnett Junior pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de pós-graduação, Augusto Wingert, Carlos José Petry Filho, Cláudia Freitas de Moura Modena, Daniele Morosini Costa, Deborah Stona, Dimas João Rodrigues Neto, Duziene Denardini Pereira, Fernanda Borguetti Manfroi, Helena Fetter Filippini, Heloisa Pressi, Heloisa Costa, Ivana Agnoletto Souza, Juliana Doncatto Bettinelli, Leonardo de Cesero, Lígia Maria Nogarett, Mariana Roennau Lemos Rinaldi, Mariá Bellan, Tamara Paludo, Thayana Salgado de Souza, Vania Stephanie Sanchez Gamarra e Maurem Leitão Marcondes, por dividirem as alegrias e experiências nas aulas e laboratórios da vida acadêmica.

Aos meus cunhados, Mathias Friedrich e Vicente Eggers, pela paciência, parceria e por serem tão especiais.

Aos meus tios e primos, por dividirem experiências acadêmicas e estarem sempre disponíveis para encontros e alegrias.

Aos meus amigos, Aline Grangeiro Pilger, Tatiana Melo Campos, Daniela Robinson Araujo, Kelli Cristina Marcos, Luciana Munaro da Silveira, Roberta Chequeller de Almeida Antonelli, Carolina Marques, Diogo Preto, Daiane Borges, Bruna da Rosa, Jorge Gadelha, Daiana Bottcher, Mariele Mildner por apoiarem, auxiliarem, incentivarem e compreenderem a minha ausência em diversos momentos.

Aos meus sogros, Renato e Claudete e à Aline e Cássio, pelos jantares que ajudaram na inspiração para escrever esta tese.

Ao funcionário do laboratório de Materiais Dentários, Antônio Carlos Teixeira Miranda por não medir esforços para auxiliar nas pesquisas.

Aos funcionários do Centro de Microscopia e Microanálises, Gustavo Gonçalves, Leandro Menezes Baum e Wagner Prates, pela atenção, dedicação e disponibilidade prestadas durante meu doutorado.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Davenir, Gabriel, Kléber e Vanessa por serem sempre solícitos e atenciosos.

A todas as pessoas que contribuíram de maneira direta ou indiretamente para realização deste estudo.

Muito obrigada!

“...fazer uma experiência com algo significa que algo nos acontece, nos alcança; que se apodera de nós, que nos tomba e nos transforma. Quando falamos em “fazer” uma experiência, isso não significa precisamente que nós a façamos acontecer, “fazer” significa aqui: sofrer, padecer, tomar o que nos alcança receptivamente, aceitar, à medida que nos submetemos a algo. Fazer uma experiência quer dizer, portanto, deixar-nos abordar em nós próprios pelo que nos interpela, entrando e submetendo-nos a isso. Podemos ser assim transformados por tais experiências, de um dia para o outro ou no transcurso do tempo”.

Martin Heidegger, 1987.

RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito de agentes clareadores externos em esmalte dental bovino e humano. Foram avaliados diferentes produtos disponíveis comercialmente para realização de clareamento dentário: cremes dentais clareadores e géis de peróxido de carbamida e hidrogênio utilizados na técnica caseira, supervisionada pelo cirurgião-dentista. A ação dos cremes dentais clareadores foi avaliada em dois diferentes substratos: esmalte dental humano e bovino. Devido às diferenças nos protocolos de aplicação dos produtos clareadores e nas metodologias dos estudos, estes foram divididos em três capítulos:

Capítulo 1:

Artigo 1: Avaliação do efeito de diferentes cremes dentais clareadores na rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário bovino.

Capítulo 2:

Artigo 2: Avaliação do efeito de diferentes cremes dentais clareadores na rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário humano.

Capítulo 3:

Artigo 3: Análise da alteração de cor, rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário bovino submetido a diferentes agentes clareadores caseiros.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of external bleaching agents in bovine and human dental enamel. There were evaluated different products commercially available for performing tooth whitening: whitening toothpastes and carbamide peroxide gels and hydrogen used in at-home technique, supervised by the dentist. The action of the dental bleaching creams was evaluated in two different substrates: human and bovine dental enamel. Due to differences in application protocols of bleaching products and methodologies of the studies, these were divided into three chapters:

Chapter 1:

Article 1: Effect of different whitening toothpastes on the roughness and surface topography of dental enamel.

Chapter 2:

Article 2: Effect of different whitening toothpastes on the roughness and surface topography of human tooth enamel.

Chapter 3:

Article 3: Analysis of color change, surface roughness and topography of bovine dental enamel submitted to different home bleaching agents.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Artigo 1

Figura 1 – Desenho esquemático da preparação da amostra.....	20
Figura 2 – Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura	27
Figura 3 – Imagens obtidas pela Microscopia de Força Atômica	29

Capítulo 2

Artigo 2

Figura 1 – Desenho esquemático da preparação da amostra.....	40
Figura 2 – Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura	48
Figura 3 – Imagens obtidas pela Microscopia de Força Atômica	50

Capítulo 3

Artigo 3

Figura 1 – Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura	72
Figura 2 – Imagens obtidas pela Microscopia de Força Atômica	73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Artigo 1

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa	21
Tabela 2 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais, intermediárias e finais de cada grupo.	25

Capítulo 2

Artigo 2

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa	42
Tabela 2 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais, intermediárias e finais de cada grupo.....	46

Capítulo 3

Artigo 3

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa	66
Tabela 2 – Médias e (DP) para ΔE , ΔL , Δa , Δb de cada grupo	70
Tabela 3 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais e finais de cada grupo.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δ - Delta

μm - micrômetros

CAPES - Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior

CCE-FOPUCRS - Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

$\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$ - fórmula química do peróxido de carbamida

CIE / Lab - Comissão Internacional da Iluminação / L - luminância, a, b - gamas de cores que vão respectivamente do verde ao vermelho e do azul ao amarelo

DP - desvio padrão

Dr. - doutor

et al - el alii (e outros)

EUA - Estados Unidos da America

g - grama

H_2O_2 - fórmula química do peróxido de hidrogênio

HO - hipótese nula

Ltda - limitada

mA - miliAmpère

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MFA - Microscopia de Força Atômica

min - minutos

mL - mililitros

mm - milímetros

n - tamanho amostral

p - probabilidade

ppm - parte por milhão

PE- Pernambuco

Prof. - professor

Ra - rugosidade aritmética ou média

rpm - rotações por minuto

RJ – Rio de Janeiro

RS - Rio Grande do Sul

s - segundos

SC - Santa Catarina

SP - São Paulo

t - tempo

x - magnificação

α - nível de significância

SUMÁRIO

INTROUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	16
ARTIGO 1	16
Resumo	16
Palavras-chave	17
Introdução	17
Materiais e métodos	19
Resultados	25
Discussão	30
Conclusões	32
Referências	32
CAPÍTULO 2	37
ARTIGO 2	37
Resumo	37
Palavras-chave	38
Introdução	38
Materiais e métodos	39
Resultados	46
Discussão	51
Conclusões	53
Referências	53
DISCUSSÃO GERAL	57
CAPÍTULO 3	61
ARTIGO 3	61

Resumo	61
Palavras-chave	62
Introdução	62
Materiais e métodos	64
Resultados	69
Discussão	74
Conclusões	77
Referências	78
REFERÊNCIAS GERAIS	83
ANEXOS	87
Carta de aprovação da CCE-FOPUCRS protocolo # 6231	87
Carta de aprovação da CCE-FOPUCRS protocolo # 6742	88
Carta de envio e número de aprovação do Sistema Nacional de Informação Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - protocolo 50877815.9.0000.5336	89

INTRODUÇÃO GERAL

A cor da coroa dentária é determinada pela tonalidade da dentina que varia de amarelo a marrom e é influenciada pelos matizes azul, verde e rosa que caracterizam o esmalte dentário (WATTS E ADDY, 2001). Além disso, alterações de natureza intrínseca e/ou extrínseca podem determinar modificações nesta coloração.

Fatores extrínsecos estão relacionados à deposição de cromógenos no biofilme ou diretamente sobre a superfície externa dentária. São provenientes da dieta como café, vinho tinto, chá, vegetais; ou devido ao uso de tabaco e medicações (CAREY, 2014).

Em relação às alterações intrínsecas, essas ocorrem quando há a incorporação de pigmentos no interior da estrutura dentária durante a odontogênese, como por exemplo nos casos de fluorose dentária, uso de tetraciclina, desordens hematológicas e fatores genéticos. Posteriormente a erupção dental, necrose pulpar e iatrogenias também podem ocasionar alterações. Além disso, o próprio envelhecimento proporciona modificações na textura e espessura dos tecidos mineralizados do dente. Por fim, a deposição de dentina secundária e terciária também pode determinar escurecimento dental (HATTAB, QUDEIMAT E AL-RIMAWI, 1999; WATTS E ADDY, 2001; SULIEMAN, 2004).

Diferentes técnicas são passíveis de serem realizadas com o intuito de alterar a coloração dentária, como remoção mecânica de manchas superficiais, clareamento dental ou técnicas operatórias que visam bloquear a coloração, parcial ou totalmente, da superfície coronária, como facetas e coroas protéticas. O clareamento dental caracteriza-se por ser uma técnica não invasiva, de baixo custo e relativamente simples (SULIEMAN, ADDY E REES, 2003).

Agentes clareadores podem ser utilizados na superfície externa do dente (clareamento dental vital) e podem apresentar diferentes formulações químicas, concentrações e formas de utilização. A técnica realizada em consultório dentário, por cirurgião-dentista, caracteriza-se

pela utilização de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que variam entre 35 e 38%. Já na técnica supervisionada por cirurgião-dentista, são utilizadas concentrações entre 10 e 22% de peróxido de carbamida ($CH_6N_2O_3$) ou 3 a 14% de peróxido de hidrogênio. Além disso, produtos comercializados diretamente para o público em geral apresentam baixas concentrações de peróxido de hidrogênio ou carbamida e são encontrados em farmácias, supermercados e pela internet (AUSCHILL, HELLWIG E SCHIDALE *et al*, 2005; MEIRELES, HECKMANN E LEIDA *et al*, 2008).

A técnica de clareamento dental caseira, supervisionada por cirurgião-dentista, foi desenvolvida por Klusmier, em 1968. Haywood e Heymann, em 1969, a aperfeiçoaram e introduziram a utilização de peróxido de carbamida a 10% (FEARON, 1993). Atualmente, é vista como o padrão-ouro referente a clareamento dental e proporciona remoção de manchas extrínsecas, bem como alteração da cor intrínseca da estrutura dentária (PACHALY E POZZOBON, 2012).

Nos últimos anos, procedimentos odontológicos estéticos têm recebido uma maior atenção e interesse, assim a demanda por agentes clareadores em diferentes concentrações têm crescido consideravelmente. Além disso, diversos produtos como cremes dentais, anti-sépticos, géis e fitas clareadoras têm surgido (DEMARCO, MEIRELES E MASOTTI, 2009; TORRES, PEROTE E GUTIERREZ *et al*, 2013). Inicialmente, os cremes dentais apresentavam somente abrasivos em suas composições, porém a introdução de peróxido de hidrogênio nas formulações tornou-as mais complexas (SULIEMAN, 2004).

Devido a grande variedade de composição, comercialização (diretamente ao consumidor final e/ou profissional) e diferentes frequências e duração de possíveis técnicas, torna-se importante avaliar possíveis alterações na cor e possíveis efeitos na rugosidade do esmalte. A rugosidade pode ocorrer pela abrasão dental que se refere ao desgaste dos tecidos dentais duros através de fatores mecânicos que não o contato com outro dente, enquanto que

erosão dental está associada ao dano provocado por substâncias químicas ácidas (BARBOUER E REES, 2006).

Estudos *in vitro* que avaliam a influência dos agentes clareadores externos são realizados em esmalte dental bovino (HILGENBERG, PINTO E FARAGO, 2011; TRENTINO, 2015; VIEIRA-JUNIOR, LIMA E TABCHOURY, 2016) e humano (WORSCHER, RODRIGUES E MARTINS, 2006; BOLAY, CAKYR E GURGAN, 2012; ÖZKAN, KANSU E ÖZAK, 2013). Devido à escassez na literatura referente a comparações nos dois substratos, avaliou-se também o efeito em relação a rugosidade superficial e alterações de morfologia em ambos os substratos, quando utilizados cremes dentais clareadores.

ARTIGO 1

Avaliação do efeito de diferentes cremes dentais clareadores na rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário bovino.

RESUMO:

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito de cremes dentais clareadores na rugosidade e topografia superficial do esmalte dentário bovino. Cinquenta e seis amostras foram obtidas de dezenove incisivos bovinos, estas foram polidas e randomizadas em quatro grupos de acordo com o creme dental utilizado ou grupo controle: G1 - Oral B 3D White, G2 - Colgate Luminous White Advanced, G3 - Close Up Diamond Attraction; G4 - água destilada e vaselina (n=14). A rugosidade superficial média (Ra, μm) foi avaliada previamente a escovação simulada (Ra₀), após 30 (Ra₁), 180 (Ra₂) e 365 (Ra₃) dias, respectivamente. Os dados foram submetidos ao teste de Levene e Kolmogorov-Smirnov para avaliação da homogeneidade e normalidade das amostras. Após, os grupos foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni para avaliação intra-grupo e Análise de Variância de dois fatores (grupo e tempo) e Bonferroni para avaliação entre os grupos. Avaliando-se o comportamento intra-grupos, verifica-se que a rugosidade superficial média aumentou em todos os grupos e o comportamento foi similar para os grupos G1, G2 e controle que apresentaram aumento da rugosidade a partir de 30 dias de escovação simulada. Porém, o G3 apresentou comportamento com diferença estatisticamente significativa dos demais. Referente a avaliação entre os grupos, todos os grupos se comportaram como o controle, com exceção do G1 na Ra₂ ($p=0,002$) que se mostrou diferente do controle, porém similar aos demais grupos. Avaliando-se a topografia do esmalte bovino, verifica-se que a mesma sofreu alterações em todos os grupos. Assim, conclui-se que todos os grupos apresentaram aumento da rugosidade com comportamento intra-grupo similar

ao grupo controle, com exceção do G3. Entre os grupos e tempo o comportamento foi similar para todos, com exceção do grupo G1 no tempo Ra₂. Alteração da topografia superficial do esmalte bovino foi verificada nos diferentes grupos em MEV e MFA e a abrasão mecânica ocasionada pela escovação dental simulada é evidenciada em todos os grupos na MFA.

PALAVRAS-CHAVE: Cremes dentais, Escovação dentária, Abrasão dentária, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica

INTRODUÇÃO:

Desde as civilizações antigas verifica-se o interesse por higiene oral e estética odontológica através do desenvolvimento de diferentes instrumentos e técnicas para remoção de placa bacteriana e manchas. Inicialmente, a disponibilidade de conchas, corais, cinza óssea, mármore e pedra-pomes fez com que estes materiais fossem empregados. Nos dias atuais, a associação de dentifrício e escova dental mostra-se como o principal método utilizado para profilaxia dental¹⁻³.

Para promover efeitos terapêuticos e cosméticos, cremes dentais apresentam formulações complexas, compostas por abrasivos, surfactantes, umectantes, gelificantes, flavorizantes, conservantes, corantes, emolientes e adoçantes. Além disso, substâncias terapêuticas como flúor e outras, têm sido incorporadas a estes produtos com o intuito de prevenir mal hálito, cárie, gengivite, placa bacteriana, cálculo dental, desmineralização e hipersensibilidade dentinária⁵.

Substâncias abrasivas são os componentes mais antigos incorporados aos cremes dentais e são responsáveis pela remoção de manchas extrínsecas, placa bacteriana e restos alimentares

da superfície dentária. Caracterizam-se por serem insolúveis em água e por não influenciarem diretamente na cor intrínseca do dente. As mais utilizadas em dentifrícios são as sílicas, óxidos metálicos, fosfatos, carbonatos e silicatos⁶. Contudo, apresentam eficiência restrita às áreas de acesso da escova dentária, assim regiões interproximais, cervicais e acometidas por mal posicionamento dentário recebem efeito limitado⁷.

Deste modo, substâncias químicas como surfactantes, peróxidos, enzimas, citratos, pirofosfatos, e hexametáfosfato têm sido incorporadas à formulação para prevenir e remover manchas, além de promoverem alteração da cor intrínseca da estrutura dentária^{7,8}. Estes produtos foram denominados cremes dentais clareadores e foram introduzidos recentemente no mercado.

