



Joana Duarte Silva e Castro

Licenciada em Medicina Nuclear

Estudo dos efeitos do abuso de produtos de branqueamento no esmalte dentário

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno,
FCT-UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Miguel Lourenço Silveira, GIBBO-
UICOB

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Doutora Sofia de Mello Lima Teixeira Santos Arantes e Oliveira

Vogal: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno

Estudo dos Efeitos do Abuso de Produtos de Branqueamento no Esmalte Dentário

Copyright © Joana Duarte Silva e Castro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them.”

-Walt Disney-

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Sofia Pessanha todo o apoio, disponibilidade que demonstrou e pela partilha de conhecimentos durante a realização deste trabalho. Foi uma pessoa paciente e incansável para esclarecer qualquer dúvida. Por toda a ajuda e compreensão, muito Obrigado!

Agradeço também ao meu orientador Professor Doutor João Silveira, pela ajuda dada ao longo de todo este trabalho.

Quero, ainda, agradecer à Professora Filipa Chasqueira por toda a simpatia e disponibilidade demonstradas, sempre com um sorriso na cara. Ao João Godinho pela ajuda laboratorial prestada e crucial para a realização deste trabalho. Ao professor Mauro, que mesmo não sendo meu orientador, auxiliou no laboratório.

A todos os professores que ao longo da vida ajudaram a traçar o meu percurso académico.

Aos meus familiares queridos e amigos por todo o apoio e por acreditarem. Por vezes, as palavras não são suficientes.

Resumo

A estética dentária tem recebido bastante enfoque nos últimos anos, particularmente devido à importância a que a população atribui à aparência estética do sorriso. É, assim, desejado um sorriso o mais branco possível e que de preferência seja fácil de obter, eficaz, rápido, económico e que seja o menos invasivo possível. Com vista a satisfazer esta necessidade, surgiu no mercado uma grande diversidade de produtos Over the Counter (OTC). Os produtos OTC podem ser facilmente adquiridos por qualquer pessoa a um baixo custo. Contudo, a maioria destes produtos têm concentrações do agente ativo bastante superiores aos níveis considerados seguros pela Comissão Europeia (CE). Muitos autores têm demonstrado preocupação em relação à segurança e consequentes efeitos no esmalte dentário devido ao possível uso abusivo destes produtos. Mais precisamente, a obsessão por dentes brancos pode constituir uma patologia, na qual os produtos de branqueamento dentário são constantemente aplicados pelo paciente, sem qualquer supervisão médica. Nos casos mais graves pode causar lesões na cavidade oral, induzindo efeitos adversos severos tais como sensibilidade dentária, redução da microdureza e aumento da rugosidade do dente. O objetivo deste estudo *in vitro* é avaliar se o grau de mineralização e o teor elementar do esmalte dentário são alterados aquando o branqueamento dentário com dois produtos de branqueamento OTC diferentes, excedendo as recomendações indicadas pelos fabricantes. De forma a realizar este estudo, foram usados dezassete dentes. Foram realizados dois protocolos: no primeiro protocolo foram aplicados dois produtos diferentes (Teeth *Whitening* Home Kit e White! – Bingo-UK) por um período de 39 dias. Para cada produto foram selecionadas seis espécimes aleatoriamente, tendo as condições experimentais sido idênticas. No segundo protocolo, cinco espécimes foram tratadas com o produto (WHITE! -Bingo-UK) por um período de 5 dias. Ambos produtos foram adquiridos em *sites* online. Entre cada aplicação todos os espécimes foram conservados em saliva humana. O conteúdo elementar de cada espécime, antes e após o branqueamento foi obtido com recurso à espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) e a banda do fosfato (PO_4^{3-}) foi avaliada com espectroscopia Raman. Em relação ao primeiro protocolo, 7 dias após o branqueamento a desmineralização estudada foi significativa ($p < 0,01$), sendo que após os 39 dias de tratamento o aumento do grau de desmineralização (GD) parece ser permanente. As amostras no segundo protocolo demonstraram resultados semelhantes relativamente ao GD, mas em diferentes momentos.

Palavras-chave: Dente; biologia oral; odontologia; OTC; branqueamento dentário; cálculos quantitativos; μ -EDXRF; μ -Raman.

Abstract

Aesthetic dentistry has received extensive focus in recent years, particularly due to the importance that people give to the appearance of the smile. It is desired a smile as white as possible and preferably easy to obtain, effective, painless, fast, economic and less invasive. In order to satisfy this need, a high diversity of Over The Counter (OTC) products has appeared on the market. OTC products can be easily bought by anyone and at a low cost. However, many of these products have active agent concentrations well above the European Commission safety levels. Many authors have demonstrated a concern for safety and consequent effects on the tooth surface due to the possible abuse of these products. More precisely, bleachorexia is a disease characterized by the constant application of whitening products, without any medical control. It may cause in more severe cases lesions in the oral cavity, inducing severe adverse effects such as tooth transitory sensitivity, reduction of microhardness and increase of roughness. The purpose of this in vitro study is to assess whether the mineralization degree and elemental content in tooth enamel are altered when bleaching the teeth with two different OTC bleaching gels, exceeding the recommendations of the manufacturer. In order to perform this evaluation, seventeen healthy teeth were used. Two protocols were performed: on the first protocol were applied two different products (Teeth *Whitening* Home Kit and WHITE! -Bingo-UK), for the period of 39 days. For each product six samples were selected randomly, having the experimental conditions being identical. On Protocol 2 five samples were treated with the OTC product (WHITE! -Bingo-UK) for the period of 5 days. All samples were stocked in human saliva between each application. The elemental content of each sample, before and after was obtained by Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDXRF) and phosphate (PO_4^{3-}) profile was evaluated with Raman Spectroscopy. For the first protocol, seven days after treatment demineralization was significant ($p < 0,01$), wherein after 39 days of treatment the Degree of Demineralization (DD) seems to be permanent. Samples on the second protocol demonstrated similar results regarding the DD, but in different moments of time.

Keywords: Teeth; oral biology; dentistry; OTC; dental bleaching; quantitative calculations; μ -EDXRF; μ -Raman.

Glossário

λ – Comprimento de Onda
 μ -EDXRF – Micro Energy Dispersive X-Ray Fluorescence
ADA – American Dental Association
Al - Alumínio
C - Carbono
Ca – Cálcio
 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – Hidroxiapatite
CCPC – Comissão Científica em Produtos de Consumo
Cl - Cloro
 CO_3^{2-} – Carbonato
Cu - Cobre
EBM – Engenharia Biomédica
F - Flúor
 F^- – Fluoreto
FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia
Fe – Ferro
GD – Grau de desmineralização
H – Hidrogénio
HAp – Hidroxiapatite
HCl – Ácido Clorídrico
ILD – Incerteza dos limites de detecção
K – Potássio
LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LD – Limites de detecção
LED – Light Emitting Diode
MEV - Microscopia Electónica de Varrimento
Mg – Magnésio
Mn - Manganésio
Na – Sódio
O – Oxigénio
P – Fósforo
PC – Peróxido de Carbamida
PH – Peróxido de Hidrogénio
PS – Perborato de Sódio
PU – Peróxido de ureia
 PO_4^{3-} - Fosfato
S - Enxofre
Strips – Tiras ou bandas adesivas branqueadoras
UICOB – Unidade de Investigação em Ciências Orais e Bioquímicas
Rh – Ródio
UNL – Universidade Nova de Lisboa
XRF - X-Ray Fluorescence
Zn – Zinco

Índice de Conteúdos

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Pertinência do tema em Engenharia Biomédica, na especialidade e carácter inovador.... | 2 |
| 2. O Dente | 3 |
| 2.1 Constituição do dente | 4 |
| 2.1.1 Esmalte | 5 |
| 2.1.1.1 Caracterização e composição química | 5 |
| 2.1.1.2 Formação..... | 6 |
| 2.1.1.3 Estrutura..... | 9 |
| 2.1.1.4 Propriedades Físicas..... | 10 |
| 3. Pigmentação dentária | 11 |
| 3.1 Classificação e etiologia da pigmentação dentária..... | 12 |
| 3.1.1 Pigmentação dentária extrínseca | 12 |
| 3.1.2 Pigmentação dentária intrínseca | 13 |
| 3.1.3 Pigmentação dentária incorporada (ou internalizada) | 14 |
| 4. Branqueamento dentário..... | 15 |
| 4.1 Constituintes dos agentes químicos branqueadores..... | 16 |
| 4.2 Mecanismo de ação química dos agentes branqueadores | 17 |
| 4.3 Técnicas de Branqueamento Dentário | 18 |
| 4.3.1 Branqueamento em Consultório | 19 |
| 4.3.2 Branqueamento em Ambulatório..... | 19 |
| 4.3.3 Branqueamento Assistido | 20 |
| 4.3.4 Produtos de branqueamento <i>Over-The-Counter</i> | 20 |
| 4.4 Ativação do branqueamento dentário através de processos físicos..... | 24 |
| 4.5 Efeitos Adversos do branqueamento dentário | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.5.1 | Sensibilidade Dentária | 25 |
| 4.5.2 | Irritação dos tecidos moles | 26 |
| 4.5.3 | Efeitos na micromorfologia e na microrugosidade..... | 27 |
| 4.5.4 | Efeitos na microdureza..... | 28 |
| 5. | Técnicas analíticas não destrutivas..... | 29 |
| 5.1 | μ -Especetroscopia Raman | 29 |
| 5.1.1 | O princípio físico | 29 |
| 5.1.2 | Fluorescência nos espectros Raman..... | 32 |
| 5.1.3 | Vibrações moleculares | 33 |
| 5.1.4 | Instrumentação Raman – Espectroscopia Confocal de μ -Raman | 34 |
| 5.1.5 | Vantagens e limitações da técnica..... | 35 |
| 5.1.6 | Estudos realizados - estado da arte | 36 |
| 5.2 | Especetroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia, com micro feixe - μ -EDXRF | 36 |
| 5.2.1 | Interação dos raios X com a matéria..... | 37 |
| 5.2.1.1 | Efeito Fotoelétrico | 38 |
| 5.2.1.2 | Dispersão | 39 |
| 5.2.1.3 | Radiação Bremsstrahlung..... | 39 |
| 5.2.2 | O princípio físico | 39 |
| 5.2.3 | Instrumentação do μ -EDXRF | 40 |
| 5.2.4 | Artefactos | 42 |
| 5.2.5 | Vantagens e limitações da técnica..... | 42 |
| 5.2.6 | Estudos realizados - estado da arte | 43 |
| 6. | Objetivos | 45 |
| 6.1 | Gerais..... | 45 |
| 6.2 | Específicos..... | 45 |
| 7. | Materiais e Métodos..... | 47 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.1 | Preparação das amostras | 47 |
| 7.1.1 | Preparação da solução de Cloramina..... | 47 |
| 7.2 | Recolha da saliva humana..... | 47 |
| 7.3 | Produtos de branqueamento | 48 |
| 7.3.1 | Constituição dos produtos de branqueamento..... | 48 |
| 7.3.2 | Aferição do agente branqueador dos produtos de branqueamento dentário | 49 |
| 7.3.3 | Determinação da concentração do princípio ativo..... | 49 |
| 7.3.4 | Determinação do pH dos produtos..... | 51 |
| 7.4 | Protocolos | 51 |
| 7.5 | Setup Experimental – μ -EDXRF..... | 53 |
| 7.5.1 | Testes de exatidão e limites de deteção | 54 |
| 7.6 | Setup Experimental – μ -Raman | 56 |
| 7.7 | Análise estatística | 56 |
| 8. | Resultados e Discussão | 59 |
| 8.1 | Determinação do agente branqueador dos produtos de branqueamento dentário | 59 |
| 8.2 | Concentração do princípio ativo..... | 59 |
| 8.3 | Razão Ca/P..... | 60 |
| 8.3.1 | Protocolo 1 | 61 |
| 8.3.2 | Protocolo 2 | 62 |
| 8.4 | Grau de desmineralização - μ -Raman..... | 62 |
| 8.4.1 | Protocolo 1 | 63 |
| 8.4.2 | Protocolo 2 | 64 |
| 8.5 | Alterações do conteúdo da matéria orgânica no esmalte | 69 |
| 8.6 | Variação dos vários constituintes elementares – μ -EDXRF..... | 71 |
| 8.6.1 | Protocolo 1 | 73 |
| 8.6.2 | Protocolo 2 | 79 |
| 8.7 | Produtos Over-The Counter estudados – Concentração do agente branqueador..... | 84 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 9. Conclusão | 87 |
| 10. Trabalho Futuro | 89 |
| 11. Publicações..... | 91 |
| 12. Referências Bibliográficas | 93 |
| Anexo A | 101 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1: Arcadas dentárias e respetivos dentes (adaptado de (VanPutte, et al., 2013)). | 3 |
| Figura 2.2: Constituição do dente no alvéolo dentário (adaptado de (VanPutte, et al., 2013)). | 4 |
| Figura 2.3: Cristal de esmalte dentário (hidroxiapatite) com a disposição dos iões cálcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{2-}) e hidroxilo (OH^-). | 5 |
| Figura 2.4: Fases da amelogénese com apresentação das distintas morfologias dos ameloblastos (adaptado de (Avery, 2000)). | 6 |
| Figura 2.5: Formação do esmalte aprismático e prismático durante amelogénese (diferentes fases dos ameloblastos). O padrão do esmalte prismático deriva das diferentes migrações dos ameloblastos formando as bandas Hunter-Schreger (adaptado de (Odontologia, 2001)). | 9 |
| Figura 3.1: À esquerda a escala TAPAN Classical Shade Guide (VITA) (VITA, 2015) – escala de cores ordenada pelo croma, e à direita a escala de cores VITA Bleachedguide 3D-Master (VITA) – escala de cores ordenada pelo valor (SmartPractice, 2015). | 11 |
| Figura 3.2: Classificação, etiologia e tratamento nas diferentes pigmentações dentárias existentes. | 14 |
| Figura 4.1: Decomposição do PC e do PH. | 16 |
| Figura 4.2: Reações químicas decorrentes da decomposição do PH. Em a) formação de espécies reativas de oxigénio, b) formação de radicais hidroxil e perhidroxil, c) formação do anião superóxido e d) formação de aniões de peróxido de hidrogénio (adaptado de (Silveira, 2009)). | 18 |
| Figura 5.1: Representação esquemática dos níveis de energia para os diferentes casos de sinal Raman (adaptado de (Moreno, 2013) (Tsuda & Arends, 1997)). | 30 |
| Figura 5.2: Espectro Raman da matriz de HAP do esmalte (adaptado de (Awonusi & Morris, 2007) (Berger, et al., 2014) (Penel, et al., 1998) (Sa, et al., 2012)). | 32 |
| Figura 5.3: Alongamentos e deformações angulares das ligações moleculares. | 33 |
| Figura 5.4: Modos vibracionais da molécula PO_4^{3-} (adaptado de (Thomas, 2011)). | 34 |
| Figura 5.5: Interação dos fotões de raios X com a matéria (adaptado de (Gauglitz & Moore, 2014)). | 37 |
| Figura 5.6: Ionização seguida de relaxação radiativa causando a emissão de fluorescência de raios X característicos ou relaxação não radiativa com a emissão de eletrões Auger (adaptado de (Gauglitz & Moore, 2014)). | 38 |
| Figura 5.7: Ilustração dos canais presentes no interior de uma lente policapilar (adaptado de (Sciences, 2015)). | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.8: <i>Setup</i> do M4 Tornado da Bruker (adaptado de (Bruker, 2015)). | 41 |
| Figura 7.1: Produto de branqueamento Teeth <i>Whitening</i> Home Kit. | 48 |
| Figura 7.2: Produto de branqueamento WHITE! - Bingo-UK. | 48 |
| Figura 7.3: a) Solução com o gel branqueador dissolvido e a solução indicadora de ferroína, b) solução no ponto de equivalência. | 50 |
| Figura 7.4: <i>Workflow</i> do Protocolo 1. | 52 |
| Figura 7.5: <i>Workflow</i> do Protocolo 2. | 52 |
| Figura 7.6: Amostras fixadas no porta-amostra com recurso a plasticina. | 53 |
| Figura 8.1: Espectros Raman (espectros empilhados) em unidades arbitrárias obtidos para os produtos Teeth Whitening Home Home Kit e White! - Bingo UK. | 59 |
| Figura 8.2: Razão Ca/P \pm incerteza do valor para o espécime de dente A3 referente ao produto A. | 61 |
| Figura 8.3: Razão Ca/P \pm incerteza do valor para o espécime de dente A6 referente ao produto B. | 62 |
| Figura 8.4: Razão Ca/P \pm incerteza do valor para o espécime de dente A21 referente ao produto B. | 62 |
| Figura 8.5: Média do GD e respetivos desvios padrão dos espécimes A1-A3, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto A. | 63 |
| Figura 8.6: Média do GD e respetivos desvios padrão dos espécimes A4-A6, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto B. | 64 |
| Figura 8.7: Média do GD e respetivos desvios padrão dos espécimes A8, A17, A20 e A21, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto B. | 64 |
| Figura 8.18: Variação da concentração elementar do Mn, Fe e Cu nos espécimes A4 e A6 ao longo de 39 dias de estudo. | 77 |
| Figura 8.19: Variação da concentração elementar do Zn, Sr e Pb nos espécimes A4 e A6 ao longo de 39 dias de estudo. | 78 |
| Figura 8.10: a) total do ponto focal corresponde somente a esmalte, b) ponto focal corresponde a uma porção do esmalte e a restante ar. | 83 |
| Figura 8.11: Página de internet disponível do Ebay® para a compra do produto de branqueamento Teeth <i>Whitening</i> Home Kit. A compra é acessível a qualquer pessoa a um baixo custo (3.15 €). | 85 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1: Composição dos produtos de branqueamento dentário (Miguel, 2009) (Mota, 2011) (Silveira, 2015) (Ventura, 2009)..... | 17 |
| Tabela 4.2: Agentes dessensibilizantes utilizados (Silveira, 2015) (Ventura, 2009). | 26 |
| Tabela 5.1: Vantagens e limitações da Espectroscopia Confocal de μ -Raman. | 35 |
| Tabela 5.2: Vantagens e limitações da μ -EDXRF..... | 43 |
| Tabela 7.1: Constituintes dos produtos de branqueamento segundo os fabricantes..... | 49 |
| Tabela 7.2: Concentração elementar e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Meal NIST-1489 e valores certificados pelo método de quantificação do WinAXIL..... | 54 |
| Tabela 7.3: Concentração elementar e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Ash NIST-1400 e valores certificados pelo método de quantificação do WinAXIL..... | 54 |
| Tabela 7.4: Concentração elementar média e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Meal NIST-1489 e valores certificados pelo método de embutido no M4 Tornado. | 55 |
| Tabela 7.5: Concentração elementar média e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Ash NIST-1400 e valores certificados pelo método de embutido no M4 Tornado. | 55 |
| Tabela 7.6: Limite de detecção e incertezas do limite de detecção obtidos para Bone Meal NIST-1489 em $\mu\text{g g}^{-1}$ | 55 |
| Tabela 7.7: Limite de detecção e incertezas do limite de detecção obtidos para Bone Ash NIST-1400 em $\mu\text{g g}^{-1}$ | 56 |
| Tabela 8.1: Concentração de PH nos vários ensaios para cada produto estudado..... | 60 |

1. Introdução

A estética dentária tem recebido bastante enfoque nos últimos anos, particularmente devido à importância a que a população atribui à aparência estética do sorriso (Demarco, et al., 2008) (Ferreira, 2009A) (Silveira, 2015). É, assim, desejado um sorriso o mais branco possível e que de preferência seja fácil de obter, eficaz, rápido, económico e que seja o menos invasivo possível (Mota, 2011) (Silveira, 2015). Do ponto de vista social e profissional, possuir um sorriso que corresponda aos padrões estabelecidos pela sociedade contribui para um aumento da autoestima, confiança e uma discriminação positiva em contexto laboral. Com vista a satisfazer esta necessidade, surgiram no mercado uma elevada diversidade de técnicas e de formulações galénicas de produtos para branqueamento dentário, de modo a remover a pigmentação dentária extrínseca, derivada do consumo de determinados alimentos (café, bebidas gaseificadas, vinho, chá, tabaco, especiarias) e a tratar discronias dentárias (Silveira, 2015). Esses produtos, constituídos na sua maioria por Peróxido de Carbamida (PC) ou por Peróxido de Hidrogénio (PH), diferem nas concentrações, tempos de aplicação, formatos e modos de aplicação. No entanto, devido à procura crescente de alcançar estes padrões estéticos e devido à falta de conhecimento na área, são ignorados por parte da população, os efeitos adversos relacionados com estas sucessivas intervenções (Mota, 2011).

O dente é constituído por esmalte, dentina e pulpa e apesar de a sua cor natural ser estabelecida pela dentina, que é amarela, apresenta habitualmente uma coloração esbranquiçada, uma vez que o esmalte que recobre a dentina é translúcido atenuando, assim, a cor apresentada pela dentina (Fernandes, 2013). Quer o esmalte quer a dentina, possuem uma matriz orgânica, constituída por proteínas, lípidos e uma matriz inorgânica maioritariamente constituída por hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ que não é mais do que uma forma complexa de fosfato de cálcio (apatite) com hidroxilo. Na matriz orgânica grande parte das proteínas da dentina são proteínas colagénicas, enquanto que no esmalte não existe qualquer tipo de proteína colagénica. Contudo, a principal diferença entre os dois tecidos é a proporção de matriz orgânica presente em cada um, sendo maior na dentina do que no esmalte (Godinho, 2013).

O branqueamento dentário pode ser realizado em consultório, em ambulatório, assistido ou venda livre, também conhecido como *Over-The-Counter* (OTC). Mas é em relação a este último que tem havido maior preocupação, dado que nos produtos OTC não existe um acompanhamento médico nas fases de diagnóstico e estabelecimento da terapêutica. Uma das consequências desta ausência de acompanhamento médico tem sido a exposição de milhares de pessoas a reações alérgicas, à ingestão do produto, bem como a outros efeitos adversos, potenciados pelo uso

incorreto destes produtos (Pinto, et al., 2014). Em suma, estes produtos revelam ser prejudiciais para a saúde dentária de quem os usa e os resultados podem não ser tão positivos, quanto os tratamentos realizados com supervisão médica (Demarco, et al., 2008).

Apesar do número relativo de estudos existentes, atualmente, na área da Medicina Dentária e particularmente nos efeitos do branqueamento nas estruturas dentárias, carece de avaliação o estudo da relação de abuso destes produtos e as possíveis consequências no esmalte dentário. Existe uma falta de estudos independentes no que respeita à utilização de produtos de branqueamento dentário OTC de modo a fornecer evidências clínicas suficientes, para se concluir se existem alterações no esmalte dentário e nos elementos traço. Assim, a presente investigação pretende estudar o efeito do branqueamento dentário no esmalte utilizando de forma abusiva dois produtos OTC, recorrendo às técnicas não destrutivas de micro-espectroscopia Raman (μ -Raman) e espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia, com micro feixe (μ -EDXRF) – do inglês, *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*.

1.1 Pertinência do tema em Engenharia Biomédica, na especialidade e carácter inovador

A Engenharia Biomédica (EBM) é uma área polivalente que integra o conhecimento de várias áreas recorrendo a instrumentos tradicionais de engenharia. Torna-se, deste modo, vantajoso estudar problemas da clínica médica, como no presente caso, recorrendo para isso a fenómenos físicos e a diversos instrumentos (FCT/UNL, 2015) (Técnico, 2015). A obsessão por dentes brancos, conhecida em inglês por “bleachorexia”, é uma patologia caracterizada pela constante aplicação de produtos de branqueamento, sem qualquer controlo. Pode provocar nos casos mais graves lesões na cavidade oral, causando danos irreversíveis no esmalte dentário, sendo este facto ignorado pela população. Por consequência, a investigação neste tema possibilitará o desenvolvimento de novos conhecimentos e um maior entendimento nesta área.

2. O Dente

Um adulto dentro dos padrões de normalidade tem 32 dentes, distribuídos por duas arcadas dentárias, uma maxilar e outra mandibular. A distribuição dos dentes em cada metade é simétrica à do lado oposto. Deste modo, a distribuição dos dentes pode ser dividida em quatro quadrantes: superior direito, superior esquerdo, inferior direito e inferior esquerdo. Em cada um destes quadrantes existe um incisivo central e um lateral, um canino, o primeiro e segundo pré-molares e o primeiro, segundo e terceiro molares (Figura 2.1). O terceiro molar é conhecido vulgarmente como o dente do siso (Seeley, et al., 2003).

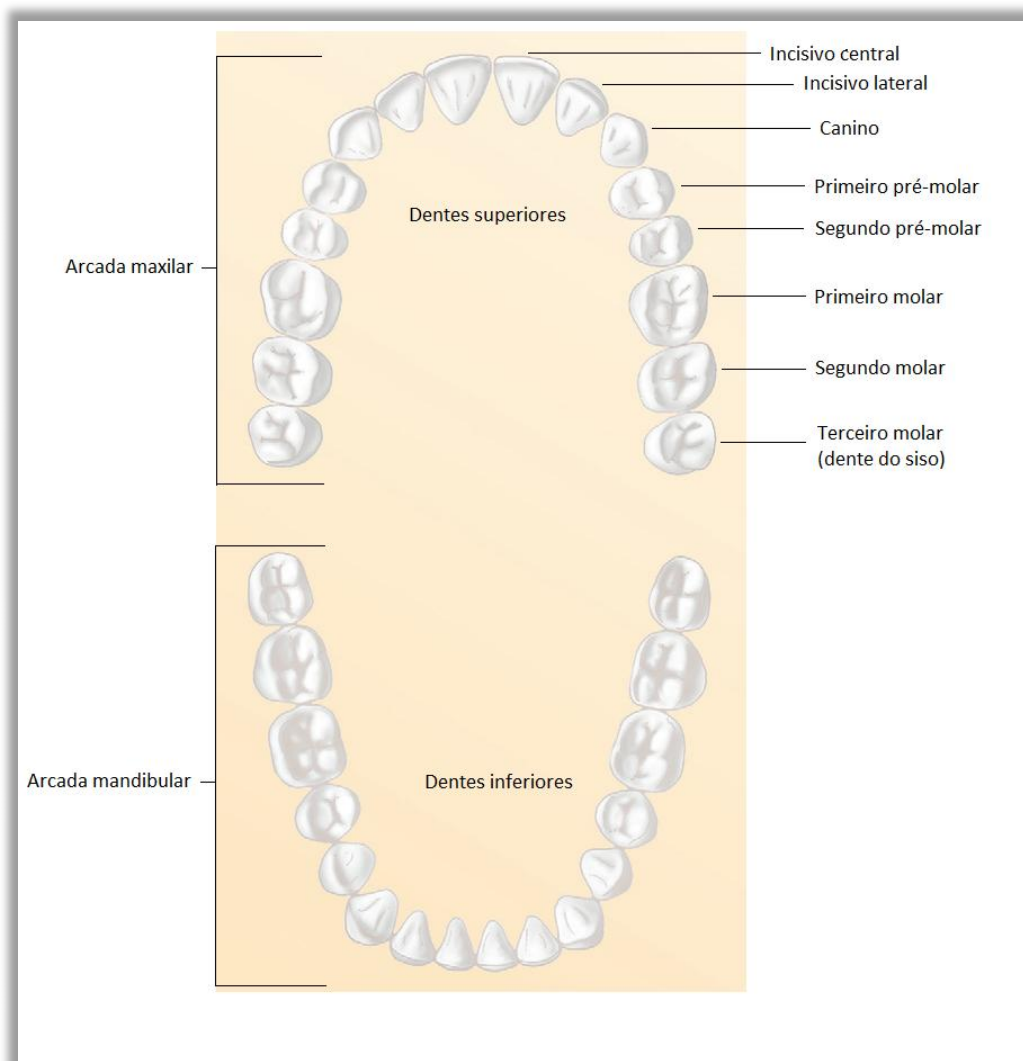


Figura 2.1: Arcadas dentárias e respetivos dentes (adaptado de (VanPutte, et al., 2013)).

2.1 Constituição do dente

Cada dente é constituído por uma coroa com uma ou mais cúspides, um colo e uma raiz. A coroa pode ser diferenciada de duas formas distintas: coroa clínica – porção do dente visível e coroa anatómica – porção do dente revestida por esmalte (Seeley, et al., 2003).

Na parte mais interior do dente encontra-se a cavidade pulpar – um espaço que é preenchido com vários vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo – constituindo a pulpa. Uma porção da pulpa penetra na raiz, denominando-se de canal radicular. Os vasos sanguíneos e os nervos presentes na cavidade pulpar penetram e saem da pulpa por um orifício que se encontra na extremidade de cada raiz – *foramen* ou buraco apical. A pulpa é revestida pela dentina – tecido vivo, celular e calcificado. Por sua vez, a dentina da coroa do dente é revestida por um tecido extremamente duro e acelular, o esmalte. Este último tem a função de proteger os dentes da abrasão e dos ácidos produzidos pelas bactérias da boca, constituindo o tecido mais duro do organismo. Na raiz, a superfície da dentina está envolvida por uma substância celular semelhante ao osso e que ajuda a fixar o dente ao maxilar/mandíbula – o cimento. Os dentes estão fixos nos alvéolos ao longo dos processos alveolares da maxila e da mandíbula. Os processos alveolares estão cobertos por tecido conjuntivo fibroso denso e por epitélio pavimentoso estratificado, constituindo a gengiva. O que permite os dentes estarem ancorados aos alvéolos são os ligamentos periodontais, que se encontram à volta dos dentes (Figura 2.2) (Seeley, et al., 2003).

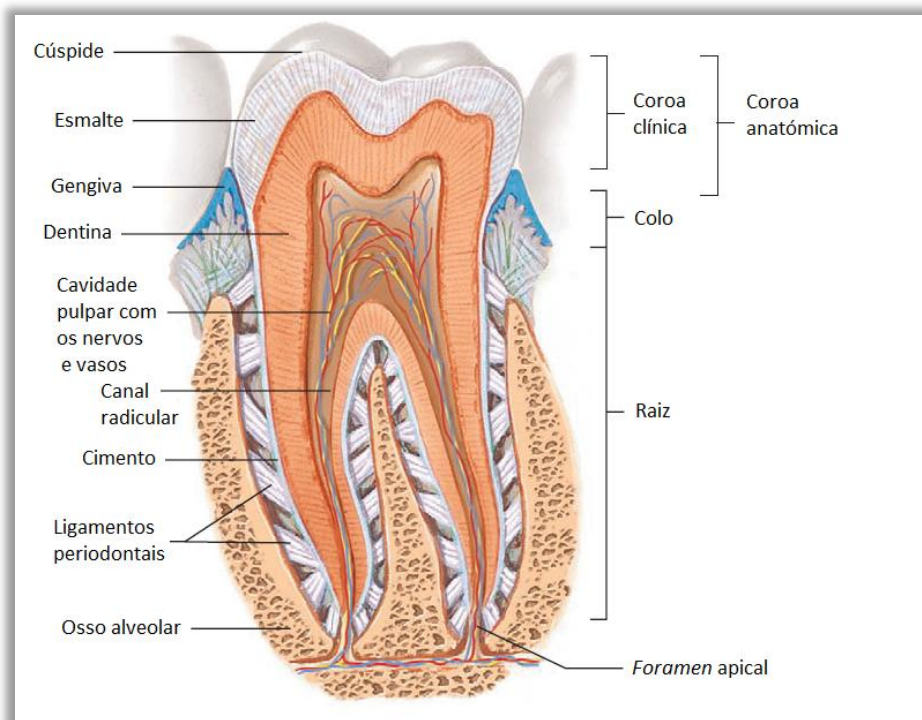


Figura 2.2: Constituição do dente no alvéolo dentário (adaptado de (VanPutte, et al., 2013)).

2.1.1 Esmalte

2.1.1.1 Caracterização e composição química

O esmalte, quando surge na cavidade oral, apresenta-se como a estrutura mais dura, resistente e mais densamente mineralizada do corpo humano, constando na sua composição 96-98% de matéria inorgânica (minerais), sendo os restantes 2-4% representados por matéria orgânica e água (Serra & Ferreira, 1981).

A unidade estrutural do esmalte é o prisma, com uma secção pentagonal ou hexagonal e com um comprimento entre 2 a 2,5 milímetros (mm) – correspondente à espessura total do esmalte, espessura de cerca de 4 micrómetros (μm) e disposto perpendicularmente à dentina, não seguindo, porém, um trajeto retilíneo até à superfície do dente (Serra & Ferreira, 1981). Cada prisma é composto por um grande número de cristais de hidroxiapatite (HAp) (Figura 2.3) (Berkovitz, et al., 1992). A ligação entre prismas é feita através de uma substância inter-prismática, representando, assim, a pequena porção orgânica do esmalte (2-4%) (Serra & Ferreira, 1981).

A parte mineral do esmalte é formada, maioritariamente, por fosfato de cálcio (apatite), na forma de complexos cristais de HAp $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Serra & Ferreira, 1981). Portanto, os elementos major são o Cálcio (Ca), o Fósforo (P), o Oxigénio (O) e o Hidrogénio (H). Em menores quantidades – elementos traço – verifica-se o Flúor (F), o Sódio (Na), o Magnésio (Mg), o Fósforo (P), o Enxofre (S), o Cloro (Cl), o Potássio (K), o Manganésio (Mn), o Ferro (Fe), o Cobre (Cu), o Zinco (Zn), o Estrôncio (Sr) e o Chumbo (Pb) (Godinho, et al., 2014) (Silveira, 2015) (Silveira, et al., 2015) (Ozdemir, et al., 2010). A composição mineral varia quer entre dentes, quer nas diferentes zonas do mesmo dente. Existe, inclusive, uma heterogenidade entre a parte mais interna e a periferia de um prisma (Berkovitz, et al., 1992).

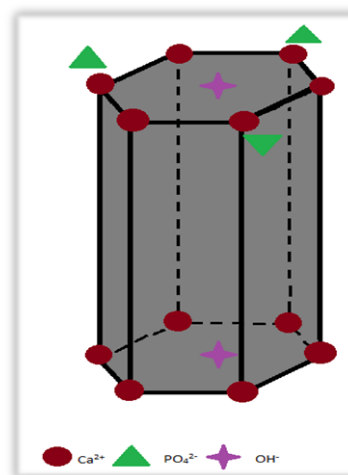


Figura 2.3: Cristal de esmalte dentário (hidroxiapatite) com a disposição dos íões cálcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{2-}) e hidróxido (OH^-).

Após a erupção dentária, o esmalte é um tecido acelular e apresenta apenas 1% de proteínas na sua constituição (Gerlach, 2008). As proteínas que constam são na sua maioria enamelinas e produtos de degradação das amelogeninas, formando um gel sem estrutura (Berkovitz, et al., 1992).

O esmalte termina no colo do dente, ao nível da junção ameloceментária (JAC) – junção entre o esmalte e o cimento radicular; e encontra-se separado da dentina pela junção amelodentinária (JAD) (Picosse, 1971). A formação da dentina acontece antes da formação do esmalte (Gerlach, 2008).

Para se entender as alterações que ocorrem no esmalte dentário é necessário, em primeiro lugar, compreender como este se forma. O processo de formação do esmalte denomina-se de amelogénese (Gerlach, 2008).

2.1.1.2 Formação

O esmalte tem origem no folheto germinativo externo (camada de células germinativas) denominado de ectoderme (Seeley, et al., 2003). O desenvolvimento do esmalte é regulado pelos ameloblastos (células epiteliais) que expressam um conjunto de genes que codificam a produção de proteínas cruciais para a formação do tecido dentário (Arnold & Gaengler, 2007) (Nishio, 2008). Os ameloblastos são células alongadas e que contêm no seu interior uma grande quantidade de organitos, típicos de células que produzem uma grande quantidade de proteínas (p.e: retículo endoplasmático, aparelho de Golgi). A amelogénese pode ser dividida em diferentes fases, sendo que ao longo deste processo os ameloblastos apresentem distintas morfologias, Figura 2.4 (Gerlach, 2008).