Devido às variações nas composições químicas dos cremes dentais, como diferentes estruturas cristalinas, clivagem, friabilidade e dureza, bem como concentração, forma, distribuição, tamanho e características superficiais das partículas⁶, torna-se importante compreender possíveis efeitos que estes produtos podem produzir na estrutura dental, já que se encontram disponíveis comercialmente e podem ser utilizados sem recomendação ou supervisão de um cirurgião-dentista.

Além disso, estudos prévios demonstraram que a associação de dentes clareados com peróxido de hidrogênio ou carbamida e posterior realização de escovação simulada causou alterações no esmalte dentário^{9,10}. Assim, considerando a incorporação de peróxido de hidrogênio e/ou outras substâncias químicas clareadoras no creme dental, o presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos que estas associações podem produzir no esmalte dental bovino.

As hipóteses nulas testadas neste estudo são: (H₀₁) que os diferentes cremes dentais clareadores não alteram a rugosidade superficial do esmalte bovino após diferentes tempos de

escovação dentária simulada; (H₂O₂) os diferentes cremes dentais clareadores produzem o mesmo comportamento em relação as possíveis alterações superficiais na estrutura dentária; (H₂O₃) a topografia superficial do esmalte dentário bovino mantém-se inalterada quando utilizados diferentes cremes dentais;

MATERIAIS E MÉTODOS:

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob número 6231/2015.

Confecção das amostras:

Dezenove incisivos bovinos foram coletados logo após o abate dos animais para a indústria alimentícia. Com um disco diamantado flexível de dupla face (7000 rpm - KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) e irrigação constante, as raízes foram separadas das coroas dentárias e descartadas conforme figura 1 - 1A. Três blocos contendo esmalte e dentina foram removidos do terço médio de cada coroa (figura 1 - 1B; 1C). Os espécimes foram mantidos em solução de timol 0,1% por 24 horas e posteriormente mantidos em saliva artificial por uma semana sendo trocada diariamente. No total, cinquenta e seis amostras de 4x4x3mm¹¹ foram obtidas. Estas amostras foram avaliadas com magnificação de 30x sob microscopia óptica VZM-200 (Caltex, Irvine, California, EUA) e as que apresentavam trincas ou outros defeitos foram descartadas. As amostras selecionadas foram incluídas em resina composta, com a utilização de uma matriz, mantendo-se a superfície vestibular 1mm acima da altura da resina composta (figura 1 - 1D).

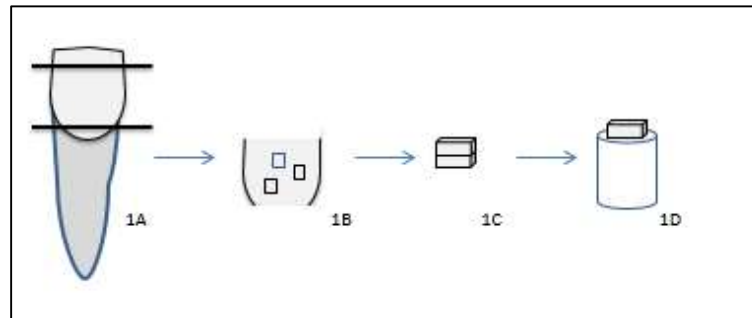


Figura 1 – Desenho esquemático da preparação da amostra: 1A: Remoção da porção radicular e terço incisal coronário; 1B e 1C: Três blocos contendo esmalte e dentina foram removidos do terço médio de cada coroa; 1D: As amostras selecionadas foram incluídas em resina composta, com a utilização de uma matriz, mantendo-se a superfície vestibular 1mm acima da altura resina composta.

A superfície de esmalte foi polida utilizando-se lixas d'água de granulação de 600, 1200 e 2400¹⁰ numa politriz horizontal Struers (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) por 20 segundos cada¹¹. Pastas diamantadas com 6, 3, 1 e 0,25 μm (Arotec, Cotia, SP, Brasil) e feltro foram utilizados para proporcionar um polimento adicional¹². As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com o creme dental utilizado e um grupo controle (n=14) conforme tabela 1.

Material	Fabricante	Princípio ativo	Outros componentes
G1 - Oral-B 3D White	Procter & Gambler do Brasil S.A., Seropedica, RJ, Brasil	Fluoreto de sódio (1450ppm de flúor) e pirofosfato dissódico	Água, sílica hidratada, sorbitol, lauril sulfato sódico, aroma, hidróxido de sódio, goma de celulose, Mica CI 77891, polietileno, corante artificial Blue 1 Lake, sacarina sódica, goma xantana, carbomêro e limoneno
G2 - Colgate Luminous White Advanced	Colgate Palmolive S.A., San José Iturbide, Guanajuato, México	Peróxido de hidrogênio 1% e monofluorfosfato de sódio 0,76% (1000 ppm)	Propileno glicol, pirofosfato de cálcio, glicerina, PEG/PPG-116/copolímero 66, PEG-12, PVP-peróxido de hidrogênio, PVP, sílica, aroma. pirofosfato tetrassódico, lauril sulfato de sódio, pirofosfato dissódico, sacarina sódica, sucralose, BHT, eugenol
G3 - Close-Up Whitening Diamond Attraction	Unilever Brasil LTDA, Ipojuca, PE, Brasil	Fluoreto de sódio (1450ppm de flúor)	Sorbitol, água, sílica hidratada, PEG-32, lauril sulfato sódico, aroma, mica, goma de celulose, sacarina, fosfato trissódico, sacarina sódica, copolímero PVM/MA, CI 74160, acetato de tocoferol, limoneno
G4 - Controle - Vaselina sólida	Farmax, Divinópolis, MG, Brasil	Petrolato	

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa.

Após o polimento, todas as amostras foram colocadas em lavadora ultrasônica L100 (Schuster, Santa Maria, RS, Brasil) por 10 minutos, com água destilada, antes da avaliação da rugosidade superficial inicial.

Rugosidades superficiais médias iniciais (R_{a0}):

A aferição da rugosidade superficial inicial (R_a , μm) foi realizada com um rugosímetro digital SJ 201 (Mitutoyo Surfest Analyzer, Toquio, Japão). Para realizar a leitura da rugosidade, a ponta diamantada do rugosímetro percorreu a superfície de 1,25 mm (*reading length*), com 0,25 mm de comprimento de amostragem (*cutoff*), com uma velocidade constante de 0,1 mm/s¹². A rugosidade superficial de cada amostra foi determinada através da média aritmética obtida de 3 medições consecutivas (R_{a0}), realizadas em diferentes regiões de cada amostra.

Escovação simulada:

Uma marcação foi realizada com ponta diamantada esférica 1010 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) e caneta de alta-rotação (Kavo Joinville, SC, Brasil) na resina composta de cada corpo de prova para determinar que a escovação simulada fosse realizada sempre no mesmo sentido. A escovação foi realizada em máquina de escovação simulada desenvolvida pelo Instituto Ideia da PUCRS. Cada corpo de prova foi fixado no orifício da placa acrílica com auxílio de cera utilidade, permanecendo 1mm acima da superfície da placa de acrílico. Cada placa foi introduzida no reservatório de acrílico, no qual foi adicionado 1g de creme dental, aferido em balança de precisão AG204 (Mettler-Toledo, Greifensee, Suíça) para 1mL de água destilada, utilizando seringa descartável de 5mL Luer Slip (Descarpack, São Paulo, SP, Brasil)¹². O reservatório de acrílico é fixado à máquina de escovação por parafusos metálicos. Escovas de cerdas de *nylon* macias Colgate Essencial Care Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizadas com a aplicação de 200g de carga e velocidade de 250 ciclos por

minuto¹³. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de escovação: 825, 5.000 e 10.000¹² que representam aproximadamente 30 (t_1), 180 (t_2) e 365 (t_3) dias de escovação.

Após cada ciclo de escovação, as amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em lavadora ultrassônica por 10 minutos para posterior avaliação da rugosidade superficial média.

Rugosidades superficiais médias intermediárias e finais (Ra_1 , Ra_2 e Ra_3):

As rugosidades superficiais médias intermediárias e finais foram reavaliadas nos tempos t_1 , t_2 e t_3 gerando as rugosidades Ra_1 , Ra_2 e Ra_3 . Estas rugosidades foram avaliadas no sentido perpendicular ao sentido realizado pelas cerdas das escovas dentais durante a escovação, verificados através da marcação realizada previamente. As medições das rugosidades superficiais intermediárias e finais foram realizadas da mesma forma que as iniciais (Ra_0).

Uma amostra de cada grupo não foi submetida à escovação (t_0) para ser avaliada na Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo. Em cada tempo (t_1 , t_2 , t_3) uma amostra também foi removida com a mesma finalidade. Assim, um total de 14 amostras foram designadas para cada grupo, porém devido a remoção sequencial para análise de topografia (Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo), foram mantidas sempre as mesmas 10 amostras ($n=10$)⁸ para análise da rugosidade superficial média, ou seja, a mesma amostra foi avaliada nos diferentes tempos, caracterizando uma análise de medidas repetidas.

Topografia superficial do esmalte:

Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV):

Uma amostra de cada grupo foi utilizada nos diferentes tempos (t_0 , t_1 , t_2 , t_3) de escovação simulada para avaliação da topografia da superfície do esmalte. As amostras foram secas com leves jatos de ar, fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas através da deposição de íons de

prata (100 segundos, 60mA) através da utilização de um dispositivo de pulverização catódica (Bal-Tec SCD 005, Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha). Todas as imagens foram obtidas com a mesma magnificação (5000x) e escala de 30 μm em Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM, Inspeccionar F50, FEI, Hillsboro, OR, Estados Unidos da America).

Microscopia de Força Atômica (MFA):

Três amostras de cada grupo, nos diferentes tempos (t_0 , t_1 , t_2 , t_3), foram selecionadas aleatoriamente para avaliação em Microscopia de Força Atômica (MFA, Dimension Icon, Bruker, Billerica, MA, Estados Unidos da América). As amostras não necessitaram de preparação, porém foram colocadas em uma lavadora ultrassônica por 10 minutos com água destilada, e após foram secas com jatos leves de ar. O modo utilizado para obtenção das imagens foi o *Peak Force Tapping*. O tamanho selecionado para as amostras foi de 60 μm por 60 μm e as imagens foram geradas pelo programa NanoScope Analysis 1.40 (Bruker, Billerica, MA, Estados Unidos da America).

Análise estatística:

Os resultados foram avaliados através do programa para Windows SPSS versão 21 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos da America) sendo submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das amostras e ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das amostras. Após os dados foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e ao teste *post hoc* Bonferroni para avaliação da rugosidade superficial média nos diferentes tempos, dentro de cada grupo. E também foi realizado Análise de Variância de dois fatores (grupo e tempo) e Bonferroni para avaliação da variação da rugosidade superficial entre os grupos. Para todos os testes foi considerado $\alpha=0,05$.

RESULTADOS:

Rugosidade superficial:

Os resultados foram submetidos ao teste de Levene ($p=0,229$) que verificou a homogeneidade das amostras e ao teste Kolmogorov-Smirnov ($p=0,162$) que avaliou a normalidade. Então, foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e ao teste *post hoc* Bonferroni para cada grupo (intra-grupo). Após os resultados foram submetidos a Análise de Variância de dois fatores (grupo e tempo) e Bonferroni para avaliação entre os grupos. Os resultados da média e desvio padrão em cada tempo estão dispostos na tabela 2.

Grupos	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Ra ₀	Ra ₁	Ra ₂	Ra ₃
G1 - $p=0,001$	0,111 ± ,034 ^{Ab}	0,169 ± ,057 ^{Aa}	0,214 ± ,065 ^{Ba}	0,179 ± ,059 ^{Aa}
G2 - $p=0,001$	0,102 ± ,036 ^{Ab}	0,147 ± ,024 ^{Aa}	0,161 ± ,024 ^{ABa}	0,173 ± ,027 ^{Aa}
G3 - $p=0,004$	0,108 ± ,039 ^{Ab}	0,152 ± ,050 ^{Aab}	0,170 ± ,037 ^{ABa}	0,182 ± ,057 ^{Aa}
G4 - $p=0,001$	0,076 ± ,051 ^{Ab}	0,139 ± ,029 ^{Aa}	0,136 ± ,034 ^{Aa}	0,148 ± ,025 ^{Aa}

Tabela 2 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais, intermediárias e finais de cada grupo. Médias seguidas de letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni. dentro de cada grupo (linhas). Letras maiúsculas comparam grupos e tempo (linhas e colunas) de acordo com Análise de Variância de dois fatores e Bonferroni. Para todos os testes foi considerado $\alpha=0.05$

Avaliando-se a variação da rugosidade superficial média intra-grupo, verifica-se comportamento estatisticamente semelhante para as rugosidades superficiais médias para os grupos G1, G2 e G4 (controle). Observa-se também que o G3 apresentou um comportamento diferente dos demais já que estatisticamente a rugosidade após 30 dias (Ra₁) mostrou-se estatisticamente semelhante a rugosidade superficial média inicial (Ra₀) e aos demais períodos

Ra₂ e Ra₃. Porém, enquanto que as rugosidades médias superficiais Ra₂ e Ra₃ não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si, apresentaram diferença estatisticamente significativa comparando-as com a rugosidade superficial média inicial deste grupo (Ra₀). Avaliando-se os diferentes grupos, verifica-se que somente o G1 após 180 dias de escovação simulada (Ra₂) apresenta-se diferente estatisticamente do G4 ($p=0,002$), porém similar aos demais cremes dentais. Para todos os demais grupos, nos diferentes tempos o comportamento mostrou-se estatisticamente semelhante.

Topografia superficial do esmalte:

Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo:

As alterações na morfologia do esmalte dentário foram avaliadas através de MEV (Figura2). No grupo G1, verifica-se rugosidades similares nas imagens G1.1 e G1.2, porém após o período de 365 dias de escovação simulada (G1.3), verifica-se alteração na topografia da superfície dentária. Já para os grupos G2 e G3, verifica-se similaridades nas rugosidades nas imagens G2.1 e G3.1 correspondentes a 30 dias de escovação simulada e alterações na topografia do esmalte dentário nas imagens G2.2 e G3.2. As imagens G2.3 e G3.3 indicam diminuição nesta rugosidade. No grupo controle (G4.1-3), verifica-se que a topografia do esmalte dentário não apresentou alterações na topografia com o passar do tempo.