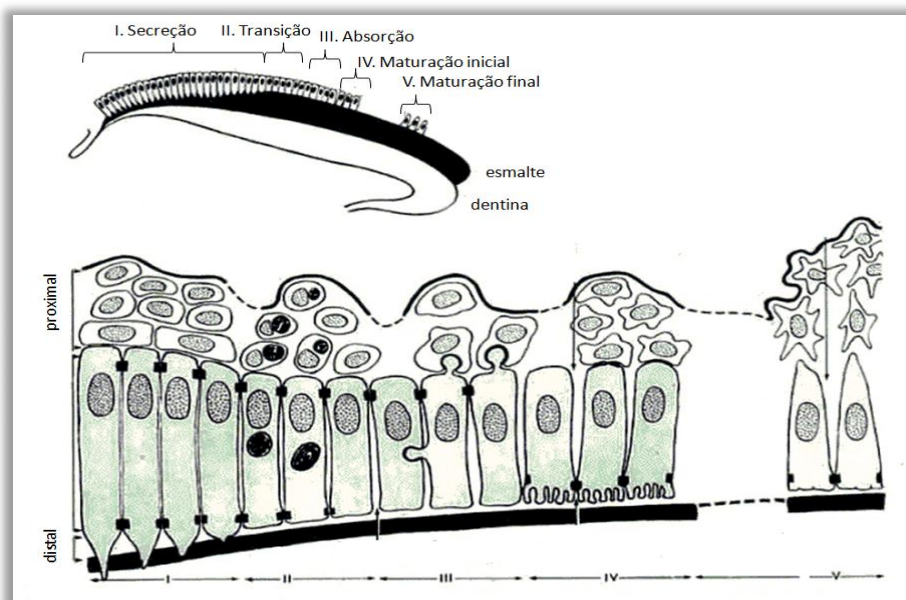
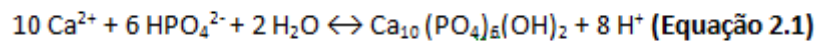


Figura 2.4: Fases da amelogénese com apresentação das distintas morfologias dos ameloblastos (adaptado de (Avery, 2000)).

- **Fase de Secreção:** Durante esta fase os ameloblastos sintetizam e secretam proteínas da matriz do esmalte, nomeadamente, as amelogeninas (90%), ameloblastinas e enamelinas; e ainda enzimas importantes para o processo (Nishio, 2008). Neste estágio, os ameloblastos caracterizam-se por serem células colunares altas e por expressarem o processo de Tomes, processo este, em que estas células junto à matriz do esmalte apresentam o formato de um cone, e que será importante para a formação dos prismas de esmalte. À medida que os ameloblastos migram, estes vão secretando uma matriz proteica, sendo que o cristal só vai crescendo em comprimento, acompanhando a migração das células, quase não crescendo em largura. Por dia, cada ameloblasto secreta sensivelmente $5 \mu\text{m}^3$, preenchido em proteínas. As proteínas secretadas, na sua maioria amelogeninas, controlam o crescimento do cristal em comprimento, devido à afinidade que estas têm pelos cristais de HAp (Gerlach, 2008). Estas proteínas permitem que os cristais formados sejam mais longos e finos, porque as nanoesferas das amelogeninas organizam os cristais diminuindo os espaços interprismáticos, permitindo uma maior mineralização (Arnold & Gaengler, 2007) (Oldak & Gerlach, 2012). Nesta fase do processo, cada cristal de HAp é extremamente fino. Contudo à volta de cada cristal, existe uma camada de proteínas que na fase de maturação irão contribuir para que a espessura dos cristais aumente, de modo a que no esmalte maduro se visualizem poucos espaços vazios e abundantes cristais longos e finos (Gerlach, 2008). As enamelinas, que constituem 3-4% da matriz secretada, encontram-se na zona mais central dos prismas e são cruciais para a formação do esmalte dentário (Gerlach, 2008) (Oldak & Gerlach, 2012). Neste início da amelogénese, o esmalte, apresenta-se como uma matriz proteica mineralizada em 30% (Gerlach, 2008).
- **Fase de Transição:** Entre a fase de secreção e de maturação, metade dos ameloblastos morre por apoptose. Porém, as células que não morrem neste instante, possuem no seu interior uma grande quantidade de lisossomas (vacúolos) intracelulares, por forma a diminuir o número de organitos aptos para secretar proteínas. Assim, nesta fase, a secreção de proteínas é próxima de zero (Arnold & Gaengler, 2007) (Gerlach, 2008).
- **Fase de Maturação:** Neste momento, quando toda a extensão da matriz proteica do esmalte já foi secretada, existe uma modificação na morfologia dos ameloblastos. Apesar, dos ameloblastos continuarem a ser células colunares, estas são mais baixas em relação à fase anterior, perdendo as características das células que secretam grandes quantidades de proteínas e não exibindo o processo de Tomes. Deste modo, os ameloblastos mudam a sua morfologia, mas continuam a revestir o esmalte (Gerlach, 2008).

É também neste estágio, que existe deposição de HAp na matriz proteica, ocorrendo o processo de mineralização. Parece existir, uma transição entre ameloblastos com borda lisa e ameloblastos com borda rugosa, devido a variações do pH no meio. A modificação das junções das bordas das células coincidente com variação entre dois pH diferentes – entre 6,8 e 7,2 – aparenta ser crucial para que haja a deposição de minerais de forma homogênea ao longo da espessura da matriz secretada na primeira fase. Num ambiente ácido a HAp desmineraliza-se/dissolve-se e de igual forma num ambiente básico ela tende a precipitar-se, havendo libertação de prótons e conseqüentemente a diminuição do pH do meio (Equação 2.1) (Gerlach, 2008).



A título de exemplo, a formação de um dente permanente começa logo após o nascimento. Neste mesmo instante, depois de toda a espessura da matriz do esmalte já estar formada, os ameloblastos da fase de secreção mudam de morfologia passando para a fase de maturação. Nesta última, ao longo de vários anos, a matriz do esmalte vai incorporando do meio extracelular minerais, até 95% do volume dos prismas ser constituído por matéria inorgânica. Durante estes mesmos anos, ocorre ao longo do dia, as variações de pH anteriormente descritas, permitindo a passagem de íões desde a superfície dos ameloblastos até ao início da matriz. Estudos recentes indicam que, ainda nesta fase, os ameloblastos contêm organitos (p.e: retículo endoplasmático) que armazenam cálcio e proteínas, e que transportam esse cálcio desde a superfície até à parte mais interna da matriz do esmalte (Arnold & Gaengler, 2007) (Gerlach, 2008).

É de realçar que o número de cristais desde a fase de secreção até esta fase não se altera. Ou seja, os cristais iniciais muito finos da fase de secreção ganham minerais nas regiões laterais, acabando por preencher os espaços que na fase de secreção eram ocupados por proteínas, maioritariamente amelogeninas, anteriormente referidas. Devido às proteases presentes no citoplasma, as amelogeninas são clivadas, permitindo a precipitação dos minerais em redor nos cristais de HAp (Arnold & Gaengler, 2007) (Gerlach, 2008).

- **Fase de Proteção:** Os ameloblastos apresentam-se como células colunares baixas e cuboides, devido à menor atividade metabólica, formando uma camada papilar. Têm, maioritariamente, a função de proteção do esmalte antes de surgir na cavidade oral. Esta proteção é bastante importante, pois caso o esmalte entre em contacto com o tecido conjuntivo vizinho, pode ser reabsorvido ou existir a formação de cimento por cima deste (Gerlach, 2008).

Devido aos ameloblastos degenerarem após a formação do esmalte, este último não tem a capacidade de se regenerar mantendo o seu aspeto morfológico inalterado (Serra & Ferreira, 1981). O mecanismo de formação do esmalte dentário ainda não é totalmente compreendido. Desconhece-se em que medida é que cada uma das proteínas descritas exerce a sua função, e de que modo influenciam o processo de mineralização do esmalte dentário (Arnold & Gaengler, 2007) (Nishio, 2008).

2.1.1.3 Estrutura

Um prisma de esmalte vai desde, aproximadamente da JAD até à superfície do esmalte, indicando o trajeto percorrido por um ameloblasto na fase de secreção. A direção do ameloblasto é definida pelo processo de Tomes; assim uma das características importantes deste processo é estabelecer as diferentes direções dos cristais no esmalte (Gerlach, 2008).

É importante referir que existem dois tipos de esmalte no dente humano: o esmalte prismático e o esmalte aprismático. Quer no início da formação do esmalte, quando os ameloblastos ainda não apresentam o processo de Tomes, quer no final da sua formação em que os ameloblastos já perderam o processo de Tomes, tem-se o esmalte denominado como aprismático devido aos cristais estarem todos paralelos entre si, Figura 2.5 (Gerlach, 2008).

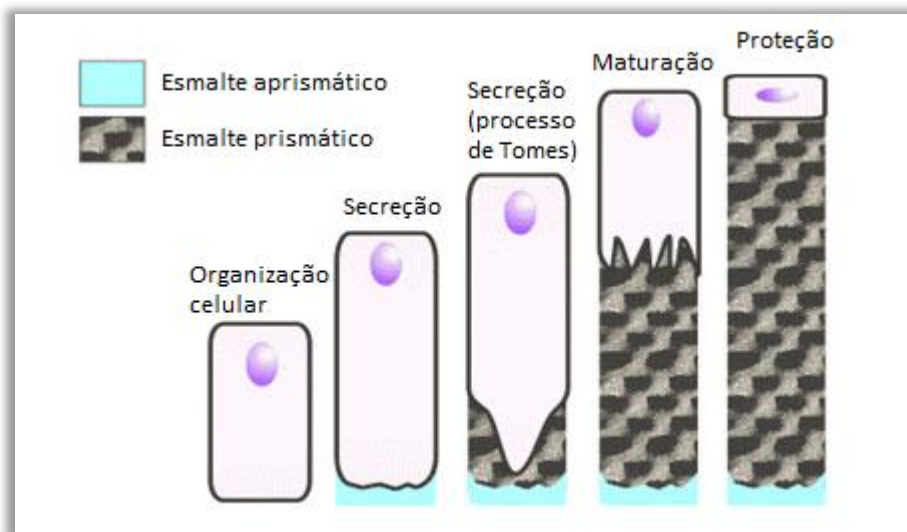


Figura 2.5: Formação do esmalte aprismático e prismático durante amelogénese (diferentes fases dos ameloblastos). O padrão do esmalte prismático deriva das diferentes migrações dos ameloblastos formando as bandas Hunter-Schreger (adaptado de (Odontologia, 2001)).

Porém, se todos os prismas tivessem a mesma orientação o esmalte seria muito frágil. Assim sendo, na parte mais interna do esmalte maduro humano, existe uma região em que consta o esmalte prismático. Este esmalte é constituído por um conjunto de prismas formados em direções opostas conforme as diferentes migrações dos ameloblastos, estabelecidas na fase de secreção. Alguns apresentam uma direção longitudinal, enquanto que outros uma direção transversal, e é este

atributo que dá coesão ao esmalte. As forças da mastigação são dissipadas devido à orientação distinta dos conjuntos de cristais, que são os prismas de esmalte (Gerlach, 2008). Estas diferentes orientações, fazem com que se visualizem bandas claras e escuras conhecidas como bandas de Hunter-Schreger (Gerlach, 2008) (Picosse, 1971). Existem, ainda, linhas incrementais no esmalte que são formadas por células que estão alinhadas num dado momento, em que existe uma alteração metabólica – linhas de Retzius (Gerlach, 2008) (Picosse, 1971) (Serra & Ferreira, 1981).

2.1.1.4 Propriedades Físicas

O esmalte é translúcido, deixando transparecer a cor mais escura da dentina. Por este facto, existem diferentes matizes de cores associadas ao dente humano. Tem uma densidade (número de cristais por área) de 2,8 e um índice de refração igual a 1,63. Segundo a escala de Mohs, tem uma dureza de 5, o que corresponde à dureza da apatite (Berkovitz, et al., 1992) (Serra & Ferreira, 1981). Tem baixa resistência à tração, é friável e possui um módulo de Young elevado, ou seja, é rígido (Berkovitz, et al., 1992) (Oldak & Gerlach, 2012). Esta propriedade conjugada com o suporte flexível da dentina subjacente minimiza a possibilidade de fratura (Berkovitz, et al., 1992).

A camada de esmalte varia consoante a porção do dente, sendo maior (2 a 3 mm), mais dura, mais densa e menos porosa na face oclusal dos dentes incisivos e no ápice das cúspides dos caninos, pré-molares e molares e menor à medida que se aproxima da linha cervical (Berkovitz, et al., 1992) (Serra & Ferreira, 1981).

3. Pigmentação dentária

A percepção da cor dentária depende da estrutura da coroa clínica (esmalte, dentina e pulpa) (Ferreira, 2009B) (Silveira, 2015). Qualquer alteração nestes tecidos irá causar modificações no aspeto da coroa clínica devido às suas propriedades óticas de transmissão e reflexão da luz incidente (Silveira, 2015). Por conseguinte, a cor dentária depende da quantidade e tipo de luz refletida pela superfície do dente. Deste modo, a cor é uma percepção subjetiva devido à variabilidade inter-sujeito, tornando-se difícil realizar uma medição rigorosa da cor dentária (Ferreira, 2009B).

O conceito de cor dentária agrega três dimensões, nomeadamente: matiz (tonalidade), valor (luminosidade) e croma (saturação), sendo que a diferença de cor (ΔE) é representada pela diferença das três dimensões enumeradas entre objetos (Ferreira, 2009B).

A eficácia do branqueamento dentário é classificada em unidades de mudança de cor, obtida visualmente (apresentado em unidades de escala de cor) ou recorrendo para isso a instrumentos, como o colorímetro (apresentado sob a forma de ΔE). A escala de cor mais utilizada pelo Médico Dentista (MD) para a avaliação da cor dentária é TAPAN Classical Shade Guide (VITA) (Figura 3.1), estando esta dividida em quatro distintas matizes: A (castanho-avermelhado), B (laranja-amarelado), C (cinzento-esverdeado) e D (cinzento-rosado), estando por sua vez cada uma destas matizes divididas em quatro graus de croma (Ferreira, 2009B). Porém, como a avaliação do resultado do branqueamento consiste, essencialmente, na mudança de valor, foi criada uma escala específica para o branqueamento: VITA Bleachedguide 3D-Master (VITA) (Figura 3.1) (Ferreira, 2009B) (Joiner, 2006).

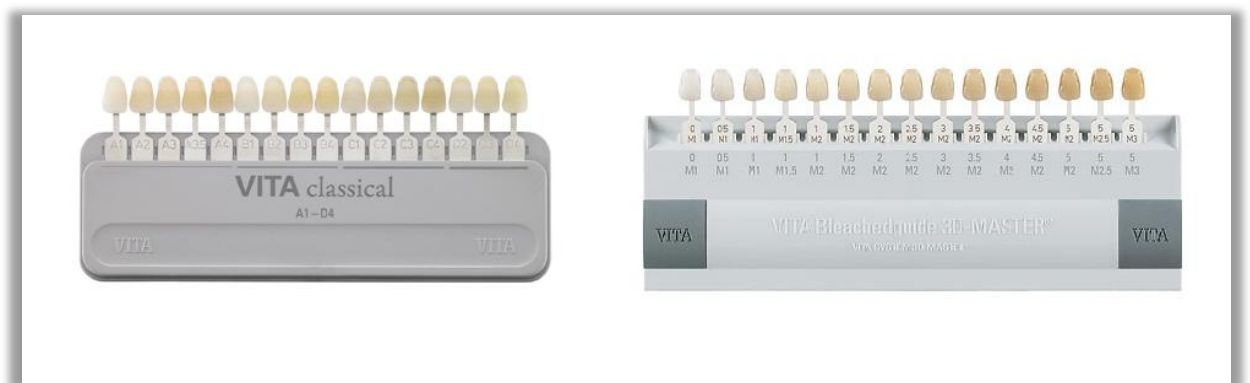


Figura 3.1: À esquerda a escala TAPAN Classical Shade Guide (VITA) (VITA, 2015) – escala de cores ordenada pelo croma, e à direita a escala de cores VITA Bleachedguide 3D-Master (VITA) – escala de cores ordenada pelo valor (SmartPractice, 2015).

A utilização do colorímetro tem a vantagem de se obter um valor objetivo da cor não havendo a possibilidade de interpretação inter-sujeito, contudo é necessário que o posicionamento na arcada

dentária seja igual entre consultas, para além de que é uma técnica morosa e de difícil manuseio (Ferreira, 2009B) (Joiner, 2006).

No branqueamento dentário a quantidade amarelo e branco, bem como o aumento do valor e a diminuição do croma do dente são importantes atributos na percepção da cor dentária. Por outras palavras é muito importante o diagnóstico do tipo de descoloração dentária. Não obstante à apreciação feita pelo paciente, há que ter em atenção fatores como etiologia, intensidade, aparência e localização da pigmentação dentária, pois serão cruciais para um correto prognóstico (Ferreira, 2009B).

A coloração dentária resulta da combinação da cor intrínseca do dente com a presença de manchas extrínsecas formadas na superfície deste. Antes de qualquer tratamento de branqueamento dentário, o MD deve realizar um correto diagnóstico quanto ao tipo e etiologia da pigmentação dentária, realizando uma anamnese ao paciente, de modo a inferir uma história clínica detalhada: hábitos alimentares, práticas de higiene oral, exposição a químicos, traumas e infeções passadas. Assim, o MD poderá escolher o tratamento mais apropriado para o caso, e no caso de esse tratamento ser o branqueamento dentário, eleger a concentração e tipo de agente ativo a ser usado, e prever, ainda, o resultado esperado (Ferreira, 2009B) (Joiner, 2006). No entanto, este procedimento de grande relevância antes da realização do branqueamento dentário é inexistente para os produtos OTC. Este facto pode contribuir para casos em que o branqueamento dentário não é o tratamento mais adequado, como é descrito no sub-capítulo seguinte.

A *American Dental Association* (ADA) estipula que um sistema de branqueamento contendo peróxido só é considerado eficaz quando proporciona uma mudança de no mínimo dois tons na escala de cores ordenada de acordo com o valor do dente (Araújo, et al., 2013).

3.1 Classificação e etiologia da pigmentação dentária

A pigmentação dentária é classificada em conformidade com a localização do pigmento. Atualmente, a pigmentação dentária é classificada como: extrínseca, intrínseca e internalizada/incorporada (Silveira, 2015).

3.1.1 Pigmentação dentária extrínseca

Neste tipo de pigmentação existe adsorção de agentes externos (pigmentos) na superfície dentária ou na película adquirida (Ferreira, 2009B) (Silveira, 2015). Alguns fatores, como defeitos no esmalte, a composição e quantidade de saliva, e higiene oral pobre, predispõem o aparecimento de pigmentos na superfície do dente. Segundo Nathoo, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009B), a pigmentação extrínseca pode ser discriminada em três categorias distintas:

- Nathoo tipo 1 (N1): neste caso a pigmentação ocorre quando o material cromogénico, com uma cor característica, liga-se à superfície dentária, pigmentando esta. É também denominada como pigmentação extrínseca direta e inclui compostos que habitualmente estão presentes na dieta alimentar como o café, o chá e o vinho ou que contactam frequentemente com a superfície do dente como é o caso dos metais e das bactérias cromogénicas (Ferreira, 2009B) (Silveira, 2015).
- Nathoo tipo 2 (N2): neste caso, também conhecido como pigmentação extrínseca indireta, o pigmento ao interagir com a superfície do dente, reage quimicamente, alterando a sua cor. Os materiais cromogénicos descritos em N1 podem provocar este tipo de pigmentação devido ao seu escurecimento com o tempo (Ferreira, 2009B) (Silveira, 2015). Antissépticos orais catiónicos e sais minerais podem também induzir esta pigmentação (Silveira, 2015).
- Nathoo tipo 3 (N3): ocorre por materiais incolores ou pré-cromogéneos que se ligam à superfície do dente, sofrendo uma reação química que provoca pigmentação dentária. Esta pigmentação é causada por alimentos ricos em carboidratos ou agentes pigmentantes como o fluoreto de estanho e a clorhexidina (Ferreira, 2009B).

Quanto à origem dos pigmentos nos vários tipos de pigmentação dentária extrínseca, esta classifica-se, ainda, como metálica e não metálica (Silveira, 2015).

Os tratamentos realizados nestes casos são destartarização e o polimento profilático da superfície dentária para remoção das manchas extrínsecas, não se realizando portanto, o branqueamento dentário nestas situações (Ferreira, 2009B) (Silveira, 2015). O diagnóstico costuma ser favorável e previsível (Ferreira, 2009B).

3.1.2 Pigmentação dentária intrínseca

Esta pigmentação é causada pela incorporação de pigmentos no esmalte ou na dentina durante a odontogénese ou após erupção do dente (Ferreira, 2009B). Ocorrem, assim, alterações na organização dos tecidos dentários, implicando modificações nas dimensões ou estrutura destes. Algumas alterações cromáticas podem ocorrer durante a odontogénese devido a alterações metabólicas, levando a uma pigmentação intrínseca com diferentes graus de severidade. Outras causas conhecidas para este tipo de pigmentação são, por exemplo: envelhecimento, fluorose dentária, hipoplasia do esmalte, pigmentação por tetraciclina (antibióticos), amelogénese imperfeita, dentinogénese imperfeita, displasia dentinária (Pinto, et al., 2014) (Silveira, 2015).

O branqueamento dentário é realizado para o tratamento da pigmentação dentária intrínseca e podem ser utilizadas duas técnicas distintas, consoante onde o produto é aplicado: branqueamento

interno ou branqueamento externo, e ainda a combinação de ambos. O branqueamento dentário interno é realizado pela colocação do produto de branqueamento na câmara pulpar; sendo que o branqueamento dentário externo é realizado na superfície do dente. Em dentes vitais (dentes não desvitalizados), apenas pode ser feito o branqueamento externo. Já em dentes não vitais podem ser realizadas ambas as técnicas (Silveira, 2015).

3.1.3 Pigmentação dentária incorporada (ou internalizada)

Na pigmentação incorporada ocorre incorporação da pigmentação extrínseca na estrutura dos tecidos dentários após a sua completa formação. Ocorre em casos onde existe defeitos no esmalte ou superfície permeável da dentina exposta, a título de exemplo: anomalias de desenvolvimento e anomalias adquiridas (desgaste dentário, cárie dentária ou materiais restauradores) (Silveira, 2015). Os pigmentos incorporados nestes tecidos são os mesmos que causam a pigmentação extrínseca. Tal como na pigmentação dentária intrínseca, também neste tipo de pigmentação se realiza o branqueamento dentário (Silveira, 2015).

A Figura 3.2, pretende ilustrar um resumo das distintas pigmentações dentárias, bem como, as respetivas etiologias e tratamentos associados.

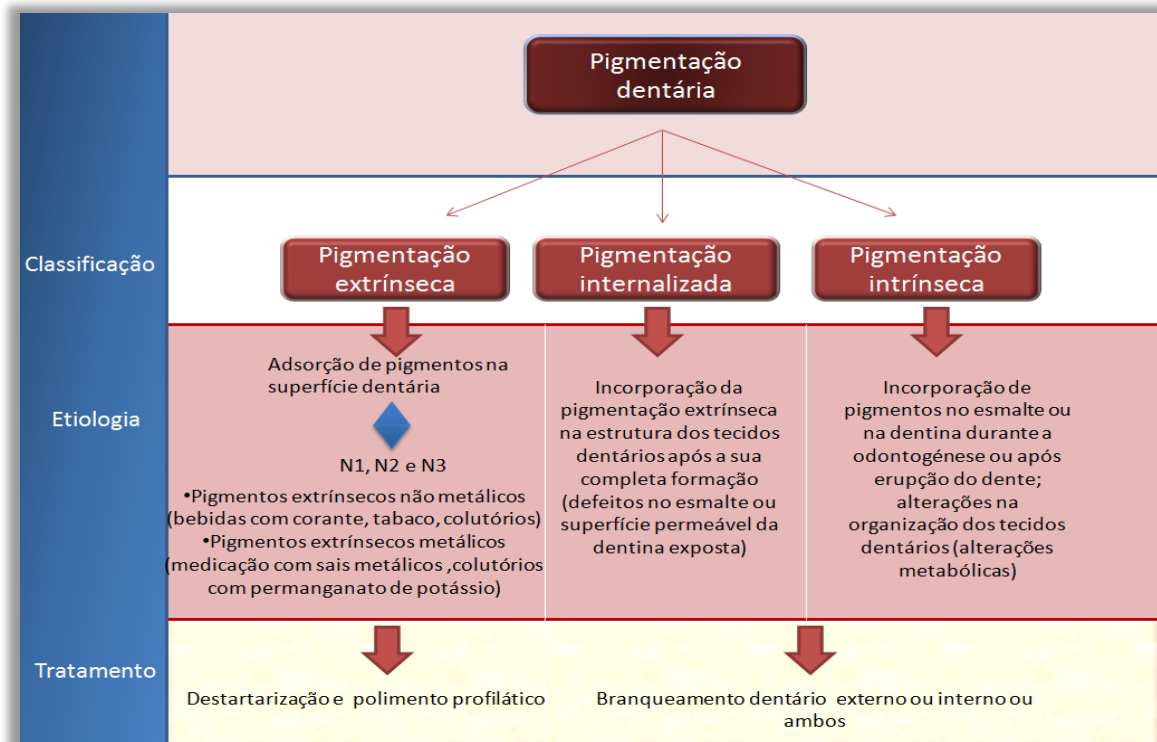


Figura 3.2: Classificação, etiologia e tratamento nas diferentes pigmentações dentárias existentes.

4. Branqueamento dentário

Aquando a pesquisa do estado da arte verifica-se a existência de um maior número de investigações referentes ao estudo dos efeitos do branqueamento dentário em consultório e em ambulatório e à escassez de estudos quantitativos no que respeita ao branqueamento realizado com produtos *Over-The-Counter* (OTC). Desta forma, torna-se crucial reunir pesquisa bibliográfica para a construção de um referencial teórico de modo a reunir, cogitar e aprofundar as informações necessárias para o objetivo proposto.

O branqueamento dentário constitui uma alternativa conservadora para o melhoramento da cor dentária em comparação com técnicas mais invasivas e dispendiosas tais como: a microabrasão (com agentes abrasivos ou ácidos), as restaurações diretas (recorrendo a sistemas adesivos e resinas compostas) ou as restaurações indiretas em ou resina composta - por exemplo, as coroas e as facetas (Pinto, et al., 2014).

Este procedimento não é recente tendo sido realizado anteriores vezes em partes diferentes da história da humanidade. Durante muitos anos, foi um tratamento exclusivamente realizado no consultório dentário. Em 1867, M'Quillen deparou-se com dentes manchados tendo anotado e estudado este acontecimento, tendo mais tarde Chappel, em 1877, introduzido o branqueamento de dentes vitais (Ferreira, 2009B) (Mota, 2011).

Quando um determinado produto está a ser avaliado para ser posteriormente utilizado por pacientes o sucesso dos conceitos eficácia clínica e segurança são cruciais (Mota, 2011). A eficácia clínica refere-se ao grau de benefício clínico associado a uma determinada terapia em que proporciona um resultado positivo ao paciente, num ambiente clínico controlado e definido. Neste caso em particular, a eficácia clínica da terapia de branqueamento depende dos agentes químicos usados, a sua forma de aplicação, da forma galénica e concentração do agente branqueador, tempo de aplicação (contacto do agente ativo com a estruturas dentárias duras a branquear) e duração do tratamento. A segurança tem em consideração os danos colaterais provocados por determinado produto ou terapia ao longo do tempo, sendo importante várias medições ao longo do procedimento, com fim a parametrizar os limites aceitáveis. É comparado o estado final do paciente após o procedimento com o estado inicial, sendo desejável a ausência de qualquer dano colateral permanente comparativamente ao benefício clínico associado (Mota, 2011).

Segundo investigadores, utilizando 10% de Peróxido de Carbamida (PC), pode considerar-se o branqueamento dentário um procedimento relativamente seguro. Contudo, deve-se ter em consideração potenciais alterações da estrutura mineral dentária (p.e: desmineralização) devido às

reações químicas dos agentes branqueadores ou dos seus excipientes, como será desenvolvido ao longo do trabalho (Demarco, et al., 2008) (Fernandes, 2013) (Ferreira, 2009A) (Mota, 2011). De acordo com o Decreto de Lei português 142/2005 que segue as várias diretrizes da Comissão Europeia (CE), os produtos OTC podem conter somente uma concentração máxima de 0,1 % de Peróxido de Hidrogénio (PH) (INFARMED, 2005). A mais recente legislação comunitária e sua respectiva transposição não estabeleceram alterações a este valor.

A revisão do estado da arte, bem como o trabalho experimental têm enfoque no branqueamento dentário externo realizado em dentes vitais.

4.1 Constituintes dos agentes químicos branqueadores

O PH (H_2O_2) e o PC ($CH_4N_2O \cdot H_2O_2$) são os agentes mais vulgarmente utilizados nos sistemas branqueadores, sendo o PC mais usado por ser a forma mais estável do PH. Quando analisados em separado, a concentração de PC é 2,76 vezes superior à do PH, a título de exemplo: uma solução de 10% de PC dissocia-se em, aproximadamente, 3% de PH e em 7% de ureia. Posteriormente, o PH degrada-se em água e oxigénio, enquanto que a ureia degrada-se em amónia e em dióxido de carbono (Figura 4.1). A libertação destes últimos compostos resulta no aumento do pH da solução. Esta característica é vantajosa, pois numa solução alcalina a energia mínima necessária à degradação do PH é menor, levando a uma maior taxa de libertação de PH e de radicais livres, facilitando o processo de branqueamento. A ureia, para além de estabilizar o PH, estimula a produção de saliva, essencial para a remineralização das estruturas dentárias duras (Miguel, 2009). Para além do agente branqueador, os géis de branqueamento dentário têm outros constituintes com importantes funções de modo a aumentar a sua eficácia e ajustar os produtos a diferentes regimes terapêuticos, sumarizados na Tabela 4.1 (Ferra, 2010) (Mota, 2011) (Silveira, 2015).

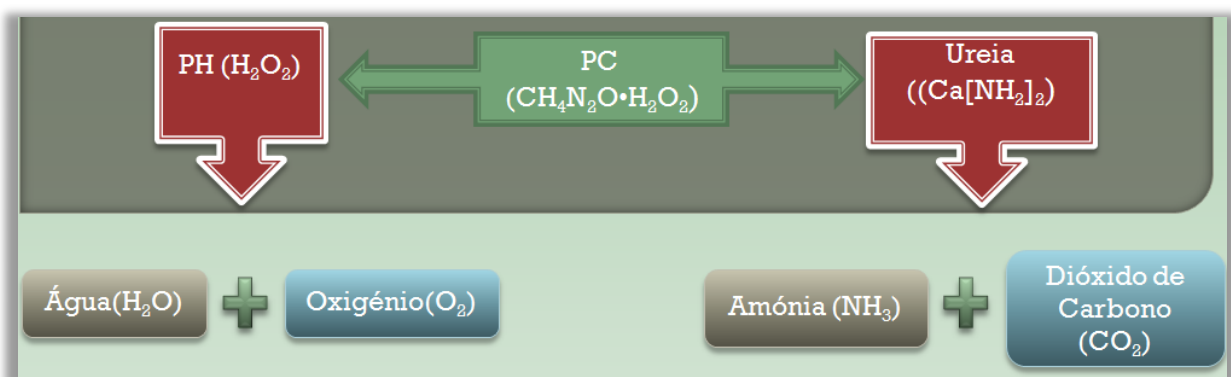


Figura 4.1: Decomposição do PC e do PH.

Existem outras formulações que contêm como princípios ativos o Perborato de Sódio (PS) e Ácido Clorídrico (HCl) (Ferreira, 2009A).

Tabela 4.1: Composição dos produtos de branqueamento dentário (Miguel, 2009) (Mota, 2011) (Silveira, 2015) (Ventura, 2009).

| Constituinte | Função |
|-------------------------------|---|
| Carbopol | Espessante: aumenta a viscosidade do gel, melhorando a sua aderência e retenção na moldeira. O branqueamento torna-se mais eficiente, pois a libertação de PH é prolongada diminuindo a frequência de substituição e quantidade de produto necessários. Impede a degradação do agente ativo ao entrar em contacto com a saliva. |
| Glicerina (excepiante) | Facilita a manipulação do gel. |
| Surfatantes | Facilita a difusão do princípio ativo na interface com a superfície do dente. |
| Aromatizantes | Aumentar a adesão à terapêutica pelo agradável sabor do produto. |
| Conservantes | Impede a proliferação bacteriana nos produtos. |

4.2 Mecanismo de ação química dos agentes branqueadores

O mecanismo do PH aquando o branqueamento não é totalmente compreendido, contudo existem na literatura algumas hipóteses estudadas.

O PH caracteriza-se por ser um agente oxidante forte, com baixo peso molecular que penetra no esmalte e dentina por difusão, podendo atingir a pulpa do dente. Consoante as condições da reação, tais como a temperatura e o pH, pode formar um número distinto de radicais livres de oxigénio como o hidroxilo (OH[·]), o perhidroxilo (HO₂[·]) e os aniões de oxigénio (O₂⁻ e O⁻), Figura 4.2 (Godinho, 2013) (Joiner, 2006). Outros fatores que podem influenciar este mecanismo são a concentração do produto, a taxa de libertação e difusão nos tecidos dentários e a capacidade de reação com os pigmentos (Godinho, et al., 2014).

Estes produtos de baixo peso molecular ao penetrarem no dente atingem os cromóforos – moléculas complexas dos pigmentos orgânicos, presentes no esmalte e na dentina. Os cromóforos são compostos formados por anéis de carbono, que conferem ao dente uma cor escura, pois são cadeias moleculares longas, que absorvem a luz incidente sobre o dente. Estas macromoléculas são clivadas em moléculas mais simples, lineares, menos densas e mais longas, através de uma reação de oxidação-redução (redox), pela ação de radicais livres resultantes da degradação do PH. Deste modo, as moléculas resultantes refletem mais luz, sendo o dente percebido como mais branco (Joiner, 2006) (Pinto, et al., 2014) (Silveira, 2015).

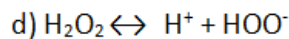
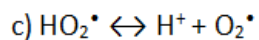
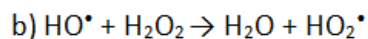
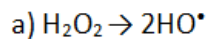


Figura 4.2: Reações químicas decorrentes da decomposição do PH. Em a) formação de espécies reativas de oxigênio, b) formação de radicais hidroxil e perhidroxil, c) formação do anião superóxido e d) formação de aniões de peróxido de hidrogénio (adaptado de (Silveira, 2009)).

4.3 Técnicas de Branqueamento Dentário

Durante bastante tempo, a única maneira segura de se proceder ao branqueamento dentário foi através da técnica de branqueamento em consultório (do inglês, *In Office System Power Bleaching*), até Haywood e Heymann, em 1989, introduzirem a primeira técnica realizada em casa, passando a ser conhecida como branqueamento dentário em ambulatório usando 10% de PC aplicado numa moldeira individual de uso noturno (do inglês, *Take Home System*) – considerada a técnica *gold standard*. Perdigão cit in Mota (Mota, 2011), refere que segundo os vários estudos clínicos, esta técnica demonstrou ser segura e com resultados satisfatórios, destacando que a *American Dental Association* (ADA) “indica não existirem riscos significativos a longo prazo para a saúde oral e sistémica dos pacientes utilizadores desta técnica”. Porém, a demanda por produtos mais rápidos e eficazes, fez com que a indústria desenvolvesse e disponibilizasse novos produtos, com novas concentrações do agente ativo, novas técnicas e tempos de aplicação, nas técnicas de branqueamento dentário em consultório até às técnicas sem prescrição médica. Em suma, variáveis como a concentração do agente ativo, o tipo de agente ativo, o tempo de aplicação e a técnica escolhida irão influenciar fortemente o resultado final pretendido (Ferra, 2010) (Ferreira, 2009A) (Mota, 2011).