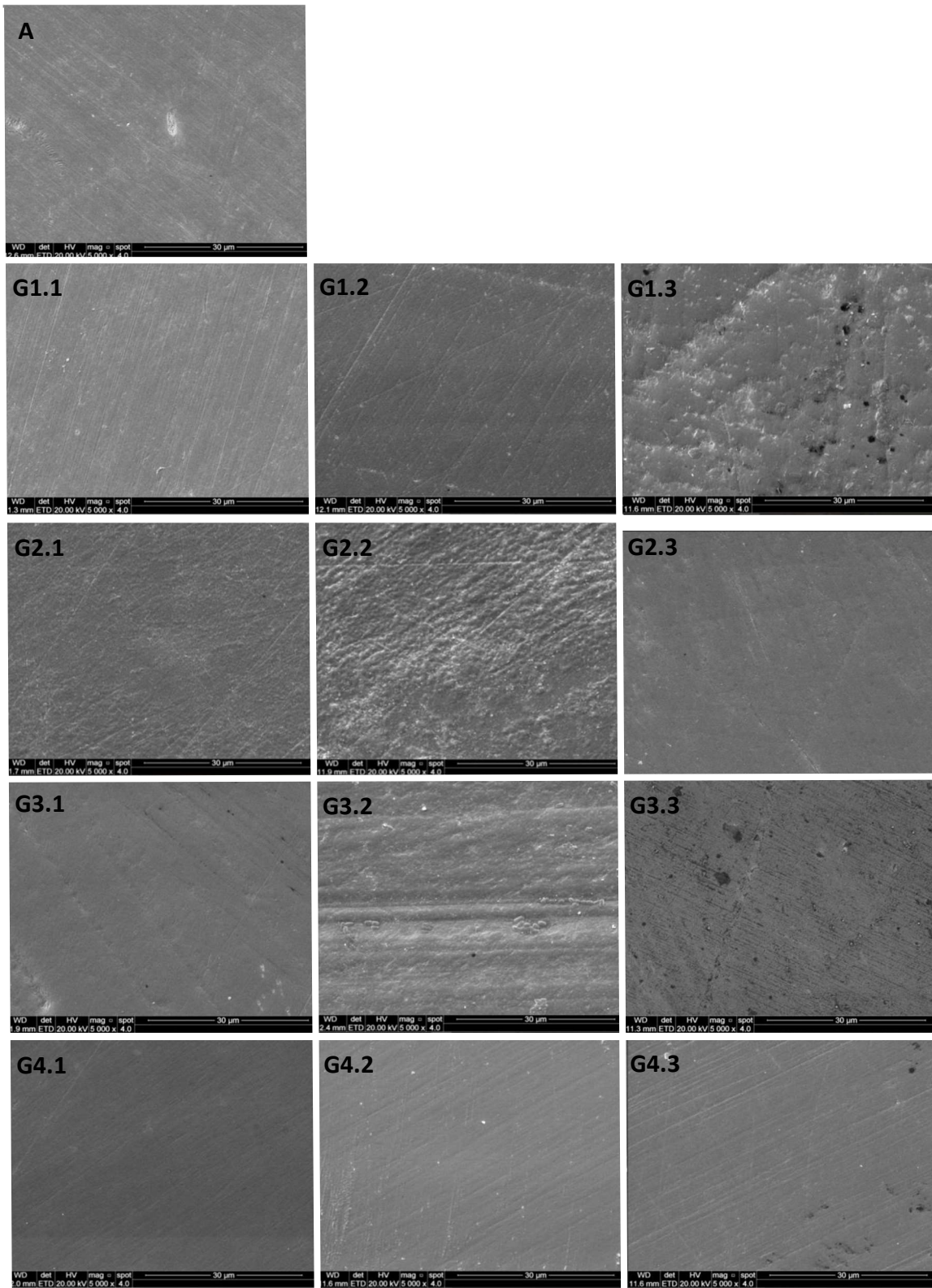


Figura 2 – Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (x5000; 10μm): A – Inicial (Ra₀); G1 – Oral B 3D White: G1.1 – Ra₁; G1.2 – Ra₂; G1.3 – Ra₃; G2 – Colgate Luminous White Advanced: G2.1 – Ra₁; G2.2 – Ra₂; G2.3 – Ra₃; G3 – Close Up Whitening Diamond Attraction: G3.1 – Ra₁; G3.2 – Ra₂; G3.3 – Ra₃; G4 – Controle: G4.1 – Ra₁; G4.2 – Ra₂; G4.3 – Ra₃

Microscopia de Força Atômica:

Avaliando-se as imagens de MFA verifica-se na imagem A (inicial) uma superfície típica de esmalte polido com picos e vales de baixo relevo conforme já descrito em um estudo prévio¹⁴. Todas as demais imagens apresentam linhas unidirecionais relacionadas a escovação dentária simulada. Avaliando-se as imagens do G1 nos tempos 30 (G1.1) e 180 (G1.2) dias verifica-se maior profundidade nos picos e vales sugerindo maior abrasividade nesses tempos. Já a imagem G1.3 sugere uma diminuição nesta rugosidade. Para o G2, as imagens que sugerem maior rugosidade estão associadas aos tempos 180 (G2.2) e 360 (G2.3) dias, enquanto que para o G3 somente a imagem G3.2 parece ter picos e vales mais profundos enquanto que as demais parecem mais semelhantes a inicial e entre elas. Para o G4, sinais claros de rugosidade por abrasão da escovação aparecem principalmente nas imagens G4.1 e G4.3, enquanto que a imagem G4.2 parece apresentar maior rugosidade que as demais.

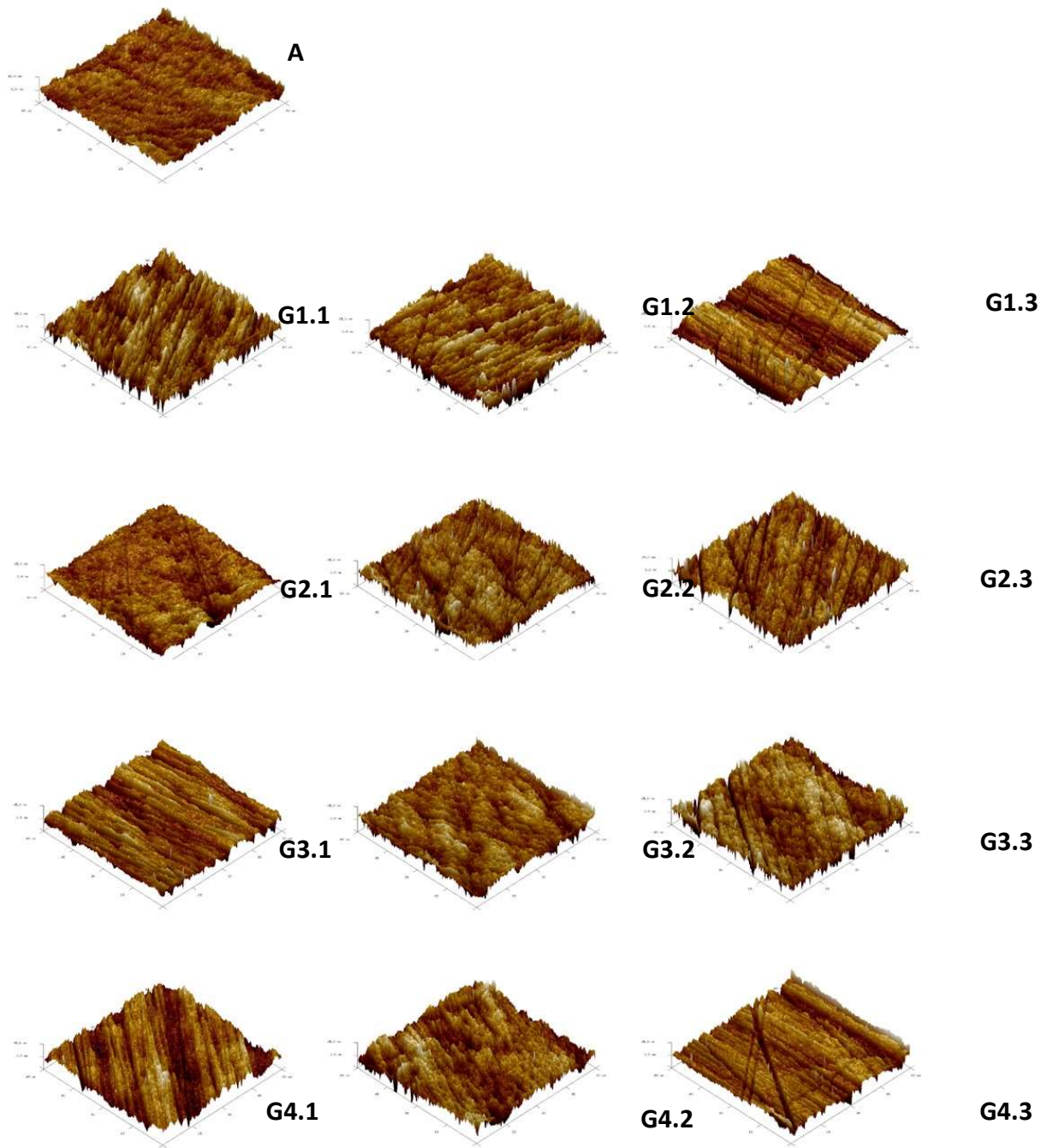


Figura 3 – Imagens obtidas pela Microscopia de Força Atômica ($60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$): A – Inicial (Ra_0); G1 - Oral B 3D White: G1.1 – Ra_1 ; G1.2 – Ra_2 ; G1.3 – Ra_3 ; G2 – Colgate Luminous White Advanced: G2.1 – Ra_1 ; G2.2 – Ra_2 ; G2.3 – Ra_3 ; G3 – Close Up Whitening Diamond Attraction: G3.1 – Ra_1 ; G3.2 – Ra_2 ; G3.3 – Ra_3 ; G4 – Controle: G4.1 – Ra_1 ; G4.2 – Ra_2 ; G4.3 – Ra_3 ;

DISCUSSÃO:

No presente estudo, foi avaliado o efeito dos cremes dentais clareadores na rugosidade superficial do esmalte dental bovino. A hipótese nula referente ao efeito dos cremes dentais clareadores na alteração da rugosidade superficial do esmalte dentário (HO_1) foi aceita, apesar de todos os grupos mostrarem aumento na rugosidade superficial média. Como o aumento na rugosidade superficial do esmalte também foi verificada no grupo controle, sugere-se que a escovação dentária seja responsável pela alteração da rugosidade dentária e não o creme dental.

A alteração da rugosidade superficial média do esmalte em grupos controles também foi encontrada em outros estudos realizados em substrato bovino¹¹ e humano⁹, porém não foi verificada no estudo de Vieira-Junior¹². Possíveis justificativas podem estar associadas ao tipo de escova dental utilizada. Em todos os estudos, escovas dentais com cerdas de nylon macias foram utilizadas, porém este critério pode não ser o suficiente para padronizá-las quando comparadas com outros estudos, pois diferenças na flexibilidade do material¹⁵ e no *design* das cerdas podem determinar alterações na rugosidade¹⁶. Outros estudos utilizaram agentes clareadores com altas concentrações de peróxido de carbamida ou hidrogênio¹⁷⁻¹⁹ previamente a escovação. Este procedimento inviabiliza comparações com o esmalte polido devido a possíveis alterações provocadas pelos agentes clareadores.

A hipótese nula referente à similaridade no comportamento dos diferentes cremes dentais clareadores em relação a alterações na superfície do esmalte dentário (HO_2) foi rejeitada, pois avaliando-se o comportamento intra-grupo, o G3 comportou-se diferentemente dos demais. Possíveis explicações podem estar relacionadas aos diferentes abrasivos e substâncias químicas utilizados nas formulações dos cremes dentais, como também sugerido por Bolay⁹. Além disso, quando utilizados cremes dentais com composições químicas similares, não foram verificados comportamentos distintos entre os grupos em outro estudo²⁰.

Para o fator topografia de superfície ($H0_3$), a hipótese nula foi rejeitada. Estudos prévios demonstraram a importância de avaliar a rugosidade proporcionada pelos cremes dentais através de análises quantitativas e qualitativas^{21,22}. Avaliando-se os resultados obtidos através da rugosidade superficial média (R_a) e as imagens das MFA e MEV, verifica-se diferenças entre essas análises. Avaliando-se as imagens na MEV, as imagens que apresentam maior rugosidade parecem ser as G1.3, G2.2 e G3.2 Já para MFA, verifica-se os sinais de abrasão provocados pelo comportamento mecânico da escovação dentária simulada. Além disso, em alguns grupos e tempos (G1.1, G1.2, G2.2, G2.3, G3.2 e G4.2), a rugosidade apresenta-se aumentada em relação a outras. Uma possível explicação para este fato pode estar relacionado aos diferentes processamentos e modos de avaliação destas imagens. A preparação da amostra para avaliação em MEV pode mudar a topografia da superfície⁸.

No presente estudo, dentes bovinos foram utilizados para obtenção das amostras. Caracterizam-se pela facilidade de obtenção dos mesmos, integridade da superfície dentária e aceitabilidade para utilização em pesquisas *in vitro*^{23,24}.

Uma limitação deste estudo é a não utilização de agente remineralizador entre os diferentes tempos de escovação simulada, já que a ação de substâncias remineralizadoras pode estar associada a menores valores de rugosidade superficial. Outra limitação é a não diferenciação de abrasão e erosão provocada pelos cremes dentais quando utilizado escovação simulada, assim estudos avaliando separadamente estes componentes tornam-se necessários. Bem como a avaliação da possível relação entre pH e o modo como abrasivos e componentes químicos atuam individualmente e comumente na rugosidade superficial média e na alteração da topografia superficial do esmalte dental bovino.

CONCLUSÕES:

Frente as limitações deste estudo *in vitro*, conclui-se que todos os cremes dentais aumentaram a rugosidade superficial do esmalte, com comportamento intra-grupo similar ao grupo controle, ou seja, um aumento significativamente similar na rugosidade superficial média a partir dos 30 dias de escovação dental simulada, sem diferença nos demais; com exceção do creme dental *Close-Up Whitening Diamond Attraction*. E entre os grupos e tempos, o comportamento foi similar para todos, com exceção do creme dental *Oral B #D White* no tempo Ra₂ que apresentou os maiores valores de rugosidade superficial média do esmalte bovino. Alteração da topografia superficial do esmalte bovino foi verificada nos diferentes grupos e a abrasão mecânica ocasionada pela escovação dental simulada é evidenciada em todos os grupos na Microscopia de Força Atômica.

REFERÊNCIAS:

1. Ganavadiya R, Shekar B, Goel P *et al.* (2014) Comparison of anti-plaque efficacy between a low and high cost dentifrice: a short term randomized double-blind trial. *European Journal of Dentistry* **8(3)** 381-4.
2. Pascaretti-Grizon F, Mabillean G, Chappard D. (2013) Abrasion of 6 dentifrices measured by vertical scanning interference microscopy. *Journal of Applied Oral Science* **21(5)** 475-81.
3. Fiscman SL (1997) The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years? *Periodontology 2000* **15** 7-14

4. Davies R, Scully C, Preston A (2010) Dentifrices: an update. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal* **15(6)** 976-82.
5. Stamm JW (2007) Multi-function toothpastes for better oral health: a behavioural perspective. *International Dental Journal* **57** 351-63.
6. Schemehorn B, Moore BR, Putt M (2011) Abrasion, Polishing and Stain Removal Characteristics of various commercial dentifrices in vitro. *Journal of Clinical Dentistry* **22** 11-8.
7. Joiner A (2010) Whitening toothpastes: a review of the literature. *Journal of Dentistry* **38** 17-24.
8. Hildeberg SP, Pinto SCS, Farago PV, Santos FA, Wambier DS (2011) Physical-chemical characteristics of whitening toothpaste and evaluation of its effects on enamel roughness. *Brazilian Oral Research* **25(4)** 288-94.
9. Bolay S, Cakir FY, Gurgan S (2012) Effects of Toothbrushing with Fluoride Abrasive and Whitening Dentifrices on Both Unbleached and Bleached Human Enamel Surface in Terms of Roughness and Hardness: An in vitro study. *Journal of Contemporary Dental Practice* **13(5)** 584-89.

10. Borges BCD, Borges JS, Melo CD *et al* (2011) Efficacy of a Novel At-home Bleaching Technique With Carbamide Peroxides Modified by CPP-ACP and Its Effect on the Microhardness of Bleached Enamel. *Operative Dentistry* **36(5)**, 521-528.
11. Attia ML, Cavalli V, Espírito Santo AM *et al* (2015) Effects of bleaching agents combined with regular and whitening toothpastes on surface roughness and mineral content of enamel. *Photomedicine and Laser Surgery* **33(7)** 378-83.
12. Vieira-Junior WF, Lima D, Tabchoury CPM *et al* (2015) Effect of toothpaste application prior to dental bleaching on whiteness effectiveness and enamel properties. *Operative Dentistry* **41(1)** 29-38.
13. Monteiro B, Spohr AM (2015) Surface Roughness of Composite Resins after Simulated Toothbrushing with Different Dentifrices. *Journal of International Oral Health* **7(7)** 1-5.
14. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E *et al* (1999) An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry* **27** 509-15.
15. Teche FV, PAranhos HF, Motta MF *et al* (2011) Differences in abrasion capacity of four soft toothbrushes. *International Journal of Dental Hygiene* **9(4)** 274-8.

16. Kumar S, Kumari M, Acharya S *et al* (2014) Comparison of surface abrasion produced on the enamel surface by a standard dentifrice using three different toothbrush bristle design: a profilometric in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry* **17(4)** 369-73.
17. Pachaly R, Pozzobon RT (2012) Analysis of surface roughness of human enamel exposed to bleaching agent and submitted to brushing. *Acta Odontologica Latinoamericana* **25(1)** 59-66.
18. Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LRM *et al* (2006) Brushing Effect of Abrasive Dentifrices during At-home Bleaching with 10% Carbamide Peroxide on Enamel Surface Roughness. *The Journal of Contemporary Dental Practice* **7(1)** 1-9.
19. Navimpur EJ, Kimyai S, Nikazar S *et al* (2012) In Vitro Evaluation of the Effect of Delaying Toothbrushing With Toothpaste on Enamel Microhardness Subsequent to Bleaching the Teeth With 15% Carbamide Peroxide. *Operative Dentistry* **37(1)** 87-92.
20. Özkan P, Kansu G, Özak ST *et al* (2013) Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel. *Acta Odontologica Scandinavica* **37(1)** 488-497.
21. Freitas CP, Espejo LC, Botta SB (2010) AFM analysis of bleaching effects on dental enamel microtopography. *Journal of Applied Surface Science* **256** 2915-19.