Apresentam-se em seguida, as diversas técnicas atualmente disponíveis realizadas para o branqueamento de dentes vitais e algumas das conclusões dos estudos realizados em cada campo.

4.3.1 Branqueamento em Consultório

Na técnica realizada em consultório os agentes usados são o PH com elevadas concentrações (*Power Bleaching*), habitualmente 35% (podendo variar entre 15-38%) e o PC com concentrações iguais ou maiores que 30%, dependendo das concentrações necessárias a cada caso clínico (Ferra, 2010) (Ferreira, 2009A) (Mota, 2011). Antes de se iniciar o tratamento é realizada uma limpeza com uma escova de baixa rotação, de modo a remover a placa bacteriana ou outros resíduos orgânicos que consomem peróxido. Dentes com cálculos ou pigmentos superficiais podem impedir ou dificultar a eficácia do agente branqueador, condicionando o sucesso do tratamento. Esta técnica é realizada exclusivamente pelo Médico Dentista (MD) e deve ser decidido a cor final dos dentes pretendida recorrendo a uma escala de cores. São tiradas fotografias ao longo do tratamento para acompanhar-se a evolução (Ferra, 2010). O MD isola os tecidos moles e aplica o produto branqueador em gel diretamente na superfície dos dentes (Mota, 2011).

Os vários estudos relatam que devido à exigência demonstrada pelo paciente e pela competência associada ao profissional de medicina dentária os resultados apresentam-se mais rapidamente, não sendo necessariamente melhores. Como desvantagens refere-se a incidência de hipersensibilidade pós-operatória e o tempo de cadeira (Mota, 2011).

4.3.2 Branqueamento em Ambulatório

Esta é técnica atualmente conhecida como “nightguard vital bleaching” e tornou-se bastante popular em detrimento ao branqueamento realizado em consultório, sendo o procedimento mais frequentemente realizado pelo MD (Demarco, et al., 2008). É usado um *kit* personalizado para cada paciente a partir de impressões das arcadas dentárias, sendo confeccionada uma moldeira onde o agente branqueador é colocado pelo paciente segundo as instruções dadas pelo clínico. Este gel, normalmente, contém entre 10 a 20% de PC (Mota, 2011). O tratamento tem a duração de quatro semanas, uma ou duas vezes por dia e entre uma a duas horas cada aplicação ou durante duas semanas à noite durante quatro horas. Apesar de ser mais económico em comparação com o branqueamento em consultório, apresenta como desvantagens o tempo de duração do tratamento (entre duas a quatro semanas) e o tempo de aplicação (até 8 horas diárias) (Demarco, et al., 2008) (Ferreira, 2009A).

Araújo *et al* (Araújo, et al., 2013), realizaram um estudo interventivo longitudinal em regime ambulatório, durante duas semanas por duas horas diárias, com vista a avaliar a eficácia do PC, com concentração de 10%. A seleção dos pacientes teve em conta a presença de dentes vitais naturalmente escurecidos e com ausência de cárie dentária, doenças periodontais, restaurações e sensibilidade antes do tratamento. A cor dentária apresentada, pré e pós-tratamento, foi avaliada através de um exame clínico de seleção de cor por comparação com a escala de cores VITA clássica e

fotografias. A avaliação pós tratamento foi realizada quinze dias depois, tempo necessário à hidratação dentária e recuperação do *stress* oxidativo, ao qual o tecido pulpar foi submetido. Foi verificado o aumento de dois tons no valor da cor em todos os casos tratados. Em relação aos efeitos adversos verificados, 71% dos pacientes apresentou sensibilidade dentária e 50% irritação gengival, durante o tratamento.

A equipa de Caballero, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009A), comparou a eficácia entre dois produtos branqueadores, um com PH a 3,5% e outro com PC a 10%, segundo as técnicas usadas em ambulatório e acima descritas, chegando à conclusão que ambos os produtos mostraram eficácia segundo concentrações diferentes.

Existe, ainda, a técnica combinada entre ambulatório e consultório que permite a redução do tempo total de tratamento e das consequentes idas ao consultório, sendo obtidos em geral melhores resultados e ainda uma elevada satisfação por parte do paciente. São usadas elevadas concentrações do agente branqueador (PH a 35%) aplicado em consultório, sendo o restante tratamento completado em casa pelo tempo de 5 dias, com concentrações menores do agente ativo. Caso o resultado alcançado não seja o pretendido, então pode ser aplicado em consultório novamente o agente branqueador (Mota, 2011). Os efeitos adversos verificados no branqueamento em ambulatório são a sensibilidade dentária e irritação gengival, que desaparecem assim que o tratamento é terminado ou quando é aplicado nitrato de potássio ou fluoreto de sódio (agentes dessensibilizantes) (Demarco, et al., 2008).

4.3.3 Branqueamento Assistido

No branqueamento dentário assistido, também conhecido em inglês como *Waiting Room Bleaching*, o agente branqueador usado é o PC com concentração de 35%. O MD aplica o agente branqueador na moldeira e o paciente aguarda na sala-de-estar (*Waiting Room*) durante 30 minutos. Após este período de tempo, o MD avalia o resultado final (Mota, 2011) (Silveira, 2015).

Em qualquer uma das técnicas o paciente é aconselhado a não ingerir alimentos com corantes, pois durante este período a estrutura do dente fica mais suscetível à pigmentação dentária (Araújo, et al., 2013).

4.3.4 Produtos de branqueamento *Over-The-Counter*

Devido aos bons resultados obtidos no branqueamento em ambulatório com uma concentração de PC a 10%, houve um incentivo por forma a desenvolver produtos de acesso livre e a baixo custo, reduzindo a desigualdade observada no acesso a serviços de saúde e reduzindo o custo de tratamentos (Demarco, et al., 2008) (Pinto, et al., 2014).

Existem diversos produtos de branqueamento OTC disponíveis sem prescrição, como por exemplo, *kits* de venda livre com gel branqueador e moldeira, pastas de dentes, pastilhas elásticas, colutórios, fio dentário, pincéis com gel e tiras de branqueamento. A aplicação de qualquer um destes produtos é feita mediante as instruções dadas na embalagem do produto. Em alguns casos, estes *kits* podem conter ácido cítrico ou fosfórico proporcionando um ambiente ácido de atuação do produto e colocando em risco a saúde oral. Existe falta de evidência clínica quanto à segurança e eficácia destes produtos. Os estudos existentes são realizados pelos próprios fabricantes e têm suporte por parte da indústria farmacêutica, sendo realizados durante curtos períodos de tempo. Para além disso, nenhum destes produtos é adaptado a cada consumidor apresentando baixo rigor, podendo muitas das vezes os resultados não corresponder ao expectável (Demarco, et al., 2008) (Mota, 2011).

- **Kits de venda livre com gel branqueador e moldeira**

Os *kits* de venda livre com gel branqueador e moldeira podem ser pré-fabricados como no caso da moldeira *standard*, ou podem ser semi-modelados como no caso das tiras de branqueamento. No caso específico da moldeira *standard* coloca-se o gel branqueador na moldeira e aplica-se pelo período de tempo indicado pelo fabricante (Demarco, et al., 2008) (Silveira, 2015). Devido a não ser moldável, o paciente pode experimentar algum desconforto, sendo que em alguns dos casos, inclusive, causar ligeiros danos nos tecidos moles da cavidade oral (Demarco, et al., 2008) (Suliman, et al., 2004).

Ghalili *et al* (Ghalili, et al., 2014), estudaram a eficácia clínica e a segurança de um *kit* de venda livre, com 9% de PH em gel, em 43 pacientes. A cor dentária pós-tratamento foi avaliada após 5 dias de tratamento e re-avaliada 3 meses depois, tendo sido usada a escala de cores VITA. O tratamento foi realizado duas vezes por dia durante 5 minutos, ao longo de 4 dias, sendo que no último dia o tempo de tratamento foi de 50 minutos. Ao fim de 5 dias, apenas 5 pacientes reportaram algum desconforto durante o tratamento e a média de cores na escala VITA melhorou 7 cores. Na avaliação feita aos três meses houve só um melhoramento de 5,7 na escala de cores, sendo que seis dos indivíduos melhoraram até dois tons durante o acompanhamento. Foi experienciada pelos pacientes uma sensibilidade transitória, tendo desaparecido na totalidade depois do tratamento ter terminado.

Os dentes submetidos a tratamentos de branqueamento dentário podem sofrer mudanças significativas e tornarem-se ainda mais claros, até sete dias após o tratamento devido à presença de oxigénio residual, derivado da reação do peróxido, sendo que após quinze dias a cor apresentada é a definitiva (Demarco, et al., 2008). Pode ainda haver, inicialmente, a perceção de recidiva da cor do dente devido à desidratação decorrente do branqueamento dentário. Contudo, existe falta de consenso na comunidade científica quanto a este pressuposto (Araújo, et al., 2013).

- **Pastas dentífricas, fio dentário e escovas de dentes branqueadores**

Mais de metade dos produtos OTC são constituídos por pastas dentífricas que afirmam possuir propriedades branqueadoras, porém raramente contêm algum tipo de agente ativo. A capacidade de remoção de manchas superficiais extrínsecas encontra-se relacionada com a presença de grandes quantidades de agentes abrasivos na sua formulação galénica, tais como: carbonato de cálcio, óxido de alumínio, fosfato de cálcio desidratado e sílica hidratada. Porém, são pouco eficazes pois os agentes abrasivos somente removem as manchas superficiais presentes no dente (pigmentação extrínseca), não alterando a cor natural como acontece no branqueamento dentário. Existe, por sua vez, um número reduzido de pastas que para além de agentes abrasivos, têm na sua constituição uma percentagem muito reduzida do agente ativo (inferior a 2% PH). Nestes casos, os componentes ativos incluem enzimas que quebram as moléculas orgânicas da película adquirida. Comparando as pastas dentífricas normais com as pastas dentífricas branqueadoras, estas últimas promovem um aumento na luminosidade, apesar de não haver nenhuma diminuição b^* da cor amarela. Deste modo, percebe-se um efeito de falso branqueamento, sendo que os resultados apresentados não têm significado clínico. Em alguns casos, o uso de determinadas pastas dentífricas podem produzir resultados mais satisfatórios por estas possuírem na sua composição mais agentes abrasivos. No entanto, o uso excessivo destas pastas deve ser evitado de forma a limitar o desgaste do esmalte (Demarco, et al., 2008) (Horn, et al., 2014).

Num estudo em que se realizou a comparação de três distintos produtos de OTC (pasta de dentes com 1% de PH, pincéis com 18% de PC e moldeiras contendo gel branqueador com 5% de PC) demonstraram que o grupo tratado com as moldeiras obteve um melhoramento da cor enquanto que os outros dois produtos, após 14 dias, não demonstraram qualquer alteração da cor tendo em conta a inicial. Num outro estudo, realizado com pincéis com 18% de PC, 6% de PH de tiras de branqueamento e pasta branqueadora, observaram que em relação a esta última não houve qualquer alteração da cor do dente. Em ambos os estudos os pacientes experienciaram sensibilidade dentária e irritação gengival (Demarco, et al., 2008).

Recentemente, surgiu no mercado fio dentário branqueador por forma a prevenir o aparecimento de manchas. A presença de sílica no fio promove a abrasão superficial durante a aplicação na região interdental. Contudo, não existe nenhum ensaio clínico para verificar a eficácia deste método (Demarco, et al., 2008).

Em relação às escovas de dentes, foi realizado um estudo comparando as escovas manuais normais com as elétricas de modo a manter os dentes brancos após o paciente realizar o tratamento com 15% PC. Após seis meses, a escova elétrica demonstrou melhores resultados para manter o efeito branqueador que a escova manual (Demarco, et al., 2008).

- **Colutórios Branqueadores**

Em relação, aos colutórios de branqueamento com pequenas percentagens de PC ou PH existe dúvidas quanto à sua eficácia no branqueamento dentário. Gerlach *et al*, *cit in* Demarco *et al* (Demarco, et al., 2008), realizaram um estudo comparando um colutório branqueador com 2% de PH e tiras branqueadoras com 10% de PH usadas duas vezes ao dia durante uma semana, tendo chegado à conclusão que o grupo tratado com as tiras demonstrou um melhoramento na cor obtida; o mesmo não acontecendo com o grupo tratado com colutório.

- **Pincéis com gel branqueador**

Este género de pincéis disponíveis no mercado são produtos de branqueamento que contêm PC ou PH numa suspensão que é posteriormente aplicada com o pincel sobre a superfície do dente, aderindo ao esmalte (Demarco, et al., 2008). Lo *et al*, *cit in* Demarco (Demarco, et al., 2008), realizaram um estudo para comparar a eficácia de pincéis com gel branqueador com 18% de PC, tiras branqueadoras com 6% de PH e um placebo (pasta de dentes com fluoreto). O que apresentou melhor resultado foram as tiras, seguido do gel branqueador aplicado com pincéis. O reduzido efeito branqueador verificado neste último caso, pode ser explicado devido ao pouco tempo de contacto do agente branqueador com a superfície do esmalte.

Foi realizado outro estudo *in vitro*, por forma a comparar diferentes géis branqueadores aplicados com pincel durante duas semanas com um grupo controlo conservado em saliva artificial, nomeadamente: 10 % de PC, 19% de PS, peróxido de ureia (PU) e 8,7% de PH. Através dos guias de cores VITA, verificou-se que os grupos que apresentaram melhor resultado foram os de PH e PS. Os autores referem que pode haver uma sobre-estimação dos resultados obtidos uma vez que os dentes após aplicação do agente branqueador eram conservados em gaze impregnada com saliva, não estando portanto sujeitos a diluição e fricção previstos em ambiente oral (Demarco, et al., 2008).

- **Tiras/bandas adesivas branqueadoras (Strips)**

As tiras branqueadoras foram criadas para substituírem as moldeiras usadas até então por se verificarem mais práticas. São tiras adesivas de polietileno que contêm o agente branqueador e são colocadas na arcada mandibular ou maxilar, nos dentes anteriores, libertando o agente ativo durante curtos períodos de tempo (5 a 60 minutos), uma ou duas vezes por dia, durante vinte dias. O agente ativo é o PH em concentrações relativamente baixas (5 a 14%) (Demarco, et al., 2008) (Ferreira, 2009A). São vários os investigadores que se questionam quanto ao tempo do uso do agente branqueador, a sua eficácia e duração de tratamento no caso dos agentes OTC (Araújo, et al., 2013).

Estudos demonstraram que existe um aumento no efeito de branqueamento quando as tiras são usados pelo período de 28 dias, em comparação com um período de 14 dias, e que este efeito pode manter-se até dois anos (Demarco, et al., 2008).

Em estudos realizados recentemente, foram comparadas tiras branqueadoras com uma concentração de 6% de PH com moldeiras contendo 10% de PC, tendo sido verificado um melhoramento da cor no primeiro caso, bem como uma maior sensibilidade dentária. Quanto maior a concentração de PH maior são os efeitos descritos anteriormente (Demarco, et al., 2008) (Suliman, et al., 2004). As tiras têm demonstrado ser a escolha preferida por parte da população tendo em conta o efeito branqueador e o valor de mercado de no máximo de 40 euros (Mota, 2011).

Gerlach e colaboradores, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009A), realizaram um estudo com o objetivo de verificar a segurança e eficácia das tiras adesivas com PH a 10%, tendo obtido resultados positivos ao fim de 3 dias e 7 dias. Porém, foram diagnosticados os efeitos adversos de sensibilidade dentária e irritação da mucosa. Um outro estudo realizado por Lo *et al*, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009A), comparou a eficácia entre tiras adesivas com PH a 6% e gel de PC a 18%, tendo as tiras adesivas apresentado bons resultados no brilho e na cor mais cedo. Já, Shahidi *et al*, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009A), investigaram a diferença na eficácia de tiras adesivas com diferentes concentrações: uma com concentração de PH a 10% e outra com PH a 6%. Ambas demonstraram ter a mesma eficácia mas a tempos diferentes, as tiras de PH a 10% ao fim de uma semana têm a mesma eficácia que as tiras de PH a 6% ao fim de duas semanas.

Concentrações mais elevadas de agente ativo têm maior eficácia sendo necessárias menos aplicações do produto de branqueamento, contudo se o tempo de aplicação e o número de aplicações aumentar para concentrações mais baixas o efeito será o mesmo, tendo este facto sido demonstrado por Leonard *et al*, *cit in* Ferreira (Ferreira, 2009A) (Suliman, et al., 2004). Segundo Suliman *et al* (Suliman, et al., 2004), a relação entre a concentração de peróxido e o número de aplicações necessárias para atingir o mesmo nível de branco percebido é explicado por uma função exponencial. Este salienta que é possível branquear os dentes até a um ponto considerado terminal, e não para além deste.

4.4 Ativação do branqueamento dentário através de processos físicos

Abbot e Ames, foram os pioneiros no que respeita à ativação do processo de branqueamento através de uma fonte de calor. Em 1937, Ames usou um agente oxidante (PH a 35%) para estudar o efeito deste no branqueamento dentário, tendo mais tarde inovado o mesmo método adicionando uma fonte de energia eletromagnética, como fonte de calor com o propósito de acelerar o processo de branqueamento e a sua eficácia. Ao utilizar-se radiação eletromagnética a temperatura do PH aumenta, acelerando a reação de oxidação do PH e a sua consequente degradação, existindo maior

número de radicais livres libertados. A título de exemplo, o aumento de 10 °C pode fazer com que a taxa da reação aumente para o dobro. Nos últimos anos foram introduzidos no mercado dispositivos de ativação de branqueamento potenciado através de radiação eletromagnética, sendo os mais comuns os dispositivos emissores de radiação que utilizam Díodos Emissores de Luz (do inglês, *Light Emitting Diodes* – LEDs) e Lasers (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Vários são os grupos de investigadores, que concluíram não haver qualquer diferença ao realizar-se o branqueamento com agentes químicos ativados. Por outro lado, outros grupos, em menor número, afirmam que existe um melhoramento na cor aquando a realização desta técnica (Ferreira, 2009A) (Ferreira, 2009B) (Mota, 2011). Segundo, Ferreira (Ferreira, 2009A), para se obter algum resultado positivo, a quantidade de calor fornecido através de radiação eletromagnética tem que ser bastante elevado podendo causar alterações químicas e/ou morfológicas no esmalte e nos tecidos adjacentes. As fontes de calor foram eliminadas do mercado devido ao dano pulpar e as luzes por falta de evidência quanto ao benefício clínico aquando a sua utilização (Silveira, 2015).

4.5 Efeitos Adversos do branqueamento dentário

Os produtos OTC são agentes oxidantes usados muitas vezes em elevadas concentrações, por conseguinte é natural que se verifiquem alguns efeitos adversos decorrentes do branqueamento dentário. A capacidade de tolerar estes efeitos encontra-se relacionada com a concentração do agente ativo *versus* o tempo de contacto do produto com a superfície do dente, da composição do produto, assim como da técnica empregue (Collins, et al., 2004).

4.5.1 Sensibilidade Dentária

A sensibilidade dentária caracteriza-se por uma dor aguda e espontânea após a estimulação por distintos estímulos (térmicos, químicos). Devido ao baixo peso molecular do agente ativo, este difunde-se desde o esmalte, passando pela dentina, atingido a pulpa; causando irritação do nervo e produzindo uma pulpíte reversível. Em casos mais graves, devido a alterações morfológicas e estruturais do esmalte, este sintoma pode-se tornar mais acentuado (Ventura, 2009). É o efeito adverso mais comum, verificando-se em cada 2/3 dos pacientes após a realização do tratamento de branqueamento dentário, mesmo com concentrações de peróxido baixas. Tende a ocorrer no início do tratamento e a diminuir com término deste. No entanto, a taxa de difusão não é proporcional à concentração do agente, variando consoante os produtos utilizados. Pelas propriedades do carbopol ao gerar uma lenta libertação de radicais livres, os tecidos orais encontram-se expostos durante mais tempo, podendo aumentar o nível de sensibilidade dentária (Araújo, et al., 2013) (Miguel, 2009).

Pacientes que tenham sensibilidade dentária, *a priori*, não devem realizar branqueamento dentário (Ferra, 2010) (Ferreira, 2009A).

- **Agentes dessensibilizantes**

A Tabela 4.2 ilustra alguns dos agentes dessensibilizantes utilizados atualmente, disponíveis para durante e após o branqueamento ou comumente adicionados aos produtos de branqueamento.

Tabela 4.2: Agentes dessensibilizantes utilizados (Silveira, 2015) (Ventura, 2009).

| Agente | Função |
|---------------------------------|--|
| Fluoreto | Oclusão dos túbulos dentinários devido à precipitação do fluoreto. Promove a redução do raio dos túbulos dentinários e aumento na dureza do esmalte, impedindo o fluxo de substâncias até à pulpa. |
| Fluoreto de sódio | Pensa-se que forme uma barreira na superfície exposta através da precipitação de cristais de CaF_2 (fluorapatite). |
| Nitrato de potássio | Afeta a transmissão do impulso nervoso, produzindo um efeito calmante, através da prevenção da repolarização. |
| Fosfato de cálcio amorfo | Forma HAp, devido à interação do fosfato de cálcio amorfo com o carbonato; ocluindo os túbulos e defeitos nos prismas de esmalte, aumentando a sua dureza. |

4.5.2 Irritação dos tecidos moles

O potencial risco de contacto dos agentes branqueadores com a mucosa oral aumenta com a técnica OTC, devido a problemas como: má adaptação das moldeiras, colocação do produto em excesso na moldeira, falta de agente espessante (Carbopol), deterioração do gel ou perigo de ingestão. Estes problemas resultam, essencialmente, por falta de acompanhamento médico. No caso de serem utilizadas concentrações muito elevadas, podem ocorrer queimaduras ou úlceras aftosas na mucosa oral (Attin, et al., 2009) (Collins, et al., 2004).

Pensa-se assim, que a irritação oral se relaciona com o aumento da frequência com que se efetua as aplicações, já a sensibilidade pensa-se que esteja relacionado com o tipo de exposição (tempo de aplicação diário, duração do tratamento, tipo de produto OTC). A severidade dos sintomas aumenta com a concentração do agente ativo.

4.5.3 Efeitos na micromorfologia e na microrugosidade

Elevadas concentrações do agente ativo podem danificar a integridade da superfície do esmalte resultando num aumento da rugosidade. Como consequência, os dentes podem ficar mais suscetíveis à descoloração dentária por pigmentação extrínseca, após o branqueamento (Tredwin, et al., 2006).

Recorrendo à técnica de Microscopia Eletónica de Varrimento (MEV) – do inglês, *Scanning Electron Microscope* (SEM), tem sido possível analisar a morfologia superficial do esmalte ao longo do branqueamento dentário. O *design* do estudo, o tipo de produto de branqueamento, o pH e o tempo de exposição têm demonstrado ser fatores que influenciam os resultados quanto à severidade verificada nas alterações morfológicas do dente; variando desde nenhuma alteração, erosão em áreas localizadas e aumento da porosidade do esmalte, até a alterações severas. Especificamente, num estudo utilizando PH com pH ácido demonstrou haver alterações na superfície do dente, não acontecendo o mesmo para o produto de PH com a mesma concentração mas com um pH neutro. Salienta-se, ainda que ambos os produtos obtiveram a mesma eficácia clínica, melhorando a cor dentária, após o branqueamento dentário (Kwon, et al., 2014) (Sun, et al., 2011).

Consequentemente, o pH tem demonstrado ser um fator importante no que respeita ao grau de perda de tecido mineralizado, por erosão. De facto, num estudo experimental realizado por Kwon *et al* (Kwon, et al., 2014), constatou-se um aumento da rugosidade e das irregularidades no esmalte – sendo o aspeto inicial do dente alterado (regular, plano e polido) - aquando o uso de produtos OTC, os quais tendem a apresentar um pH ácido. Neste caso específico, o produto continha um pH de 6. Tem sido sugerido que os produtos de branqueamento contendo um pH baixo, serão responsáveis pela desmineralização causada por processos de erosão ácida, em vez de efeitos adversos pelo peróxido *per se* (Kwon, et al., 2014) (Sun, et al., 2011). O pH reduzido diminui a degradação do gel contendo PH, razão pela qual alguns fabricantes o utilizam (Silveira, 2015).

4.5.4 Efeitos na microdureza

As alterações na microdureza encontram-se relacionadas com a perda ou ganho de mineral (desmineralização ou remineralização) na estrutura do dente. No caso específico de os dentes ficarem conservados em saliva humana entre aplicações, poderá levar a um aumento da microdureza, devido à remineralização. Também, a presença de flúor nos produtos de branqueamento ou a sua aplicação após o tratamento, tende a atenuar a diminuição na microdureza. Em estudos, onde as amostras são conservadas em saliva artificial ou em água destilada, as análises realizadas à microdureza demonstraram haver uma diminuição acentuada (Attin, et al., 2009). Tal como no caso da morfologia e da rugosidade, o pH ácido do produto de branqueamento, tem sido apontado como o maior fator para a ocorrência de desmineralização, causando uma diminuição na microdureza do dente e da sua tenacidade (menor modulo de elasticidade), bem como da sua resistência à erosão, à abrasão e ao atrito. Sun *et al* (Sun, et al., 2011), chegaram à conclusão que devido à diminuição no conteúdo mineral no esmalte, houve um aumento da desmineralização deste tecido, tendo como consequência um aumento das microrugosidades, levando a uma alteração da sua morfologia. Como técnica complementar, o grupo recorreu à espectroscopia Raman que corroborou os resultados quanto ao grau de mineralização.

5. Técnicas analíticas não destrutivas

Tem existido uma grande procura, por parte dos investigadores em diferentes áreas, de técnicas analíticas não destrutivas que possibilitem a análise e quantificação elementar e/ou molecular de uma determinada estrutura. No presente caso, é crucial para o sucesso da investigação, utilizar técnicas que permitam medições antes e ao longo das repetidas aplicações do produto de branqueamento dentário, sendo portanto um estudo *self-control*. Duas das técnicas que cumprem estes requisitos são a micro (μ) - espectroscopia Raman e a espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia, com micro feixe (μ -EDXRF).

5.1 μ -Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi descoberto em 1928 por Sir Chandrasekhra Venkata Raman, tendo em 1930 ganho o Prémio Nobel. Nas décadas seguintes foram desenvolvidos diversos termos experimentais e de instrumentação que permitiram que se tornasse numa das técnicas com maior relevância no estudo de estruturas químicas. Na sua forma mais simples, a espectroscopia Raman consiste na incidência de um fóton de luz na amostra em estudo, difundindo a radiação em diferentes comprimentos de onda (λ). Este processo produz um espectro da radiação difundida inelasticamente. Devido à sua elevada resolução, proporciona em tempo reduzido informação química e os modos vibracionais de qualquer material ou composto orgânico e/ou inorgânico, permitindo a sua identificação (Bitar, 2009) (Farias, 2014) (Moreno, 2013) (Silveira, et al., 2012).

5.1.1 O princípio físico

Aquando a interação da radiação com a matéria esta pode ser transmitida, absorvida ou difundida (Bitar, 2009) (Leite, 2008). Nesta técnica, é utilizado um feixe de radiação monocromática (laser) para excitar a amostra podendo dar origem a dois fenómenos distintos: difusão inelástica (efeito Raman) e difusão elástica (Difusão Rayleigh). A maior parte dos fótons são absorvidos ou reemitidos elasticamente (sem variação de energia), porém uma pequena fração ($1/10^8$) pode interagir com os níveis de energia vibracional das moléculas (modos normais de vibração) e ocorrer, assim, uma troca de energia entre o fóton ($E_0=h\nu_0$) e a molécula ($\Delta E=E_1-E_0=h\nu_{\text{vib}}$), que se traduz num fóton difundido ($=E_0 \pm \Delta E$) com uma energia maior (ou menor) que a do fóton incidente (Moreno, 2013) (Pereira, 2004). Esta diferença é o resultado de uma variação da energia de rotação e/ou de vibração da molécula (Bitar, 2009) (Pereira, 2004). Desta forma, os fótons resultantes têm uma frequência ligeiramente inferior (ou superior) à frequência da radiação incidente. A diferença de frequências

corresponde a um modo preciso de vibração molecular de amostra analisada, sendo que estas trocas de energia originam picos no espectro Raman independentes da frequência da radiação incidente (Bitar, 2009) (Farias, 2014) (Leite, 2008) (Tsuda & Arends, 1997).

As trocas de energia podem ser a favor do fóton ou a favor da molécula. Se, após, a interação fóton-molécula, a molécula anteriormente no estado fundamental retoma para um estado de energia vibracional excitado, serão então emitidos fótons com menor energia do que os fótons incidentes (bandas raman Stokes): $E=h(\nu_0-\nu_{vib})$, Figura 5.1 (Alcantara, 2002) (Moreno, 2013) (Tsuda & Arends, 1997).

Por sua vez, existem moléculas que inicialmente já se encontram num modo vibracional excitado. Assim, após a interação fóton-molécula, estas podem voltar para o estado fundamental, emitindo fótons com uma energia superior aos fótons incidentes (bandas raman Anti-Stokes): $E=h(\nu_0+\nu_{vib})$, Figura 5.1 (Alcantara, 2002) (Moreno, 2013) (Tsuda & Arends, 1997).

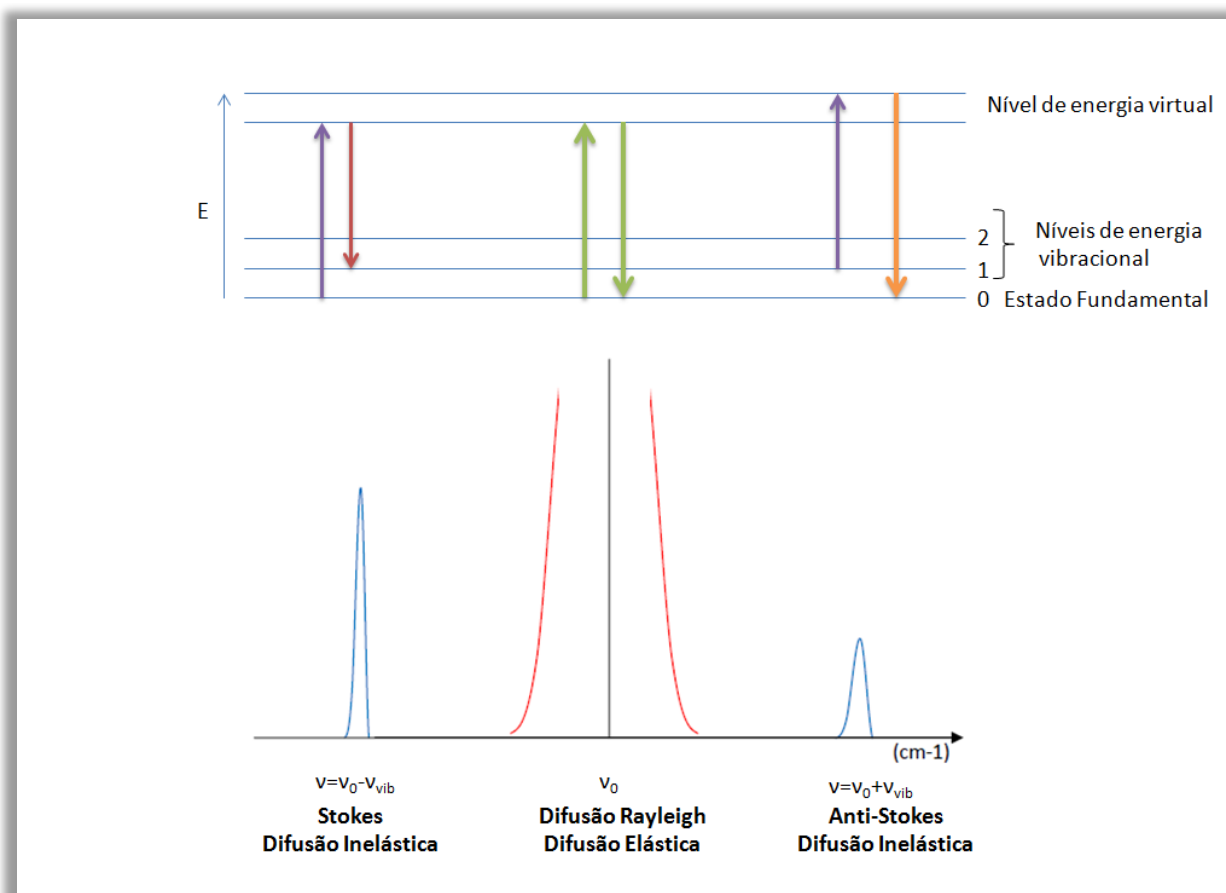


Figura 5.1: Representação esquemática dos níveis de energia para os diferentes casos de sinal Raman (adaptado de (Moreno, 2013) (Tsuda & Arends, 1997).

Para uma molécula ser ativa em Raman tem que cumprir a condição de mudança da polarização da nuvem eletrónica durante a interação com a radiação incidente (radiação eletromagnética) (Gauglitz & Moore, 2014) (Moreno, 2013).

Um campo elétrico ao incidir numa molécula força os eletrões e os núcleos a moverem-se em direções opostas. Um momento dipolar é induzido, sendo este proporcional à intensidade do campo elétrico e à polarização da molécula (Equação 5.1) (Gauglitz & Moore, 2014).

$$p = \alpha E \text{ (Equação 5.1)}$$

Por sua vez, o tensor de polarização α pode ser decomposto (Equação 5.2), em que q é a vibração molecular (Gauglitz & Moore, 2014).

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 \cos(2\pi \nu_{\text{vib}} t) \text{ (Equação 5.2)}$$

A Equação 5.1 e a Equação 5.2, resultam na Equação 5.3.

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 E_0 [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_{\text{vib}}) t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_{\text{vib}}) t)] \text{ (Equação 5.3)}$$

O primeiro termo na Equação 5.3 refere-se à difusão Rayleigh, o segundo termo à difusão Raman Stokes e o terceiro termo à difusão Raman Anti-Stokes. Este dipolo induzido, p , produz radiação eletromagnética posteriormente detetada com a instrumentação adequada, produzindo um espectro Raman (Gauglitz & Moore, 2014).

Num espectro Raman observa-se no eixo vertical a intensidade e no eixo horizontal o número de onda. A Figura 5.2, pretende demonstrar um espectro Raman obtido para a matriz de hidroxiapatite (HAp) do esmalte salientando a intensidade das diferentes bandas. Perante um espectro Raman existem alguns parâmetros a ter em conta aquando a sua análise, nomeadamente: a posição e o número das diferentes bandas no espectro (desvio), a intensidade da banda e a forma da banda. Estas características estão relacionadas diretamente com a estrutura molecular da amostra em estudo. Esta técnica tem a vantagem de ser não destrutiva por não aplicar qualquer alteração da superfície analisada (Berger, et al., 2014) (Gauglitz & Moore, 2014) (Leite, 2008).