22. Johannsen G, Tellefsen G, Johannsen A et al (2013) The importance of measuring toothpaste abrasivity in both a quantitative and qualitative way. *Acta Odontologica Scandinavica* **71** 508–517.
23. Yassen GH, Platt JA, Hara AT (2011) Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of Oral Science* **53(3)** 273-282.
24. Yesilyurt C, Sezer U, Ayar MK *et al* (2013) The effect of a new calcium-based agent, Pro Argin, on the microhardness of bleached enamel surface. *Australian Dental Journal* **58** 207-12.

ARTIGO 2

Avaliação do efeito de diferentes cremes dentais clareadores na rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário humano.

RESUMO:

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito de cremes dentais clareadores na rugosidade superficial do esmalte dentário humano. Cinquenta e seis amostras foram obtidas de trinta dentes incisivos humanos, estas foram polidas e randomizadas em três grupos de acordo com o creme dental utilizado: G1 - Oral B 3D White, G2 - Colgate Luminous White Advanced, G3 - Close Up Diamond Attraction; e grupo controle: G4 - Água destilada e vaselina (n=14). A rugosidade superficial média (Ra, μm) foi avaliada previamente a escovação simulada (Ra₀), após 30 (Ra₁), 180 (Ra₂) e 365 (Ra₃) dias, respectivamente. Os dados foram submetidos ao teste de Levene e Kolmogorov-Smirnov para avaliação da homogeneidade e normalidade das amostras. Após, os grupos foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni para avaliação intra-grupos e Análise de Variância e Dunnett para avaliação entre os grupos. Avaliando-se o comportamento intra-grupos, verifica-se que a rugosidade superficial média aumentou em todos os grupos e o comportamento foi similar para os grupos G1, G2 e G4 que mostraram diferença estatisticamente significante a partir dos 30 dias de escovação simulada. Já o G3 mostrou diferença estatisticamente significativa a partir de 180 dias. Entre os grupos, mostraram-se similares estatisticamente os grupos G1, G2 e G4, enquanto que o G3 mostrou-se estatisticamente diferente dos demais ($p=0,001$). Avaliando-se a topografia do

esmalte humano verifica-se que a mesma sofreu alterações em todos os grupos. Assim, conclui-se que todos os grupos apresentaram aumento da rugosidade com comportamento intra-grupo e entre os grupos similar ao G4, com exceção do G3.

PALAVRAS-CHAVE: Cremes dentais, Escovação dentária, Abrasão dentária, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica.

INTRODUÇÃO:

Higiene oral é realizada normalmente de 3 a 4 vezes por dia com escova e creme dental¹. Para uma adequada profilaxia, o dentífrico ideal deveria prover excelente remoção de manchas e polimento, com mínima perda de estrutura dental². Diferentes tipos de abrasivos como perlita, sílica, carbonato de cálcio, entre outros, têm sido utilizados para este fim e estudos avaliando a atuação destas substâncias são realizados há no mínimo 60 anos^{3,4}.

A introdução de dentífricos multi-funcionais, através do refinamento de suas formulações e incorporação de ingredientes químicos que proporcionam benefícios terapêuticos e cosméticos, tornaram-se disponíveis comercialmente em supermercados e farmácias. Visam prevenção e tratamento de mal odor, cárie, gengivite, remoção de placa, cálculo dentário, desmineralização e hipersensibilidade⁵.

Com o maior interesse por estética, novos produtos com ação clareadora também surgiram e estão aumentando em quantidade progressivamente⁶. Propõem alteração de cor dentária e melhora no sorriso. Apesar do papel importante que os abrasivos exercem na profilaxia dentária, este não pode ser o único componente responsável por este procedimento¹. Para que a ação clareadora ocorra na estrutura dentária, novos grupos de componentes

tornaram-se presentes, como as substâncias surfactantes que possuem a função de produzir um melhor molhamento da superfície dentária, favorecendo o espalhamento dos demais componentes. E ainda, substâncias enzimáticas que auxiliam na redução e desorganização das moléculas de pigmentação extrínseca, e substâncias oxidantes que promovem o clareamento intrínseco da estrutura dental²⁻⁵.

Estudos *in vitro*^{7,8} ainda são controversos em relação ao aumento na rugosidade superficial do esmalte quando utilizados agentes clareadores com diferentes concentrações de peróxido de carbamida e hidrogênio e a associação destes produtos com escovação dentária simulada. Porém, esta rugosidade na superfície do esmalte dentário pode contribuir para o acúmulo de placa dentária e aparecimento de novas manchas extrínsecas⁹.

Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de diferentes cremes dentais clareadores na superfície do esmalte humano. As hipóteses nulas testadas neste estudo são: (H0₁) que os diferentes cremes dentais clareadores não alteram a rugosidade superficial do esmalte humano após escovação dentária simulada; (H0₂) os diferentes cremes dentais clareadores produzem o mesmo comportamento em relação as possíveis alterações na estrutura superficial dentária; (H0₃) a topografia superficial do esmalte dentário humano mantém-se inalterada quando utilizados diferentes cremes dentais;

MATERIAIS E MÉTODOS:

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob número 6742/2015. Após foi aprovado pelo Sistema Nacional de Informação Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, sob número 50877815.9.000.5336 através da Plataforma Brasil.

Confeção das amostras:

Trinta incisivos humanos extraídos por indicação terapêutica foram obtidos, através de termo de consentimento assinado, para utilização nesta pesquisa.

Com um disco diamantado flexível de dupla face (7000 rpm - KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) e irrigação constante, as raízes foram separadas das coroas dentárias e descartadas conforme figura 1 - 1A. Dois blocos contendo esmalte e dentina foram removidos do terço médio de cada coroa (figura 1 - 1B; 1C). Os espécimes foram mantidos em solução de timol 0,1% por 24 horas e posteriormente mantidos em saliva artificial por uma semana, sendo trocada diariamente. No total, 56 amostras de 4x4x3 foram obtidas, de acordo com uma metodologia previamente descrita⁷. Estas amostras foram avaliadas sob microscopia óptica VZM-200 (30x, Caltex, Irvine, California, Estados Unidos da América) e as que apresentavam trincas ou outros defeitos foram descartadas. As amostras selecionadas foram incluídas em resina composta, com a utilização de uma matriz, mantendo-se a superfície vestibular 1mm acima da altura da resina composta (figura 1 -1D).

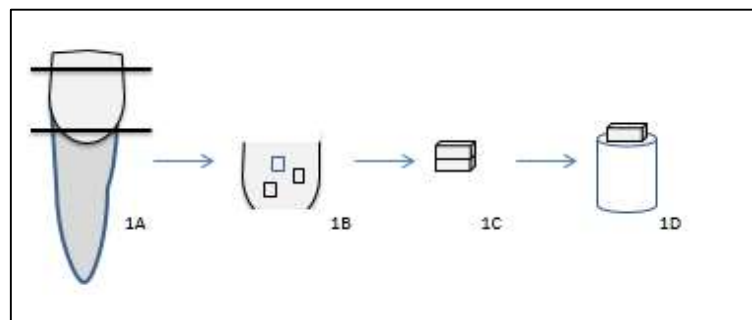


Figura 1 – Desenho esquemático da preparação da amostra.

A superfície de esmalte foi polida utilizando lixas d'água de 600, 1200, 2400¹⁰ numa politriz horizontal Struers (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) por 20 segundos cada⁷. Pastas

diamantadas com 6, 3, 1 e 0,25 μm (Pasta diamantada, Arotec, Cotia, SP, Brasil) e feltro foram utilizados para proporcionar um polimento adicional¹¹. As amostras foram divididas aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o creme dental utilizado ou controle (n=14) conforme tabela 1.

Material	Fabricante	Princípio ativo	Outros componentes
G1 - Oral-B 3D White	Procter & Gambler do Brasil S.A., Seropedica, RJ, Brasil	Fluoreto de sódio (1450ppm de flúor) e pirofosfato dissódico	Água, sílica hidratada, sorbitol, lauril sulfato sódico, aroma, hidróxido de sódio, goma de celulose, Mica CI 77891, polietileno, corante artificial Blue 1 Lake, sacarina sódica, goma xantana, carbomêro e limoneno
G2 - Colgate Luminous White Advanced	Colgate Palmolive S.A., San José Iturbide, Guanajuato, México	Peróxido de hidrogênio 1% e monofluorfosfato de sódio 0,76% (1000 ppm)	Propileno glicol, pirofosfato de cálcio, glicerina, PEG/PPG-116/copolímero 66, PEG-12, PVP-peróxido de hidrogênio, PVP, sílica, aroma. pirofosfato tetrassódico, lauril sulfato de sódio, pirofosfato dissódico, sacarina sódica, sucralose, BHT, eugenol
G3 – Close-Up Whitening Diamond Attraction	Unilever Brasil LTDA, Ipojuca, PE, Brasil	Fluoreto de sódio (1450ppm de flúor)	Sorbitol, água, sílica hidratada, PEG-32, lauril sulfato sódico, aroma, mica, goma de celulose, sacarina, fosfato trissódico, sacarina sódica, copolímero PVM/MA, CI 74160, acetato de tocoferol, limoneno
G4 - Controle - Vaselina sólida	Farmax, Divinópolis, MG, Brasil	Petrolato	

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa.

Após o polimento, todas as amostras foram colocadas em lavadora ultrasônica L100 (Schuster, Santa Maria, RS, Brasil) por 10 minutos, com água destilada, antes da avaliação da rugosidade superficial inicial.

Rugosidade superficial inicial (Ra_0):

A aferição da rugosidade superficial inicial (Ra_0 , μm) foi realizada com um rugosímetro digital SJ 201 (Mitutoyo Surfest Analyzer, Toquio, Japão). Para realizar a leitura da rugosidade, a ponta diamantada do rugosímetro percorreu a superfície de 1.25 (*reading length*), com 0,25 de comprimento de amostragem (*cutoff*), com uma velocidade constante de 0,1 mm/s¹¹. A rugosidade superficial de cada amostra foi determinada através da média aritmética obtida de 3 medições consecutivas, realizadas em diferentes regiões de cada amostra.

Escovação simulada:

A escovação foi realizada em máquina de escovação simulada desenvolvida pelo Instituto Ideia da PUCRS. Cada corpo de prova foi fixado no orifício da placa acrílica com auxílio de cera utilidade, permanecendo 1mm acima da superfície da placa de acrílico. Cada placa foi introduzida no reservatório de acrílico, no qual foi adicionado 1g de creme dental, aferido em balança de precisão AG204 (Mettler-Toledo, Greifensee, Suíça) para 1mL de água destilada, utilizando seringa descartável de 5mL Luer Slip (Descarpack, São Paulo, SP, Brasil)¹¹. O reservatório de acrílico é fixado à máquina de escovação por parafusos metálicos. Escovas de cerdas macias Colgate Essencial Care Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizadas com a aplicação de 200g de carga e velocidade de 250 ciclos por minuto¹². As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de escovação: 825, 5.000 e 10.000¹¹ que representam aproximadamente 30 (t_1), 180 (t_2) e 365 (t_3) dias de escovação simulada.

Após cada ciclo de escovação, as amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em lavadora ultrassônica por 10 minutos para posterior avaliação da rugosidade superficial média.

Rugosidades superficiais médias intermediárias e finais (Ra_1 , Ra_2 , Ra_3):

As rugosidades superficiais médias intermediárias e finais foram reavaliadas nos tempos t_1 , t_2 e t_3 gerando as rugosidades Ra_1 , Ra_2 e Ra_3 . Estas rugosidades foram avaliadas no sentido perpendicular ao sentido realizado pelas cerdas das escovas dentais durante a escovação, verificados através da marcação realizada previamente. As medições das rugosidade superficiais médias e finais foram realizadas através da mesma forma que as iniciais (Ra_0).

Uma amostra de cada grupo não foi submetida à escovação (t_0) para ser avaliada na Microscopia Eletrônica de Varredura por Campo. Em cada tempo (t_1 , t_2 , t_3) uma amostra também foi removida com a mesma finalidade. Assim, um total de 14 amostras foram designadas para cada grupo, porém devido a remoção sequencial para análise de topografia (Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo), foram mantidas sempre as mesmas 10 amostras ($n=10$)¹³ para análise da rugosidade superficial média, ou seja, a mesma amostra foi avaliada nos diferentes tempos, caracterizando uma análise de medidas repetidas.

Topografia superficial do esmalte:

Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo:

Uma amostra de cada grupo foi utilizada nos diferentes tempos (t_0 , t_1 , t_2 , t_3) de escovação simulada para avaliação da topografia da superfície do esmalte. As amostras foram secas com leves jatos de ar, fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas através da deposição de íons de prata (100 segundos, 60mA) através da utilização de um dispositivo de pulverização catódica (Bal-Tec SCD 005, Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha). Todas as imagens foram obtidas com a mesma magnificação (5000x) e escala de 30 μm em Microscópio Eletrônico de

Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM, Inspeccionar F50, FEI, Hillsboro, OR, Estados Unidos da America).

Microscopia de Força Atômica:

Três amostras de cada grupo, nos diferentes tempos (t_0 , t_1 , t_2 , t_3), foram selecionadas aleatoriamente para avaliação em Microscopia de Força Atômica (MFA, Dimension Icon, Bruker, Billerica, MA, Estados Unidos da América). As amostras não necessitaram de preparação, porém foram colocadas em uma lavadora ultrassônica por 10 minutos com água destilada, e após foram secas com leves jatos de ar. O modo utilizado para obtenção das imagens foi o *Peak Force Tapping*. O tamanho selecionado para a obtenção das imagens foi de $60\mu\text{m}$ por $60\mu\text{m}$ e as imagens foram geradas pelo programa NanoScope Analysis 1.40 (Bruker, Billerica, MA, Estados Unidos da America).

Análise estatística:

Os resultados foram avaliados através do programa para Windows SPSS versão 21 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EUA) sendo submetidos ao teste de Levene e Kolmogorov-Smirnov para avaliar a homogeneidade e normalidade das amostras. Após, os dados foram avaliados através de Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni para avaliação intra-grupos e Análise de Variância e Dunnett para avaliação entre os grupos. Para todos os testes, foi considerado $\alpha=0,05$.

RESULTADOS:

Rugosidade superficial:

Os resultados foram submetidos ao teste de Levene ($p=0,01$) e Kolmogorov-Smirnov ($p=0,022$) e após foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni para avaliação intra-grupos (tabela 2) que demonstrou similaridade no comportamento da rugosidade para os grupos G1, G2 e G4, e diferença estatisticamente significativa para o G3. O mesmo ocorreu entre os grupos, com diferença estatisticamente significativa para o G3 ($p=0,001$) com todos os grupos.

Grupos	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média DP
	Ra ₀	Ra ₁	Ra ₂	Ra ₃
G1 ^B - $p=1,000$	0,071 ± ,055 ^b	0,153 ± ,0408 ^a	0,177 ± ,043 ^a	0,168 ± ,038 ^a
G2 ^B - $p=1,000$	0,07 ± ,0559 ^b	0,152 ± ,048 ^a	0,164 ± ,030 ^a	0,194 ± ,041 ^a
G3 ^A - $p=0,001$	0,016 ± ,003 ^b	0,036 ± ,017 ^b	0,097 ± ,033 ^a	0,108 ± ,039 ^a
G4 ^B - $p=0,087$	0,0394 ± ,051 ^b	0,143 ± ,0042 ^a	0,166 ± ,034 ^a	0,173 ± ,0356 ^a

Tabela 2 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais, intermediárias e finais de cada grupo. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com Análise de Variância de Medidas Repetidas e Bonferroni.

Topografia superficial do esmalte:**Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo:**

As alterações na morfologia superficial do esmalte dentário foram avaliadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura2). As amostras revelam que a superfície do esmalte sofreu alterações na topografia superficial. As maiores rugosidades parecem estar presentes nas imagens G1.2 e G4.2. As demais imagens apresentam-se muito similares a imagem inicial (A).