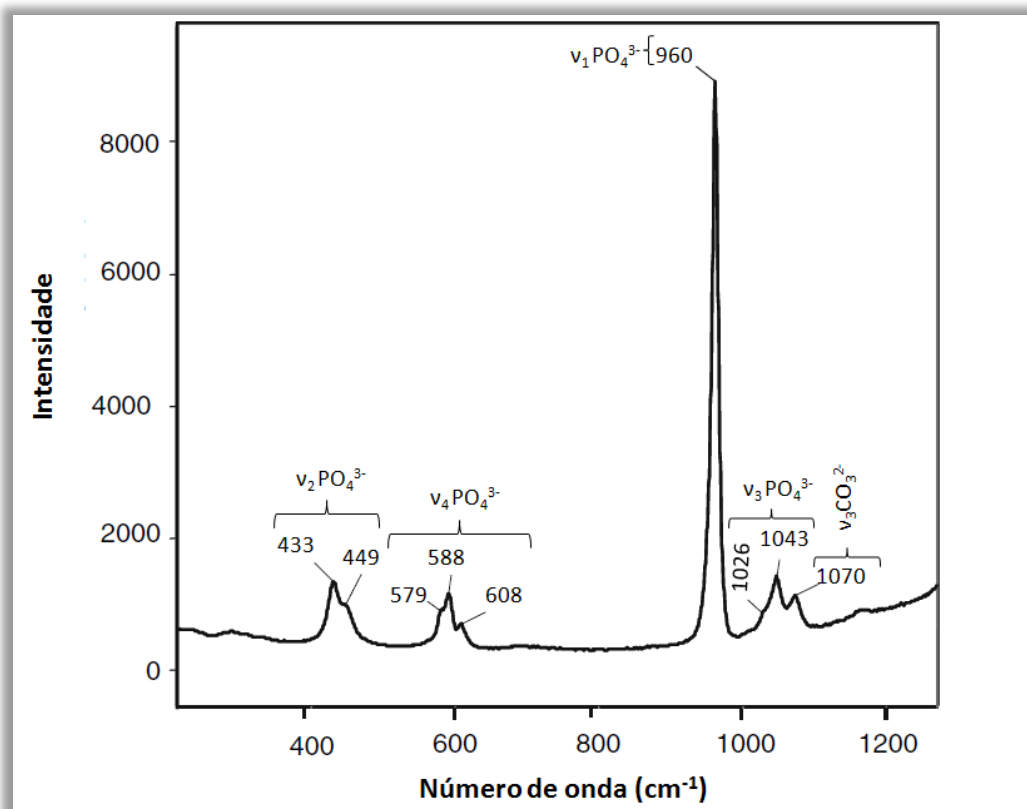


Figura 5.2: Espectro Raman da matriz de HAp do esmalte (adaptado de (Awonusi & Morris, 2007) (Berger, et al., 2014) (Penel, et al., 1998) (Sa, et al., 2012)).

5.1.2 Fluorescência nos espectros Raman

A fluorescência acontece quando uma substância absorve e, imediatamente a seguir, emite luz (Thomas, 2011). A fluorescência pode permanecer 10^7 mais intensa do que o efeito Raman, dificultando a análise do espectro e encontra-se associada a materiais orgânicos, o que para o estudo de amostras biológicas, torna-se a maior limitação desta técnica (Gauglitz & Moore, 2014). Devido a este facto, a espectroscopia Raman tem sido maioritariamente utilizada para estudos de esmalte dentário, pois esta estrutura tem uma percentagem de matéria orgânica muito reduzida, referido no capítulo 2 – O Dente, o que reduz significativamente a fluorescência (Moreno, 2013) (Tsuda & Arends, 1997).

De forma a evitar o encobrimento da difusão Raman pela fluorescência, a diferença entre o nível virtual de energia e o nível eletrónico excitado S1 tem que ser suficientemente grande. Isto pode ser alcançado utilizando preferencialmente um laser com um λ no infravermelho próximo. Nesta zona as transições eletrónicas são menores, especialmente para a matéria orgânica, contudo para além da fluorescência, também, a intensidade do efeito Raman é reduzida (Gauglitz & Moore, 2014) (Thomas, 2011) (Tsuda & Arends, 1997).

5.1.3 Vibrações moleculares

A identificação de uma molécula torna-se possível, pois as posições relativas dos átomos na molécula não são fixas. As vibrações moleculares são originadas pelos movimentos dos átomos ao longo do tempo, podendo as vibrações ser distinguidas de duas formas: alongamentos das ligações moleculares (do inglês, *stretching*) e/ou deformações angulares (do inglês, *bending*). Os alongamentos das ligações moleculares consistem na variação contínua na distância inter-atômica ao longo do eixo de ligação entre os átomos, podendo ser um alongamento simétrico ou assimétrico, Figura 5.3. Por sua vez, as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre as ligações, podendo ser dos tipos, Figura 5.3: *rocking*, *scissoring*, *wagging*, *twisting* e *torsion*¹ (Gauglitz & Moore, 2014) (Torres, 2008).

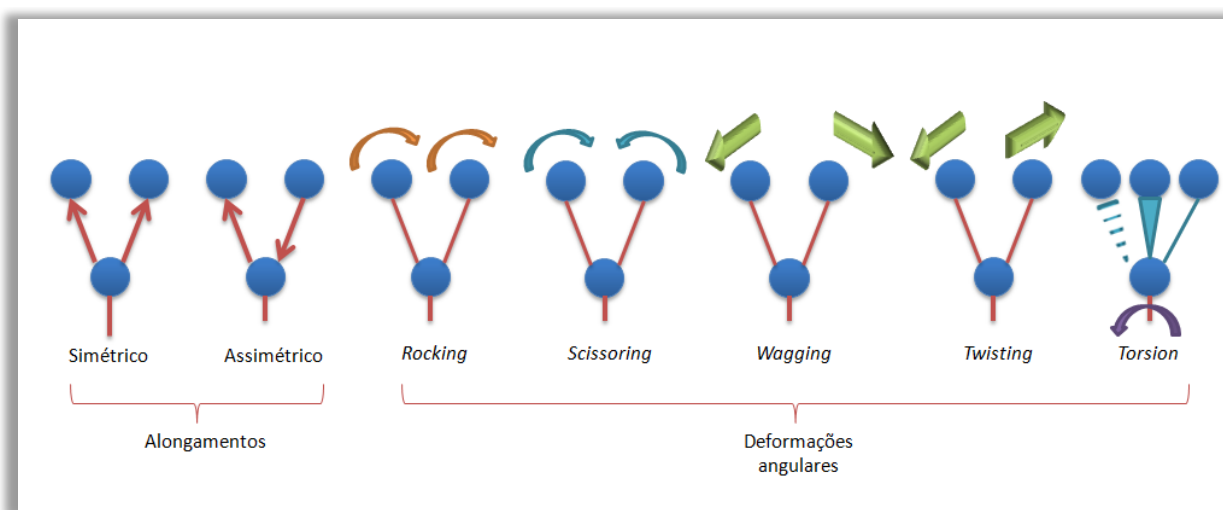


Figura 5.3: Alongamentos e deformações angulares das ligações moleculares.

Contudo, cada molécula em estudo possui vibrações moleculares precisas não tendo que apresentar todas as vibrações moleculares da Figura 5.3. Para o caso particular do presente trabalho, o íão que é de mais interesse estudar é o fosfato (PO_4^{3-}) (Farias, 2014) (Santini, et al., 2008). O fosfato é um anião formado a partir de um átomo de fósforo ligado a quatro átomos de oxigénio. Os átomos de oxigénio tendem a manter-se afastados, conferindo uma geometria molecular tetraédrica (Thomas, 2011). A Figura 5.4, resume os modos vibracionais da molécula em estudo.

¹ Termos científicos originais, por forma a manter-se a coerência com a literatura

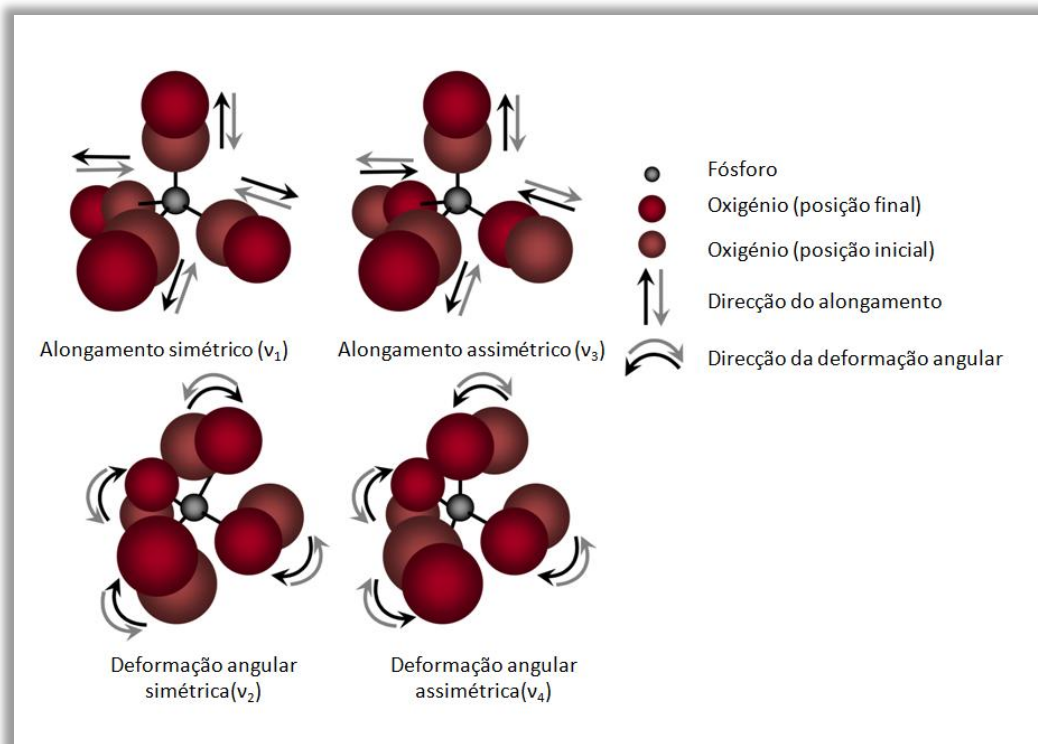


Figura 5.4: Modos vibracionais da molécula PO_4^{3-} (adaptado de (Thomas, 2011)).

Como evidenciado pela Figura 5.2, o espectro Raman da HAp apresenta vários picos em diferentes bandas. Esses picos não correspondem unicamente ao PO_4^{3-} , sendo alguns destes picos correspondentes a outras ligações moleculares, nomeadamente o anião carbonato (CO_3^{2-}). A Figura 5.2 pretende, ainda, sintetizar os diferentes picos inorgânicos presentes num espectro Raman da matriz de HAp do esmalte, bem como os modos vibracionais correspondentes; já que a matéria orgânica presente nesta estrutura é quase inexistente e por isso aparece no espectro de forma reduzida (Aminzadeth, et al., 1999) (Awonusi & Morris, 2007) (Berger, et al., 2014) (Paula, et al., 2010) (Penel, et al., 1998).

5.1.4 Instrumentação Raman – Espectroscopia Confocal de μ -Raman

Nos últimos anos tem-se verificado uma evolução tecnológica nos vários equipamentos de espectroscopia Raman. A instrumentação tem sido aperfeiçoada de forma a obter-se espectros com melhor qualidade. Nesta dissertação, foi utilizado um espectrómetro confocal μ -Raman, sendo o seu funcionamento explicado em seguida.

Em primeiro lugar, um espectrómetro Raman possui uma fonte de excitação laser, mais especificamente um laser díodo. Estes possuem comprimentos de onda específicos (desde a região do azul até ao infravermelho próximo) e têm a vantagem de terem uma elevada eficiência, a uma potência não muito elevada, e dimensão pequena. Como já referido a escolha do λ do laser, é uma das características de maior importância, de forma a minimizar-se a fluorescência, como referido

neste sub-capítulo; assim sendo é usado habitualmente um laser com um λ no infravermelho próximo (785 nm). Devido ao sinal proveniente da difusão Raman ser mais fraco, o feixe laser tem que ser corretamente focado na amostra, bem como a radiação dispersa ser recolhida da maneira mais eficiente. Para este fim, é acoplado ao espectrómetro um microscópio ótico com uma aplicação de 10× a 100×. Habitualmente, o laser é focado na amostra usando a última amplificação. Por conseguinte, a radiação dispersa pela amostra passa novamente pela objetiva do microscópio e é direcionada para filtros *notch*, com fim a remover a radiação Rayleigh proveniente da amostra. De seguida, a radiação Raman é focada para abertura *pinhole*, sendo reorientada para a fenda de entrada do monocromador. Após a radiação passar pelo monocromador atravessa a rede de difração, sendo coletada por um detetor CCD (do inglês, *charge coupled devices*).

5.1.5 Vantagens e limitações da técnica

A Tabela 5.1 sintetiza as principais vantagens e limitações associadas à Espectroscopia μ -Raman com geometria confocal (Bitar, 2009) (Farias, 2014) (Júnior, 2008) (Santini, et al., 2008) (Silveira, et al., 2012) (Torres, 2008) (Tsuda & Arends, 1997).

Tabela 5.1: Vantagens e limitações da Espectroscopia Confocal de μ -Raman.

| Vantagens | Limitações |
|--|------------------------------|
| Não invasiva e não destrutiva | Fluorescência |
| Realizada em curtos períodos de tempo | Elevado custo do equipamento |
| Pode ser realizada sob várias condições de temperatura e pressão | |
| Reposta linear à concentração mineral | |
| Sensibilidade e precisão elevadas (2 cm^{-1} em nº de onda) | |
| Monitorização da amostra em tempo real sem qualquer degradação | |
| Capacidade de controlar a capacidade da área analisada e redução elevada da fluorescência ² | |

² Vantagens específicas associadas à microscopia confocal em comparação com a microscopia óptica

5.1.6 Estudos realizados - estado da arte

Santini *et al* (Santini, et al., 2008), estudaram a alteração da concentração do fosfato no esmalte dentário derivado da aplicação de um produto de branqueamento dentário contendo 10% de Peróxido de Carbamida (PC), utilizando para isso a técnica de espectroscopia confocal μ -Raman. Foram recolhidos 6 dentes molares sem cárie, tendo sido cortadas secções planas da face do esmalte de cada metade do dente, com aproximadamente 2x2 mm, providenciado 12 sub-amostras. Nestas últimas foi aplicado, durante 28 dias o produto de branqueamento dentário, pelo período de 8 horas diárias. A equipa de investigação concluiu que após o período de tratamento, houve um decréscimo na intensidade do pico de ν_1 PO_4^{3-} , comparativamente às medições iniciais, indicativo de desmineralização na superfície dentária. O grupo sugere, ainda, que o branqueamento dentário não deve ser prolongado até ao momento em que comece a existir perda da superfície do esmalte, sendo neste caso em particular a partir do sétimo dia. Também, Paula *et al* (Paula, et al., 2010), obtiveram resultados semelhantes.

Por outro lado, Silveira *et al*, realizaram um estudo pioneiro no qual recorrendo à técnica de espectroscopia confocal μ -Raman, mediram a presença de oxigénio no esmalte dentário, decorrente do branqueamento dentário. Neste estudo, utilizaram 6 dentes molares com uma área superficial de $0,25 \text{ mm}^2$, tendo aplicado o agente branqueador (38% de Peróxido de Hidrogénio (PH)) sido aplicado por 24 horas seguidas. Chegaram à conclusão, que o oxigénio gerado a partir dos produtos de branqueamento dentário é incorporado no esmalte, tendo medido o pico deste aos 1552 cm^{-1} . Anotaram, ainda, uma diminuição da fluorescência associada à matéria orgânica do esmalte. Estes resultados são consistentes com teorias presentes na literatura, nomeadamente por Demarco *et al* (Demarco, et al., 2008), referido no subcapítulo 4.3.4 -Produtos de branqueamento *Over-The-Counter*, evidenciando que após o término do tratamento devido ao oxigénio residual os dentes podem ficar mais brancos.

5.2 Espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia, com micro feixe - μ -EDXRF

Os raios X foram descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895. Röntgen na sequência de experiências realizadas em tubos de descarga observou um novo tipo de radiação incógnita até à data, tendo-a denominado de raios X. A radiação ionizante observada provocava um efeito de fluorescência, observável mesmo quando o tubo era coberto de papel preto (Godinho, 2013) (Grieken & Markowicz, 2002) (Wikipedia, 2015). Os raios X são radiação eletromagnética com um comprimento de onda compreendido entre 0,01 e 10 nm e energias entre 100 eV a 100 keV (Gauglitz & Moore, 2014) (Wikipedia, 2015).

A micro fluorescência de raios X (μ -XRF) caracteriza-se por ser uma poderosa ferramenta analítica qualitativa e quantitativa para análise elementar, de áreas muito pequenas de materiais (líquidos e sólidos). É ideal para a determinação da composição da amostra e concentração elementar, e para identificação específica de elementos major e traço presentes em amostras com matrizes complexas (Gauglitz & Moore, 2014) (XOS, 2015).

Na sua forma mais simples, esta técnica consiste na medição das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, a partir da ionização dos níveis internos dos átomos que a constituem, pela irradiação com radiação X. A intensidade da energia característica medida está relacionada com a concentração elementar da amostra em estudo (Gauglitz & Moore, 2014) (Moreno, 2013).

5.2.1 Interação dos raios X com a matéria

Quando um feixe de raios X passa através da matéria, alguns fótons são absorvidos no material, enquanto que outros fótons são dispersos tendo em conta o trajeto inicial, Figura 5.5 (Gauglitz & Moore, 2014).

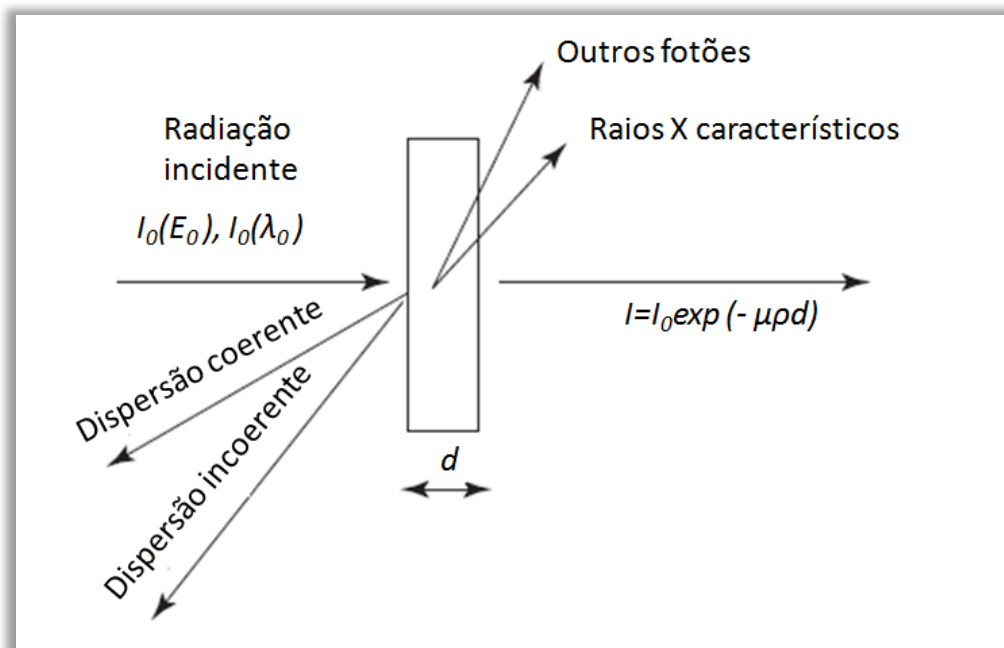


Figura 5.5: Interação dos fótons de raios X com a matéria (adaptado de (Gauglitz & Moore, 2014)).

A lei de Lambert – Beer (Equação 5.4), afirma que quando um feixe de raios X com uma determinada intensidade I_0 , passa por um material com espessura d , densidade ρ e coeficiente de atenuação mássico μ , tem como intensidade final I . A intensidade é reduzida (número de fótons), porém a energia permanece na maioria das vezes inalterada. Por sua vez, o coeficiente de atenuação mássico $\mu(M)$, de uma determinada matriz M que consiste numa mistura de n elementos, pode ser

calculado a partir do μ , onde μ_i é o coeficiente de atenuação mássico do elemento puro e w_i é a fração de massa na amostra considerada (Equação 5.5). O $\mu(M)$ desempenha uma papel importante na análise quantitativa de XRF, pois permite relacionar a intensidade da fluorescência observada com a sua concentração na amostra (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002).

$$I = I_0 e^{-\mu \rho d} \text{ (Equação 5.4)}$$

$$\mu(M) = \sum_{i=1}^n w_i \mu_i \text{ (Equação 5.5)}$$

5.2.1.1 Efeito Fotoelétrico

No processo de absorção fotoelétrica, um fóton é completamente absorvido pelo átomo e um elétron da camada interna é ejetado. Após a interação, o átomo (agora íon) permanece num estado excitado devido à lacuna criada na camada mais interna. O átomo, em seguida, tende a voltar ao seu estado estável emitindo um elétron Auger ou um fóton de raios X característico, Figura 5.6. Este último processo é conhecido como fluorescência de raios X. Ambos os processos são complementares e têm probabilidade de ocorrência dependente do número atômico (Z): a probabilidade de ocorrência para a emissão de elétrons Auger é maior para elementos leves ($Z < 20$) e a probabilidade de ocorrência de emissão de raios X característicos é maior para elementos pesados (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002).

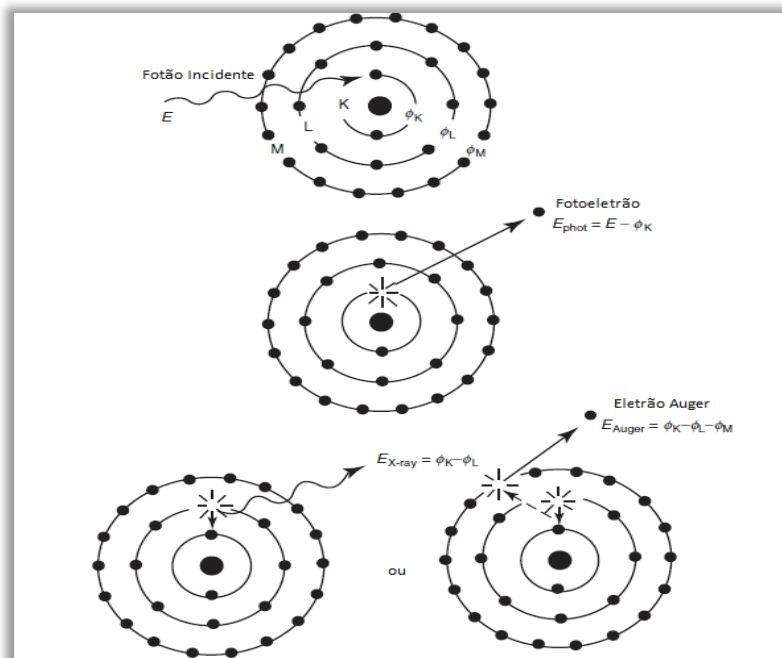


Figura 5.6: Ionização seguida de relaxação radiativa causando a emissão de fluorescência de raios X característicos ou relaxação não radiativa com a emissão de elétrons Auger (adaptado de (Gauglitz & Moore, 2014)).

5.2.1.2 Dispersão

Dispersão é a interação entre a radiação e a matéria, causando a mudança de direção do fóton inicial (Figura 5.5). Se a energia do fóton após a dispersão for igual à energia inicial o processo denomina-se como dispersão elástica ou dispersão Rayleigh. No caso de o fóton perder alguma energia, o processo denomina-se como dispersão inelástica ou dispersão de Compton (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002). Estes processos de interação da radiação primária com a amostra induzem o fundo no espectro (XOS, 2015).

5.2.1.3 Radiação Bremsstrahlung

Este tipo de radiação é produzido quando um feixe energético de elétrons colide com um material de elevado Z e os elétrons sofrem uma desaceleração devido às forças de Coulomb do núcleo. Os elétrons ao perderem energia cinética emitem um fóton com energia igual à diferença entre a energia inicial do elétron e a final. Assim, se um elevado feixe de elétrons interagir com um determinado material, a radiação Bremsstrahlung resultante irá consistir num conjunto de fótons com um contínuo de energia - uma gama de energias desde o zero até ao valor máximo que corresponderá à energia inicial do elétron (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002) (Moreno, 2013).

5.2.2 O princípio físico

A fluorescência de raios X é induzida quando fótons de energia suficientemente elevada, que são emitidos a partir de uma fonte de raios X, colidem com o material em estudo. Estes raios X primários sofrem processos de interação com os átomos da amostra. Deste modo, os fótons de alta energia induzem a ionização dos elétrons que se encontram na camada mais interna através do efeito fotoelétrico, criando assim lacunas nestas camadas mais internas (K, L, M). Consequentemente, existe uma transição dos elétrons das camadas mais externas para estas lacunas, originando uma cascata de transições eletrónicas. Os fótons são emitidos com uma energia específica – emissão de raios X característicos, correspondendo à diferença de energia entre as camadas envolvidas. A título de exemplo, quando um elétron é ejetado da camada K devido à absorção de um fóton proveniente do tubo de raios X, o átomo fica num estado ionizado, permanecendo uma lacuna na camada K. Se a lacuna for preenchida por um elétron da camada L, a transição é acompanhada pela emissão de uma linha de raios X conhecida como a linha $K\alpha$. Por outro lado, se o átomo tiver elétrons suficientes, a lacuna da camada K pode ser preenchida por um elétron da camada M, sendo neste caso a transição acompanhada pela emissão da linha $K\beta$. O conjunto de raios X característicos de cada elemento permite a identificação do elemento em estudo (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002).

O princípio de funcionamento da análise por μ -XRF é a medição do λ ou da energia e intensidade dos fótons característicos emitidos, a partir da reduzida área da amostra. As medições dos espectros de radiação dos raios X característicos emitidos, podem ser realizadas usando um espectrómetro dispersivo em comprimento de onda ou dispersivo em energia (μ -EDXRF), sendo que apenas esta última geometria foi utilizada neste trabalho. O conceito básico para qualquer espectrómetro de XRF é a fonte, a amostra e o sistema de detecção. Neste caso específico, o que distingue ambos os instrumentos é o distinto sistema de detecção. A instrumentação do espectrómetro de μ -EDXRF encontra-se descrita neste capítulo na secção 5.2.3 (Gauglitz & Moore, 2014). Posteriormente, toda a informação da análise é armazenada num espectro com as diferentes linhas características sobrepostas a um fundo (Gauglitz & Moore, 2014).

5.2.3 Instrumentação do μ -EDXRF

Existem fundamentalmente três tipos de fontes de raios X empregues, atualmente, na análise recorrendo a este tipo de radiação: (i) tubos selados de raios X, (ii) fontes radiativas e (iii) produção em sincrotrão. A maioria dos espectrómetros de raios X disponíveis comercialmente, utilizam a primeira opção como fonte de excitação. Tipicamente, estes tubos empregam um filamento de tungsténio aquecido para induzir a emissão de eletrões numa câmara de vácuo. Após aceleração, através de uma elevada voltagem, os eletrões são direcionados para uma camada de metal (de Rh no presente caso) que serve como ânodo. Nesta camada de metal é produzida radiação Bremsstrahlung de forma contínua, sendo as linhas características do material do ânodo sobrepostas. Apesar, da radiação Bremsstrahlung garantir uma permanente excitação dos vários elementos da amostra, contribui também para a formação de um fundo contínuo presente nos espectros de EDXRF. Os equipamentos contêm como opção um conjunto de filtros entre a amostra e o feixe que podem ser selecionados para alterar o *output* do feixe incidente. Deste modo, o fundo disperso na região de interesse é reduzido, bem como a intensidade de excitação dos picos de baixa energia (Gauglitz & Moore, 2014) (Grieken & Markowicz, 2002).

O espectrómetro utiliza uma fonte de raios X que excita diretamente a amostra, induzindo a emissão de fluorescência de raios X. Os raios X provenientes do tubo passam por uma lente policapilar (Figura 5.7), de modo a restringir o tamanho do feixe e focando esse feixe numa área reduzida na superfície da amostra. As lentes policapilares possuem como vantagens a capacidade de manter o elevado fluxo de raios X proveniente da fonte e ultrapassar a limitação da dependência do inverso do quadrado da intensidade dos raios X em relação à distância entre o foco e a fonte, o que não é alcançado com os colimadores *pinhole*. O aumento da intensidade resultante que chega à superfície da amostra, na ordem dos μm , permite uma maior resolução espacial, proporcionando a análise de pequenas características da amostra, com um maior pormenor e uma maior sensibilidade

para a medição de elementos traço (XOS, 2015). No caso específico do equipamento usado neste trabalho, obtém-se um *spot* de 25 μm para a radiação $K\alpha$ do Mo (Bruker, 2015).

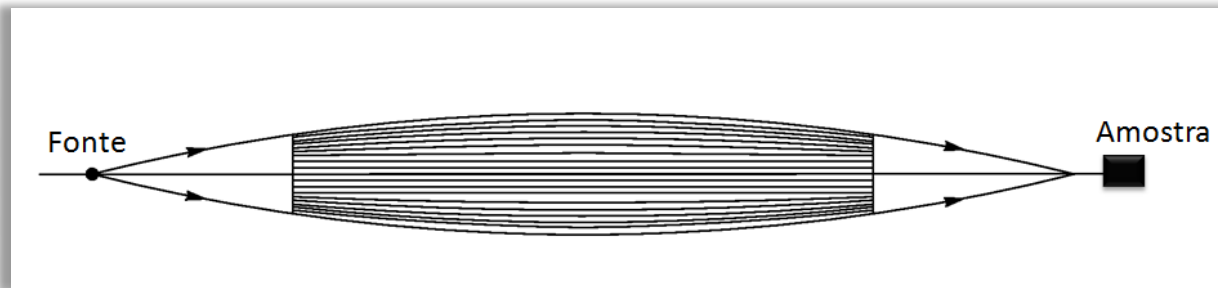


Figura 5.7: Ilustração dos canais presentes no interior de uma lente policapilar (adaptado de (Sciences, 2015)).

Após os raios X interagirem com o material, são emitidos raios X característicos provenientes da amostra que serão coletados pelo detector dispersivo em energia. O detector do equipamento utilizado é um detector de sílcio SSD (do inglês, *Silicon Drift Detector*) da marca XFlash® e possui uma elevada resolução em energia, garantindo a excelente capacidade de separação dos diferentes picos do espectro. O cristal detector é arrefecido por ar. Um transistor FET (do inglês, *Field Effect Transistor*) atua como um amplificador de sinal e suporta a resolução em energia. Esta eletrônica conjugada permite a utilização de técnicas rápidas de processamento de sinal. Após o detector classificar os fótons segundo a sua energia os dados são armazenados numa memória multicanal. Por fim, obtém-se um espectro de energia em função da intensidade (Bruker, 2015). A Figura 5.8, ilustra o *setup* do equipamento utilizado na dissertação.

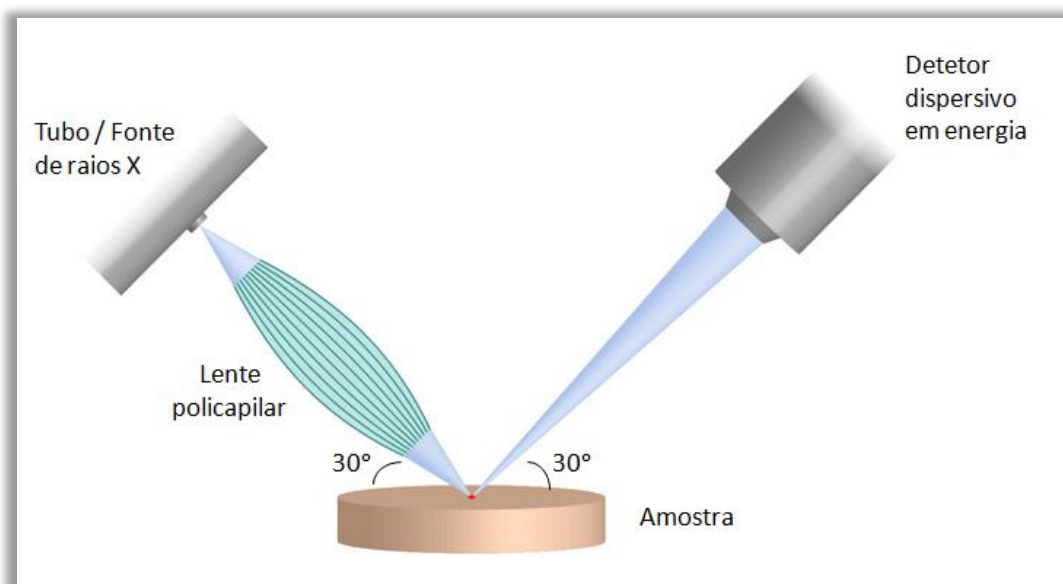


Figura 5.8: *Setup* do M4 Tornado da Bruker (adaptado de (Bruker, 2015)).

5.2.4 Artefactos

Um espectro é composto pelas linhas características e pelo fundo. Como visto anteriormente, o fundo é devido maioritariamente à dispersão elástica e inelástica, que surgem devido à interação da radiação com a amostra. Para além de tais características, existem também artefactos derivados da interação da radiação com o equipamento. Os artefactos que podem ocorrer são:

- Pico escape: quando um fóton incidente interage com o material do detetor, ocorre o efeito fotoelétrico dentro do detetor, havendo emissão e reabsorção dos raios X característicos desse material (Si no presente caso), quando os eventos fotoelétricos ocorrem na superfície, pode ocorrer o escape dos raios X característicos do material do detetor e a não coleção de carga. Deste modo uma quantidade de energia é perdida, sendo que o pico de escape será a energia do pico original menos 1,74 keV (Si $K\alpha$) (Grieken & Markowicz, 2002) (Moreno, 2013).
- Pico soma: estes picos ocorrem quando dois fótons chegam em simultâneo ao detetor, sendo detetados ao mesmo tempo. O detetor não consegue reconhecer os dois fótons como eventos distintos. Assim, o pico final será a soma da energia de ambos os fótons (Grieken & Markowicz, 2002) (Moreno, 2013).
- Pico de difração: quando a radiação proveniente do tubo irradia uma estrutura cristalina esta pode ser refletida segundo um determinado ângulo (Difração de Bragg). O grau de dispersão depende do grau de cristalinidade da estrutura. A radiação difratada dispersa é coletada e aparecem picos adicionais no espectro (Grieken & Markowicz, 2002).

5.2.5 Vantagens e limitações da técnica

A Tabela 5.2 sintetiza as principais vantagens e limitações associadas à espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia, com μ feixe (Bruker, 2015) (Grieken & Markowicz, 2002) (Silveira, 2015) (XOS, 2015).

Tabela 5.2: Vantagens e limitações da μ -EDXRF.

| Vantagens | Limitações |
|---|---------------------------|
| Não invasiva e não destrutiva | Amostras pouco homogêneas |
| Realizada em curtos períodos de tempo (análise de uma quantidade de amostras) | |
| Capacidade multielementar de modo simultâneo | |
| Resposta linear à concentração mineral | |
| Elevada precisão e exatidão | |
| Limites de detecção baixos | |
| Visualização e ampliação da imagem através pela incorporação de microscópios ópticos | |
| Possibilidade de fazer medições em vácuo para elementos leves | |
| Monitorização da amostra em tempo real sem qualquer degradação | |
| Análise qualitativa e quantitativa de quase todos os elementos relativamente a uma amostra desconhecida | |

5.2.6 Estudos realizados - estado da arte

Godinho *et al* (Godinho, et al., 2014), estudaram a alteração do conteúdo elementar do P, do Ca e do Zn no esmalte dentário, após realizarem branqueamento com gel branqueador. Uma amostra de 6 dentes anteriores saudáveis e extraídos por razões periodontais ou motivos ortodônticos foram cortados para se obter sub-amostras de 8x2 mm. Foi aplicado o gel branqueador com 10% de PC, durante 8 horas diárias, ao longo de 14 aplicações. Com o objetivo de simular a remineralização ocorrida na superfície do esmalte, entre aplicações as amostras foram colocadas em saliva artificial. Recorrendo à técnica de μ -EDXRF mediu-se o conteúdo mineral de cada sub-amostra, antes e depois do tratamento, tendo os investigadores concluído que o conteúdo mineral do esmalte

não foi afetado utilizando o produto segundo instruções do fabricante e sob supervisão do médico dentista. Também, Silveira *et al* (Silveira, et al., 2015), estudaram a alteração do conteúdo elementar (Ca, P, Fe, Cu, Zn, Pb e Sr) após o branqueamento dentário. Os investigadores utilizaram dois produtos de branqueamento distintos: o primeiro para uso em consultório e com concentração de 40 % de PH e o segundo para uso em ambulatório e com uma concentração de 10% de PC. Ambos os produtos foram aplicados segundo as instruções dos fabricantes, tendo as amostras sido conservadas em saliva artificial entre aplicações para simular a remineralização ocorrida. As concentrações das várias amostras antes e após o branqueamento dentário não foram significativas, com a exceção para duas amostras em que a concentração de Fe e o Cu presente numa concentração inicial mais elevada, diminuíram após o branqueamento. O grupo de investigadores observou, ainda, a grande heterogeneidade observada nos elementos traço entre dentes e no próprio dente.