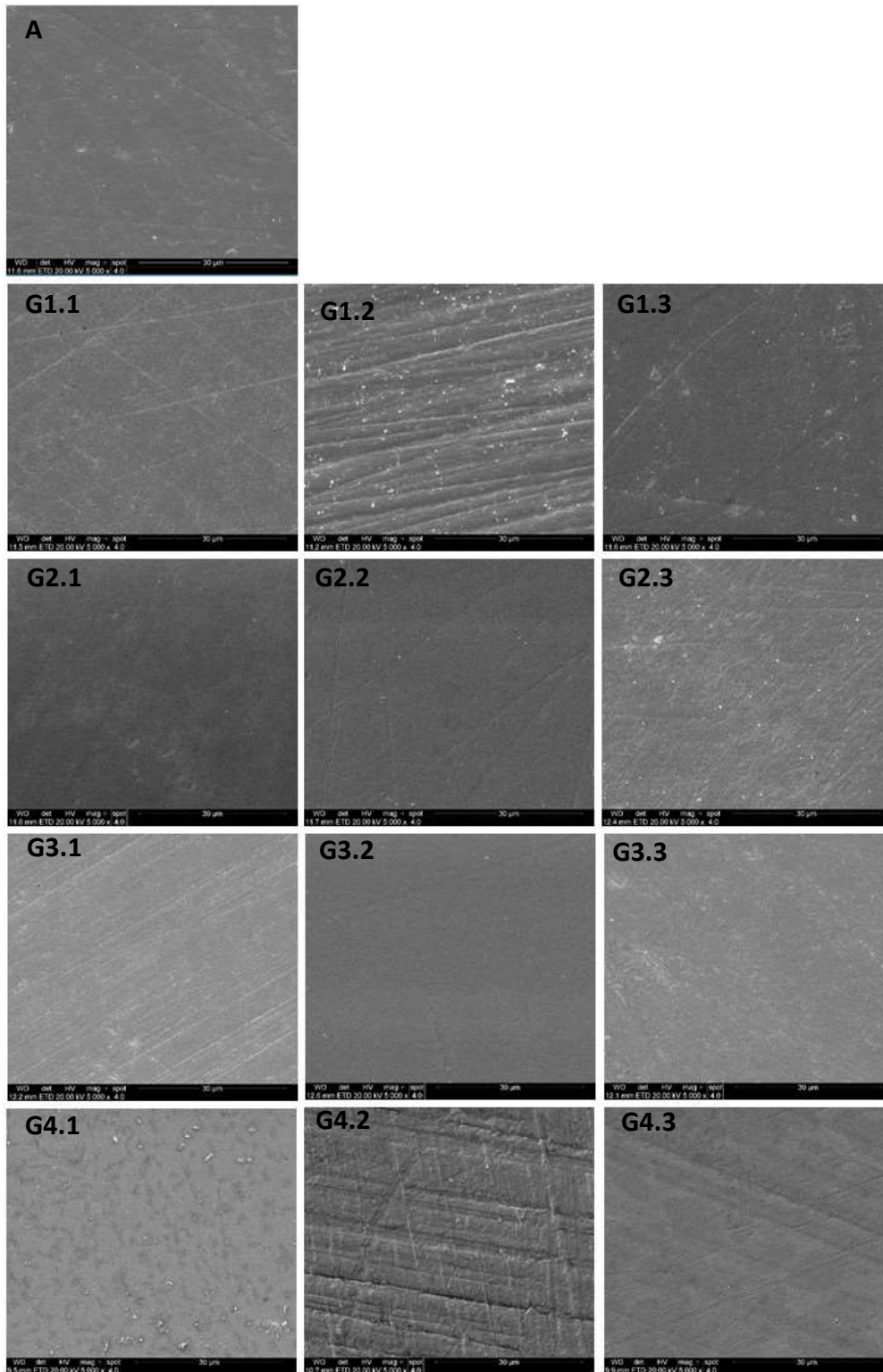


Figura 2 – Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura: A – Inicial (Ra_0); G1 - Oral B 3D White: G1.1 – Ra_1 ; G1.2 – Ra_2 ; G1.3 – Ra_3 ; G2 – Colgate Luminous White Advanced: G2.1 – Ra_1 ; G2.2 – Ra_2 ; G2.3 – Ra_3 ; G3 – Close Up Whitening Diamond Attraction: G3.1 – Ra_1 ; G3.2 – Ra_2 ; G3.3 – Ra_3 ; G4 – Controle: G4.1 – Ra_1 ; G4.2 – Ra_2 ; G4.3 – Ra_3 ;

Microscopia de força atômica:

Avaliando-se as imagens de MFA verifica-se na imagem A (inicial) uma superfície típica de esmalte polido com picos e vales de baixo relevo conforme já descrito em um estudo prévio¹⁴. Em todos os grupos verifica-se imagens representativas de maior rugosidade com vales e picos mais profundos como nas imagens G1.3, G2.2, G2.3, G3.2, G3.3 e G4.3. As demais imagens mostram-se com rugosidade similar à da imagem inicial com vales e picos pouco profundos.

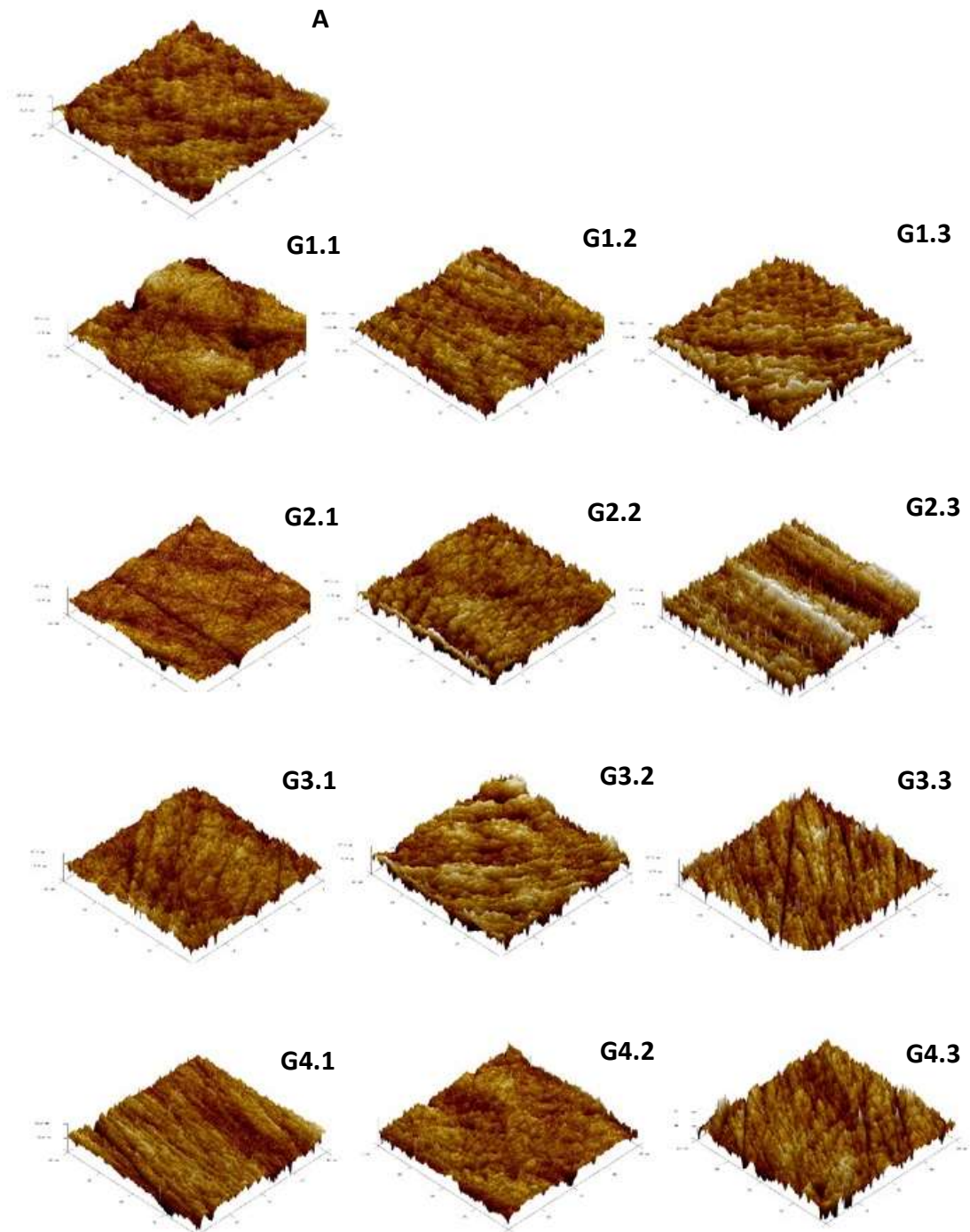


Figura 3 – Imagens obtidas pela Microscopia de Força Atômica ($60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$) : A – Inicial (Ra_0); G1 - Oral B 3D White: G1.1 – Ra_1 ; G1.2 – Ra_2 ; G1.3 – Ra_3 ; G2 – Colgate Luminous White Advanced: G2.1 – Ra_1 ; G2.2 – Ra_2 ; G2.3 – Ra_3 ; G3 – Close Up Whitening Diamond Attraction: G3.1 – Ra_1 ; G3.2 – Ra_2 ; G3.3 – Ra_3 ; G4 – Controle: G4.1 – Ra_1 ; G4.2 – Ra_2 ; G4.3 – Ra_3 ;

DISCUSSÃO:

No presente estudo, foi avaliado o efeito dos cremes dentais clareadores na rugosidade superficial do esmalte dental humano. Para estudos *in vitro*, normalmente são utilizados terceiros molares inclusos. Porém, devido a maior susceptibilidade dos dentes inclusos aos processos de abrasão e erosão por não terem passado pelo estágio de maturação pós-eruptiva do esmalte¹⁵, optou-se pela utilização de incisivos humanos. Este substrato tem sido utilizado em pesquisas envolvendo processos de abrasão e erosão e escovação simulada¹⁶⁻¹⁸.

A hipótese nula referente ao efeito dos cremes dentais clareadores na alteração da rugosidade superficial do esmalte dentário (HO₁) foi aceita, apesar de todos os grupos apresentarem a rugosidade aumentada. Como o aumento na rugosidade superficial do esmalte também foi verificado no grupo controle, sugere-se que a escovação dentária¹⁶ seja responsável pela alteração da rugosidade dentária e não os cremes dentais.

Porém como a rugosidade proporcionada pelos cremes dentais foi estatisticamente diferente para o G3, a hipótese nula referente ao comportamento dos cremes dentais foi rejeitada (HO₂). O G3 apresenta o mesmo tipo de abrasivo que o G1, porém diferenças na forma, distribuição, tamanho e características superficiais dessas partículas podem determinar variabilidade no modo de ação destes produtos³.

Estudos prévios^{14, 19, 20} mostraram que agentes clareadores com peróxido de hidrogênio podem alterar a superfície dentária, porém a incorporação de peróxido de hidrogênio na formulação de cremes dentais não determinou maior rugosidade na superfície do esmalte dentário. Possíveis explicações podem estar associadas a pequena porcentagem utilizada (1%) e a presença de agentes de polimento que auxiliam na regularização da superfície³.

Em relação a topografia do esmalte dentário, diferenças foram observadas nos diferentes grupos, ao longo do tempo. Assim, a hipótese nula (H_0) foi rejeitada. Ao avaliar a rugosidade através da MEV, as maiores rugosidades ESTÃO presentes nas imagens G1.2 e G4.2. Enquanto que na MFA as imagens representativas de maior rugosidade com vales e picos mais profundos estão presentes nas imagens G1.3, G2.2, G2.3, G3.2, G3.3 e G4.3.

Estudos com amostras de esmalte humano submetidos a processos de abrasão dentária e avaliados através de ambas as técnicas de microscopia (MEV e MFA) são escassos na literatura dificultando a possível comparação entre as imagens. Apesar das técnicas serem complementares, a quantificação de perda de estrutura dentária também é de grande importância e caracteriza-se como uma limitação deste estudo. Programas computacionais que quantifiquem e mapeiem as alterações na superfície dentária já foram propostos anteriormente e poderiam determinar uma precisão maior destes resultados²¹. A estimativa de possível perda mineral reversível ou que não cause prejuízo a estrutura dentária, ocasionada anualmente por abrasão dentária, não é conhecida, assim a associação de diferentes métodos pode auxiliar a definir estes parâmetros, já que uma maior rugosidade superficial média *in vitro*, não necessariamente está associada a danos *in vivo*.

No presente estudo, prismas de esmalte não foram visualizados nas imagens de topografia superficial do esmalte, porém a necessidade de polimento pode determinar exposição de camadas diferentes de esmalte das encontradas *in vivo*¹⁸, assim esta situação constitui-se uma limitação deste estudo, pois comparações *in vivo* e *in vitro* tornam-se limitadas. Sugere-se mais estudos para avaliação da rugosidade superficial do esmalte em diferentes camadas deste substrato.

CONCLUSÕES:

Frente as limitações deste estudo *in vitro*, conclui-se que todos os cremes dentais aumentaram a rugosidade superficial do esmalte, com comportamento intra-grupo similar ao grupo controle, com exceção do dentifrício Close-Up *Whitening Diamond Attraction*. E entre os grupos e tempos, o comportamento foi similar para todos, com exceção do creme dental Close-Up *Whitening Diamond Attraction*. Na topografia superficial do esmalte humano, avaliada através de MEV e MFA, alterações foram visualizadas nos diferentes grupos, principalmente, na escovação dental simulada após 180 e 360 dias.

REFERÊNCIAS:

1. Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LRM *et al* (2006) Brushing Effect of Abrasive Dentifrices during At-home Bleaching with 10% Carbamide Peroxide on Enamel Surface Roughness *The Journal of Contemporary Dental Practice* **7(1)** 1-9.
2. Meyers IA, McQueen MJ, Harbrow D *et al* (2000) The surface effect of dentifrices. *Australian Dental Journal* **45(2)** 118-24.
3. Schemehorn B, Moore BR, Putt M (2011) Abrasion, Polishing and Stain Removal Characteristics of various commercial dentifrices in vitro. *Journal of Clinical Dentistry* **22** 11-8.
4. Joiner A (2009) A silica toothpastes containing blue covarine: a new technological breakthrough in whitening. *International Dental Journal* **59** 284-288.

5. Stamm JW (2007) Multi-function toothpastes for better oral health: a behavioural perspective *International Dental Journal* **57** 351-63.
6. Claydon NCA, Moran J, Bosma ML. (2004) Clinical study to compare the effectiveness of a test whitening toothpaste with a commercial whitening toothpaste at inhibiting dental stain. *Journal of Clinical Periodontology* 31 1088-91.
7. Attia ML, Cavalli V, Espírito Santo AM *et al* (2015) Effects of bleaching agents combined with regular and whitening toothpastes on surface roughness and mineral content of enamel. *Photomedicine and Laser Surgery* **33(7)** 378-83.
8. Özkan P, Kansu G, Özak ST *et al* (2013) Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel. *Acta Odontologica Scandinavica* 37(1) 488-497.
9. Pachaly R, Pozzobon RT (2012) Analysis of surface roughness of human enamel exposed to bleaching agent and submitted to brushing. *Acta Odontologica Latinoamericana* **25(1)** 59-66.
10. Borges BCD, Borges JS, Melo CD *et al* (2011) Efficacy of a Novel At-home Bleaching Technique With Carbamide Peroxides Modified by CPP-ACP and Its Effect on the Microhardness of Bleached Enamel. *Operative Dentistry* **36(5)**, 521-528.
11. Vieira-Junior WF, Lima D, Tabchoury CPM *et al* Effect of toothpaste application prior to dental bleaching on whiteness effectiveness and enamel properties. *Operative Dentistry* **41(1)** 29-38

12. Monteiro B, Spohr AM (2015) Surface Roughness of Composite Resins after Simulated Toothbrushing with Different Dentifrices. *Journal of International Oral Health* **7(7)** 1-5.
13. Hildeberg SP, Pinto SCS, Farago PV, Santos FA, Wambier DS (2011) Physical-chemical characteristics of whitening toothpaste and evaluation of its effects on enamel roughness. *Brazilian Oral Research* **25(4)** 288-94.
14. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E et al (1999) An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry* **27** 509-15.
15. Lynch RJM (2013) The primary and mixed dentition, post-eruptive enamel. *International Dental Journal* **63(2)** 3-13.
16. Kumar S, Kumari M, Acharya S et al (2014) Comparison of surface abrasion produced on the enamel surface by a standard dentifrice using three different toothbrush bristle design: a profilometric in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry* **17(4)** 369-73.
17. Kumar S, Kumar SS, Gupta A et al. (2015) A Profilometric Study to Assess the Role of Toothbrush and Toothpaste in Abrasion Process. *Journal of Dentistry* **16(3 Suppl)** 267-73.
18. Lombardini M, Ceci M, Colombo M et al. (2014) Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning* **36** 401-10.
19. Xu B, Li Q, Wang Y. (2011) Effects of pH values of hydrogen peroxide bleaching agents on enamel surface properties. *Operative Dentistry* **36** 554–562.