6. Objetivos

6.1 Gerais

O objetivo principal do tema apresentado para tese é estudar as possíveis alterações no conteúdo elementar e molecular, quer na matriz de hidroxiapatite quer nos elementos traço presentes nos dentes, recorrendo a técnicas analíticas não destrutivas, após aplicações sucessivas de produto branqueador, excedendo as recomendações do fabricante.

6.2 Específicos

- Avaliar as vantagens e limitações das técnicas nas amostras em estudo (dentes);
- Compreender as dificuldades na aplicação de métodos quantitativos em μ -EDXRF e em μ -espectroscopia Raman;
- Verificar a concentração dos produtos de branqueamento adquiridos por titulação;
- Preparar a amostra de dentes (seleção, corte);
- Desenvolver vários protocolos de aplicação em excesso do produto branqueador;
- Aplicar os produtos de branqueamento dentário segundo protocolos de aplicação em excesso;
- Analisar o tratamento estatístico dos resultados;
- Descrever, quantificar e explicar, em cada protocolo, as alterações verificadas;
 - Determinar as alterações elementares no esmalte dentário após branqueamento dentário por μ -EDXRF;
 - Determinar as alterações moleculares no esmalte dentário após branqueamento dentário por espectroscopia μ -Raman;
- Comparar os resultados obtidos nos diferentes protocolos e identificar se existem diferenças significativas entre os vários protocolos aplicados;
- Conjuguar os resultados obtidos nas duas técnicas e concluir as alterações observadas no esmalte dentário;
- Discutir a problemática inerente às elevadas concentrações destes produtos e às concentrações consideradas seguras e legais pela Comissão Europeia;
- Identificar limitações no *design* do estudo e apresentar alternativas para futuros estudos;
- Inferir possíveis implicações dos resultados do ponto de vista clínico.

7. Materiais e Métodos

7.1 Preparação das amostras

Foram selecionados vinte e um dentes hígidos conservados no banco de dentes da Unidade de Investigação em Ciências Orais e Bioquímicas (UICOB). Os dentes foram extraídos por motivos periodontais ou ortodônticos e conservados numa solução de Cloramina a 0,5 %, a 4 °C, por um período máximo de 6 meses. As superfícies dos dentes foram observadas em detalhe com uma lupa estereoscópica ou lupa binocular (Meiji Techno EMZ 8RT, Japan), por forma a identificar irregularidades na superfície das amostras. No caso de as amostras possuírem irregularidades, estas seriam rejeitadas e substituídas. Em seguida, as amostras selecionadas foram cortadas com recurso a uma lâmina de precisão (Buehler Isomet 1000, USA), de modo a obter-se somente amostras com esmalte dentário. As superfícies utilizadas foram as vestibulares e as bucais. Após o corte dos dentes, as amostras obtidas foram colocadas em frascos devidamente identificados e conservadas novamente numa solução de Cloramina T3 – H₂O, até início da aplicação dos produtos de branqueamento.

7.1.1 Preparação da solução de Cloramina

Pesaram-se 10 g de Cloramina T3 – H₂O (C₇H₇ClNNaO₂S (3H₂O); M=281,695 g/mol). Em seguida adicionou-se o pó a um recipiente de 1,5 L de água destilada e agitou-se até homogeneizar a solução.

7.2 Recolha da saliva humana

A saliva humana utilizada no estudo pertenceu ao banco de saliva do GIBBO, tendo sido conservada a uma temperatura de -80 °C. Imediatamente após a recolha da saliva humana, esta foi congelada por um período de uma semana. Um dia antes do início do estudo, a saliva foi descongelada à temperatura ambiente sendo em seguida devidamente acondicionada numa garrafa isolante e mantida num local seco e a temperatura ambiente.

De modo a assegurar a segurança biológica aquando a manipulação de fluidos humanos durante os procedimentos, foram usados em laboratório luvas descartáveis, máscara cirúrgica e bata de laboratório. De todas as vezes, o local de manipulação das amostras foi isolado com papel absorvente e desinfetado com álcool no final de cada dia.

7.3 Produtos de branqueamento

Os produtos de branqueamento utilizados foram comprados em dois *sites* diferentes em Janeiro de 2015, a um baixo custo (inferior a 10 €). Teeth *Whitening* Home Kit (Figura 7.1) foi adquirido no Ebay® (UK) enquanto que o WHITE! - Bingo-UK (Figura 7.2) foi adquirido no Amazon® (UK). Em ambos produtos, os fabricantes afirmam que a concentração do agente ativo é de 44%. Contudo, não especificam se é Peróxido de Hidrogénio (PH) ou Peróxido de Carbamida (PC).



Figura 7.1: Produto de branqueamento Teeth *Whitening* Home Kit.



Figura 7.2: Produto de branqueamento WHITE! - Bingo-UK.

7.3.1 Constituição dos produtos de branqueamento

A Tabela 7.1 resume a constituição dos dois produtos de branqueamento dentário segundo as informações disponibilizadas pelos fabricantes.

Tabela 7.1: Constituintes dos produtos de branqueamento segundo os fabricantes.

| Teeth Whietening Home Kit | White! – Bingo UK |
|----------------------------------|--------------------------|
| Peróxido | Água destilada |
| Glicerol | Peróxido |
| Propilenoglicol (excipiente) | Glicerina (excipiente) |
| | Sorbato de Potássio |
| | EDTA |
| | Polisorbato 20 |
| | Trietanolamina |
| | Carbopol |
| | Aromatizante |

7.3.2 Aferição do agente branqueador dos produtos de branqueamento dentário

Como visto no sub-capítulo 4.1 - Constituintes dos agentes químicos branqueadores, os produtos de branqueamento dentário podem conter PH, ou a sua forma estabilizada PC. Em ambos produtos adquiridos os fabricantes não especificam qual o agente branqueador presente. Dado que, que o que diferencia este dois agentes é o grupo de ureia, presente no PC, verificou-se através da técnica analítica de espectroscopia confocal μ -Raman se os produtos em estudo continham esta molécula.

7.3.3 Determinação da concentração do princípio ativo

Antes de se iniciar o estudo, os produtos foram titulados para se aferir a concentração de PH e confrontar com a concentração advogada pelo fabricante.

Para cada ensaio, foram pesados 500 mg de produto num gobelé de 600 mL, recorrendo-se a uma balança analítica com uma sensibilidade de 0,1 mg (ABJ 220-4M, Kern, Alemanha). Adicionaram-se 225 mL de água destilada e um agitador magnético até dissolução completa do gel. Após a solução se encontrar homogénea, adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5,0 M e agitou-se a solução durante mais 5 minutos. Adicionou-se, sob agitação, 10 gotas do indicador colorimétrico (ferroína) passando a solução de transparente a laranja/avermelhada. Esta solução foi titulada com com uma solução de sulfato de cério IV tetrahidratado a 0,1 M até ao ponto de equivalência, tornando-se neste ponto azul claro/cyan (Figura 7.3). A solução de sulfato de cério IV foi preparado segundo o Anexo A. Realizaram-se três ensaios para cada produto.



Figura 7.3: a) Solução com o gel branqueador dissolvido e a solução indicadora de ferroína, b) solução no ponto de equivalência.

A percentagem de PH da amostra foi calculada segundo a Equação 7.1 (Silveira, 2015):

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ (m/m)} = \frac{V \text{ (mL)} \times 0.17}{m \text{ (g)}} \text{ (Equação 7.1)}$$

Sendo que:

% H₂O₂ (m/m): quantidade de PH presente na amostra expressa em % (m/m);

V (mL): volume da solução de sulfato de cério IV tetra hidratado 0,1 M expresso em mL;

m (g): massa da amostra do produto de branqueamento utilizada para a titulação, expresso em gramas.

7.3.4 Determinação do pH dos produtos

O pH de ambos os produtos foi determinado através do *kit* universal de pH da Macherey–Nagel (MN), tendo-se obtido um pH de 3 para o produto A e um pH de 4 para o produto B.

7.4 Protocolos

Foram efetuados dois protocolos de uso abusivo dos produtos de branqueamento dentário:

- No primeiro protocolo (Protocolo 1) foram estudados dois produtos distintos (produto A e produto B). Para cada produto foram selecionados aleatoriamente seis dentes. As amostras foram colocadas com a superfície vestibular/ bucal do esmalte para cima e foram realizadas 39 aplicações em dias consecutivos, uma vez por dia, durante 45 minutos. As medições em μ -Raman e em μ -EDXRF foram realizadas: controlo (antes da primeira aplicação do gel), 7 dias, 14 dias, 17 dias, 21 dias, 24 dias, 31 dias, 35 dias e 39 dias (Figura 7.4).
- No segundo protocolo (Protocolo 2) foram selecionados cinco dentes aleatoriamente. As amostras foram colocadas com a superfície do esmalte para cima e foram realizadas 5 aplicações em dias consecutivos, 3 vezes por dia (manhã, tarde e noite), durante 60 minutos cada aplicação. As medições em μ -Raman e em μ -EDXRF foram realizadas: controlo (antes da primeira aplicação do gel), 2 dias e 5 dias (Figura 7.5). Neste protocolo somente o produto B foi estudado.

Após cada aplicação do produto, as amostras foram lavadas com água destilada e escovadas com uma escova de dentes macia, sendo em seguida colocadas diretamente nos frascos de armazenamento. Antes de cada medição, cada espécime foi lavado com água destilada e seco com papel absorvente. As amostras permaneceram conservadas na solução de Cloramina até ao início do estudo. Após a primeira aplicação do produto e entre aplicações, as amostras foram conservadas em saliva humana de modo a simular a remineralização ocorrida *in vivo* na superfície do esmalte, já que este fluido natural desempenha um papel importante na prevenção da desmineralização superficial nos dentes (Sa, et al., 2012). As indicações dos fabricantes para ambos os produtos eram de aplicação do gel na moldeira 1× por dia, entre 20-45 minutos, durante 4 semanas.

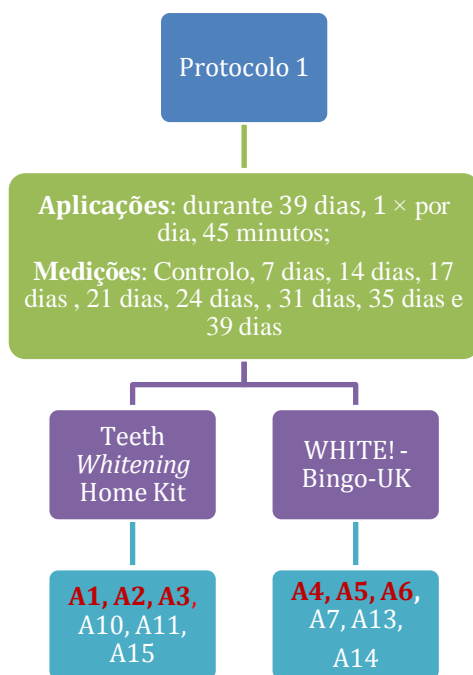


Figura 7.4: Workflow do Protocolo 1.

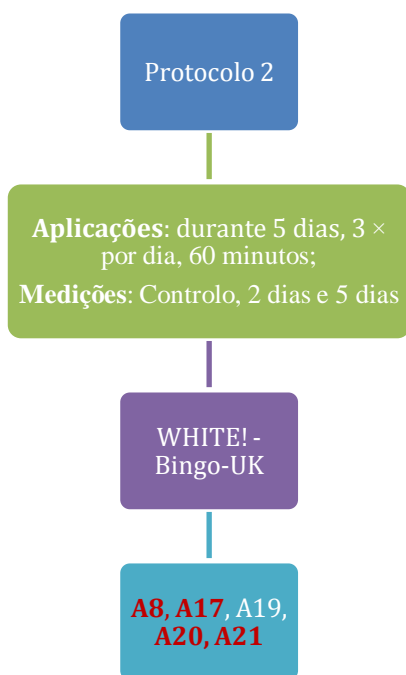


Figura 7.5: Workflow do Protocolo 2.

Todas as amostras foram medidas recorrendo-se ao μ -EDXRF, por sua vez somente algumas amostras foram medidas em espectroscopia μ -Raman (a vermelho na Figura 7.4 e na Figura 7.5), nomeadamente: A1, A2 e A3 (Protocolo 1 - produto A); A3, A4 e A5 (Protocolo 1 – produto B); A8, A17, A20 e A21 (Protocolo 2 – produto B).

7.5 Setup Experimental – μ -EDXRF

O espectrômetro de μ -EDXRF consistiu no M4 Tornado – Bruker (Alemanha), com um tubo de raios X com um ânodo de Ródio (Rh) alimentado por um gerador de alta tensão com baixo consumo de energia e refrigerado por ar. Os raios X provenientes do tubo foram focados com recurso a uma lente policapilar permitindo um ponto focal de 25 μm para Mo-K α . Os filtros usados para diminuir o fundo foram uma combinação de 100 μm Al/ 50 μm Ti/ 25 μm Cu. A detecção da radiação de fluorescência foi realizada recorrendo-se a um detetor dispersivo em energia SDD com uma área sensível de 30 mm^2 e uma resolução de energia de 142 eV para Mn-K α . As medições foram realizadas diretamente nas amostras antes e após cada aplicação do produto de branqueamento, com um total de 10 pontos por espécime. Os parâmetros de aquisição foram 50 kV de tensão e uma corrente de 300 μA . Cada espectro foi adquirido durante 200 segundos em vácuo (\approx 20 mBar). As amostras colocadas no porta-amostra do equipamento foram fixadas com auxílio de plasticina, conforme ilustrado na Figura 7.6.



Figura 7.6: Amostras fixadas no porta-amostra com recurso a plasticina

O programa embutido do M4 Tornado assume uma razão Ca/P constante (aproximadamente 2,16). Assim sendo, numa primeira fase, realizou-se a desconvolução e o *fitting* dos espectros com recurso ao *software* WinAXIL (Camberra, Bélgica), de modo a estimar a razão Ca/P \pm incerteza do valor, e garantir esta proporção. A quantificação foi realizada utilizando o método comparativo. Para configurar o método foram utilizados quatro materiais padrão de referência: Bone Ash NIST-1400 e Bone Meal NIST-1489 (National Institute of Standards and Technology, EUA), Caprine Bone 05-03 e Bovine Bone 05-02 (Department of Health, state of New York, EUA). Uma vez que esta proporção se manteve, foi possível na fase seguinte utilizar-se a desconvolução dos espectros, o *fitting* e a quantificação fornecido pelo *software* embutido no M4 Tornado baseado no método dos parâmetros fundamentais considerando a matriz de hidroxiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. A equação dos parâmetros

fundamentais relaciona a intensidade do pico de determinado elemento com a concentração desse elemento no espécime (Equação 7.2):

$$I_i = I_0 K_i A_i m C_i \text{ (Equação 7.2)}$$

onde I_0 é a intensidade inicial da radiação, I_i a intensidade da radiação X característica do elemento I , K_i é o fator de calibração experimental, m a massa do espécime em g/cm^2 e C_i é a concentração do elemento i (Grieken & Markowicz, 2002).

Apesar, do primeiro passo ter-se demonstrado necessário devido ao programa do M4 Tornado assumir uma razão Ca/P constante, este tem a vantagem de conseguir quantificar outros elementos, o que não é possível com o método utilizado pelo WinAXIL, pois este tem apenas em consideração os elementos presentes nas amostras padrão.

7.5.1 Testes de exatidão e limites de detecção

- **Teste de exatidão - WinAXIL**

A exatidão do método foi verificada:

- 1) Configurando o método comparativo utilizando três materiais padrão de referência: Bone Ash NIST-1400 (National Institute of Standards and Technology, EUA), Caprine Bone 05-03 e Bovine Bone 05-02 (Department of Health, State of New York, EUA) e quantificando o Bone Meal NIST-1489 (National Institute of Standards and Technology, EUA), Tabela 7.2.

Tabela 7.2: Concentração elementar e desvio padrão ($\mu g g^{-1}$) obtida para o Bone Meal NIST-1489 e valores certificados pelo método de quantificação do WinAXIL.

| | P | Ca | Fe | Zn | Sr |
|-----------------------------|---------------|---------------|-------|--------|--------|
| Valores obtidos | 130.000±20000 | 300.000±50000 | 20±20 | 150±20 | 280±20 |
| Valores certificados | 123.000±1900 | 265.800±2400 | 99±8 | 147±16 | 264±7 |

- 2) Configurando o método comparativo utilizando três materiais padrão de referência: o Bone Meal NIST-1489 (National Institute of Standards and Technology, EUA), Caprine Bone 05-03 e Bovine Bone 05-02 (Department of Health, State of New York, EUA) e quantificando Bone Ash NIST-1400 (National Institute of Standards and Technology, EUA), Tabela 7.3.

Tabela 7.3: Concentração elementar e desvio padrão ($\mu g g^{-1}$) obtida para o Bone Ash NIST-1400 e valores certificados pelo método de quantificação do WinAXIL.

| | P | Ca | Fe | Zn | Sr |
|-----------------------------|---------------|---------------|--------|--------|--------|
| Valores obtidos | 180.000±10000 | 330.000±20000 | 40±20 | 120±10 | 190±10 |
| Valores certificados | 179.100±1900 | 381.380±1300 | 660±27 | 181±3 | 249±7 |

- **Teste de exatidão – M4 Tornado**

A exatidão do *software* embutido no M4 Tornado foi calculada analisando o material padrão de referência Bone Meal NIST-1489 (National Institute of Standards and Technology, EUA) e o Bone Ash NIST-1400 (National Institute of Standards and Technology, EUA) e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 7.4 e Tabela 7.5, respectivamente.

Tabela 7.4: Concentração elementar média e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Meal NIST-1489 e valores certificados pelo método de embutido no M4 Tornado.

| | P | K | Ca | Fe | Zn | Sr | Pb |
|-----------------------------|--------------|-------------|--------------|--------|--------|-------|-------------|
| Valores obtidos | 173.000±2000 | 392.500±300 | 373.600±500 | 350±71 | 272±30 | 395±5 | 9±1 |
| Valores certificados | 123.000±1900 | 412±4 | 265.800±2400 | 99±8 | 147±16 | 264±7 | 1,335±0,014 |

Tabela 7.5: Concentração elementar média e desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtida para o Bone Ash NIST-1400 e valores certificados pelo método de embutido no M4 Tornado.

| | P | K | Ca | Fe | Zn | Sr | Pb |
|-----------------------------|--------------|--------|--------------|---------|--------|--------|-----------|
| Valores obtidos | 172.900±800 | 300±70 | 372.900±1800 | 700±400 | 180±20 | 230±20 | 14±1 |
| Valores certificados | 179.100±1900 | 186±8 | 381.800±1300 | 660±27 | 181±3 | 249±7 | 9,07±0,12 |

- **Limites de detecção**

O limite de detecção (LD) traduz-se como a concentração mínima de um elemento que é possível determinar num espécime, em $\mu\text{g g}^{-1}$ (Moreno, 2013). Os LD obtidos para o EDXRF, foram calculados de acordo com a Equação 7.3:

$$LD = 3 \frac{C \sqrt{n_B}}{n_p} \text{ (Equação 7.3)}$$

onde C é a concentração do elemento, n_p o número de contagens correspondentes ao pico do elemento e n_B é o número de contagens do fundo. Os resultados obtidos para o Bone Meal NIST-1489 apresentam-se na Tabela 7.6 e para o Bone Ash NIST-1400 apresentam-se na Tabela 7.7.

Tabela 7.6: Limite de detecção e incertezas do limite de detecção obtidos para Bone Meal NIST-1489 em $\mu\text{g g}^{-1}$.

| | P | K | Ca | Fe | Zn | Sr | Pb |
|------------|------|----|------|----|-----|-----|-----|
| LD | 6070 | 98 | 0,20 | 15 | 7 | 7 | 1 |
| ILD | 100 | 2 | 2 | 1 | 0,8 | 0,2 | 0,1 |

Tabela 7.7: Limite de detecção e incertezas do limite de detecção obtidos para Bone Ash NIST-1400 em $\mu\text{g g}^{-1}$.

| | P | K | Ca | Fe | Zn | Sr | Pb |
|-----|------|----|-----|----|-----|-----|-----|
| LD | 5693 | 30 | 220 | 40 | 9 | 8 | 4 |
| ILD | 65 | 2 | 0,8 | 2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 |

7.6 Setup Experimental – μ -Raman

O espectrômetro confocal μ -Raman usado foi da XploRA (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França) com uma fonte de laser díodo operando a um λ de 785 nm. A gama espectral estudada foi entre os 130 cm^{-1} e os 1800 cm^{-1} utilizando uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . As medições Raman foram efetuadas nos mesmos dias das medições de EDXRF. Os parâmetros de aquisição foram: *Hole* 300 μm , *Slit* 100 μm , *Grating* 1200 grooves/mm, objectiva 100 \times and um filtro 50%, com um feixe com potência na amostra de 9 mW. O tempo de exposição foi de 5 segundos e o número de leituras acumuladas foram de 10 para cada janela. Para cada espécime, uma média de 12 medições foram realizadas a temperatura ambiente (25 °C). Foram obtidas fotografias da área de medição na superfície através do microscópio confocal (Olympus BX41, Japão) equipado com uma câmara fotográfica Ueye 1640.

O fitting e correção da linha de base foram efetuados utilizando o *software* LabSpec versão 5.58.25 (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França) e a intensidade do pico do grupo fosfato foi calculado com o fim de se determinar o grau de desmineralização (GD). Esta percentagem foi calculada de acordo com a Equação 7.4 (Santini & Miletic, 2008):

$$\text{GD} = 1 - \left(\frac{I_{\text{desmineralizado}}}{I_{\text{mineralizado}}} \right) \text{ (Equação 7.4)}$$

onde I é a intensidade do pico da hidroxiapatite aos $\approx 960 \text{ cm}^{-1}$ no esmalte desmineralizado e mineralizado.

7.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente recorrendo ao *software* estatístico SPSS v.20 (SPSS Inc, Chicago, IL USA). O nível de significância considerado foi de 5 %. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk.

As diferenças entre os valores médios durante o estudo foram analisados com recurso ao teste Two-Way ANOVA, expresso em % de desmineralização para o μ -Raman, em percentagem da concentração (w/w %) para o Ca e o P e em $\mu\text{g g}^{-1}$ para os restantes elementos estudados no μ -EDXRF. Foi tido em consideração o teste Post Hoc Scheffe de modo a determinar as diferenças significativas entre as várias variáveis. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e

muito significativas para $p < 0,01$. Os gráficos foram obtidos com recurso ao *software* Microsoft Excel (2007) e ao OriginLab 8.0 (OriginLab Corporation, EUA).

8. Resultados e Discussão

8.1 Determinação do agente branqueador dos produtos de branqueamento dentário

O espectro de ambos os produtos de branqueamento (Figura 8.1) revelou três diferentes bandas: 1003, 1461 and 1664 cm^{-1} características da molécula de ureia em solução aquosa, de acordo com Desseyn *et al* (Desseyn & Alsenoy, 1999). Em suma, os produtos adquiridos continham PC na sua constituição.

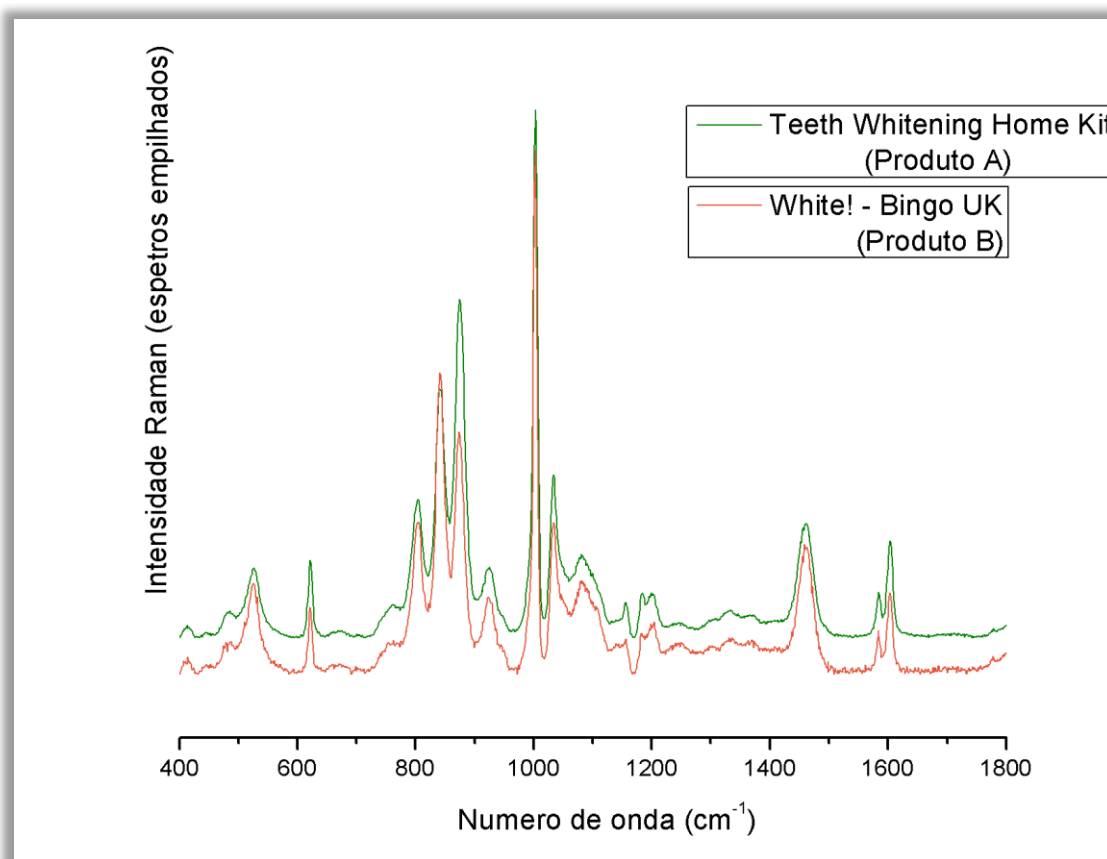


Figura 8.1: Espectros Raman (espectros empilhados) em unidades arbitrárias obtidos para os produtos Teeth Whitening Home Home Kit e White! - Bingo UK.

8.2 Concentração do princípio ativo

A Tabela 8.1, apresenta os resultados obtidos para a titulação efetuada para os diversos ensaios.

Tabela 8.1: Concentração de PH nos vários ensaios para cada produto estudado.

| | Teeth Whitening Home Kit | White! – Bingo UK |
|---|--------------------------|-------------------|
| Ensaio 1 (% H ₂ O ₂) | 13,48 | 11,53 |
| Ensaio 2 (% H ₂ O ₂) | 13,38 | 10,63 |
| Ensaio 3 (% H ₂ O ₂) | 13,71 | 10,52 |
| Média dos ensaios | 13,52 (≈ 14%) | 10,89 (≈ 11%) |

Uma vez que a concentração de PC é 2,76 vezes superior à de PH, pode-se concluir que o produto *Teeth Whitening Home Kit* tinha uma concentração de 38,6 % de PC e o produto *White! - Bingo UK*, uma concentração de 30,4 % de PC (Godinho, 2013) (Silveira, 2015). Estes valores inferiores em comparação aos estabelecidos pelos fabricantes, podem ser justificados devido ao modo de conservação adotado durante o transporte.

8.3 Razão Ca/P

A razão Ca/P do esmalte encontra-se documentada na literatura como tendo o valor de 2 (Arnold & Gaengler, 2007) (Berger, et al., 2014) (Poorni, et al., 2010). Foram calculadas, para todos os dentes em estudo, as respetivas razões Ca/P e incertezas tendo-se verificado que em todos os casos essa razão se manteve, Figura 8.2, Figura 8.3 e Figura 8.4. Rotstein *et al*, cit in Berger *et al* (Berger, et al., 2014), obtiveram uma redução da razão Ca/P após o branqueamento com 35% de Peróxido de Hidrogénio (PH) durante 7 dias. Também, Poorni *et al* (Poorni, et al., 2010), observaram uma diminuição na razão Ca/P após o branqueamento com 35% de PH durante meia hora. Algumas razões para as variações de resultados entre os estudos poderão ser devido a protocolos de aplicação diferentes, a diferentes concentrações do agente branqueador ou diferenças entre o esmalte humano e o bovino (Berger, et al., 2014). A maior razão para não haver variação ao longo do estudo relaciona-se com a conservação das amostras em saliva humana que é rica em minerais, lípidos, carboidratos, proteínas e outras substâncias (Poorni, et al., 2010).

Em todos os casos a média tende a ser inferior ao valor postulado apresentando um valor médio de cerca 1,80. Isto pode dever-se ao pico do escape do Ca se situar perto do pico do P. Existe, assim,

uma sobrevalorização do valor do P com valores acima dos 17% e uma diminuição dos valores de Ca, inferiores a 37%, resultando num valor de Ca/P mais inferior ao teórico.

Associada a esta limitação existe uma outra limitação associada ao método de quantificação do WinAXIL. Este método compara o volume de cada espécime com o volume dos padrões. Dado que as amostras apresentam uma geometria diferente dos padrões, que é plana, no momento de quantificação existe uma subvalorização dos elementos medidos. Estas limitações são muito difíceis de ultrapassar sem se danificar as amostras. Muitos estudos, relatam esta razão superior ao que se obteve porque na maior parte das vezes desgastam os dentes para obterem amostras o mais planas possíveis e porque os equipamentos utilizados são diferentes (Berger, et al., 2014).

8.3.1 Protocolo 1

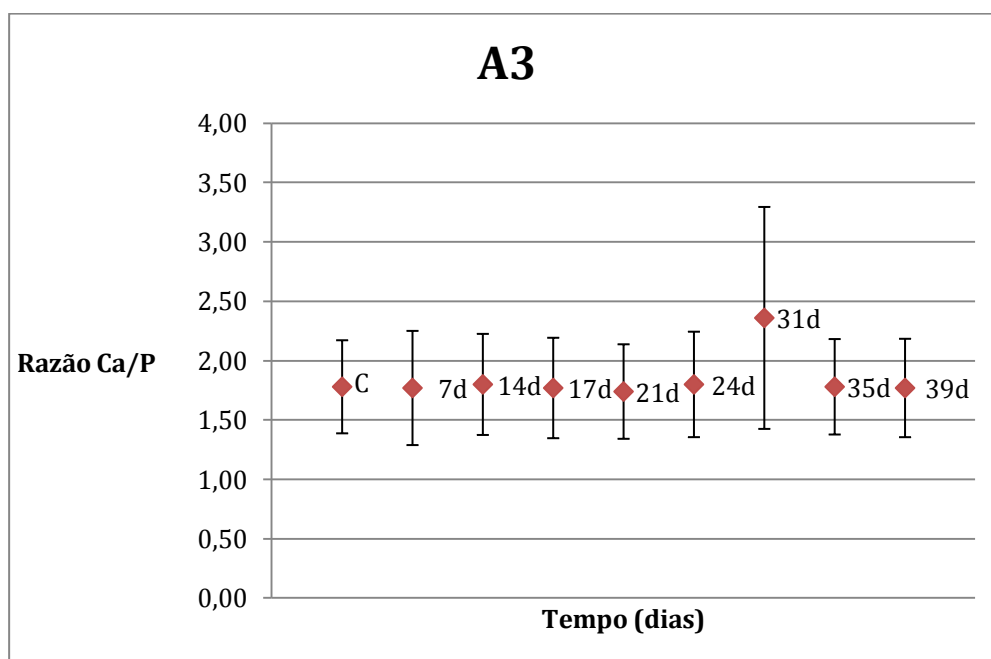


Figura 8.2: Razão Ca/P \pm incerteza do valor para o espécime de dente A3 referente ao produto A.

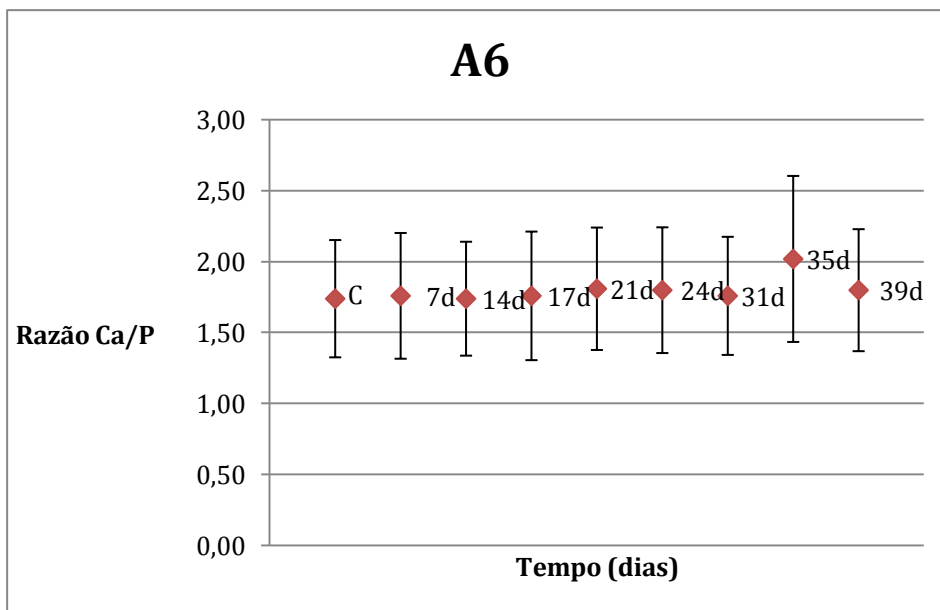


Figura 8.3: Razão Ca/P ± incerteza do valor para o espécime de dente A6 referente ao produto B.

8.3.2 Protocolo 2

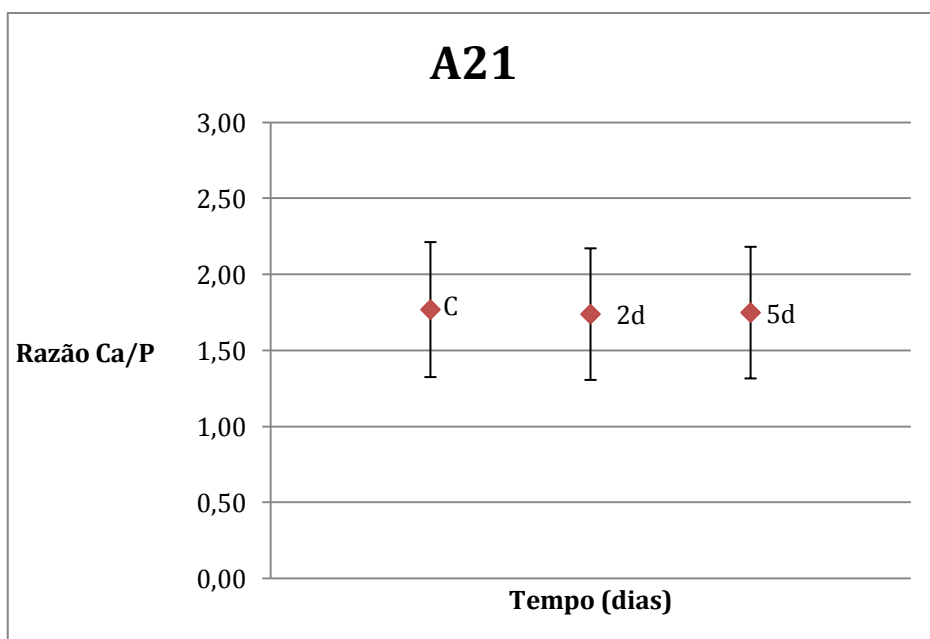


Figura 8.4: Razão Ca/P ± incerteza do valor para o espécime de dente A21 referente ao produto B.

8.4 Grau de desmineralização - μ -Raman

De modo a descrever as mudanças ocorridas no esmalte dentário, a concentração do grupo fosfato (PO_4^{3-}) no esmalte tem-se revelado como um bom indicador para se calcular o grau de desmineralização (GD). Além disso, a intensidade/área do $\text{PO}_4^{3-} \nu_1$ na espectroscopia Raman é diretamente proporcional à concentração do grupo fosfato da molécula de hidroxiapatite (HAp). Com recurso à técnica de μ -Raman determinou-se a evolução da área correspondente ao pico de $\text{PO}_4^{3-} \nu_1$,

após a aplicação dos produtos de branqueamento, tendo sido possível calcular o GD ao longo do estudo para as referidas amostras.

8.4.1 Protocolo 1

A Figura 8.5, representa o GD ao longo do tempo para os espécimes A1-A3, onde o produto A foi aplicado. Existe um máximo de desmineralização 7 dias após o início do branqueamento dentário, havendo uma recuperação gradual do grau de mineralização até ao dia 17 (para os espécimes A2 e A3) e até ao dia 21 para o espécime A1. As medições para os espécimes A2 e A3 ao dia 21, e ao dia 24 para o espécime A1 mostram, no entanto, uma nova desmineralização que aumenta até ao dia 35. No último dia do estudo existe uma nova diminuição do GD mais acentuada para os espécimes A1 e A2. O GD para o espécime A3 parece manter-se similar ao do dia 35 do estudo. Apesar de estas pequenas diferenças no que respeita a variação do GD entre espécimes, num modo geral tendem a apresentar resultados similares e consistentes.

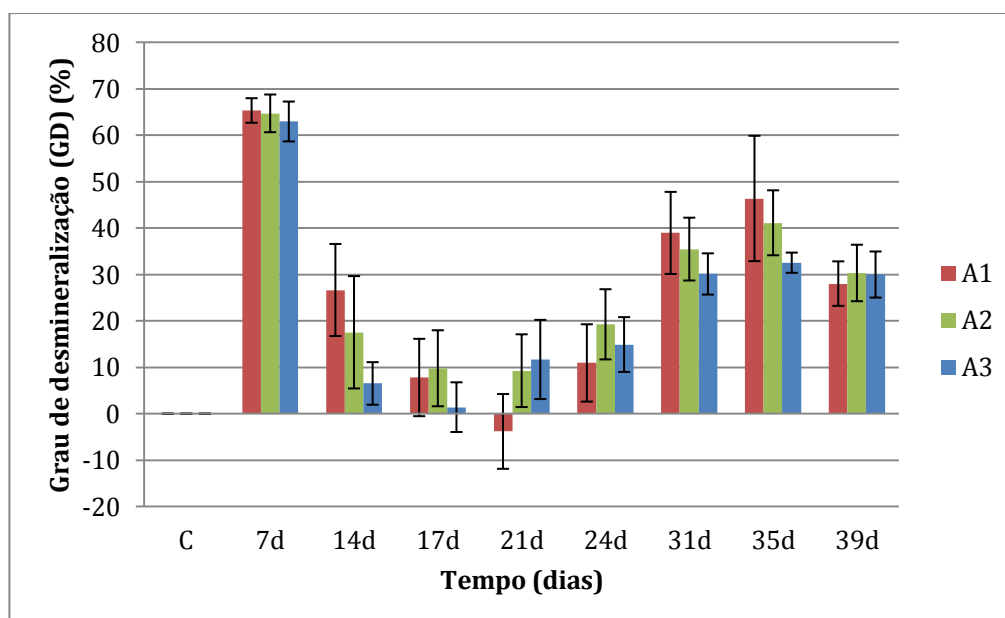


Figura 8.5: Média do GD e respetivos desvios padrão dos espécimes A1-A3, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto A.

Continuamente, a Figura 8.6 representa o GD ao longo do tempo para os espécimes A4-A6, onde o produto B foi aplicado. Para os espécimes A5 e A6, até ao dia 17 os resultados sugerem não haver uma desmineralização significativa no esmalte dentário, mas a partir do dia 21, o GD tende a aumentar até ao término do estudo, alcançando um máximo entre os 41 e os 45 %. Os resultados negativos no espécime A4 não têm significado físico, no entanto variam ligeiramente sugerindo haver um remineralização até ao dia 21, uma desmineralização entre os dias 24 e 31, e uma nova diminuição do GD a partir do dia 35 até ao dia 39.

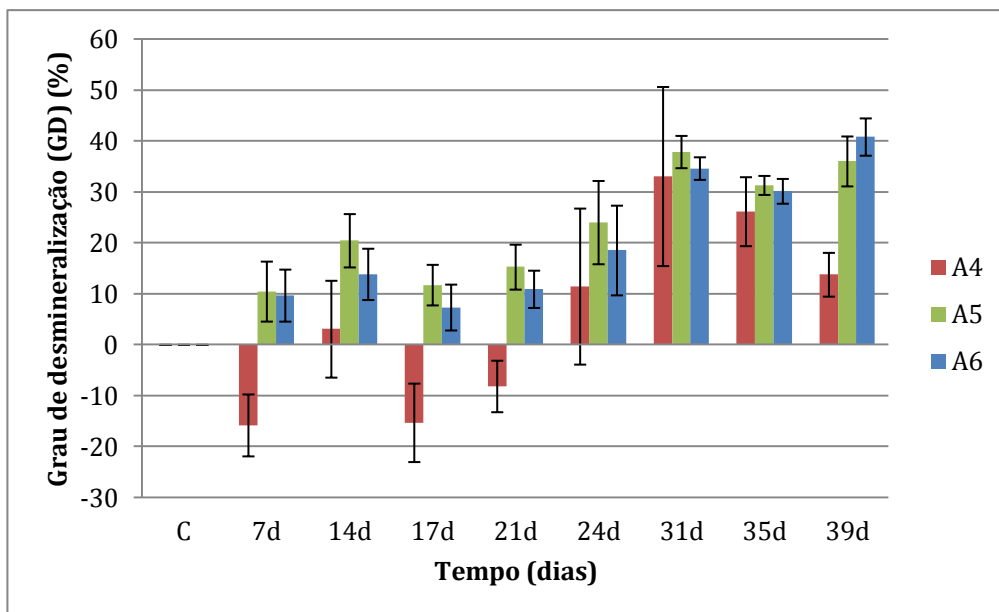


Figura 8.6: Média do GD e respectivos desvios padrão dos espécimes A4-A6, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto B.

8.4.2 Protocolo 2

No que concerne ao protocolo 2, onde somente o produto B foi aplicado, os resultados sugerem haver um aumento progressivo do GD das amostras estudadas. Este aumento tende a ser mais acentuado nos espécimes A8 e A21, sendo que nos espécimes A17 e A20 tende a não haver grande variação dos resultados comparando os dias 2 e 5 (Figura 8.7).

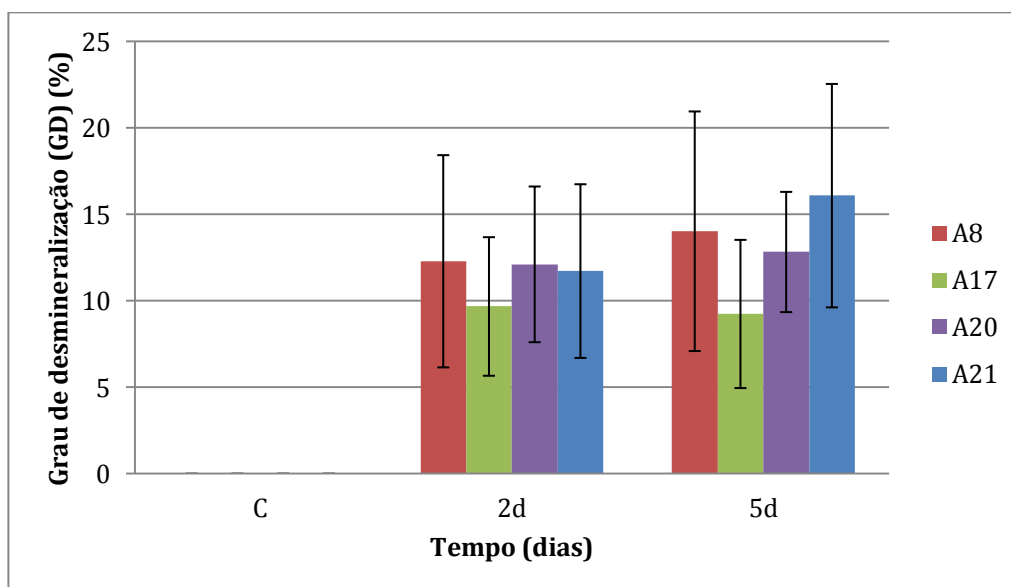


Figura 8.7: Média do GD e respectivos desvios padrão dos espécimes A8, A17, A20 e A21, ao longo dos 39 dias de estudo, após aplicação do produto B.

As intensidades das bandas Raman encontram-se correlacionadas com as concentrações, de forma a permitir que análises quantitativas dos minerais incorporados sejam descritas. Visto que

cada molécula possui a sua própria vibração molecular, o espectro Raman de um espécime em particular consistirá numa série de bandas, cada uma relacionada com a sua frequência vibracional característica, fornecendo assim, a identificação para a molécula que está a ser estudada. Os resultados obtidos pela técnica analítica podem ser explicados por três teorias distintas mas complementares.

Em primeiro lugar, poder-se-á hipotetizar que estas oscilações podem ser explicadas pelo facto de a saliva não ter sido renovada ao longo do estudo, perdendo o seu efeito de remineralização. Não obstante, a saliva humana foi responsável pela reversão da desmineralização nos primeiros tempos de estudo.

Em segundo lugar, é possível que ao longo do tempo o produto tenha perdido as suas propriedades iniciais devido a uma conservação pouco adequada ou devido ao tempo alargado que permaneceu aberto. Assim, para o Protocolo 1 – Produto A, conjugando estas duas teorias, os resultados são sugestivos que existe um ataque agressivo ao esmalte aprismático devido à elevada concentração do produto e, principalmente, devido ao pH ácido, possível de se observar durante os primeiros 7 dias. Por conseguinte, uma degradação do produto ao longo do estudo, e a consequente ação remineralizadora da saliva, permite que os valores de PO_4^{3-} retomem os valores iniciais. Ainda que, o produto tenha perdido a sua agressividade, este continua a ser aplicado nas amostras de esmalte, apesar de que muito provavelmente a saliva tenha perdido a capacidade de remineralizar este tecido, contribuindo para o aumento do GD observado a partir do dia 17.

No que respeita ao produto B do protocolo 1, com uma concentração de PH menor e com um pH menos ácido, o ataque ao esmalte aprismático não é tão pronunciado e a saliva consegue remineralizar esta estrutura nos momentos iniciais. No entanto, e em semelhança ao que acontece com o produto 1, dado que a saliva não foi renovada, a sua ação de remineralização diminui e o GD tende a aumentar.

Em relação ao protocolo 2, onde somente o produto B foi aplicado, considerando estas duas teorias; o crescente aumento do GD pode ser explicado devido ao facto de a saliva nesta fase ter perdido grande parte das suas propriedades iniciais (o protocolo 2 foi realizado 50 dias após o início do protocolo 1), e também porque o produto ao ser aplicado três vezes ao dia, o tempo para remineralizar o dente de cada vez que o produto é aplicado acaba por ser bastante inferior. Assim, o ataque ao esmalte aprismático é superior à capacidade que a saliva tem de remineralizar. Comparando a Figura 8.6 com a Figura 8.7, pode-se observar que o GD aos 5 dias da Figura 8.7, correspondem aproximadamente, ao GD aos 14 dias da Figura 8.6; já que o produto foi aplicado neste protocolo três vezes ao dia.

Ainda assim, estas duas teorias não explicam as variações no GD que ocorrem no final do estudo, especialmente no protocolo 1, nem as diferentes variações entre espécimes. Existe uma terceira teoria anteriormente estudada por Albers *cit in* Santini *et al* (Santini, et al., 2008), postulando que a aplicação contínua do produto de branqueamento dentário causa uma progressiva desmineralização do esmalte que ocorre com concomitante degradação da matriz de esmalte da camada aprismática, em provavelmente alguns μm de profundidade. Esta hipótese permite uma interpretação mais completa dos resultados obtidos no presente estudo. Analisando o espécime A3 (Protocolo 1 – Produto A), a aplicação de 38,6 % de PC resulta num aumento do GD (diminuição da intensidade do pico do fosfato), aumento esse que ocorre numa maior percentagem aos 7 dias. É de se esperar que quantas mais aplicações do produto de branqueamento se realizarem, maior será a alteração ocorrida nas estruturas inorgânicas e orgânicas do dente. Contudo, aos 17 dias, existe uma diminuição do GD (aumento do pico do fosfato). Esta diminuição poderá ser devido à degradação superficial do esmalte que ocorre após a escovagem, de acordo com o protocolo experimental, antes de se obter os espectros Raman, removendo a camada superficial alterada pelo produto com uma elevada concentração e baixo pH, expondo uma camada menos afetada contendo uma concentração do grupo fosfato mais elevada. A subsequente aplicação do produto até aos 35 dias permite observar o fenómeno ocorrido aos 7 dias. Novamente aos 39 dias, último dia do estudo, existe uma nova diminuição do GD em consequência da remoção de mais uma camada de esmalte em alguns μm de profundidade. Os restantes espécimes deste protocolo (A1 e A2), demonstram ter um comportamento semelhante no que respeita ao GD, contudo os tempos a que ocorre a remoção da camada de esmalte expondo a camada menos afetada parece divergir, ocorrendo nestes casos não aos 17 dias mas sim aos 21 dias. Foi registada uma diferença muito significativa ($p < 0,01$) nos resultados obtidos entre os produtos aplicados no protocolo 1. Tendo em consideração os valores medidos no controlo, todos os tempos de medição apresentam valores estatisticamente muito significativos ($p < 0,01$) com exceção dos dias 17 para o produto A do protocolo 1 e para o dia 21 para o produto B do protocolo 1.

Da mesma forma, os espécimes do produto B do protocolo 1 (A4-A6) parecem diferir nos tempos a que ocorre a remoção da camada de esmalte, em comparação com o produto A. Inclusive, existe uma discrepância entre o espécime A4 e A6.

O protocolo 2 por comparação com o protocolo 1, parece evidenciar uma certa analogia. Tal como no produto B do primeiro protocolo existe uma progressão do GD dos 7 aos 14 dias, que é similar ao ocorrido entre os 2 aos 5 dias do protocolo B. Os resultados sugerem não haver uma diferença significativa entre branquear os dentes durante 14 dias, 1 vez ao dia, ou branquear durante 5 dias, 3 vezes ao dia, pois não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Contudo, para haver confirmação desta hipótese dever-se-ia ter realizado medições após cada branqueamento no protocolo 2.

O esmalte aprismático é a camada de esmalte mais mineralizada e conseqüentemente mais resistente à desmineralização (Sun, et al., 2011). Inicialmente, a erosão ácida ocasionada pelos produtos de branqueamento, causa um desgaste suave na superfície do esmalte, sendo que o impacto pode variar de acordo com o tempo de exposição ao produto e do pH. Se esta primeira camada não sofrer nenhuma remineralização, por exemplo por um agente remineralizante como a saliva, ou se a capacidade remineralizante da saliva for inferior à desmineralização ocorrida, ficará mais frágil perdendo volume e será mais vulnerável à ação mecânica (escova de dentes), havendo por fim uma remoção adicional da restante camada de esmalte aprismático. Se o tratamento persistir, existe uma dissolução consecutiva das camadas subjacentes de esmalte, levando a uma perda permanente do esmalte superficial. O processo de erosão pode revelar uma aparência do dente mais lisa e suave (West & Joiner, 2014).

Existe uma grande verossimilhança de que as duas primeiras teorias suportem a terceira teoria influenciando os resultados. Poderá supor-se que se a saliva tivesse uma renovação mais assídua e o pH do produto fosse maior, talvez não houvesse valores tão elevados do GD bem como da constante remoção das camadas de esmalte mais superficiais.

A dissolução do esmalte num meio ácido ocorre como o resultado da interação de iões de hidrogénio e HAp – Equação 2.1 (sub-capítulo 2.1.1 - Esmalte). O baixo pH presente em ambos os produtos afetam a dissolução do conteúdo mineral do esmalte. Todavia Santini *et al* (Santini, et al., 2008), salientam que em *in vivo*, os produtos contendo PC tendem a aumentar o pH acima dos 7, não provocando assim a decomposição do esmalte. Esta aparente contradição, realça o pouco conhecimento em relação ao exato mecanismo envolvido no branqueamento dentário, destacando a necessidade de se investigar todos os aspetos destes mecanismos e não apenas o aparente efeito clínico estudado isoladamente (Santini, et al., 2008).

Em estudos prévios foram reportados casos em que quanto maior for a concentração de peróxido menor é o pH do produto de branqueamento (Kwon, et al., 2014)(Sun, et al., 2011). Sa *et al* (Sa, et al., 2012), estudaram os efeitos na superfície do esmalte, de dois produtos de branqueamento *in-office* com diferentes valores de pH. Concluíram, que o branqueamento dentário com produtos com um pH ácido e com um pH neutro, tiveram a mesma eficácia no branqueamento *in vitro*, no entanto o esmalte humano tratado com o produto de branqueamento com um pH ácido foi suscetível a uma maior desmineralização. Esta constatação indica que a desmineralização ocorrida na superfície do esmalte pode ser principalmente causada pelo baixo valor do pH, em vez do PH *per se*. O grupo de investigadores chegou também à conclusão de que os efeitos adversos causados pelo pH baixo do

produto podem ser minimizados aquando a conservação em saliva humana. Este fluido natural revelou efeitos protetores mais elevados na estrutura do esmalte humano do que em a água destilada. Em estudos anteriores, foi postulado que a presença de uma película de saliva rica em iões de Ca, P e F na cavidade oral humana, poderá ser responsável pela manutenção do conteúdo mineral do esmalte, através da incorporação destes iões na sua superfície. A película de saliva poderá cobrir a camada subjacente da superfície de esmalte, e assim compensar os efeitos adversos derivados da erosão ácida (inibir a desmineralização) (Godinho, 2013) (Sa, et al., 2012). Da mesma forma, também o grupo de investigadores de Sun *et al* (Sun, et al., 2011), estudaram a diferença entre produtos de branqueamento dentário com a mesma concentração diferindo entre um pH neutro e um pH ácido; tendo chegado às mesmas conclusões que Sa *et al*. A desmineralização ocorrida potenciada pela erosão ácida derivada do produto de branqueamento pode resultar em alterações significativas na morfologia do esmalte e numa diminuição da microdureza (Salehi, et al., 2007) (Sun, et al., 2011) (West & Joiner, 2014).

Para além das diferentes concentrações do agente ativo e do valor de pH em ambos os produtos estudados, os diferentes resultados obtidos podem ser devido à diferente cinética de libertação do PH em meio aquoso. Comparando os valores obtidos no protocolo 1, o produto A poderá ter uma maior cinética de libertação do PH (totalidade do conteúdo de PH libertado para o meio) do que o produto B, no tempo de aplicação praticado, tal como investigado anteriormente por Silveira (Silveira, 2015).

Não foram observados os picos nas bandas de 880 e 1400 cm^{-1} indicando a presença de PH nem aos 1552 cm^{-1} característicos do grupo oxigénio (O_2), tal como observado nos estudos de Silveira *et al* (Silveira, et al., 2012) (Silveira, 2015). A escovagem após cada aplicação do produto de branqueamento terá eliminado o PH à superfície do dente e o O_2 residual terá sido removido facilmente devido às propriedades antioxidantes da saliva. Ainda assim, para medir qualquer um destes picos o tempo necessário de aquisição teria de ser prolongado para várias horas ou dias, tal como realizado pela equipa de Silveira *et al* (Silveira, 2015).

Tendo em conta os resultados obtidos, *in vitro*, pela espectroscopia Raman existe plausibilidade biológica de que a camada aprismática dos vários espécimes tenha sofrido erosão permanente expondo as sucessivas camadas de esmalte, sendo que a saliva humana utilizada apesar de minimizar o GD não preveniu a desmineralização na sua totalidade. Deverão ser efetuados futuros estudos com uma renovação da saliva diária de modo a se investigar se a cinética de remineralização é influenciada pela constante renovação deste fluido biológico. De modo complementar, dever-se-á estudar também o branqueamento dentário com agentes remineralizantes extrínsecos (ricos em

minerais como o F) de modo a compreender-se como é que estes poderão prevenir o desgaste ocorrido durante o processo.

8.5 Alterações do conteúdo da matéria orgânica no esmalte

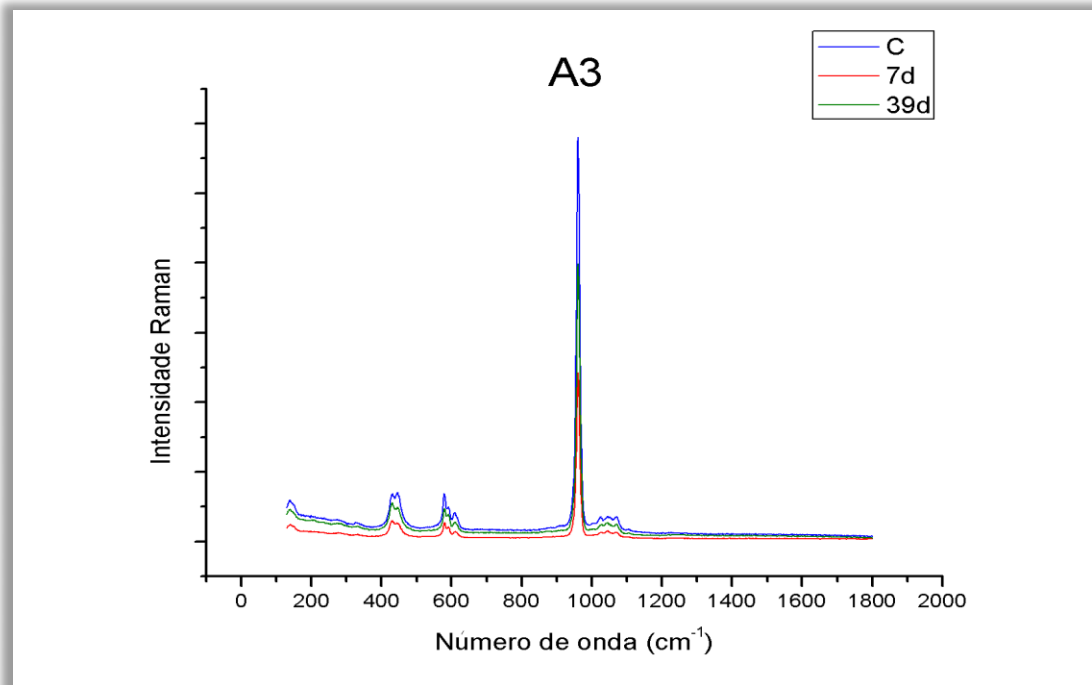


Figura 8.8: Conjunto de espetros obtidos antes, aos 7 dias e aos 39 dias após o branqueamento dentário para o espécime A3 (Protocolo 1 - Produto A).

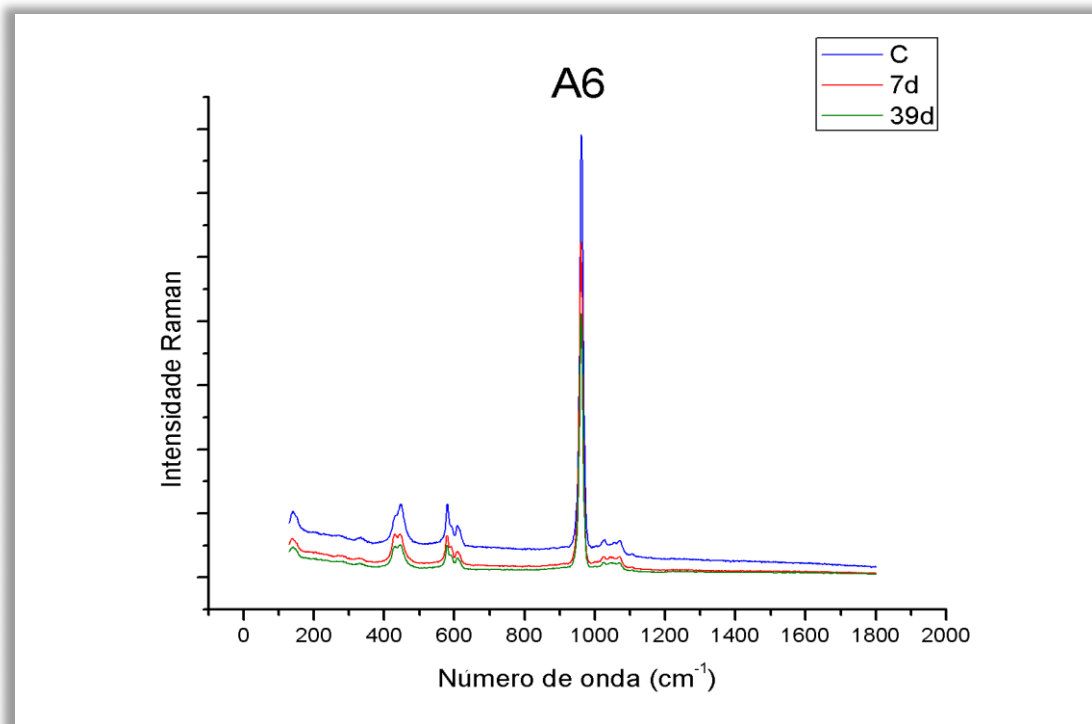


Figura 8.9: Conjunto de espetros obtidos antes, aos 7 dias e aos 39 dias após o branqueamento dentário para o espécime A6 (Protocolo 1 – Produto B).

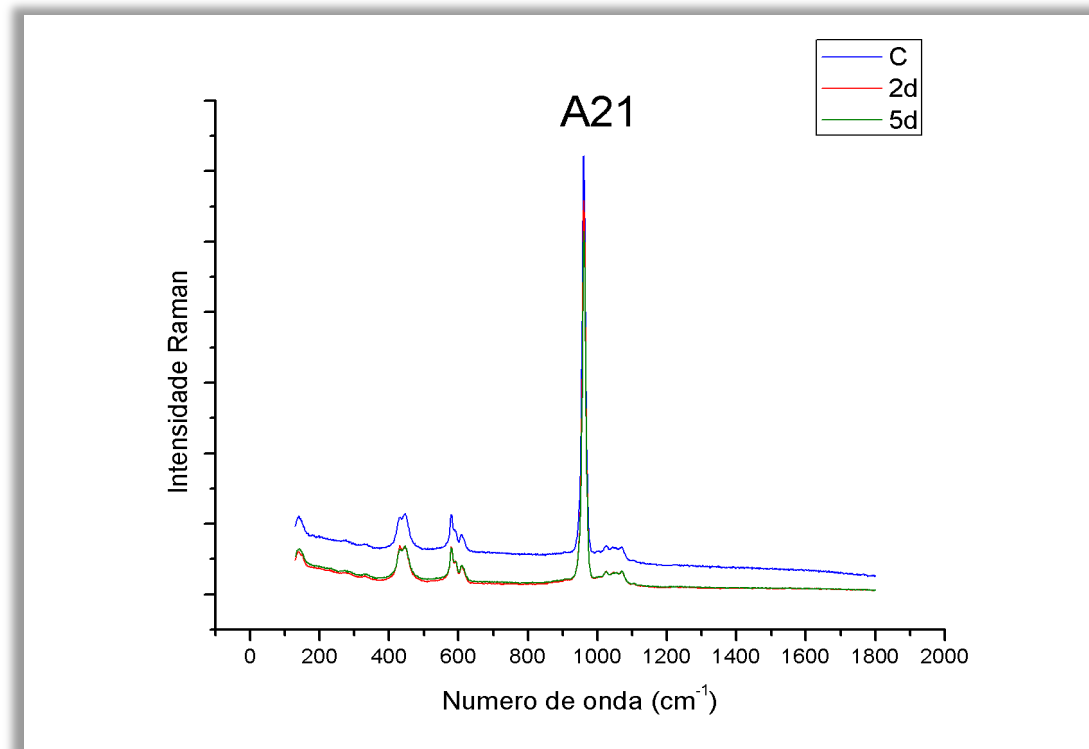


Figura 8.10: Conjunto de espectros obtidos antes, aos 2 dias e aos 5 dias após o branqueamento dentário para o espécime A21 (Protocolo 2- Produto B).

A Figura 8.8, Figura 8.9 e Figura 8.10 mostram os espectros Raman sem correção da linha de base ao longo do estudo. Em todos os espectros Raman nos espécimes A3, A6 e A21 ocorre uma diminuição significativa da fluorescência, sugerindo a perda da matéria orgânica, tal como observado por Silveira *et al* (Silveira, et al., 2012). Outros estudos prévios obtiveram resultados muito semelhantes aquando o branqueamento dentário realizado *in vitro* (Sa, et al., 2012) (West & Joiner, 2014). A diminuição da fluorescência pode ser explicada pelos radicais livres que oxidam os elementos orgânicos da matriz, presentes entre os cristais de hidroxiapatite. A diminuição da fluorescência pode, ainda, estar relacionada diretamente com a cinética do branqueamento dentário, e consequentemente com o melhoramento da cor do dente; já que as manchas presentes nos dentes são materiais orgânicos (Sa, et al., 2012).

A diferença no posicionamento dos espécimes a cada medição poderá resultar numa alteração dos valores da fluorescência medidos devido à orientação variável dos prismas de esmalte (Silveira, 2015). Contudo, devido à não exclusividade do equipamento foi difícil de assegurar o mesmo posicionamento consecutivamente.

8.6 Variação dos vários constituintes elementares – μ -EDXRF

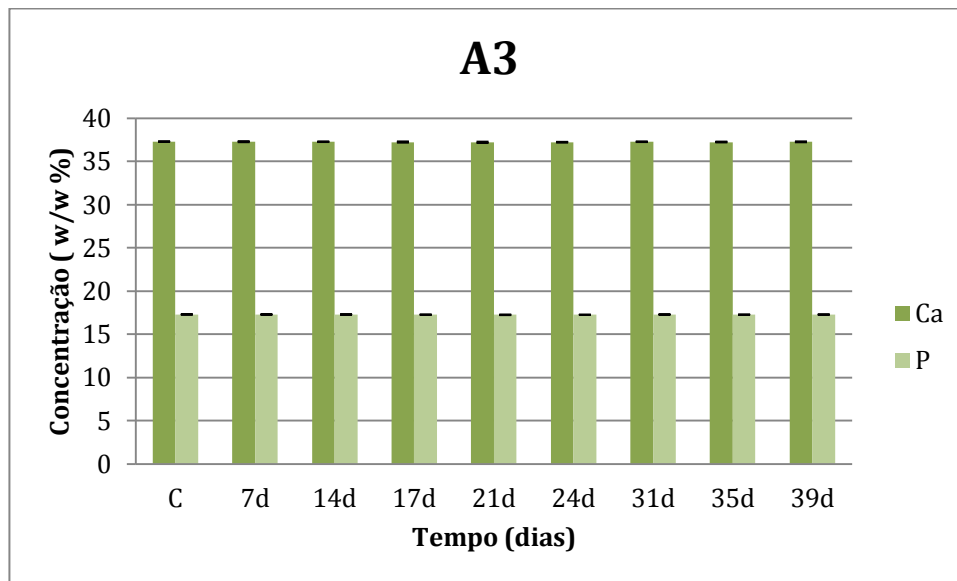


Figura 8.11: Concentração (w/w %) e desvios padrão dos elementos Ca e P ao longo do estudo para o espécime A3 (Protocolo 1-Produto A).

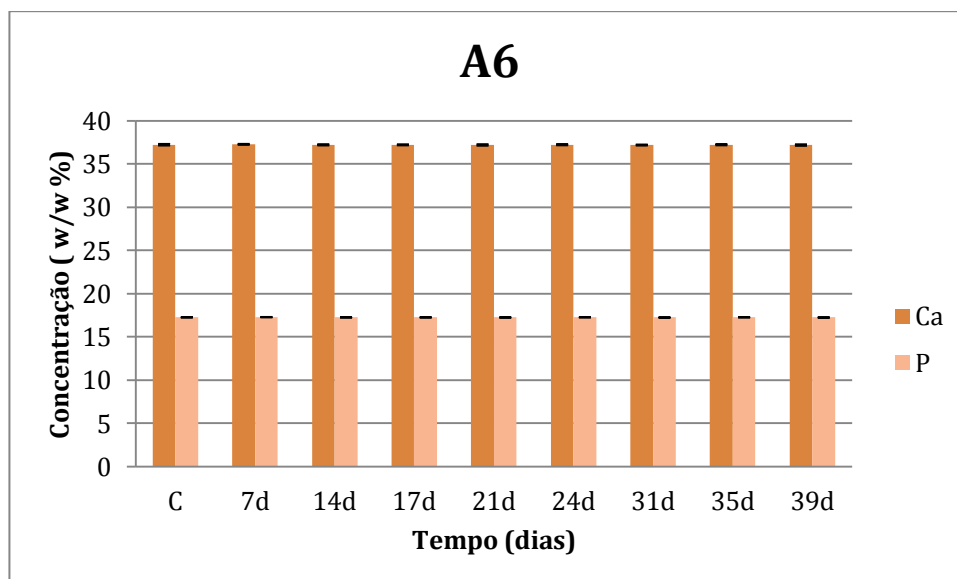


Figura 8.12: Concentração (w/w %) e desvios padrão dos elementos Ca e P ao longo do estudo para o espécime A6 (Protocolo 1-Produto B).

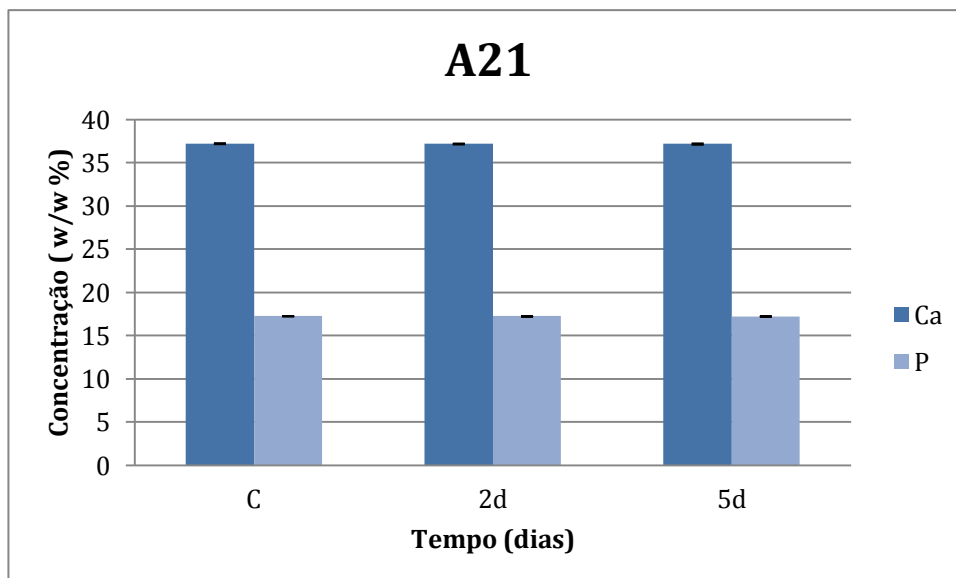


Figura 8.13: Concentração (w/w %) e desvios padrão dos elementos Ca e P ao longo do estudo para o espécime A3 (Protocolo 2-Produto B).