20. Sa Y, Sun L, Wang Z, *et al* (2013) 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* 38 100-10.

21. Mehta SB, Banerji S, Millar BJ *et al* (2012) Current concepts on the management of tooth wear: part 1. Assessment, treatment planning and strategies for the prevention and the passive management of tooth wear. *Brazilian Dental Journal* **212(1)** 17-27.

DISCUSSÃO GERAL:

O interesse em avaliar possíveis modificações na estrutura dentária através da utilização de cremes dentais é verificado na literatura odontológica há mais de sessenta anos (Schemehorn, Moore & Putt, 2011) A introdução de dentifícios clareadores, com composições distintas, visando a alteração da coloração intrínseca, prevenção e remoção de pigmentações extrínsecas e a obtenção de um efeito óptico de clareamento, tornaram as formulações químicas dos dentifícios cada vez mais complexas (JOINER, 2010).

Além disso, processos de abrasão e erosão dentária podem estar associados à escovação dentária (Lima, Melo & Passos et al, 2013). Verifica-se que estes fatores podem estar relacionados a quantidade de abrasivo e substâncias químicas erosivas presentes nos cremes dentais (Patil, Ankola & Hebal, 2014), além do próprio efeito mecânico da escovação dentária (Kumar, Kumari & Acharya *et al*, 2014). No presente estudo, avaliou-se a abrasividade proporcionada por três cremes dentais clareadores em dois substratos diferentes.

Dentes humanos são referidos como supostamente o substrato que maior teria relevância clínica quando utilizados em pesquisas *in vitro*, porém limitações referentes a integridade das coroas e dificuldade em obtenção da quantidade suficiente para uma amostra representativa fizeram com que outras alternativas fossem estudadas para a realização de pesquisas *in vitro* (YASSEN, PLATT E HARA, 2011).

Incisivos bovinos são os substitutos mais utilizados e esse uso têm crescido nos últimos trinta anos. A facilidade de obtenção dos mesmos, a presença de uma ampla superfície que proporciona a obtenção de mais de uma amostra e a quase ausência de defeitos superficiais tornam sua aplicabilidade mais acessível (YASSEN, PLATT E HARA, 2011).

No presente estudo avaliou-se a homogeneidade das amostras através do teste de Kolmogorov-Smirnov e verificou-se que as amostras bovinas apresentaram homogeneidade entre si, enquanto que a amostra de dentes humanos mostrou diferenças significativas entre si. A homogeneidade das amostras bovinas pode ser atribuída a fatores como o fato de as amostras pertencerem a animais da mesma linhagem genética, idades semelhantes e submetidos a mesma dieta (WEGEHAUPT, GRIES & WIEGAND *et al.*, 2008; YASSEN, PLATT & HARA, 2011).

Ao ser realizado o mesmo estudo em dentes humanos, uma variabilidade muito grande de superfície foi encontrada o que limitou as possíveis comparações entre os grupos. Possíveis explicações seriam variabilidades na dieta, étnicas e idade que podem alterar a estrutura do esmalte dentário (Yassen, Plat e Hara, 2011). Estudos prévios (Özkan, Kansu & Özak, 2013; Kumar, Kumari, Acharya *et al.* 2014; Kumar, Kumar, Grupta *et al.* 2015) realizados com dentes humanos mostraram a mesma condição de não homogeneidade entre os grupos.

Avaliando-se as diferenças entre os dois substratos, os resultados são controversos. Para avaliação de modelos de desmineralização e remineralização em esmalte dentário, ainda não há consenso se o uso de esmalte bovino pode ser um substituto adequado para estudos *in vitro* (Yassen, Platt & Hara, 2011). Ao avaliar a remineralização de manchas brancas, *in vitro*, através da utilização de dentifrícios fluoretados em esmalte humano e bovino (Karlinsky, Mackery & Walker, 2011) encontraram comportamento significativamente diferente entre os substratos.

No presente estudo, o comportamento que os cremes dentais clareadores apresentaram ao longo do tempo, em ambos os substratos, foi similar, apesar das diferenças entre a homogeneidade das amostras bovinas e humanas.

Assim, mais estudos tornam-se necessários para a validação do substrato bovino como sendo adequado para modelos de estudo *in vitro* envolvendo abrasão e erosão do esmalte dentário humano.

A avaliação de abrasão e erosão em superfície dentária pode ser realizada através de diferentes métodos que permitem avaliações quantitativas ou qualitativas das superfícies

dentárias. Rugosímetros, perfilômetros, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Eletrônica 3D com variação de foco, Microscopia Confocal e Microscopia de Força Atômica são algumas das opções disponíveis.

Avaliando-se a literatura disponível, verifica-se que a Microscopia Eletrônica de Varredura é o método mais utilizado para avaliação qualitativa da superfície de esmalte exposta a processos de abrasão e erosão. Porém, apresenta como desvantagem a necessidade de preparação das amostras previamente a sua análise, o que pode causar alterações na estrutura do esmalte, já que a superfície dentária caracteriza-se por ser mais sensível devido aos processos de abrasão e erosão (HEGEDÜS, BISTEY & FLÓRA-NAGY, 1999).

Microscopia de Força Atômica é utilizada há mais de quinze anos para avaliação de topografia de superfície de esmalte dentário, porém ainda é considerado um método pouco utilizado para este fim. Inicialmente, apresentava limitações como a velocidade de aquisição da amostra e devido ao contato constante da sonda e de pouca sensibilidade, assim imagens com muita saturação eram fornecidas através do software (LIMA, MELO & PASSOS *et al*, 2013; HEGEDÜS, BISTEY & FLÓRA-NAGY, 1999).

Nos últimos anos, novos modos de captação de imagens, como o *Peak Force Trapping*, e atualizações e aperfeiçoamentos nos programas computacionais resultaram em imagens mais apuradas em três dimensões através de capturação de imagens em modo intermitente o que previne danos ao substrato durante a avaliação do mesmo já que o esmalte dentário apresenta-se de maneira frágil, principalmente quando exposto a substâncias clareadoras (FREITAS, ESPEJO & BOTTA).

Como limitação da MFA, a máxima extensão das imagens (100 μ m x 100 μ m) pode ser considerada não representativa para alguns parâmetros de análise (LIMA, MELO & PASSOS *et al*, 2013).

Frente ao exposto, a Microscopia de Força Atômica mostra-se como uma alternativa ainda muito promissora para avaliação de topografia de esmalte dentário sendo mais estudos necessários para aperfeiçoamento do método.

Capítulo 3

Artigo 3 – Análise da alteração de cor, rugosidade e topografia superficial de esmalte dentário bovino submetido a diferentes agentes clareadores caseiros.

RESUMO:

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito de agentes clareadores na alteração de cor (ΔE , ΔL , Δa , Δb), rugosidade superficial média e topografia superficial do esmalte dentário bovino. Para a avaliação da cor, cinquenta coroas de incisivos bovinos foram submetidas a profilaxia com jato de bicarbonato e randomizadas em um grupo controle e quatro grupos de acordo com o agente clareador utilizado: G1 – Grupo controle – saliva artificial, G2 – Peróxido de carbamida 10%, G3 – Peróxido de carbamida 22%, G4 – Peróxido de hidrogênio 4%, G5 – Peróxido de hidrogênio 10%. Para avaliação da rugosidade superficial média (R_a , μm) e topografia superficial, cinquenta e cinco amostras foram obtidas de outros vinte incisivos bovinos e foram randomizadas nos mesmos cinco grupos. A rugosidade superficial média foi avaliada previamente a exposição aos agentes clareadores e após o término dos 14 dias de tratamento. Para a avaliação da alteração de cor, os grupos foram submetidos a teste t para comparação dos fatores $\Delta E_1 - \Delta E_0$, $L_1 - L_0$, $a_1 - a_0$, $b_1 - b_0$ e para comparação entre os grupos, estes foram submetidos a Análise de Variância de um fator e Dunnett. Para avaliação da rugosidade superficial média, os grupos foram submetidos a teste t para avaliação da diferença entre a rugosidade superficial média final e inicial e Análise de Variância e Tukey para avaliação entre os grupos. A topografia superficial do esmalte foi avaliada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e de Força Atômica. Diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos foram encontradas para os fatores ΔE , ΔL e Δb . Para a rugosidade superficial média, verifica-se que os G2 e G5 apresentam-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle. Verifica-se que os G3 e G4 apresentam-se estatisticamente semelhantes entre si, e diferentes do controle, porém similares ao G2 e G5. Em relação a topografia superficial do esmalte, alterações foram verificadas para todos os grupos, com exceção do grupo controle. Conclui-se que agentes clareadores caseiros com diferentes composições e concentrações apresentam resultados estatisticamente diferentes em relação a alteração de cor, rugosidade superficial média e topografia superficial do esmalte.

PALAVRAS-CHAVE: Clareamento dental, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica.

INTRODUÇÃO:

Clareamento dentário caseiro, supervisionado por cirurgião-dentista, com a utilização de moldeiras personalizadas e gel de peróxido de carbamida 10% foi introduzido na odontologia por Haywood e Heymann¹, em 1989. Caracteriza-se por ser seguro, eficiente e de baixo custo². Também, é um dos métodos mais utilizados quando se visa clarear dentes e é considerado o padrão-ouro para comparações com outras técnicas odontológicas que visam alteração da coloração dentária³.

Porém, devido ao interesse por celeridade no tratamento⁴, produtos com peróxido de carbamida em outras concentrações foram introduzidos no mercado. Atualmente,

concentrações de até 22% são utilizadas para acelerar o processo de clareamento. Além disso, outros materiais como os que contêm peróxido de hidrogênio entre 3 e 14% também se encontram disponíveis comercialmente^{5,6}.

O gel de peróxido de carbamida a 10% decompõe-se em 3,5% de peróxido de hidrogênio e 6,5% de ureia⁷, este dado sugere que o efeito produzido por 3,5% de peróxido de hidrogênio deveria ser similar ao de peróxido de carbamida 10%⁷. Porém, quando avaliada a degradação do hidrogênio nos peróxidos de carbamida e hidrogênio, verifica-se que esta é mais lenta no peróxido de carbamida⁸, o que pode ocasionar diferenças nas alterações da superfície do esmalte dentário e cor dentária. Além disso, a presença de carbopol nos agentes clareadores também pode ocasionar alterações no substrato dentário⁹.

A efetividade do clareamento dental baseia-se na alteração da cor dentária, assim diferentes sistemas encontram-se disponíveis para avaliação do efeito clareador. Espectrofotômetros apresentam-se como um método objetivo e amplamente utilizado em estudos^{4,10-13}. A aferição da cor baseia-se no sistema CIE-Lab (*Commission Internationale de l'Eclairage*, 2004) que considera três eixos espaciais, denominados L*, a*, b*, no qual o eixo L* representa a luminosidade com variação de 0 (preto) a 100 (branco), enquanto que o eixo a* está associado aos matizes vermelho e verde. E, por fim, o eixo b*, alterna-se de amarelo a azul¹². A diferença de cor final e inicial (ΔE) também é registrada pelo espectrofotômetro.

Contudo, além do efeito clareador, torna-se importante avaliar possíveis alterações relacionadas a rugosidade e topografia na estrutura dentária que podem ocorrer após a utilização de agentes clareadores. Assim, as hipóteses nulas testadas neste estudo são: (H0₁) não há alteração no comportamento clareador para as diferentes composições e concentrações dos géis clareadores no esmalte dental bovino; (H0₂) os diferentes géis

clareadores não alteram a rugosidade superficial do esmalte bovino; (H₂O₂) a topografia superficial do esmalte dentário bovino mantém-se inalterada quando utilizados os diferentes agentes clareadores.

MATERIAIS E MÉTODOS:

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 6231/2015.

Confecção das amostras:

Avaliação de cor:

Para avaliar a alteração de cor, cinquenta incisivos bovinos foram coletados logo após o sacrifício dos animais para a indústria alimentícia. Com um disco diamantado flexível de dupla face (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil – 7.000 rpm), as raízes foram separadas das coroas dentárias e descartadas. As amostras foram mantidas em solução de timol 0,1% por 24 horas e posteriormente mantidas em saliva artificial por uma semana com trocas diárias da saliva, tempo de início da pesquisa. Foi realizado profilaxia nas coroas dentárias com jato de bicarbonato para remoção de manchas extrínsecas. Para garantir que a aferição da cor fosse realizada sempre no mesmo local, placas de copolímero de etileno e acetato de vinila de 1mm (FGM, Joinville, SC, Brasil) foram levadas a uma plastificadora a vácuo e posicionadas sobre as amostras. Após, a circunferência do bocal do espectrofotômetro (Vita Easyshade, Advence Zahnfabrik, Bad

Säckingen, Alemanha) foi marcada no terço médio de cada dente e removida com bisturi. As coroas foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (n = 10), conforme tabela 1.

Rugosidade superficial média (Ra, μm):

Para avaliar a rugosidade e topografia do esmalte bovino, outros vinte incisivos bovinos foram coletados logo após o sacrifício dos animais para a indústria alimentícia. Com um disco diamantado flexível de dupla face (700 rpm – KG Sorensen Cotia, SP, Brasil) e irrigação constante, as raízes foram separadas das coroas dentárias e descartadas. Três blocos contendo esmalte e dentina foram removidos do terço médio de cada coroa. Os espécimes foram mantidos em solução de timol 0,1% por 24 horas e posteriormente mantidos em saliva artificial por uma semana, sendo trocada diariamente. Cinquenta e cinco amostras de 4x4x3 foram obtidas, de acordo com uma metodologia previamente descrita por Attia, 2015¹⁴. Estas amostras foram avaliadas sob microscopia óptica VZM-200 (30x, Caltex, Irvive, Califórnia, EUA) e as que apresentavam trincas ou outros defeitos foram descartadas. A superfície de esmalte foi polida utilizando lixas d'água de 600, 1200 e 2400¹⁵ numa politriz horizontal Struers (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) por 20 segundos cada. Pastas diamantadas com 6, 3, 1 e 0,25 μm (Pasta diamantada, Arotec, Cotia, SP, Brasil) e feltro foram utilizados para proporcionar um polimento adicional¹⁶. Após o polimento, todas as amostras foram colocadas em lavadora ultrassônica L100 (Schuster, Santa Maria, RS, Brasil) por 10 minutos, com água destilada e foram divididas aleatoriamente em cinco grupos de acordo com o agente clareador utilizado ou controle (n=11) de acordo com a tabela 1.

Material	Lote	Fabricante	Tempo de exposição	Componentes
G1 - Saliva artificial – controle	697400	Apoteka, Porto Alegre, RS, Brasil	---	Água deionizada, fosfato de hidrogênio de di-potássio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio hexa-hidratado, cloreto de sódio, fluoreto de sódio
G2 - Peróxido de carbamida 10%	1520800711	3M do Brasil Ltda, Sumaré, SP, Brasil	4 horas diárias	Peróxido de Carbamida 10%, água purificada, propilenoglicol, fluoreto de sódio, nitrato de potássio, aromatizante, espessante, conservante, neutralizante e estabilizante
G3- Peróxido de carbamida 22%	1509100359 1505800455	3M do Brasil Ltda, Sumaré, SP, Brasil	4 horas diárias	Peróxido de Carbamida 22%, água purificada, propilenoglicol, fluoreto de sódio, nitrato de potássio, aromatizante, espessante, conservante, neutralizante e estabilizante
G4 - Peróxido de hidrogênio 4%	200115	FGM, Joinville, SC, Brasil	2 horas diárias	Peróxido de Hidrogênio 4%, carbopol neutralizado, nitrato de potássio, fluoreto de sódio, gluconato de cálcio, estabilizante, umectante, água deionizada
G5 - Peróxido de hidrogênio 10%	270115 110815	FGM, Joinville, SC, Brasil	30 minutos diários	Peróxido de Hidrogênio 10%, carbopol neutralizado, nitrato de potássio, fluoreto de sódio, gluconato de cálcio, estabilizante, umectante, água deionizada

Tabela 1 – Grupos e materiais utilizados na pesquisa.

Registro de cor inicial:

A aferição da cor foi registrada com um espectrofotômetro, utilizando-se condições de luz padronizadas. Entre todas as medições foi realizada a calibração do aparelho. As amostras foram levemente secas com papel absorvente antes da aferição da cor, objetivando-se manter a hidratação da amostra. A função utilizada foi Medição Média (o aparelho realiza a média de três análises consecutivas). As cores iniciais correspondem respectivamente aos valores ΔE_0 , L_0 , a_0 , b_0 .

Rugosidade superficial inicial (Ra_0):

A aferição da rugosidade superficial inicial (Ra_0 , μm) foi realizada com um rugosímetro digital SJ 201 (Mitutoyo Surfest Analyzer, Toquio, Japão). Para realizar a leitura da rugosidade, a ponta diamantada do rugosímetro percorria a superfície de 1.25 (*reading length*), com 0,25 de comprimento de amostragem (*cutoff*), com uma velocidade constante de 0,1 mm/s¹⁶. A rugosidade superficial de cada amostra foi determinada através da média aritmética obtida de 3 medições consecutivas, realizadas em diferentes regiões de cada amostra.

Exposição aos agentes clareadores:

Os grupos foram expostos aos agentes clareadores por 14 dias consecutivos, pelo tempo de exposição diário recomendado pelo fabricante conforme anteriormente descrito na tabela 1. Quando as amostras não estavam sendo submetidas ao clareamento, eram mantidas em saliva artificial.

Registro de cor final:

Após a realização dos procedimentos clareadores por 14 dias, as amostras foram mantidas em saliva artificial por 24 horas e, após este período, novas aferições foram realizadas,

denominadas ΔE_1 , L_1 , a_1 , b_1 . A avaliação da alteração de cor foi realizada avaliando-se a diferença entre os valores finais e iniciais, correspondendo as medidas ΔE , ΔL , Δa , Δb .

Rugosidade superficial média final (Ra_1):

Após os grupos serem submetidos ao tratamento clareador por 14 dias, as amostras foram mantidas em saliva artificial por 24 horas e a aferição da rugosidade superficial final (Ra_1) foi realizada da mesma forma que as iniciais (Ra_0)

Topografia superficial do esmalte:

Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV):

Uma amostra aleatória de cada grupo foi utilizada para avaliação da topografia superficial do esmalte dentário pós-polimento (inicial) e outra amostra para avaliação final (pós clareamento dental). As amostras foram secas com leves jatos de ar, fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas através da deposição de íons de prata (100 segundos, 60mA) usando-se um dispositivo de pulverização catódica (Bal-Tec SCD 005, Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha). Todas as imagens foram obtidas com a mesma magnificação (15000x) e escala de 10 μm em Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM, Inspeccionar F50, FEI, Hillsboro, OR, EUA).

Microscopia de Força Atômica (MFA):

Três amostras de cada grupo, nos diferentes tempos, foram selecionadas aleatoriamente para avaliação em Microscopia de Força Atômica (MFA, Dimension Icon, Bruker, Billerica, MA, EUA). As amostras não necessitaram de preparação, porém foram colocadas em uma lavadora ultrassônica por 10 minutos com água destilada, e após foram secas com leves jatos de ar. O modo utilizado para obtenção das imagens foi o *Peak Force Tapping*. Os tamanhos

selecionados para as amostras foram de $60\mu\text{m}$ por $60\mu\text{m}$. As imagens foram geradas pelo programa NanoScope Analysis 1.40 (Bruker, Billerica, Ma, EUA).

Análise estatística:

A análise estatística foi conduzida através do programa SPSS (versão 21, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para avaliação da cor, primeiramente os resultados foram submetidos ao teste t para amostras pareadas para avaliação das diferenças dos resultados finais e iniciais de cada grupo (ΔE , ΔL , Δa , Δb). Após, para a avaliação entre os grupos, os resultados foram submetidos a ANOVA de um fator e teste *post hoc* Dunnett.

Para a avaliação da rugosidade superficial média (R_a) os resultados foram submetidos ao teste t para amostras pareadas para avaliação das diferenças dos resultados finais (R_{a1}) e iniciais (R_{a0}) de cada grupo. Por fim, para comparação entre os grupos, foi realizado Análise de Variância de um fator e após ao teste *post hoc* Tukey.

RESULTADOS:

Alteração de cor:

Os resultados obtidos para ΔE_0 , L_0 , a_0 e b_0 foram tabulados assim como os de ΔE_1 , L_1 , a_1 , b_1 e foi-se calculada a diferença entre eles definindo-se os valores ΔE , ΔL , Δa e Δb conforme tabela 2.

Grupos	ΔE	ΔL	Δa	Δb
G1	-0,100 ^{Bc} (0,649)	-0,220 ^{Bc} (0,439)	0,070 ^{Ba} (0,170)	0,060 ^{Bb} (0,741)
G2	2,650 ^{Ab} (0,310)	5,700 ^{Ab} (0,983)	0,500 ^{Ba} (0,347)	-1,810 ^{Aa} (0,970)
G3	2,580 ^{Ab} (0,610)	6,410 ^{Ab} (0,874)	0,040 ^{Ba} (0,171)	-2,950 ^{Aa} (0,618)
G4	1,380 ^{Aab} (1,270)	4,480 ^{Aab} (3,192)	-0,012 ^{Ba} (0,282)	-1,870 ^{Aa} (1,417)
G5	1.450 ^{Aa} (1,193)	3,800 ^{Aa} (2,823)	-0,140 ^{Ba} (0,279)	-2,520 ^{Aa} (1,055)

Tabela 2 - Médias e (DP) para ΔE , ΔL , Δa , Δb de cada grupo. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com teste t para amostras pareadas (intra-grupo); Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com Análise de Variância de um fator e Dunnett (entre os grupos) ($\alpha=0,05$)

Para a avaliação intra-grupo, a diferença entre os fatores finais e iniciais (ΔE , ΔL , Δa e Δb) foi avaliada através de teste t para amostras pareadas. Não houve diferenças estatisticamente significativas para o grupo controle nos diferentes fatores. Todos os agentes clareadores mostraram diferenças estatisticamente significativas para os fatores ΔE , ΔL e Δb . Para o fator Δa , nenhum grupo mostrou diferença estatisticamente significativa.

A alteração da cor entre os grupos foi avaliada através de Análise de Variância de um fator e Dunnett e verifica-se que ocorreram alterações estatisticamente significativas entre os grupos, nos diferentes fatores ΔE , ΔL , Δb (conforme tabela 2).

Para os fatores ΔE e ΔL , o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa dos demais. Já os grupos G2 e G3 apresentaram-se similares estatisticamente ao G4, porém com diferença estatisticamente significativa do grupo G5.

Avaliando-se o Δb , verifica-se que todos os grupos submetidos a agentes clareadores obtiveram similaridade estatística entre si, porém diferiram-se estatisticamente do grupo controle (G1). Para o fator Δa , nenhum grupo mostrou diferença estatisticamente significativa.

Rugosidade superficial média (Ra_0 , Ra_1 e Ra_{1-0}):

Primeiramente, os resultados foram submetidos ao teste t pareado para avaliação da diferença entre a rugosidade final e inicial em cada grupo (Ra_{1-0}). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.

Grupos	Média e DP	Média e DP	Diferença - Ra_{1-0}
	Ra_0	Ra_1	Ra_{1-0}
G1	0,125 ^b (0,279)	0,131 ^b (0,310)	0,006 ^B
G2	0,116 ^b (0,323)	0,160 ^a (0,012)	0,044 ^{AB}
G3	0,107 ^b (0,044)	0,159 ^a (0,054)	0,052 ^A
G4	0,101 ^b (0,036)	0,170 ^a (0,033)	0,069 ^A
G5	0,112 ^b (0,031)	0,149 ^a (0,031)	0,037 ^{AB}

Tabela 3 – Médias (DP) para rugosidades superficiais iniciais e finais de cada grupo. Letras minúsculas distintas evidenciam diferenças nas rugosidades iniciais e finais submetidas ao teste t (intra-grupo). Letras maiúsculas distintas evidenciam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando submetidos a Análise de Variância e Tukey.

Todos os grupos mostraram-se com diferença estatisticamente significativa para rugosidade superficial média ao teste t para avaliação intra-grupo, com exceção do grupo controle (G1), que apresentou similaridade estatística após os 14 dias mantidos em saliva artificial, com trocas diárias.

Avaliando-se a alteração da rugosidade superficial média entre os grupos através de Análise de Variância e Tukey, verifica-se que os G2 e G5 apresentam-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle. Verifica-se que os G3 e G4 apresentam-se estatisticamente semelhantes entre si, e diferentes do controle, porém similares ao G2 e G5.

Topografia superficial do esmalte:

Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo:

As alterações na morfologia do esmalte dentário foram avaliadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 1). A amostra do grupo controle (G1) apresenta similaridade a imagem inicial (A). Já as imagens dos grupos G2, G3 e G5 apresentam leves sinais de alteração enquanto que a imagem do grupo G4 apresenta maiores alterações da topografia superficial do esmalte.

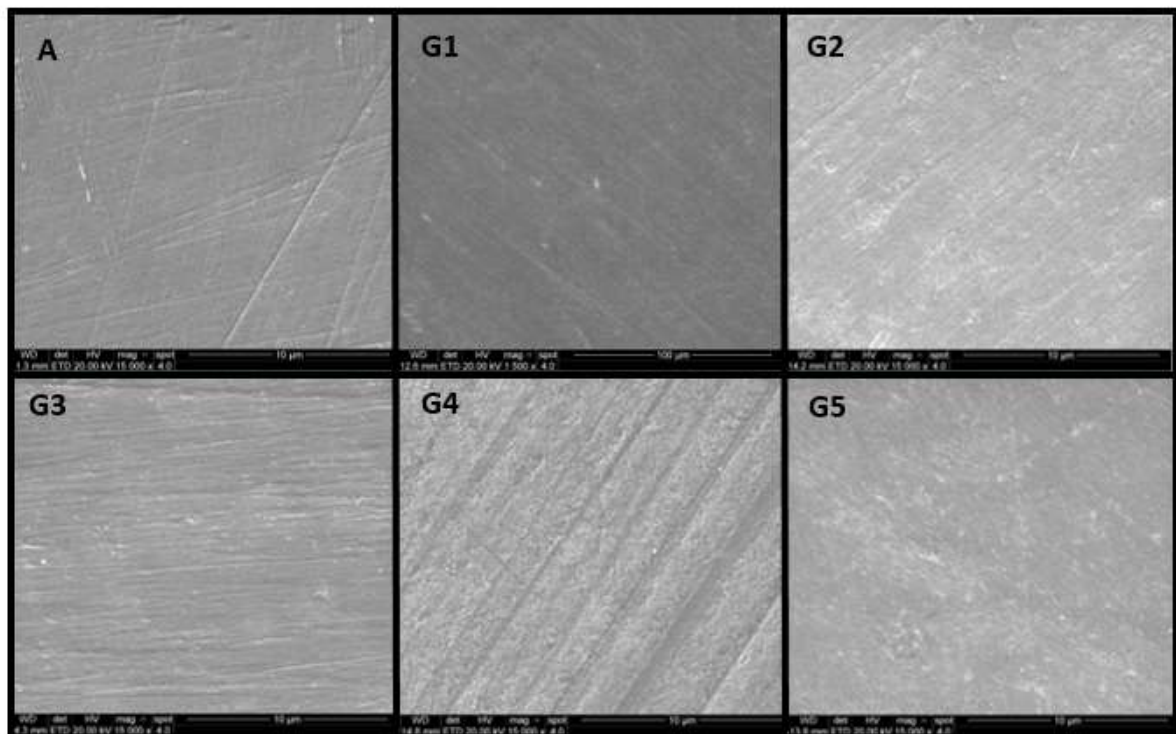


Figura 1 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (x15000 - 10µm). A – Imagem inicial; G1 – Controle, G2 – Peróxido de carbamida 10%, G3 – Peróxido de carbamida 22%, G3 – Peróxido de hidrogênio 4%, Peróxido de hidrogênio 10%.

Microscopia de Força Atômica:

Avaliando-se as imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) verifica-se na imagem 1 (inicial) uma superfície típica de esmalte polido com picos e vales de baixo relevo conforme já descrito em um estudo prévio¹⁷. As imagens referentes aos G2, G3 apresentam-se com o mesmo padrão de alteração na topografia superficial do esmalte, enquanto que os G4 e G5 apresentam similaridade na topografia superficial do esmalte dentário inclusive com o G1.

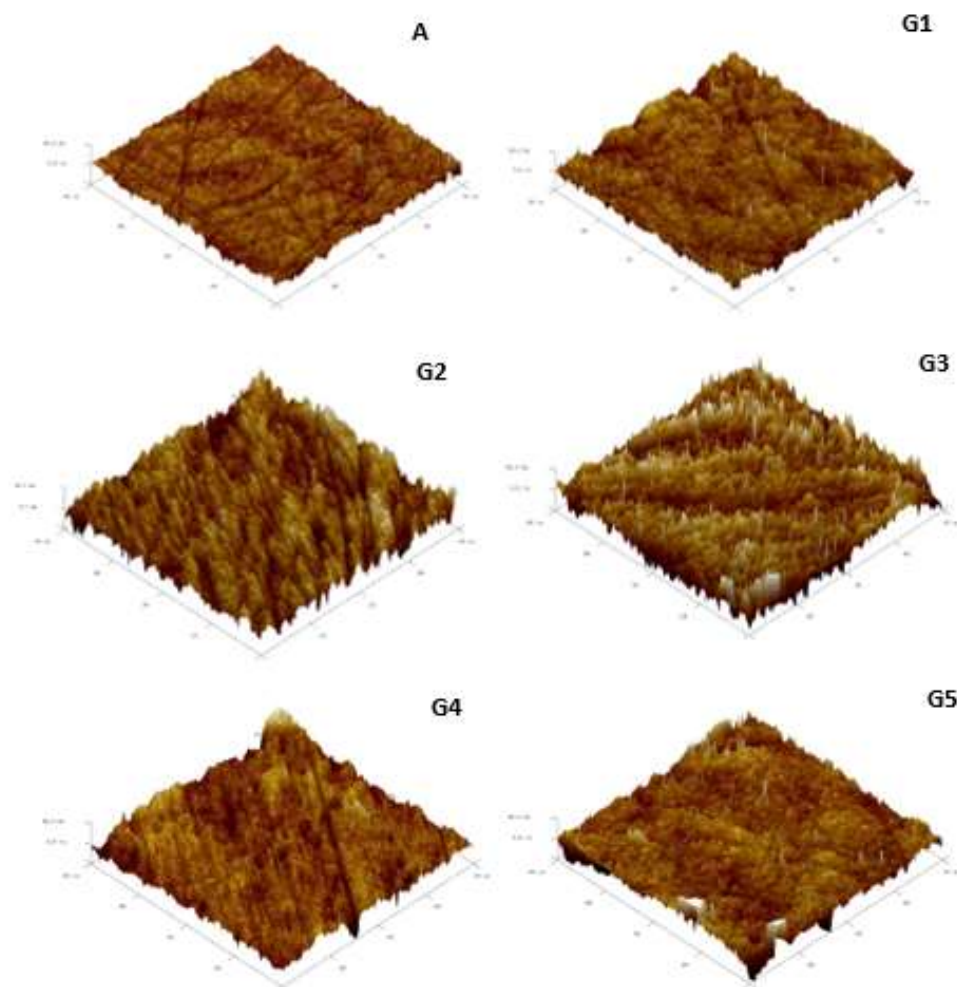


Figura 2 – Imagens de Microscopia de Força Atômica ($60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$). A – Imagem inicial; G1 – Controle, G2 – Peróxido de carbamida 10%, G3 – Peróxido de carbamida 22%, G3 – Peróxido de hidrogênio 4%, Peróxido de hidrogênio 10%.

DISCUSSÃO:

O presente estudo avaliou o efeito de agentes clareadores para uso caseiro, sob supervisão do cirurgião-dentista, em relação à alteração de cor, de rugosidade superficial e da topografia superficial do esmalte dental bovino.

Alterações de cor dentária podem ser avaliadas através de métodos subjetivos ou através do uso de instrumentação objetiva. Métodos subjetivos, como a utilização de escalas de cores, produzidas em acrílico ou porcelana, são limitados devido a variáveis como a condição de luminosidade do local, experiência, idade e fadiga ocular do examinador¹⁸.

O sistema CIE-Lab caracteriza-se por ter três referências: matiz, luminosidade e saturação. Através do espectrofotômetro, a cor pode ser quantificada a partir de seu local num espaço tridimensional L^* , a^* , b^* , o que faz com que este dado se torne objetivo e acurado^{19,20}. O valor L^* varia de 0 (preto) a 100 (branco), e os valores a^* e b^* estão relacionados a coordenadas de cromaticidade. Enquanto o valor a^* varia de um lado negativo (mais esverdeado) para o lado positivo (mais avermelhado), o valor b^* varia de um lado negativo (mais azul) para o lado mais amarelo (lado positivo)¹⁹. Assim, quando o clareamento dental é realizado, objetiva-se aumento do fator L^* e resultado negativo para o fator b^* (menos amarelo)²⁰.