Alterações na razão Ca/P e nas concentrações dos elementos traço indicam alterações nos componentes inorgânicos na matriz de HAp. No que respeita o μ -EDXRF, para além do Ca e do P da matriz de HAp, os seguintes elementos traço foram medidos e quantificados: S, Cl, K, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e o Pb. Neste estudo não foram registados os elementos H, C, O, F, Na, Mg e o Al devido à sensibilidade da tecnologia utilizada, que apenas permite a deteção de elementos com um número atómico superior a 13. Estes elementos são incorporados em pequenas quantidades na matriz de HAp durante a amelogenese, por outro lado a maior percentagem é depositada na superfície do esmalte derivado da dieta alimentar. A título de curiosidade, o S é um marcador de proteoglicanos presente na matriz de tecidos duros. Alterações deste elemento podem indicar alterações na componente orgânica da matriz (Rotstein, et al., 1996).

Não existem alterações significativas na composição da matriz (Ca e P) para a amostra de dentes analisada ao longo do estudo (Figura 8.11, Figura 8.12, e Figura 8.13) contudo, como esperado de estudo anteriores, existe uma grande heterogeneidade na distribuição dos elementos traço no esmalte, enfatizado aquando o uso da micro-análise (Alomary, et al., 2013) (Silveira, et al., 2015) (Silva, et al., 2008) (Rotstein, et al., 1996). Esta heterogeneidade encontra-se ilustrada nas seguintes figuras: Figura 8.14 - Figura 8.22, pelos gráficos *boxplot* obtidos para os referidos elementos para os espécimes A1, A3, A4, A6, A8 e A21, a título de exemplo. Em alguns casos, não se verificou, no entanto, uma uniformidade entre espécimes do mesmo grupo de estudo.

8.6.1 Protocolo 1

- Produto A

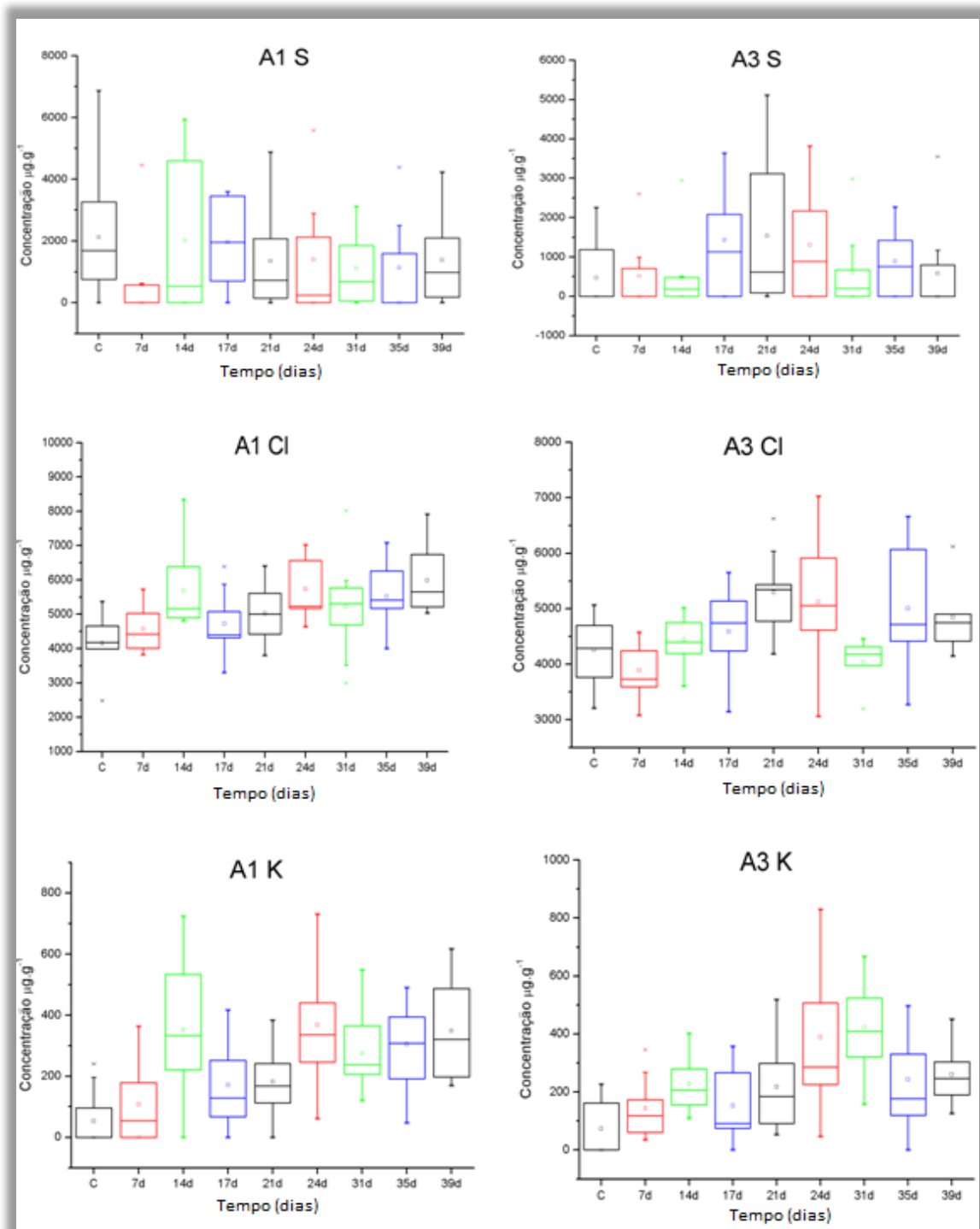


Figura 8.14: Variação da concentração elementar do S, Cl e K nos espécimes A1 e A3 ao longo de 39 dias de estudo.

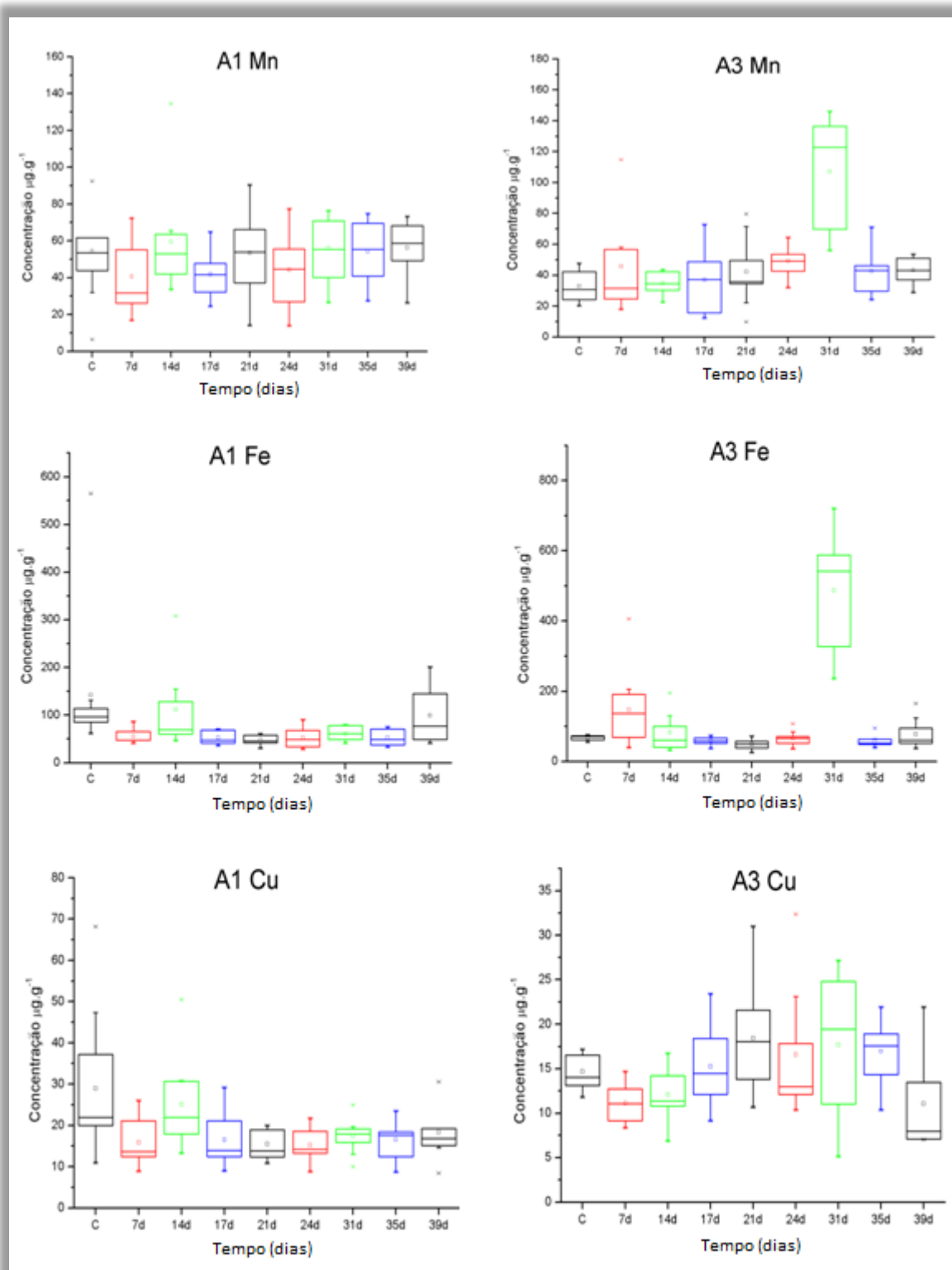


Figura 8.15: Variação da concentração elementar do Mn, Fe e Cu nos espécimes A1 e A3 ao longo de 39 dias de estudo.

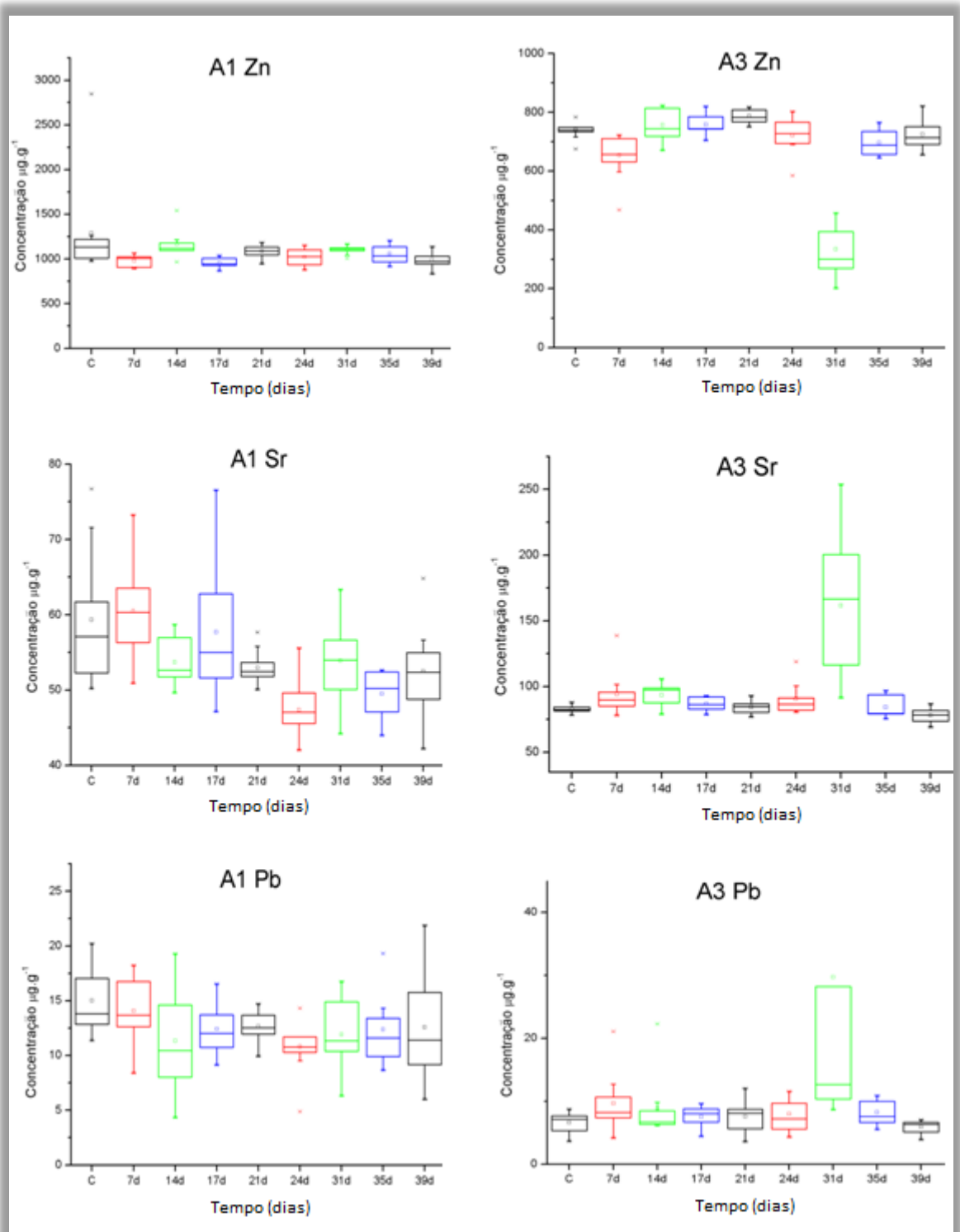


Figura 8.16: Variação da concentração elementar do Zn, Sr e Pb nos espécimes A1 e A3 ao longo de 39 dias de estudo.

- Produto B

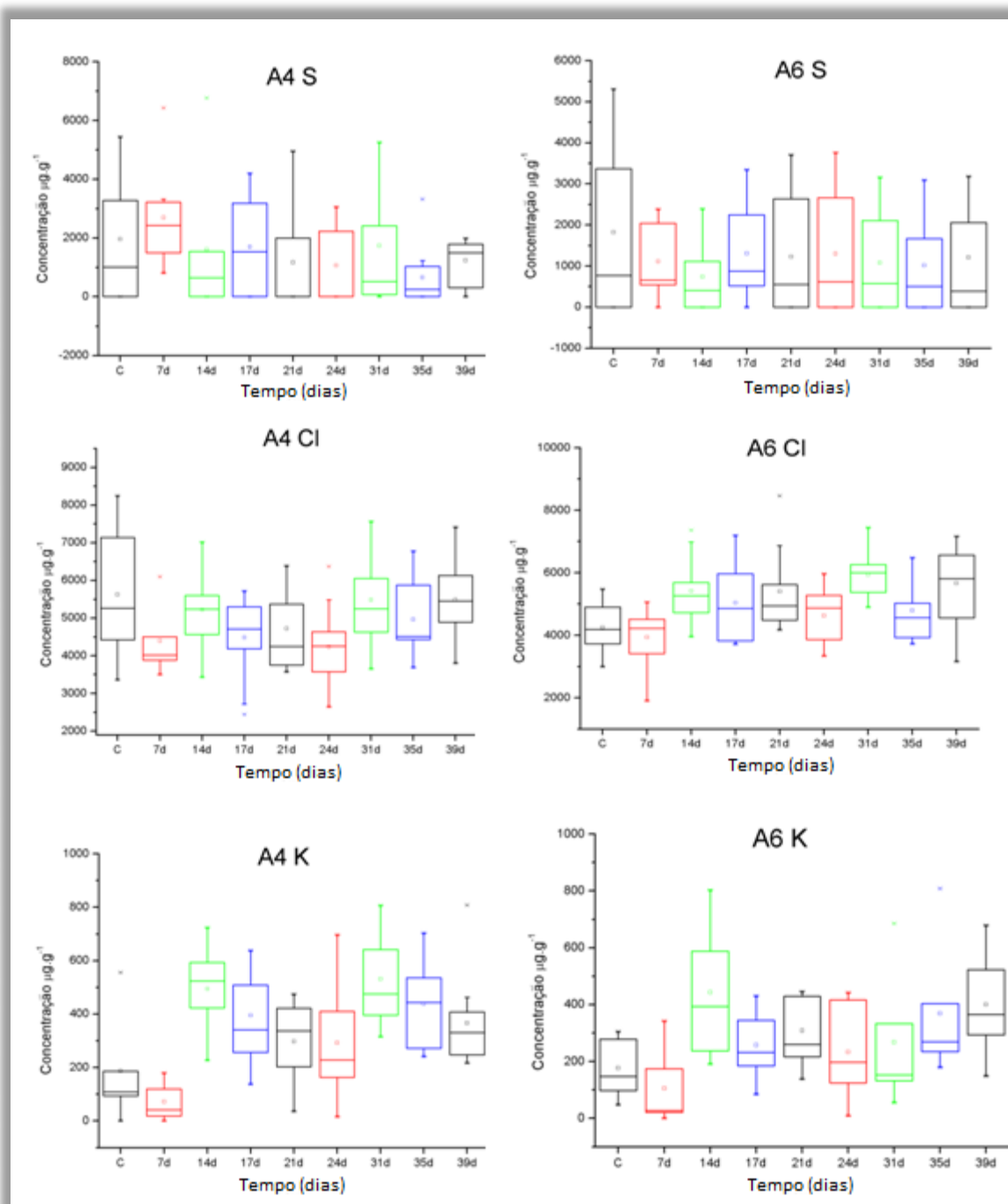


Figura 8.17: Variação da concentração elemental do S, Cl e K nos espécimes A4 e A6 ao longo de 39 dias de estudo.

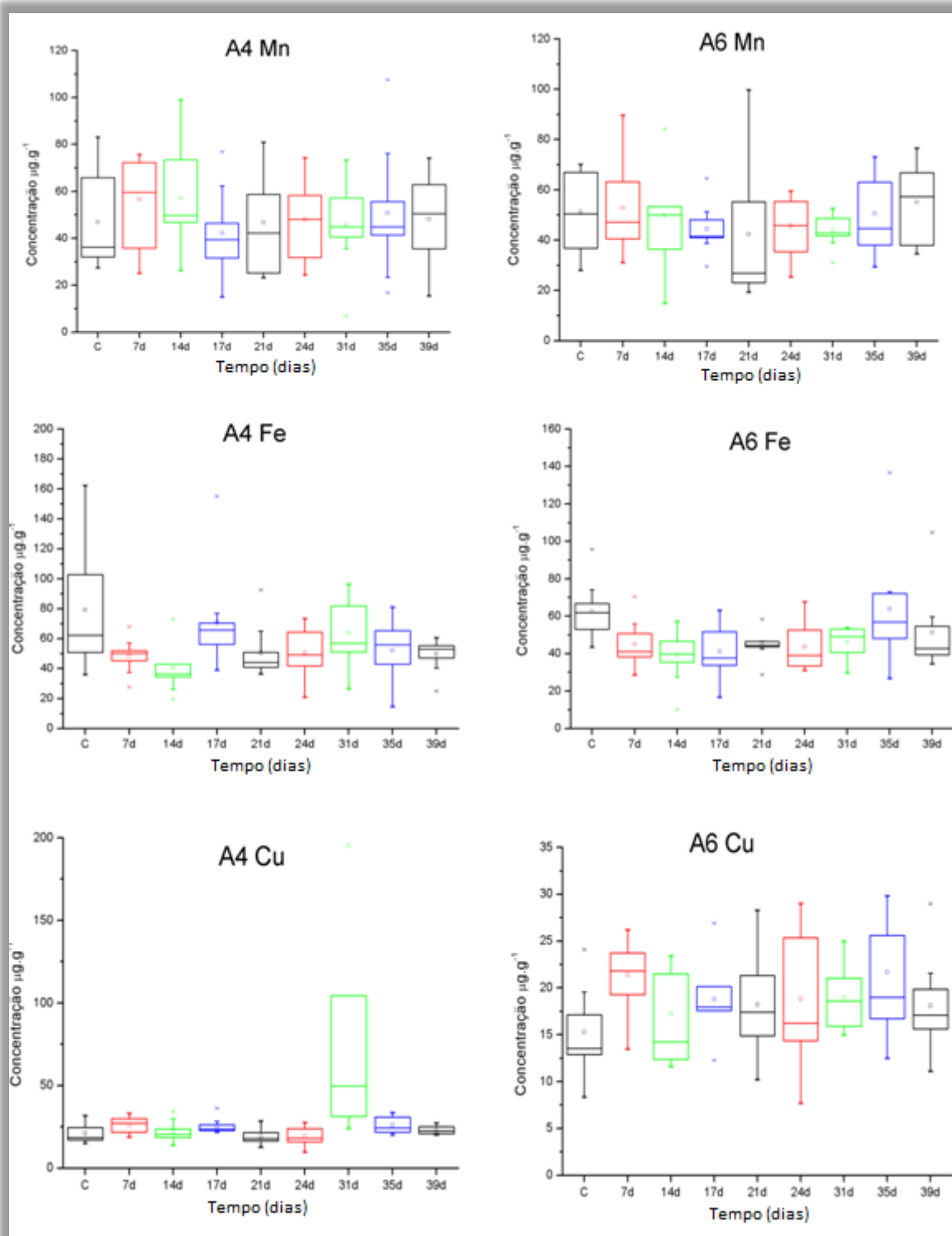


Figura 8.18: Variação da concentração elemental do Mn, Fe e Cu nos espécimes A4 e A6 ao longo de 39 dias de estudo.

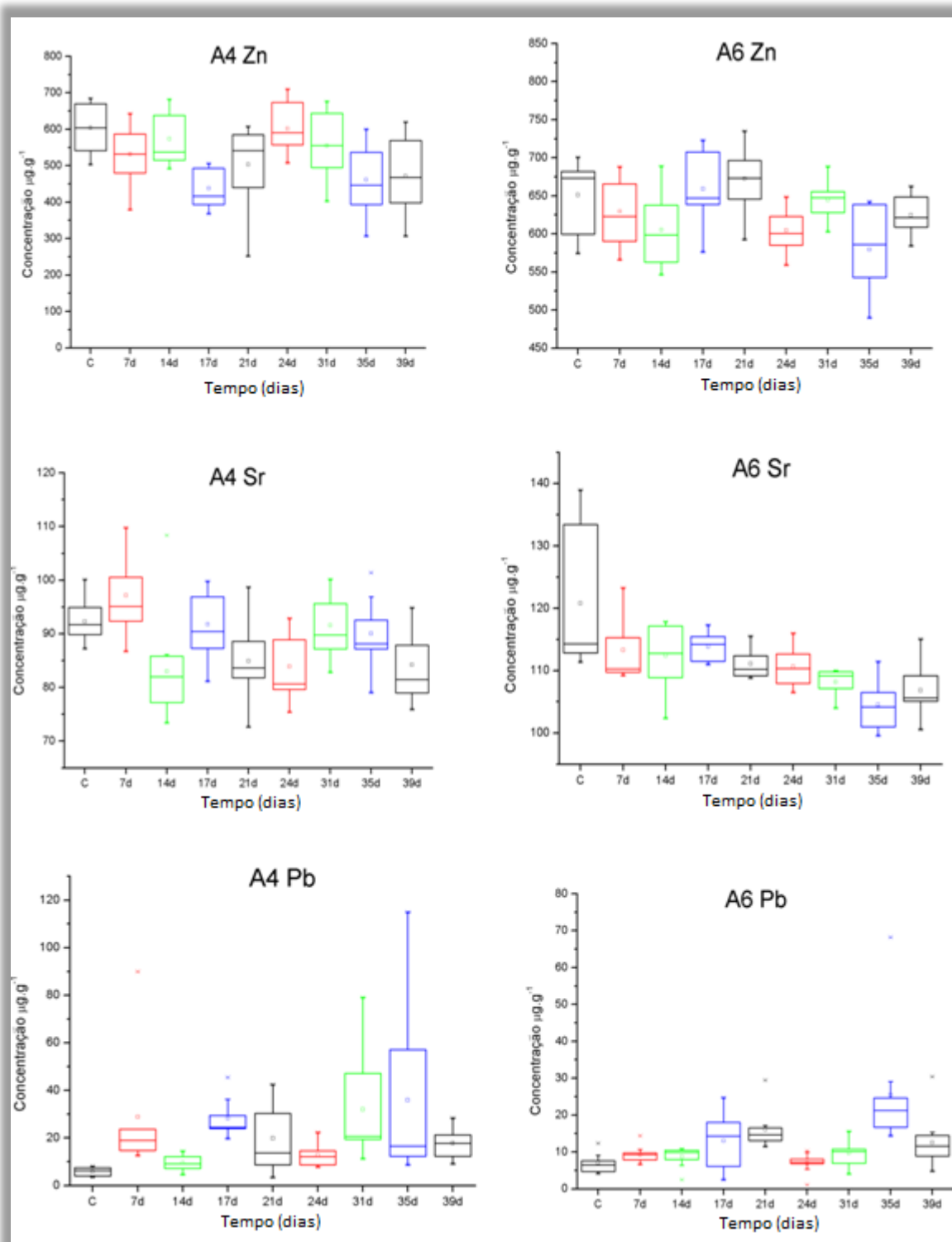


Figura 8.19: Variação da concentração elemental do Zn, Sr e Pb nos espécimes A4 e A6 ao longo de 39 dias de estudo.

8.6.2 Protocolo 2

- Produto B

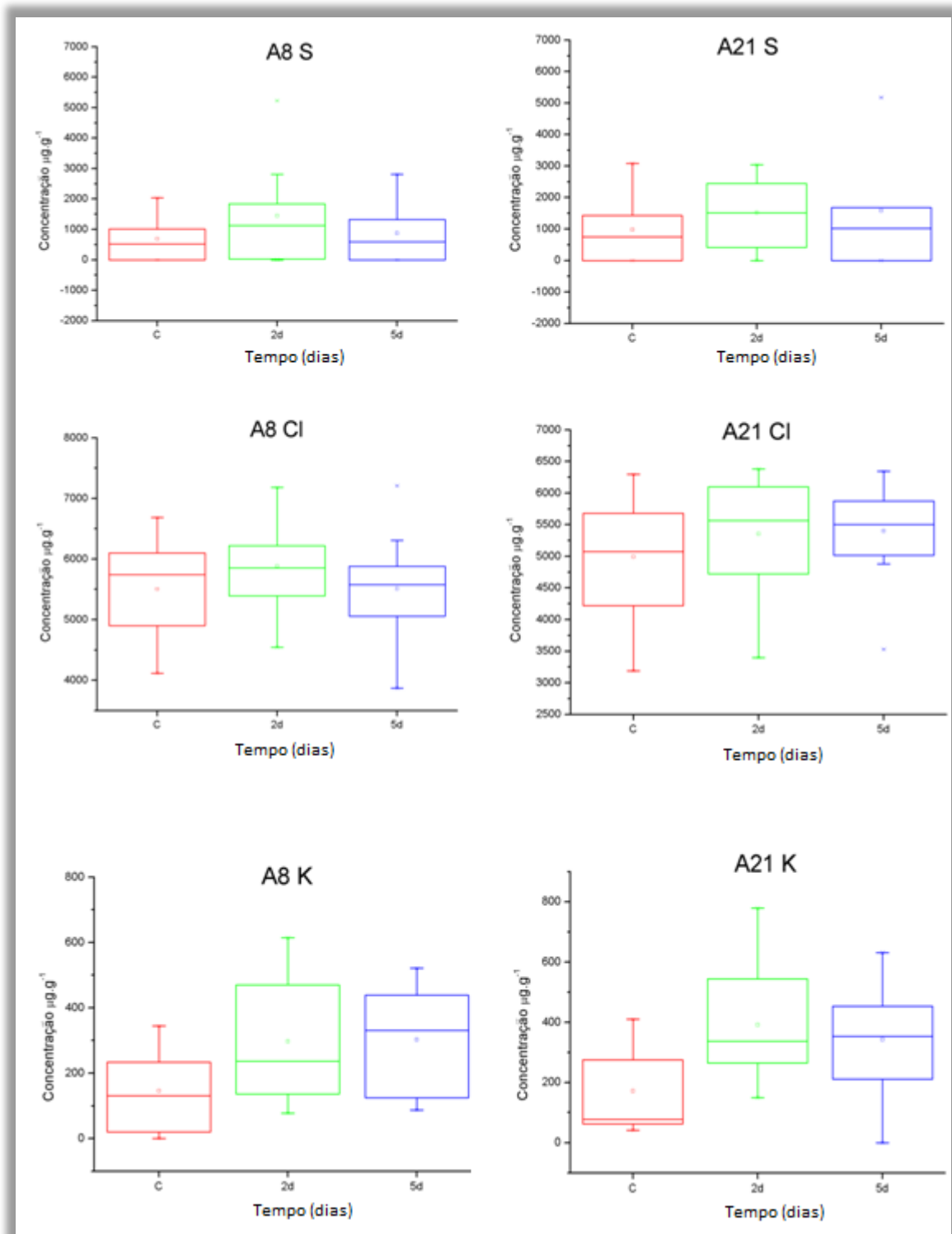


Figura 8.20: Variação da concentração elemental do S, Cl e K nos espécimes A8 e A21 ao longo de 5 dias de estudo.

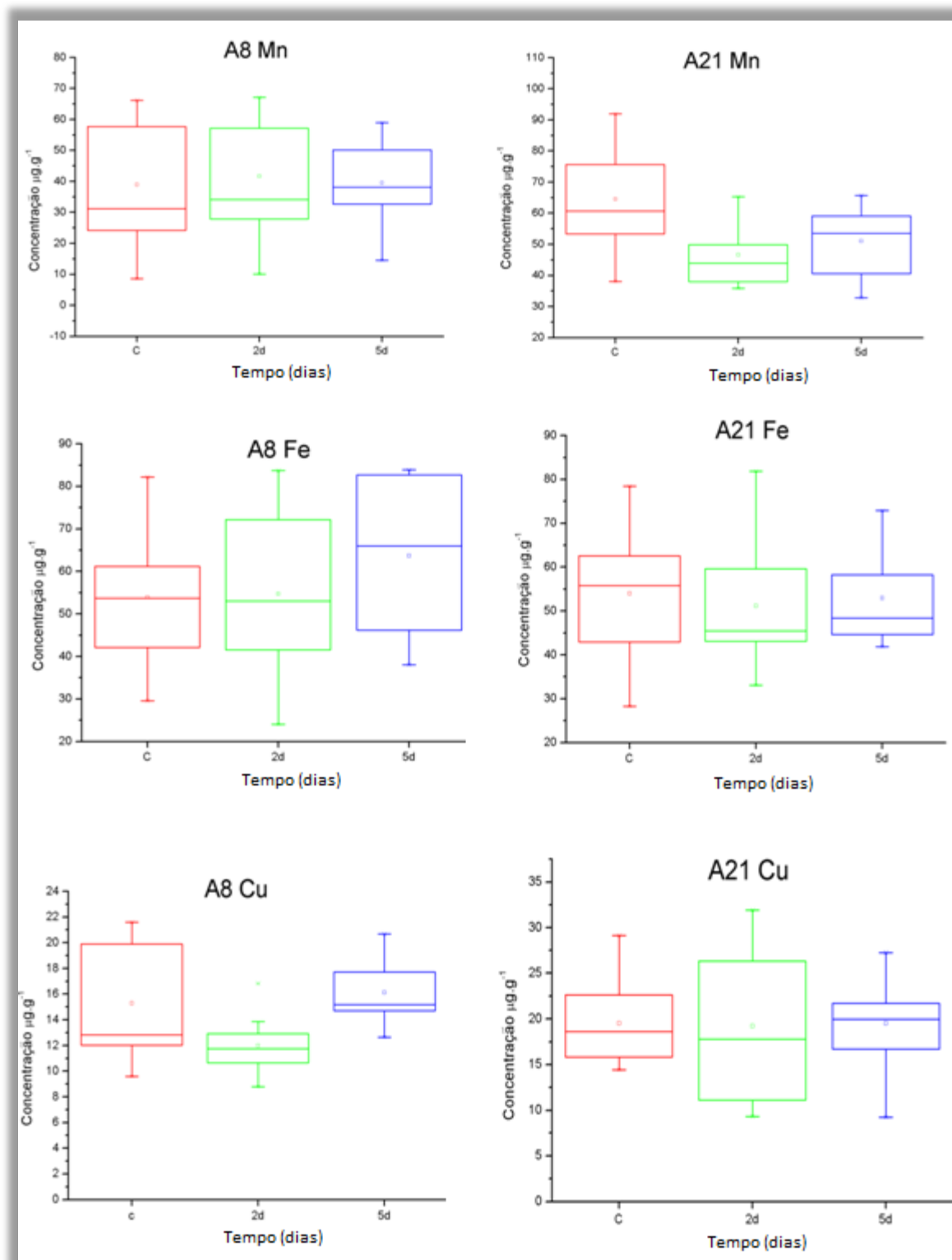


Figura 8.21: Variação da concentração elementar do Mn, Fe e Cu nos espécimes A8 e A21 ao longo de 5 dias de estudo.

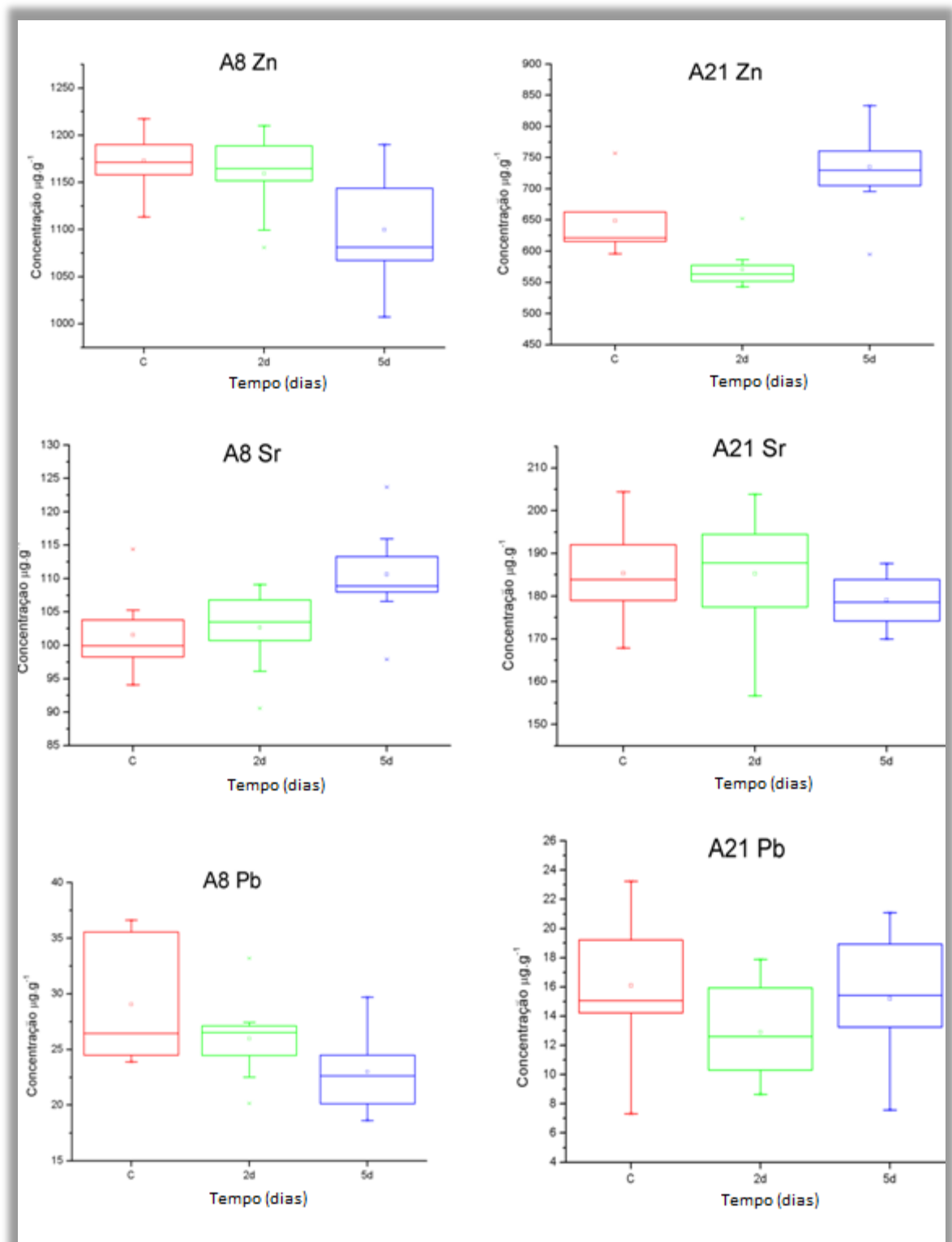


Figura 8.22: Variação da concentração elementar do Zn, Sr e Pb nos espécimes A8 e A21 ao longo de 5 dias de estudo.

Os elementos S, Cl e K mantêm a sua concentração ao longo do estudo para todos os espécimes. Por sua vez, os restantes elementos tendem a ter grandes variações nas concentrações medidas quer no mesmo espécime ao longo do tempo, quer entre espécimes do mesmo protocolo e produto. Para

estes casos, os valores divergentes podem ser explicados pela formação de *clusters* para todos os elementos com a exceção do Ca, P e Sr, sendo os *clusters* mais pronunciados para os elementos Mn, Fe, Cu e Zn (Figura 8.23). Geralmente, a concentração dos elementos traço é maior à superfície do dente do que no restante volume, assim sendo seria expectável que à medida que as camadas superficiais fossem removidas a concentração ao longo do tempo fosse diminuindo progressivamente (Oprea, et al., 2009). A título de estudo, no caso do Fe do espécime A3 (Figura 8.15), existe um aumento aos 31 dias que é contraditório aos resultados obtidos na espectroscopia Raman, onde aos 31 dias é registado um dos maiores GD. Logo, é hipotetizado neste caso que a medição realizada neste momento tenha sido numa zona de *cluster* onde a concentração do elemento é bastante mais elevada. De modo aos resultados obtidos não serem influenciados pelos *clusters* formados que são enfatizados aquando o uso da micro-análise com um *spot* de 25 µm, como no presente estudo, seria importante nos próximos estudos realizarem-se as mesmas medições recorrendo ao uso da micro-análise mas com um *spot* de 100 µm, como realizado por Godinho *et al* (Godinho, et al., 2014). Assim, a área estudada seria maior e os *clusters* não influenciariam tanto os resultados finais.

Existe também alguma diferença entre as concentrações iniciais para cada elemento. Para além da variabilidade biológica dos espécimes testados devido a fatores como o tipo de alimentação, exposição ambiental, etc, pode ser ainda explicado pelo tipo de dente e pela posição que este ocupa na cavidade oral (anterior ou posterior). A concentração de elementos traço tende a diminuir dos incisivos para os molares e da arcada maxilar para a arcada mandibular, sendo que a maior heterogeneidade de concentrações é observada na primeira arcada. Este facto pode ser explicado pela exposição ao meio externo das faces vestibulares dos dentes e ainda pelas faces interproximais (mais planas), de alguns dentes posteriores, utilizadas estarem mais resguardadas dessa exposição (Alomary, et al., 2013).

À vista destes resultados, não foram registadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no conteúdo dos elementos traço estudados após os protocolos de abuso de branqueamento dentário.

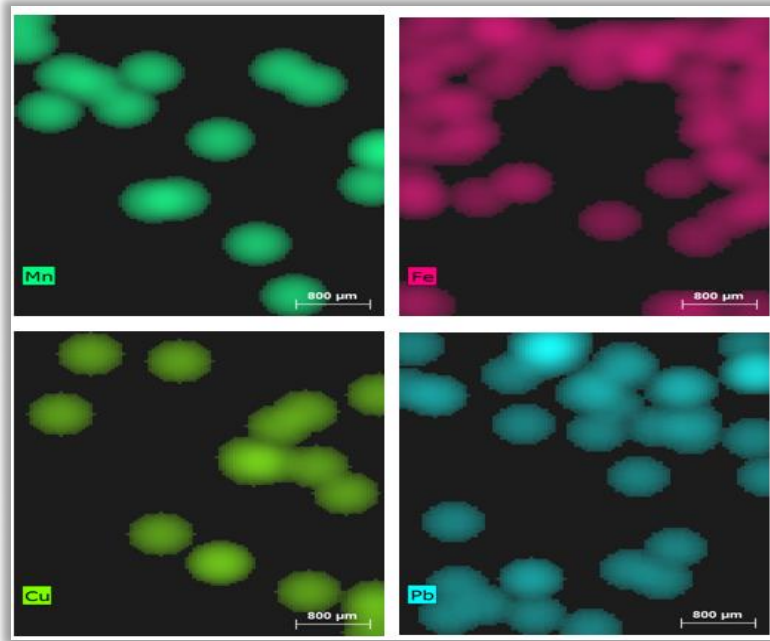


Figura 8.23: Mapeamento da superfície do dente exibindo a formação de *clusters* em vários elementos.

As diferenças de valores quer nos valores obtidos nas concentrações dos elementos traço quer na razão Ca/P podem ser justificadas pela limitação relacionada com a geometria dos dentes. Aquando uma análise a nível micrométrico, a convexidade associada a todos os dentes influencia o volume de espécime analisado, podendo na maior parte das vezes o volume do espécime medido não corresponder ao ponto focal na sua totalidade e deste modo em vez de se medir somente esmalte, medir-se-á esmalte e ar (Figura 8.24). Esta dificuldade é ainda mais relevante quando se utilizam métodos quantitativos como o *compare mode* do WinAXIL onde os espectros obtidos são comparados com espectros de pastilhas (planas) de amostras padrão.

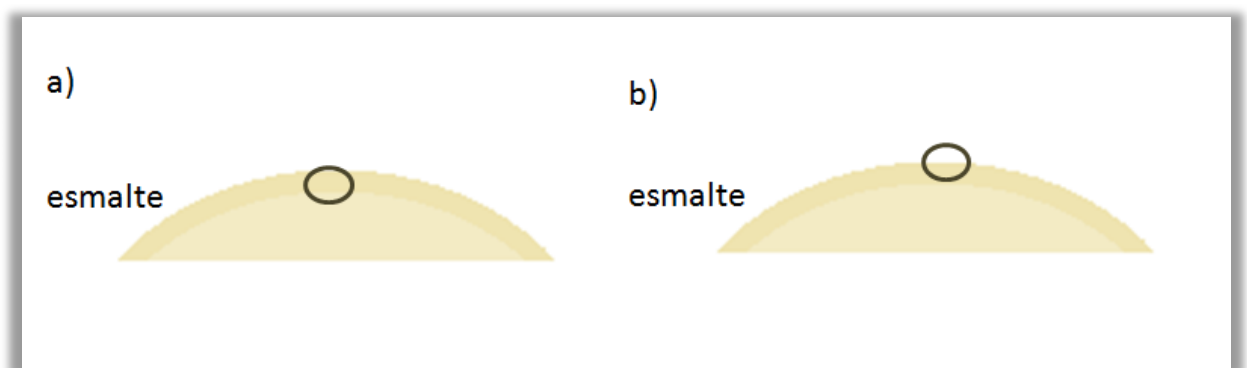


Figura 8.10: a) total do ponto focal corresponde somente a esmalte, b) ponto focal corresponde a uma porção do esmalte e a restante ar.

Quando se comparam os resultados obtidos entre as duas técnicas, a diferença significativa do volume analisado deve ser tida em consideração. O volume investigado no μ -EDXRF varia de acordo com os elementos analisados, podendo variar desde 10 μm para o P até 200 μm para o Pb, devido às diferentes energias características, e por conseguinte ocorrendo diferentes atenuações na matriz do próprio dente. Por sua vez, o volume analisado na espectroscopia confocal Raman varia tipicamente entre 1-2 μm (Gauglitz & Moore, 2014). Portanto, os resultados obtidos poderão indicar alterações muito superficiais na matriz de esmalte, aquando da análise Raman, mas não mensuráveis no que respeita a análise em EDXRF.

Os resultados deste estudo sugerem que a desmineralização causada pelos produtos é superior à capacidade remineralizante da saliva, afetando a integridade do esmalte aprismático. Contudo, não se pode afirmar que as alterações micromorfológicas da superfície do esmalte sejam irreversíveis pois não se realizaram medições para além do último dia de aplicação do produto.

Todas estas variáveis sugerem a necessidade de se realizarem estudos que examinem as propriedades e os comportamentos dos produtos de branqueamento, antes de se inferir quaisquer alterações a nível biológico.

8.7 Produtos Over-The Counter estudados – Concentração do agente branqueador

Os produtos *Over-The-Counter* (OTC) têm vindo a ter grande adesão nos últimos anos devido, principalmente, ao baixo custo associado e facilidade de aquisição. Por forma a aumentar a rapidez dos tratamentos muitos dos fabricantes têm vindo a aumentar a concentração do agente ativo (Demarco, et al., 2008). Embora estes fatores sejam habitualmente determinantes para o paciente aquando da compra do produto, ao contrário das restantes técnicas de branqueamento dentário, nos produtos OTC não existe nenhuma supervisão médica para assegurar que estes produtos têm uma concentração e composição adequadas para utilização clínica, garantindo a segurança do paciente (Silveira, 2015).

Ambos os produtos utilizados no estudo têm concentrações do agente ativo bastante superiores aos valores considerados seguros pela Comissão Europeia (CE). De acordo com o decreto de lei português 142/2005 que segue as diretrizes dos decretos da CE, os produtos OTC podem conter no máximo uma concentração de PH de 0,1%. Ambos os produtos comprados foram adquiridos em dois *sites* acessíveis a qualquer consumidor (Figura 8.11), não havendo qualquer tipo de restrição durante a compra, apesar das concentrações superarem em larga escala as consideradas seguras e legais para o uso sem a supervisão médica necessária. A variabilidade de resultados obtidos na concentração do PH, reforça a necessidade de uma correta avaliação de qualquer produto antes da realização de um estudo desta natureza.

O INFARMED, a Inspeção Geral das Actividades em Saúde (IGAS) e a Ordem dos Médicos Dentistas têm levantado preocupações em relação à venda indevida destes produtos e para as consequências para a saúde dos pacientes. Antes do uso de qualquer produto de branqueamento deve ser feita uma avaliação prévia do estado da cavidade oral por parte do MD. Sem um conjunto de procedimentos feitos *a priori* podem advir riscos para a saúde (OMD, 2013).

Price *et al* (Price, et al., 2000), relata grandes diferenças entre as concentrações e o pH entre 26 produtos disponíveis comercialmente. Estas diferenças nas formulações galénicas podem ser um fator para os diferentes efeitos dos produtos reportados para o esmalte. Assim, o impacto de um qualquer novo produto de branqueamento dentário na integridade do dente, deve ser totalmente caracterizada antes do lançamento e comercialização, com especial ênfase para os produtos OTC.

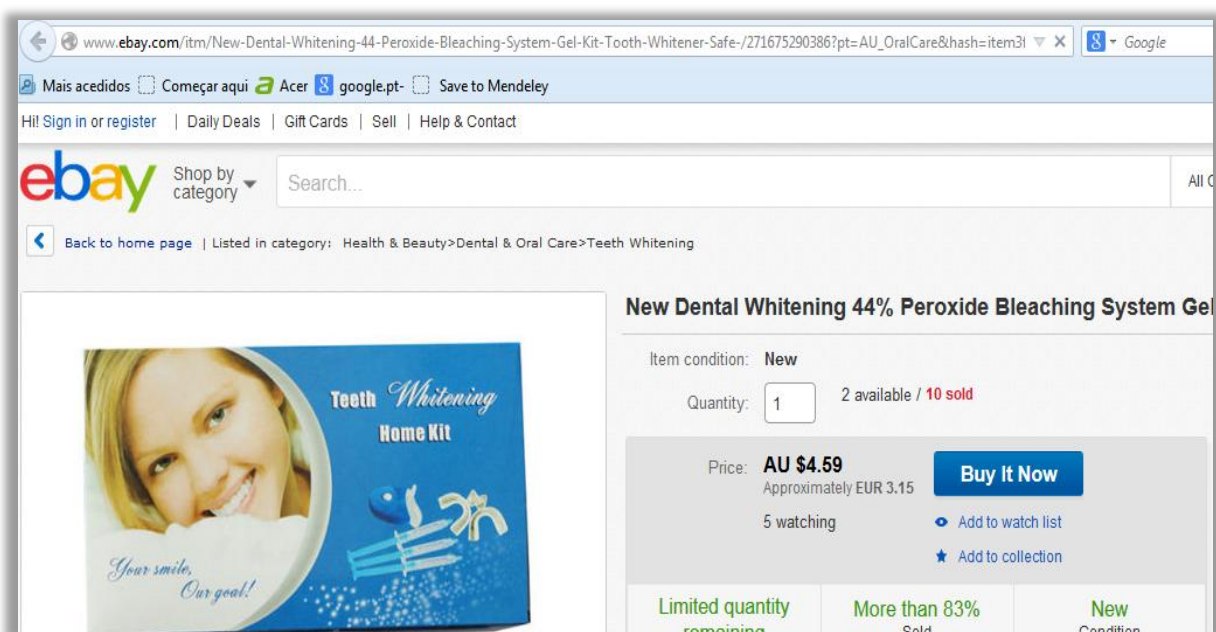


Figura 8.11: Página de internet disponível do Ebay® para a compra do produto de branqueamento Teeth Whitening Home Kit. A compra é acessível a qualquer pessoa a um baixo custo (3.15 €).

9. Conclusão

Com a realização deste trabalho podem retirar-se as seguintes conclusões:

- As concentrações observadas para ambos os produtos de branqueamento são diferentes das indicadas pelo fabricante.
- As concentrações registadas são muito superiores às legalmente permitidas e consideradas seguras pela Comissão Europeia e pela legislação portuguesa.
- Não existe restrição na compra destes produtos *Over-The-Counter* (OTC) com elevadas concentrações.
- A utilização de produtos de branqueamento dentário com elevadas concentrações e pH ácido induz alterações na superfície do esmalte.
- Após a aplicação dos dois produtos de branqueamento dentário existe uma diminuição bastante significativa no pico do fosfato em todos os espécimes, indicando uma desmineralização muito superficial do esmalte (esmalte aprismático).
- A desmineralização causada pelos produtos é superior à capacidade remineralizante da saliva, afetando a integridade do esmalte aprismático.
- Existe uma diminuição significativa da fluorescência após a realização dos dois protocolos de branqueamento, indicando perda do conteúdo orgânico do esmalte.
- Observou-se a existência dos elementos major (Ca e P) e dos elementos traço (S, Cl, K, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e o Pb) em todos os espécimes. O conteúdo elementar após a aplicação dos produtos de branqueamento testados não foi alterado de forma significativa.
- Os resultados obtidos são sugestivos de alterações muito superficiais na matriz de esmalte, aquando da análise Raman, mas não mensuráveis no que respeita a análise em EDXRF.
- O uso de produtos OTC poderá ocasionar riscos na cavidade oral do paciente, questionando-se a segurança do paciente aquando o tratamento.

10. Trabalho Futuro

Os resultados obtidos neste estudo são do tipo *in vitro*, e apesar de serem estatisticamente significativos, são somente inferidas as consequências possíveis *in vivo*. Inclusive, apesar de ter sido utilizada saliva humana, dado que esta não foi renovada diariamente levantam-se a questão se esta alteração minimizaria o grau de desmineralização. A superfície do dente exhibe uma dinâmica de contínua permuta, em ambas as direções, entre os iões da película adquirida/biofilme e os cristais de hidroxiapatite, com fim a manter um equilíbrio mineral adequado. Este processo fisiológico oral dificulta a interpretação da relevância clínica das medições laboratoriais relativas às alterações da micromorfologia, da microdureza e da microrugosidade (Kwon, et al., 2014). Seria importante estudar *in vitro* o efeito de remineralização da saliva humana, conservando um grupo de amostras em saliva e o outro grupo em água destilada. Aplicando o mesmo protocolo, ao introduzir-se esta intervenção, poder-se-ia observar quais os resultados devido ao isolamento deste fluido e aferir a totalidade do efeito protetor da saliva humana.

Torna-se necessária a realização de mais estudos sobre as alterações elementares do esmalte que investiguem outros tipos de produtos *Over-The-Counter* (OTC), quer a nível da concentração quer no modo de aplicação, utilizando um maior número de espécimes e realizando períodos de *follow-up* quando finalizado o tratamento. Tal como estudado por Silveira (Silveira, 2015), torna-se crucial estudar a cinética de libertação do Peróxido de Hidrogénio (PH) para todos os produtos testados de forma a averiguar a adequação dos tempos de aplicação indicados. Outros pontos que foram estudados neste trabalho e que se tornam importantes de realizar é a determinação da concentração do PH dos produtos bem como o seu pH. Seria uma mais valia realizar protocolos comparando produtos com a mesma concentração e pH diferentes (ácido *versus* neutro), ou para o mesmo mantendo pH dos produtos averiguar as alterações ocorridas perante diferentes concentrações.

Seria necessário, conjugar a técnica Microscopia Electrónica de Varrimento ou técnica Microscopia de Força Atómica com as técnicas utilizadas neste estudo, para em simultâneo verificar-se as possíveis alterações na micromorfologia superficial do esmalte. As medições deviam ser prolongadas após o término da aplicação dos produtos para se aferir se as alterações observadas seriam irreversíveis.

Numa fase futura, devem ser realizados estudo *in vivo*, onde sejam estudados os protocolos já aferidos *in vitro*, para confrontar as implicações destes produtos no esmalte dentário dos pacientes.

11. Publicações

J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira, S. Pessanha. (2015), "Study of the effects of unsupervised OTC whitening products in dental enamel using μ -Raman and μ -EDXRF spectroscopies" *Journal of Raman Spectroscopy*

J. Castro, J. Godinho, A. Mata, M. L. Carvalho, J. M. Silveira, S. Pessanha. (2015), "Study of the effects of unsupervised OTC whitening products in dental enamel using μ -Raman and μ -EDXRF spectroscopies". Poster apresentado na conferência internacional "Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX", Figueira da Foz, 30 agosto a 3 Setembro de 2015 <http://csi2015.fis.uc.pt/>

J. Castro, J. Godinho, A. Mata, M. L. Carvalho, J. M. Silveira, S. Pessanha "Micro analytical techniques to study the effects of abusive use of whitening products in dental enamel". Poster apresentado na conferência internacional "Iberian Joint Meeting 2015" Aveiro, 6 a 9 Setembro 2015 <http://iber2015.web.ua.pt/>

J. Castro, J. Godinho, A. Mata, M. L. Carvalho, J. M. Silveira, S. Pessanha, "Micro analytical techniques to study the effects of abusive use of whitening products in dental enamel". Abstract na conferência internacional "Iberian Joint Meeting 2015" Aveiro, 6 a 9 Setembro 2015 disponível em http://iber2015.web.ua.pt/Program/Book_light.pdf

12. Referências Bibliográficas

Alcantara, P., 2002. Espectroscopia Molecular. In: s.l.:Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física.

Alomary, A., Momani, I., Obeidat, S. & Massadeh, A., 2013. Levels of lead, cadmium, copper, iron, and zinc in deciduous teeth of children living in Irbid, Jordan by ICP-OES: some factors affecting their concentrations. *Environ Monit Assess*, Volume 185, pp. 3283-3295.

Aminzadeth, A., Shahabi, S. & Walsh, L., 1999. Raman spectroscopic studies of CO₂ laser-irradiated human dental enamel. *Spectrochimica Acta Part A*, Volume 55, pp. 1303-1308.

Araújo, A. M., Moura Neto, F. N. & Sampaio, T. J. S., 2013. Avaliação da eficácia do peróxido de carbamida a 10% manipulado para o clareamento dental caseiro. Issue R. Interd. v.6, n.3, p.1-9, jul.ago.set. .

Arnold, W. & Gaengler, P., 2007. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Annals of Anatomy*, Volume 189, pp. 183-190.

Attin, T., Schmidlin, P., Wegehaupt, F. & Wiegand, A., 2009. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: A review. *Dental Materials*, Volume 25, pp. 143-157.

Avery, J., 2000. Essentials of Oral Histology and Embryology. In: 2ª Edição ed. s.l.:Elsevier Mosby.

Awonusi, A. & Morris, M., 2007. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. *Calcif Tissue Int*, Volume 81, pp. 46-52.

Benício, F., Pacheco, M. & Júnior, L., s.d. *Monitoramento temporal da reação de oxidação do Peróxido de Hidrogênio a 35% de forma não invasiva por meio da Espectroscopia Raman*. s.l., s.n.

Berger, S. et al., 2014. Effects of various hydrogen peroxide bleaching concentrations and number of applications on enamel. *Braz J Oral Sc*, Volume 13, pp. 22-27.

Berkovitz, B., Holland, G. & Moxham, B., 1992. In: *A Colour Atlas and Textbook of Oral Anatomy, Histology and Embryology*. 2ª edição ed. USA: Wolfe Publishing Ltd, pp. 112-127.

Bitar, R., 2009. Espectroscopia Micro-Raman aplicada para o diagnóstico do melanoma cutâneo. Tese de doutoramento. In: São Paulo, Brasil: Universidade Federal de São Paulo, pp. 4-5.

Bruker, 2015. *Bruker*. [Online] Available at: <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details.html>

[Acedido em 11 Agosto 2015].

Collins, L., Maggio, B., Gallagher, A. & York, M., 2004. Safety evaluation of a novel whitening gel, containing 6% hydrogen peroxide and a commercially available whitening gel containing 18% carbamide peroxide in an exaggerated use clinical study. *Journal of Dentistry*, Volume 32, pp. 47-50.

Demarco, F., Meireles, S. & Masotti, A., 2008. *Over-the-counter whitening agents*. Brazil, Esthetic Dentistry.

Desseyn, R. & Alsenoy, B., 1999. Vibrational Analysis of Urea. *J. Phys. Chem A*, Volume 103, NO. 24.

Farias, D., 2014. Avaliação de sistemas adesivos universais na dentina sob testes de microtração e espectroscopia micro-Raman. Pós-Graduação. In: Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.

FCT/UNL, 2015. *FCT/UNL*. [Online] Available at: <http://www.fct.unl.pt/candidato/licenciaturas-e-mestrados-integrados/mestradointegrado>[Acedido em 21 Janeiro 2015].

Fernandes, N., 2013. *Branqueamento Dentário: Princípios activos e perspectiva farmacológica*. Tese de Licenciatura. Porto: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

Ferra, J., 2010. *Branqueamento de dentes vitais em consultório*. In: Porto: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

Ferreira, S., 2009A. *Perspectiva dos Médicos Dentistas acerca da metodologia clínica aplicada nos tratamentos de branqueamento dentário*. Licenciatura em Medicina Dentária. Porto: Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde.

Ferreira, S., 2009B. *Eficácia do branqueamento dentário no consultório realizado com peróxido de hidrogénio a 38% com e sem activação de luz*, Tese de Mestrado. Lisboa, Portugal: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.

Gauglitz, G. & Moore, D., 2014. Handbook of spectroscopy. In: Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co., pp. 35;49;120;1813-1830.

Gerlach, P., 2008. *iptv usp*. [Online] Available at: <http://iptv.usp.br/portal/video.action?idItem=842> [Acedido em 19 Fevereiro 2015].

Ghalili, M., Khawaled, K., Rozen, D. & Afsahi, V., 2014. Clinical study of the safety and effectiveness of a novel over-the-counter bleaching tray system. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, Volume 6, pp. 15-19.

Godinho, J., 2013. *Espetroscopia de Raios X na Detecção de Alterações Elementares no Esmalte Dentário após Branqueamento, Tese de Mestrado*. s.l.:Universidade de Lisboa.

Godinho, J. et al., 2014. Effect of bleaching gel in Ca, P and Zn content in tooth enamel evaluated by micro-EDXRF. *Elsevier*, Volume 337, pp. 78-82.

Grieken, R. E. & Markowicz, A. A., 2002. *Hanbook of X-Ray Spectroscopy*. Second Edition ed. New York: Marcel Dekker,.

Holtom, D. & Fisher, E., 1999. *Enjoy Writing Your Science Thesis or Dissertation!: A step by step guide to planning and writing dissertations and theses for undergraduate and graduate science students*. London: Imperial College Press.

Horn, B., Bittercourt, B., Gomes, O. & Farhat, P., 2014. Clinical Evaluation of the Whitening Effect of Over-the-Counter Dentifrices on Vital Teeth. *Brazilian Dental Journal*, 25 (3)(0103-6440), pp. 203-206.

INFARMED, G. J. e. C., 2005. *Decreto de Lei nº 142/2005*, s.l.: INFARMED, Gabinete Jurídico e Contencioso..

Joiner, A., 2006. The bleaching of teeth: A review of the literature. *Jornal of Dentistry*, Volume 34, pp. 412-419.

Júnior, J., 2008. *Espetroscopia Raman dos aminoácidos L-metionina e DL-alanina e de Nanotubos de carbono; Tese de Doutorado*. Fortaleza: Centro de Ciências, Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará.

Kwon, S., Kurti, S., Oyoyo, U. & Li, y., 2014. Effect of various tooth whitening modalities on microhardness, surface roughness and surface morphology of the enamel. *Odontology*, Volume 10.

Leite, J., 2008. Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património. In: Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Miguel, L., 2009. Questões de segurança e efeitos adversos no branqueamento de dentes vitais. Mestrado Integrado em Medicina Dentária. In: Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.

Moreno, A., 2013. *Non- destructive characterization of artworks in paper support using spectroscopic techniques; Tese de Doutoramento*. Lisboa: Departamento de Física, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Mota, L., 2011. *Branqueamento de dentes vitais: Perspectiva quanto à eficiência química, eficácia clínica e segurança do paciente*. Porto: Faculdade das Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

Nishio, C., 2008. Formação do esmalte dentário, novas descobertas, novos horizontes. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*, Jul/Ago, Volume 13.n 4, pp. 17-18.

Odontologia, 2001. *Odontologia Online*. [Online] Available at: <http://www.odontologia-online.com/publicaciones/histologia/2-descripcion-de-mutaciones-en-amgx-relacionadas-con-amelogenesis-imperfecta.html> [Acedido em 28 Agosto 2015].

Oldak, P. & Gerlach, P., 2012. *iptv usp*. [Online] Available at: <http://iptv.usp.br/portal/video.action?idItem=902> [Acedido em 23 Fevereiro 2015].

OMD, 2013. *omd*. [Online] Available at: <http://www.omd.pt/noticias/2013/03/branqueamento-entrevista-bastonario> [Acedido em 27 Agosto 2015].

Oprea, C., Szalanski, P., Gustova, M. & Buzguta, V., 2009. XRF detection limits for dental tissues of human teeth. *Vacuum*, Volume 83, pp. 166-168.

Ozdemir, Y., Bayindir, Y., Durna, D. & Durak, R., 2010. Quantitative EDXRF analysis of Ca, K, Mn and Na in normal and pathological adult-human teeth. *Journal of X-Ray Science and Technology*, Volume 18, pp. 193-199.

Paula, S. et al., 2010. FT-Raman and energy dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometric Analyses of enamel submitted to 38% hydrogen peroxide bleaching, an acidic beverage and simulated brushing. *Photomedicine and Laser Surgery*, Volume 28, pp. 391-396.

Pediatrics, A. A. o., 2011. *Oral Health*. [Online] Available at: <http://www.aap.org/oralhealth/eNews.html> [Acedido em 29 June 2015].

Penel, G., Leroy, G., Rey, C. & Bres, E., 1998. MicroRaman Spectral Study of the PO₄ and CO₃ Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites. *Calcif Tissue Int*, Volume 63, p. 475–481.

Pereira, M., 2004. Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂ preparadas pelo método de Sol-Gel. Tese de Doutoramento em Ciências – Área de conhecimento em Física. In: Braga: Universidade do Minho.

- Picosse, M., 1971. Anatomia Dentária. In: São Paulo, Brasil: s.n., pp. 17-20.
- Pinto, M., Godoy, C., Bortoletto, C. & Oliven, S., 2014. Tooth whitening with hydrogen peroxide in adolescents: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, Volume 15:395.
- Poorani, S. et al., 2010. Effect of 10% sodium ascorbate on the calcium: Phosphorus ratio of enamel bleached with 35% hydrogen peroxide: An in vitro quantitative energy-dispersive X-ray analysis. *Contemp Clin Dent*, 1(4), pp. 223-226.
- Price, R., Sedarous, M. & Hiltz, G., 2000. The pH of Tooth-Whitening Products. *J Can Dent Assoc*, Volume 66, pp. 421-426.
- Ribeiro, M., Sathaiah, S. & Pacheco, M., 2001. *Diagnóstico não invasivo de tecidos dentários através da utilização de espectroscopia Raman*, s.l.: 950-7132-57-5.
- Rotstein, I. D. E., Goldman, A. & Heling, I., 1996. Histochemical Analysis of Dental Hard Tissues following Bleaching. *Journal of Endodontics*, 22(1), pp. 23-26.
- Rovetta, S., Santo, A. & Miyakawa, W., s.d. *Espectroscopia Raman de dentes Bovinos em pó, parcialmente desnaturados*. s.l., s.n.
- Salehi, S., Wood, D. & Hatton, P., 2007. The effect of 24 h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness. *Journal Of Dentistry*, Volume 35, pp. 845-850.
- Santini, A. & Miletic, V., 2008. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *European Journal of Oral Science*, Volume 116, pp. 177-183.
- Santini, A., Pulham, C., Rajab, A. & Ibbetson, R., 2008. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy. *Dental Traumatology*, Volume 24, pp. 220-223.
- Santos, E., Souza, A. & Matos, R., 2013. Fluorescencespectrometry of X-Ray in the Determination of Chemical Species. *Enciclipédia Biosfera*, Issue v.9, n.17; p. 2013413.
- Sa, Y. et al., 2012. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: An in situ vs.in vitro study. *Journal of Dentistry*, Volume 40, pp. 26-34.
- Sciences, C. o. A. a. S. U. o. I., 2015. *College of Arts and Sciences*. [Online] Available at: http://www.albany.edu/x-ray-optics/polycapillary_optics.htm [Acedido em 10 Agosto 2015].

Seeley, R. R., Stephens, T. D. & Tate, P., 2003. Anatomia e Fisiologia. In: 6 ed. s.l.:McGraw-Hill Higher Education, pp. 881-883.

Serra, O. & Ferreira, F., 1981. Anatomia Dental. In: 3ª edição ed. s.l.:Artes Médicas, pp. 4-15.

Silva, E., Milic, A. & Heyd, D., 2008. The use of teeth as the site for the in vivo or ex vivo quantification of skeletal strontium by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry: A feasibility study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Volume 23, pp. 527-534.

Silveira, J., 2009. Efeitos da alta e baixa concentração de peróxido de hidrogénio no esmalte. Mestrado Integrado em Medicina Dentária. In: Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.

Silveira, J., 2015. *Efeitos do Peróxido de Hidrogénio nos Tecidos Dentários. Tese de doutoramento em Medicina Dentária*. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.

Silveira, J. et al., 2015. Assessment of teeth elemental content using micro-EDXRF: Effects by in-office and at-home bleaching products. *X-Ray Spectroscopy*, Volume 44, pp. 3-6.

Silveira, J., Longelin, S., Mata, A. & Carvalho, M., 2012. Identification of oxygen in dental enamel following tooth bleaching using confocal micro Raman spectroscopy. *Raman Spectroscopy*, Volume 43, pp. 1089-1093.

SmartPractice, 2015. *SmartPractice*. [Online] Available at: https://www.google.pt/search?q=VITA+Bleachedguide+3DMaster+%28VITA%29&biw=1366&bih=606&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=CTn4VNjpOob0Uv6sgIAL&ved=0CAYQ_AUoAQ#imgdii=_&imgsrc=Zmsg6KuQvmuxM%253A%3BOTicLifcQG7DpM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.smartpractice.com%252FIm [Acedido em 5 Março 2015].

Sulieman, M., Addy, M. & MacDonald, E., 2004. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *Journal of Dentistry*, Volume 36, pp. 295-299.

Sun, L. et al., 2011. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *Journal of Dentistry*, Volume 39, pp. 686-692.

Técnico, I. S., 2015. *Técnico Lisboa*. [Online] Available at: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/mebiom> [Acedido em 21 Janeiro 2015].

Thomas, D., 2011. *Illuminating Fossils*. [Online] Available at: <https://illuminatingfossils.wordpress.com/2011/02/01/spectroscopy-of-fossil-bone-part-1-phosphate/> [Acedido em 6 Agosto 2015].

Torres, S., 2008. *Caracterização Comparativa do esmalte de dentes decíduos e permanentes por espectroscopia Raman, Tese de Mestrado*. Brasília: Faculdade de Ciência da Saúde da Universidade de Brasília.

Tredwin, C., Naik, S., Lewis, N. & Scully, C., 2006. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal*, Volume 200, pp. 371-376.

Tsuda, H. & Arends, J., 1997. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res*, Volume 11, pp. 539-537.

VanPutte, C. et al., 2013. Seeley's Anatomy & Physiology. In: 10 ed. USA: McGraw-Hill Higher Education, pp. 867-888.

Ventura, A., 2009. Sensibilidade dentária no branqueamento. Mestrado Integrado em Medicina Dentária. In: Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.

VITA, 2015. VITA. [Online] Available at: <https://www.vita-zahnfabrik.com/en/VITA-classical-A1-D4-colour-scale-1091.html>[Acedido em 5 Março 2015].

West, N. & Joiner, A., 2014. Enamel Mineral Loss. *Journal of Dentistry*, Volume 42, pp. 2-11.

Wikipedia, 2015. *Wikipedia*. [Online] Available at: https://pt.wikipedia.org/wiki/Raios_X [Acedido em 11 Agosto 2015].

XOS, 2015. XOS. [Online] Available at: <https://xos.com/technologies/xrf/micro-x-ray-fluorescence-%CE%BCxrf/> [Acedido em 10 Agosto 2015].

Anexo A

Protocolo experimental para preparação de Sulfato de Cério IV a 0.1 M

Material:

- Balão volumétrico 1L
- Balão volumétrico 500 mL
- Gobelé 250 mL
- Esguicho
- Balança analítica
- Magneto
- Funil de vidro
- Placa de agitação e aquecimento
- Vareta de vidro
- Pipeta descartável de 25 mL

Reagentes:

- Sulfato de Cério IV (tetra hidratado), p.a. $M=404,30$ g/mol
- Ácido sulfúrico p.a (95,6 %)
- Água destilada

Protocolo:

- Lavar o material com água destilada do dia 2× e colocar a escorrer sobre o papel de filtro
- Preparar solução de ácido sulfúrico para dissolução inicial:
 - Na hotte, medir 500 mL de água destilada com um balão volumétrico e transferir para um gobelé de 1L
 - Com uma pipeta descartável de 25 mL, medir 28 mL de ácido sulfúrico concentrado
 - Transferir para o gobelé com água e colocar um magneto
 - Colocar na placa de agitação, com agitação suave
- Colocar um gobelé de 500 mL na balança e tarar
- Pesar 40,4300 g de Sulfato de Cério IV tetra hidratado
- Adicionar gradualmente a solução de ácido sulfúrico, preparada sob agitação constante, até dissolução completa
- Transferir para o balão de 1L e completar o restante com água destilada
- Identificar o balão com "Sulfato de Cério IV – solução padrão 0,1M", nome e a data de preparação