Quando da utilização do espectrofotômetro, este já disponibiliza o valor de ΔE sem a necessidade de calculá-lo. Esta informação seria o correspondente ao valor de uma escala de cores, porém sua utilização isolada, faz com que o espectro de cores não seja avaliado²¹. No presente estudo, os grupos mostraram diferenças entre si relacionadas a alteração de cor (ΔE), assim a hipótese nula (H_0) foi rejeitada. Avaliando-se os grupos correspondentes ao peróxido de carbamida (G2 e G3), estes mostraram maiores valores de ΔE , o que poderia determinar um melhor resultado para o clareamento para estes grupos. Porém, avaliando-se os fatores L^* , a^* ,

b*, verifica-se que o resultado do clareamento é muito mais complexo, já que envolve alteração de saturação e luminosidade e que todos estes fatores devem ser avaliados.

Além disso, os valores obtidos para o ΔE variaram entre 1.450 e 2.650. Valores estimados para estudos clínicos randomizados variam entre 4.000 e 5.000²². Além das diferenças metodológicas (*in vivo* versus *in vitro*), possíveis explicações para esta diferença estão associadas ao tempo de duração do clareamento, pois apesar de haver na literatura tratamentos com duração de 4 semanas, os fabricantes dos produtos utilizados na presente pesquisa indicam 14 dias de tratamento. Além disso, variações relacionadas ao substrato também estão presentes. O esmalte dental bovino apresenta um valor L* maior que o mesmo substrato humano^{23,24}, o que pode acarretar diferenças na alteração de cor quando comparado ao esmalte dental humano. Possíveis justificativas estão relacionadas a idade de coleta dos dentes. Enquanto dentes bovinos são de animais jovens; quando da utilização de dentes humanos, estes normalmente são provenientes de doença periodontal, assim estima-se que de pessoas com mais idade²⁴. Esta mesma característica também foi encontrada no estudo de Kwon, 2002²⁴. Portanto, mais estudos são necessários para comparação de possíveis diferenças entre os dois substratos quando da avaliação de alteração de cor por agentes clareadores.

No presente estudo, todos os agentes clareadores mostraram diferenças estatisticamente significantes nos valores ΔL e Δb . Observa-se que os dois grupos nos quais foram utilizados peróxido de carbamida, a diferença na luminosidade (ΔL) foi maior (numericamente), enquanto que quando utilizado peróxido de hidrogênio, estes valores foram menores. Para o fator Δb , verifica-se que as maiores concentrações de peróxido de carbamida (G3) e hidrogênio (G5) determinaram uma maior alteração (menos amarelo, mais azul), porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Portanto, parece que a composição do agente clareador parece determinar uma maior luminosidade ao esmalte dental, enquanto que a concentração do produto pode estar associada a alteração de saturação (menos amarelo) quando utilizados pelo

mesmo período de tratamento. No estudo de Meireles *et al*⁵, o comportamento para o Δb foi similar ao deste estudo quando utilizado peróxido de carbamida a 10 e 16%. Enquanto que no estudo de Llambes *et al*¹², peróxido de carbamida a 22% também determinou maior luminosidade do que peróxido de hidrogênio, mesmo numa concentração muito mais alta do que a utilizada na presente pesquisa (37,5%).

Em relação a rugosidade superficial do esmalte, todos os grupos mostraram diferenças estatisticamente significantes entre Ra_1 e Ra_0 , com exceção do grupo controle (G1), portanto a hipótese nula (H_0) foi rejeitada. Além disso, avaliando-se a diferença na rugosidade superficial média entre os grupos, verificou-se que os G2 e G5 apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle, enquanto que os G3 e G4 apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre si. Apesar de os grupos G3 e G4 diferirem-se do grupo controle, mostraram-se estatisticamente semelhantes aos G2 e G5.

O uso de peróxido de carbamida a 10% mostrou-se similar ao controle em relação ao efeito na rugosidade superficial. Este resultado está de acordo com os de Pinto *et al*, 2004²⁵, Moraes *et al*, 2006²⁶ e Know *et al*, 2015²³. No estudo de Faraoni-Romano, 2007²⁷, a rugosidade superficial do esmalte mostrou-se similar tanto na utilização de peróxido de carbamida 10%, quanto no 22%, enquanto que no presente estudo o G3 mostrou-se diferente estatisticamente do controle, porém similar ao 10%.

No presente estudo, o gel de peróxido de hidrogênio a 4% mostrou rugosidade superficial média estatisticamente diferente do grupo controle, enquanto que para o peróxido de hidrogênio a 10%, não houve diferença do controle. Diferentes protocolos de aplicação, além de diferenças no grau de saturação, pH, acidez titulável, propriedades dos quelantes e viscosidade podem determinar estas alterações^{28,29}. Assim, mais estudos são necessários para compreender como estas variáveis podem alterar o mecanismo de ação e rugosidade superficial

do esmalte de dentes bovinos. Além disso, estudos *in vitro* normalmente são realizados em dois diferentes substratos (humano e bovino), o que também pode influenciar nos resultados.

Em relação a topografia da superfície, as imagens não revelam prismas de esmalte, com pouca diferença na rugosidade nos grupos G2, G3 e G5 quando avaliada em Microscopia Eletrônica de Varredura. Já a imagem correspondente ao G4 apresenta rugosidade maior, assim a hipótese nula referente a topografia do esmalte (HO₃) foi rejeitada. Além disso, todas as amostras evidenciam sulcos que podem ser atribuídos ao processo de polimento necessário para avaliação da rugosidade superficial do esmalte dental.

Ao avaliar as imagens de Microscopia de Força Atômica, diferenças na rugosidade são perceptíveis principalmente para os grupos G2 e G3. As diferentes composições dos agentes clareadores parecem influenciar na alteração da topografia superficial do esmalte. Como a literatura é escassa em relação ao uso de MFA em substrato bovino submetido a diferentes agentes clareadores, mais estudos são necessários para avaliar possíveis alterações na topografia superficial do esmalte, relacionadas a diferentes composições e concentrações de agentes clareadores utilizados para clareamento caseiro, supervisionado por cirurgião-dentista.

CONCLUSÕES:

Frente as limitações deste estudo *in vitro*, conclui-se que agentes clareadores caseiros com diferentes composições e concentrações apresentam resultados estatisticamente diferentes em relação a alteração de cor e rugosidade superficial média do esmalte dental bovino e que alteram a topografia superficial do esmalte.

REFERÊNCIAS:

1. Haywood VB, Heymann HO (1989) Nightguard vital *bleaching Quintessence International* **20(3)** 173-176.
2. Auschill TM, Hellwig E, Schidale S *et al* (2005) Efficacy, Side-effects and Patients' Acceptance of Different Bleaching Techniques (OTC, in-office, at-home). *Operative Dentistry* **30(2)** 156-63.
3. Caballero AB, Navarro LF, Lorenzo AL (2007) In vivo evaluation of the effects of 10% carbamide peroxide and 3.5% hydrogen peroxide on the enamel surface *Medicine Oral Patology Oral Cirurgia Bucal* **12** 404-7.
4. Costa JB, McPharlin R, Hilton T *et al* (2012) Comparison of Two At-home Whitening Products of Similar Peroxide Concentration and Different Delivery Methods. *Operative Dentistry* **37(4)** 333-339.
5. Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL *et al* (2008) Efficacy and Safety of 10% and 16% Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial. *Operative Dentistry* **33(6)** 606-12.
6. Marshall MV, Cancro LP, Fischinan SL (1995) Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. *Journal of Periodontology* **66** 786-796.
7. De La Peña AV, Cabrita BO (2006) Comparison of the clinical efficacy and safety of carbamide peroxide and hydrogen peroxide in at-home bleaching gels. *Quintessence International* **37** 41-46.

8. Haywood VB (1992) History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence International* **8** 471-488.
9. Féliz-Matos L, Hernández M, Abreu N (2014) Dental Bleaching Techniques; Hydrogen-carbamide Peroxides and Light Sources for Activation, an Update. *The Open Dentistry Journal* **8** 264-268.
10. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A et al (2010) Clinical performance of vital bleaching techniques. *Operative Dentistry* **35(1)** 3-10.
11. Lima MJ, Araújo DB, de Jesus CE *et al* (2009) Efficacy of 35% hydrogen peroxide on human enamel: in vitro evaluation in different tooth areas. *Acta Odontologica Latinoamericana* **22(3)** 163-70.
12. Llambés G, Llana C, Amengual J et al (2011) In vitro evaluation of the efficacy of two bleaching procedures. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **16(6)** 845-51.
13. Karadas M, Duymus ZY (2015) In Vitro Evaluation of the Efficacy of Different Over-the-Counter Products on Tooth Whitening. *Brazilian Dental Journal* **26(4)** 373-377.
14. Attia ML, Cavalli V, Espírito Santo AM *et al* (2015) Effects of bleaching agents combined with regular and whitening toothpastes on surface roughness and mineral content of enamel. *Photomedicine and Laser Surgery* **33(7)** 378-83.

15. Borges BCD, Borges JS, Melo CD *et al* (2011) Efficacy of a Novel At-home Bleaching Technique With Carbamide Peroxides Modified by CPP-ACP and Its Effect on the Microhardness of Bleached Enamel. *Operative Dentistry* **36(5)**, 521-528.
16. Vieira-Junior WF, Lima D, Tabchoury CPM *et al* (2015) Effect of toothpaste application prior to dental bleaching on whiteness effectiveness and enamel properties. *Operative Dentistry* **41(1)** 29-38.
17. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E *et al* (1999) An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry* **27** 509-15.
18. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dental J.* 2001;190:309-16.
19. Zhao K, Zong L, Zhang Q (2013) Clinical comparison between two bleaching techniques: a 180-day follow-up study. *Quintessence International* **44(8)** 601-7.
20. Matis BA, Hamdan YS, Cochran MA *et al* (2002) A clinical evaluation of a bleaching agent used with and without reservoirs. *Operative Dentistry* **27** 5-11.
21. Grobler SR, Majeed A, Hayward R (2011) A Clinical Study of the Effectiveness of Two Different 10% Carbamide Peroxide Bleaching Products: A 6-Month Follow up. *International Journal of Dentistry* **2011** 1-5.

22. American Dental Association Council of Scientific Affairs. Acceptance program guidelines: dentist-dispensed home use tooth bleaching products. Chicago: ADA; 2006.
23. Kwon SR, Kurti SR, Oyoyo U *et al* (2015) Effect of various tooth whitening modalities on microhardness, surface roughness and surface morphology of the enamel. *Odontology* **103** 274–279.
24. Kwon YH, Huo MS, Kim KH (2002) Effect of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* **29** 473–477.
25. Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V *et al* (2004) Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Brazilian Oral Research* **18(4)** 306-11.
26. Moraes RR, Marimon JLM, Schneider LFJ *et al* (2006) Carbamide peroxide bleaching agents: effects on surface roughness of enamel, composite and porcelain *Clinical Oral Investigation* **10** 23–28.
27. Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC (2007) Concentration-dependent effect of bleaching agents on microhardness and roughness of enamel and dentin. *American Journal of Dentistry* **20(1)** 31-4.

28. Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Bollhader A et al (2013) Effect of acidic solution viscosity on enamel erosion. *Journal of Dentistry Research* **92** 289–94.
29. Fornaini C, Lagori G, Merigo E et al (2013) Analysis of shade, temperature and hydrogen peroxide concentration during dental bleaching: in vitro study with the KTP and diode lasers. *Lasers Medicine Science* **28** 1–6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AUSCHILL, T.M.; HELLWIG, E.; SCHIDALE, S. *et al.* Efficacy, Side-effects and Patients' Acceptance of Different Bleaching Techniques (OTC, in-office, at-home). *Operative Dentistry*, v. 30, n. 2, p. 156-63, 2005.

BARBOUER, M. E.; REES, G.G. The role of erosion, abrasion and attrition in tooth wear. *The Journal of Clinical Dentistry*, v. 17, n.4, p. 88-93, 2006.

BOLAY, S; CAKYR, F. Y., GURGAN, S. Effects of toothbrushing with fluoride abrasive and whitening dentifrices on both unbleached and bleached human enamel surface in terms of roughness and hardness: An in vitro study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v.13, p.584-9, 2012.

CAREY, C. M.; Tooth whitening: what we now know. *The Journal of evidence-based Dental Practice*, v. 14 - suppl, p. 70-6 2014

DEMARCO, F. F.; MEIRELES, S. S.; MASOTTI, A. S. Over-the-counter whitening agents: Critical assessment of the OTC products for home-use bleaching. *Brazilian Oral Research*, v.23 – spec issue I, p. 64 – 70, 2009.

FEARON, J. Tooth whitening: concepts and controversies. *Journal of the Irish Dental Association*, v. 53, n. 3, p. 132-40, 1993.

HATTAB, F. N.; QUDEIMAT, M. A., AL-RIMAWI, H. S. Dental Discoloration: an Overview. *Journal of Esthetic Dentistry*, v.11, n.6, p. 291-310, 1999.

HILGENBERG, S. P.; PINTO S. C. S., FARAGO, P. *et al.* Physical-chemical characteristics of whitening toothpaste and evaluation of its effects on enamel roughness. *Brazilian Oral Research*, v. 25, n. 4, p. 288-94, 2011.

KUMAR, S.; KUMARI, M.; ACHARYA, S. *et al.* Comparison of surface abrasion produced on the enamel surface by a standard dentifrice using three different toothbrush bristle design: a profilometric in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, v. 17, n.4. p. 369-73,2014.

KUMAR, S.; KUMAR, S.S.; GRUPTA, A. *et al.* A Profilometric Study to Assess the Role of Toothbrush and Toothpaste in Abrasion Process. *Journal of Dentistry*, v. 16, n. 3 suppl, p. 267-73, 2015.

MEIRELES, S. S.; HECKMANN, S. S.; LEIDA F. L. *et al.* Efficacy and Safety of 10% and 16% Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial. *Operative Dentistry*, v. 33, n.6, p.606-12, 2008.

ÖZKAN, P.; KANSU,G.; ÖZAK, S. T. *et al.* Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 71, p. 488-97, 2013.

PACHALY, R; POZZOBON, R. T. Analysis of surface roughness of human enamel exposed to bleaching agent and submitted to brushing. *Acta Odontologica Latinoamerica*, v. 25, n.1, p.59-66, 2012.

SULIEMAN, M. An Overview of Bleaching Techniques: 1. History, Chemistry, Safety and Legal Aspects. *Dental Update*, v. 31, p. 608-16, 2004

SULIEMAN, M.; ADDY, M.; REES, J. S. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *Journal of Dentistry*, v.31, p. 415-22, 2003.

TORRES, C. R. G.; PEROTE, L. C. C. C.; GUTIERREZ, N. C. *et al.* Efficacy of Mouth Rinses and Toothpaste on Tooth Whitening. *Operative Dentistry*, v. 38, n. 1, p. 57-62, 2013.

TRENTINO, A.C.; SOARES, A.F.; DUARTE, M. A. *et al.* Evaluation of pH Levels and Surface Roughness After Bleaching and Abrasion Tests of Eight Commercial Products. *Photomed Laser Surgery*, v. 33, n. 7, p.372-7, 2015.

VIEIRA-JUNIOR, W. F.; LIMA D. A. N. L.; TABCHOURY C. P. M. *et al.* Effect of Toothpaste Application Prior to Dental Bleaching on Whiteness Effectiveness and Enamel Properties, *Operative Dentistry*, v. 41, n. 1, 2016.

WATTS, A.; ADDY, M.; Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *British Dental Journal*, v. 190, n. 6, 2001.

WORSCHER, C. C.; RODRIGUES, J. A.; MARTINS, L. R. M. *et al.* Brushing Effect of Abrasive Dentifrices during At-home Bleaching with 10% Carbamide Peroxide on Enamel Surface Roughness. *Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 7, n.1, p. 25-34, 2006.

ANEXOS

SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6231

Porto Alegre, 10 de junho de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE APLICAÇÃO DE AGENTES CLAREADORES EXTERNOS EM DENTES BOVINOS" coordenado por EDUARDO GONCALVES MOTA. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6742

Porto Alegre, 9 de setembro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação da influência de cremes dentais clareadores na cor e rugosidade de esmalte dentário humano" coordenado por EDUARDO GONCALVES MOTA. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da influência de cremes dentais clareadores na cor e rugosidade de esmalte dentário humano

Pesquisador: Eduardo Gonçalves Mota

Versão: 1

CAAE: 50877815.9.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 114776/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da influência de cremes dentais clareadores na cor e rugosidade de esmalte dentário humano
Pesquisador Responsável: Eduardo Gonçalves Mota
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 50877815.9.0000.5336
Submetido em: 11/11/2015
Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio