

Influência da adição de agente remineralizante em géis clareadores na microdureza e alteração de cor do esmalte dental

Influence of the addition of remineralizing agent on bleaching gels on microhardness and alteration of tooth enamel dye

Débora Roso Oliveira(1); Rodrigo Varella de Carvalho(2); Rodrigo Ottoni(3); Simone Beatriz Alberton da Silva(4); Françoise Hélène Van de Sande Leite(5)

1 Cirurgiã-dentista, Consultório Privado, Marau, RS, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4879> | Email: debora.roso@yahoo.com.br

2 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Odontologia, Faculdade Meridional (IMED), Passo Fundo, RS, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2644-5820> | E-mail: rodrigo.carvalho@imed.edu.br

3 Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0317-1705> | E-mail: cdrodrigoottoni@gmail.com

4 Professora do Curso de Especialização em Dentística Restauradora do Centro de Estudos Odontológicos Meridional (CEOM), Passo Fundo, RS, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9883-3243> | E-mail: sbalberton@hotmail.com

5 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Odontologia, Faculdade Meridional (IMED), Passo Fundo, RS, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8239-9630> | E-mail: fvandesande@gmail.com

Journal of Oral Investigations, Passo Fundo, vol. 7, n. 2, p. 7-15, Jul.-Dez., 2018 - ISSN 2238-510X

[Recebido: Maio 08, 2018; Aceito: Junho 18, 2018]

DOI: <https://doi.org/10.18256/2238-510X.2018.v7i2.2695>

Endereço correspondente / Correspondence address

Rodrigo Ottoni

Endereço: Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Km 171, São José, Passo Fundo/RS, Brasil.

CEP 99052-900

Sistema de Avaliação: *Double Blind Review*

Editor-chefe: Aloísio Oro Spazzin

Como citar este artigo / How to cite item: [clique aqui!/click here!](#)

Resumo

Objetivo: O objetivo neste estudo foi investigar a ação de diferentes géis de clareamento dental e de um agente remineralizante na dureza em esmalte associada ao clareamento. **Método:** Dentes bovinos foram utilizados para confeccionar os espécimes de esmalte e armazenados em vinho tinto para promover o manchamento dos mesmos. Após, foram submetidos a três sessões de clareamento com peróxido de hidrogênio 35%. Três grupos (n= 9) foram utilizados para avaliação comparativa: gel de clareamento sem cálcio, gel de clareamento com cálcio e gel de clareamento com cálcio e aplicações de um agente para remineralização. As variáveis de desfecho avaliadas foram o percentual de diminuição da dureza superficial do esmalte em diferentes tempos de armazenamento (7, 14, 21 e 28 dias após o clareamento) e alteração de cor. Os dados foram avaliados com ANOVA (perda mineral) e estatística descritiva (alteração de cor). **Resultados:** As diferenças de perda mineral entre os grupos não foram estatisticamente significativas em todos os tempos avaliados. Em relação aos valores colorimétricos, todos os grupos apresentaram clareamento substancial após o tratamento. **Conclusão:** Concluiu-se que não houve influência do produto de remineralização utilizado ou gel clareador na perda mineral em esmalte.

Palavras-chave: Clareamento Dental; Peróxido de Hidrogênio; Agentes Clareadores; Desmineralização Dentária.

Abstract

Aim: The objective of this study was to investigate the action of different dental whitening gels and a remineralizing agent on the enamel hardness associated with bleaching. **Method:** Bovine teeth were used to make the enamel specimens and stored in red wine to promote the staining of the same. Afterwards, they underwent three bleaching sessions with 35% hydrogen peroxide. Three groups (n = 9) were used for comparative evaluation: calcium free bleaching gel, calcium bleaching gel and calcium bleaching gel and applications of an agent for remineralization. The outcome variables evaluated were the percentage of reduction of enamel surface hardness at different storage times (7, 14, 21 and 28 days after bleaching) and color change. Data were analyzed with ANOVA (hardness) and descriptive statistics (color change). **Results:** The differences in mineral loss between groups were not statistically significant at all time points. Regarding the colorimetric values, all the groups presented substantial bleaching after the treatment. **Conclusion:** It was concluded that there was no influence of the remineralization product used or microhardness enamel whitening gel.

Keywords: Tooth Bleaching; Hydrogen Peroxide; Bleaching Agents; Tooth Demineralization.

Introdução

A aparência dental é um importante indicador quando se avalia a atratividade facial (1). A insatisfação com a cor dos dentes é um dos fatores que levam os pacientes a buscar tratamentos estéticos, pois dentes mais claros podem estar associados à saúde, felicidade, beleza, jovialidade e atratividade do sorriso (2).

O clareamento dental é uma alternativa bastante utilizada para dentes com alteração de cor, sendo mais conservadora que os outros procedimentos disponíveis para o tratamento dessas alterações, como facetas e coroas (3). Para dentes com vitalidade, as principais técnicas de clareamento dental incluem o uso de agentes clareadores com menor concentração em moldeira, a serem utilizados em casa pelo paciente, ou com maior concentração, utilizados em sessões no consultório odontológico (3). Além disso, de acordo com a necessidade individual, a associação das duas técnicas pode ser realizada (3).

Para o clareamento de dentes vitais, realizado no consultório, o peróxido de hidrogênio é o agente químico mais utilizado, em concentrações que normalmente variam de 30 a 35% (3). Apesar de ser um tratamento conservador, alterações no esmalte após o tratamento clareador foram relatadas em alguns estudos, que mostraram um aumento da rugosidade superficial (6), erosão da superfície (7), perda mineral (8), alteração do conteúdo orgânico (9,10), diminuição na dureza e no módulo de elasticidade da estrutura (9, 11, 12, 13) e menor resistência à fratura (11).

A utilização de substâncias com potencial de remineralização da estrutura dentária poderiam minimizar a perda de conteúdo inorgânico da estrutura dentária associada ao clareamento. A adição de flúor e cálcio nos agentes clareadores foi relacionada a uma menor perda mineral em esmalte em alguns estudos *in vitro* e *in situ* (14-16). Além disso, foi relatado que a aplicação de fosfato de cálcio, antes e após o procedimento clareador, preveniu alterações no esmalte em relação à rugosidade e dureza, sem afetar a efetividade do clareamento dental (17). Embora alguns estudos tenham avaliado o uso de fluoreto de sódio e fosfato de cálcio associado ao clareamento para minimizar a perda mineral (17-19), poucos estudos foram encontrados avaliando produtos para remineralização com nanopartículas de hidroxiapatita na formulação (20, 21). Esse material apresentou resultados favoráveis para remineralização do esmalte *in vitro*, demonstrando uma diminuição na perda de dureza 24 horas após o clareamento, contudo, esse efeito não foi mantido após 14 dias e alterações na morfologia e dureza superficial foram observados em esmalte (20). Nesse estudo (20) o tratamento para remineralização foi realizado somente após o clareamento, o que pode ter interferido nos resultados de dureza do esmalte. Outro estudo avaliou o uso de nanopartículas de hidroxiapatita para minimizar os efeitos do clareamento na perda mineral em esmalte imediatamente após o clareamento, demonstrando que o

uso do produto durante o tratamento clareador resultou em menor perda mineral do esmalte do que o seu uso antes ou após o tratamento clareador (21).

Assim sendo, os objetivos no presente estudo foram investigar a perda mineral em esmalte após sessões de clareamento com ou sem a utilização de um produto para remineralização e se a utilização desse produto poderia interferir no grau de clareamento das superfícies dentárias. Para o presente estudo, as hipóteses nulas testadas foram: 1) a utilização de diferentes produtos para o clareamento e o uso de um agente para remineralização não seria capaz de reduzir a dureza em esmalte associada ao clareamento; e 2) a utilização de diferentes produtos para o clareamento e o uso de um agente para remineralização não iria interferir na efetividade do clareamento dental.

Materiais e Métodos

Os cálculos realizados para estimar o número amostral foram baseados nos resultados reportados por estudo prévio (21).

Obtenção e preparo dos espécimes

Incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas foram obtidos em um frigorífico local. Os dentes foram limpos e armazenados durante 10 dias (-20°C) até sua utilização. Para obtenção de discos de esmalte de 6 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura, o terço médio vestibular foi seccionado em furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 RPM. Para finalização foi realizada planificação da superfície com discos de lixa de forma sequencial (granulometria 800 a 2000) e polimento com disco de feltro e pasta diamantada (Metadi® Supreme, Buehler, Illinois, Estados Unidos da América) em politriz (Aropol 2V, Arotec, Cotia, SP). Todos os procedimentos durante a confecção dos espécimes foram realizados sob refrigeração por água. Posteriormente, as amostras foram limpas durante 5 minutos em água destilada (pisseta), e inspecionados com estereomicroscópio para excluir as amostras com trincas ou defeitos na superfície. As amostras foram autoclavadas e armazenadas em água destilada a 4°C até utilização (24 h). A esterilização em autoclave foi realizada conforme protocolo padrão, à 121°C por 15 a 30 minutos, a 15 libras de pressão.

Para escurecimento da cor das amostras, foi utilizado vinho tinto (pH=3,6; 9,5% de teor alcóolico). O pH foi verificado após a abertura da garrafa (Quimis 50w - Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP; V621 electrode - Analion, Ribeirão Preto, SP) e o tamponamento foi realizado com adição de NaOH 0,1 N a 100 mL da bebida a ser utilizada até que o pH atingisse 7,0. As amostras foram imersas em vinho tinto por um período contínuo de 72 horas e armazenados em estufa, a cada 24 horas o vinho era renovado.

Tratamento clareador

O quadro 1 mostra o nome comercial, o fabricante, lote e composição dos materiais utilizados nesse estudo. Os espécimes (n=9) foram aleatoriamente distribuídos e embutidos em resina fotopolimerizável (Top dam, FGM - Dentscare LTDA. Joinville, SC) deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Para posterior identificação dos espécimes, os mesmos foram codificados numericamente durante o experimento. Todos os espécimes foram submetidos a três sessões de clareamento com - peróxido de hidrogênio 35%, espaçadas por 24 horas de intervalo. Para aplicação dos agentes clareadores, as instruções de manipulação e tempo de aplicação foram seguidas conforme recomendação do fabricante. Para o gel Whiteness Hpmaxx foram realizadas três aplicações por sessão, de 15 minutos cada, e para o gel Whiteness HP Blue Calcium a aplicação do gel foi única por sessão, durante 40 minutos. Ao final de cada aplicação do clareador, o gel foi removido com gaze seguido de lavagem abundante com água destilada (pisseta). Um terceiro grupo foi criando onde, o excesso de umidade da superfície do esmalte foi removido com gaze e uma camada de produto para remineralização foi aplicada nos dentes que receberam o gel de clareamento com cálcio (Whiteness HP Blue Calcium), além de aplicações de um agente para remineralização (nanoP) com *microbrush*, cobrindo toda a superfície da amostra. O produto foi friccionado com *microbrush* durante 10 segundos em cada amostra e deixado sobre as superfícies por cinco minutos. Após, o produto foi removido com gaze. O protocolo de aplicação foi realizado conforme a instrução do fabricante. As aplicações de nanoP foram mantidas após o término das sessões de clareamento, sendo realizadas uma vez por semana, durante 4 semanas no total. Depois de cada sessão de clareamento, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos individuais (2 mL) codificados, com bolinhas de algodão embebidas em água destilada para manutenção de umidade.

Quadro 1. Nome comercial, fabricante, lote e composição dos produtos utilizados no experimento

Nome comercial	Fabricante	Lote	Componentes ativos
Whiteness HP Blue Calcium	FGM - Dentscare LTDA. Joinville/SC	130515	Peróxido de Hidrogênio a 35%
Whiteness Hpmaxx	FGM	210415	Peróxido de Hidrogênio a 35%
Desensibilize nanoP	FGM	110815	Fosfato de Cálcio Nanométrico, Fluoreto de Sódio e Nitrato de Potássio

Dureza superficial do esmalte

A avaliação foi realizada com um indentedor de diamante tipo Knoop com 25 g de carga durante 5 segundos (Micro Hardness Tester FM 700 – Future – Tech Corp, Kawasaki, Japão). Três leituras foram realizadas no centro do espécime, espaçadas em 100 µm umas das outras. Os valores de dureza obtidos em cada espécime foram utilizados para obtenção de médias individuais e para calcular o percentual de perda de dureza superficial [%PDS = (D inicial – D final) / D inicial x 100%].

As avaliações foram realizadas em cinco momentos. Inicialmente, antes da realização do clareamento, para obtenção dos valores de dureza inicial, que serviram como valores de referência e para ter uma padronização das amostras de esmalte (seleção). Depois, após a última sessão de clareamento, a dureza de superfície do esmalte foi mensurada novamente quatro vezes, em intervalos de sete dias (D2, D3, D4 e D5) para valores de dureza final.

Avaliação da cor

Os valores colorimétricos foram obtidos utilizando um espectrofotômetro (Vita Easyshade – Vita Zahnfabrik; Bad Sackingen, Alemanha) em um laboratório escurecido. O aparelho foi previamente calibrado com um padrão de reflexão branco. A ponteira foi posicionada no centro dos espécimes para as leituras. Foram anotados os valores conforme escala VITA, com letras (A, B, C, D) seguida de números (1, 2, 3 e 4) que representam as colorações dentárias.

As avaliações de cor foram realizadas após o escurecimento dos espécimes em vinho tinto (*baseline*) e uma semana após o término do clareamento.

Os dados de alteração de cor foram avaliados com estatística descritiva. Os dados de perda mineral foram avaliados com ANOVA para comparações entre os grupos em cada tempo e teste t pareado para comparações intra grupo entre os tempos. O poder do teste foi fixado em 80% e nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$. Os procedimentos foram realizados com o pacote estatístico SPSS 23.0 (Statistics for Windows Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Resultados

Em relação à efetividade do clareamento, após armazenamento em vinho tinto, o grupo HPBLUE apresentou 66 % de C4 e 33 % de A4 na leitura inicial, e após o clareamento foi encontrado 88 % de B1 e 11% de A1. No grupo HPBLUE + nano P observou-se 77% de C4 e 22% de A4 na leitura inicial, e após o clareamento foi constatado 77% de B1 e 22% de B2. Já no grupo HPmaxx, 100% de C4 na leitura inicial, e após o clareamento 44% de B1, 22% de A1, 22% de A2 e 11% de C1.

Os resultados de perda mineral podem ser observados na figura 1, com a representação gráfica das médias e desvios-padrão em cada grupo. Em todos os grupos a perda mineral (%PDS) observada foi bastante elevada. As diferenças de %PDS entre os grupos não foram estatisticamente significativas, em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$), como descrito na tabela 1. Além disso, na avaliação pareada intra-grupo, entre os diferentes tempos, também não se observou diferenças estatisticamente significativas para PDS% em nenhum dos grupos (Tabela 2).

Figura 1. Percentual de perda de dureza de superfície do esmalte (%PDS) nos grupos após o tratamento clareador.

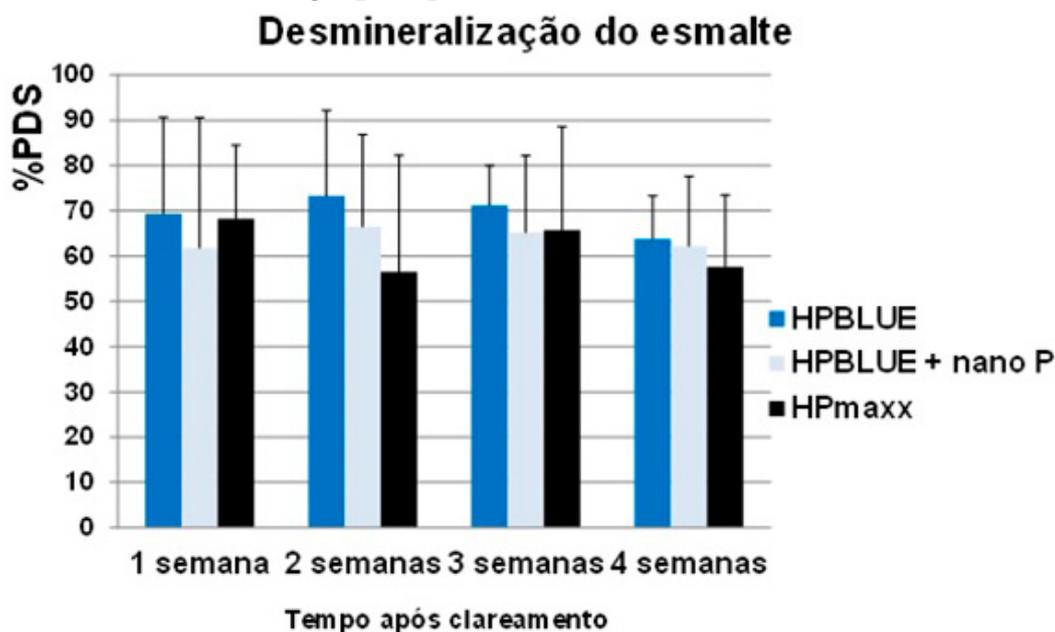


Tabela 1. Média do percentual de perda de dureza de superfície do esmalte (%PDS) e significância estatística (p) da análise de variância (ANOVA).

	HPBLUE	HPBLUE + nano P	HPmaxx	P
1 semana	69,32	61,81	68,27	0,751
2 semanas	73,24	66,50	56,57	0,284
3 semanas	71,22	65,22	65,78	0,717
4 semanas	63,78	62,22	57,56	0,619

Tabela 2. Significância estatística (p) das comparações intra-grupo entre os diferentes tempos avaliados

	HPBLUE	HPBLUE + nano P	HPmaxx
1 vs 2 semanas	0,393	0,492	0,100
2 vs 3 semanas	0,791	0,860	0,300
3 vs 4 semanas	0,058	0,458	0,064
1 vs 4 semanas	0,363	0,963	0,079

Discussão

O presente estudo avaliou o efeito do tratamento clareador na perda mineral em esmalte, bem como a influência de diferentes géis de clareamento associados ou não ao uso de remineralizante. As hipóteses nulas testadas não foram rejeitadas, uma vez que nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação à perda mineral em esmalte e na efetividade do tratamento clareador.

Com os resultados obtidos, verificou-se que houve uma perda mineral elevada no esmalte dentário quando submetido ao tratamento clareador. Esses achados estão em acordo com estudos previamente publicados, que demonstraram perda mineral associada ao tratamento clareador com gel de peróxido de hidrogênio a 35% (22-25).

Poucos estudos foram encontrados avaliando alterações em esmalte com gel de peróxido de hidrogênio a 35% com e sem cálcio na composição. Conforme os resultados observados nessa pesquisa, não houve efeito na redução da perda mineral em esmalte. Esse achado está de acordo com outro estudo que reportou que as alterações no esmalte foram semelhantes para os dois géis (26). Outros estudos, porém, relataram que não houve perda mineral nos espécimes clareados com gel contendo cálcio na composição (27, 28). Desta forma, em face do reduzido número de estudos e dos resultados conflitantes, mais avaliações devem ser conduzidas para esclarecer a influência da adição de cálcio no gel peróxido de hidrogênio a 35% sobre o esmalte.

Independente de reduzir ou não a perda mineral, uma vantagem pode ser relatada em relação ao produto comercial utilizado com cálcio na composição, pois a forma de manipulação do mesmo, com duas seringas que são acopladas para a mistura dos componentes, garante uma correta proporção dos mesmos. Diferentemente, o gel sem cálcio na composição apresenta manipulação mais sensível tecnicamente, uma vez que depende de gotejamento correto dos frascos, de forma que a proporção pode sofrer alterações, resultando em diferenças na concentração de peróxido de hidrogênio. Além disso, a utilização com aplicação única por sessão do gel com cálcio reduz o tempo do procedimento, o que é interessante sob o ponto de vista clínico (14-16).

O uso de um produto remineralizante com fosfato de cálcio para reduzir a perda mineral em esmalte também não se mostrou eficaz no presente estudo. Várias aplicações foram realizadas, logo após cada sessão, e mantidas após o término do clareamento, totalizando sete aplicações. Os resultados negativos encontrados foram inesperados, pois nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos avaliados em nenhum tempo, contrariando os achados do estudo realizado por Da Costa Soares et al. (20), onde as diferenças encontradas na dureza do esmalte perderam significância somente após 14 dias. Em relação a limitações do presente estudo, é importante relatar que após o término do estudo, o fabricante retirou dois lotes de circulação, incluindo o lote utilizado nesta pesquisa. Desta forma, não é possível afirmar que o produto em questão

seria ou não eficiente na remineralização do esmalte. Novos experimentos devem ser realizados para confirmar ou refutar os achados.

A efetividade do tratamento clareador, em relação às mudanças de cor dos espécimes, foi observada para todos os grupos avaliados. A presença de cálcio na composição do gel de clareamento e a aplicação de fosfato de cálcio não pareceram exercer nenhuma influência na ação clareadora do gel. No entanto, os dados foram avaliados apenas com estatística descritiva, limitando as conclusões. De Moraes et al. (26) relataram um maior potencial de clareamento com a utilização do agente clareador com cálcio, com diferenças estatisticamente significativas. Se esse achado for confirmado por mais investigações, seria relevante clinicamente, pois poderia reduzir o número de sessões de clareamento necessárias, minimizando efeitos indesejados como alterações nos tecidos e sensibilidade dental.

Em relação à metodologia utilizada no presente estudo, a avaliação da perda mineral foi realizada através de leituras de dureza da superfície do esmalte. Este método tem sensibilidade e reprodutibilidade para detectar perdas minerais iniciais em esmalte (29), sendo extensamente utilizado para esta finalidade (24, 30, 31, 32). Outro aspecto metodológico a ser discutido diz respeito ao uso de dentes bovinos no estudo. Esse substrato apresenta algumas vantagens para utilização em experimentação *in vitro* e *in situ*, como maior facilidade na obtenção de dentes hígidos e recentemente extraídos, maior dimensão, facilitando a confecção de espécimes, além de aspectos éticos quando se utiliza dentes humanos. Apesar de algumas diferenças entre dentes humanos e bovinos, a progressão da perda mineral é semelhante, sendo considerados adequados para estudos de desmineralização (33).

Outro ponto a considerar, é que os espécimes não foram armazenados em saliva, justamente para que os efeitos protetores da mesma não interferissem na interpretação dos resultados, isolando as variáveis de interesse. Provavelmente a perda mineral associada ao clareamento é menor clinicamente, uma vez que os dentes são cobertos por saliva. Zeczkowski et al. (34), observaram que não havia perda mineral após o clareamento, quando os espécimes foram armazenados em saliva, sem diferenças entre o experimento realizado *in vitro* e *in situ*. No estudo *in situ* realizado por Borges et al. (16), os autores relataram um aumento na mineralização do esmalte quando um gel clareador com cálcio foi utilizado, o que não foi observado no presente estudo. No entanto, este efeito foi observado apenas em espécimes de esmalte previamente desmineralizados (16), e não em espécimes hígidos, como os utilizados na presente pesquisa. Assim, mais investigações *in situ* devem ser realizadas para avaliar se há benefício adicional no uso de remineralizantes, ou se a saliva por si é suficiente para reduzir os efeitos do clareamento na perda mineral em esmalte.

Conclusão

Não houve influência do uso do produto para remineralização ou do agente clareador na perda mineral em esmalte e na efetividade do clareamento. Os géis de clareamento utilizados provocaram uma significativa redução da dureza superficial em esmalte.

Referências

1. Mack MR. Perspective of facial esthetics in dental treatment planning. *J Prosthet Dent.* 1996; 75(2): 169-76.
2. Montero J, Gómez-Polo C, Santos JA, Portillo M, Lorenzo MC, Albaladejo A. Contributions of dental colour to the physical attractiveness stereotype. *J Oral Rehabil.* 2014; 41(10): 768-82.
3. Heymann HO. Procedimentos estéticos conservativos adicionais In: (Ed.). *Sturd Art Ciênc Dent Oper.* 6ª ed, 2013; (12): 544.
4. Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 1040-5.
5. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Bleaching agents increase metalloproteinases-mediated collagen degradation in dentin. *J Endod.* 2011; 37(12): 1668-72.
6. Fu B, Hoth-Hannig W, Hannig M. Effects of dental bleaching on micro- and nano-morphological alterations of the enamel surface. *Am J Dent.* 2007; 20(1): 35-40.
7. Ushigome T, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface--cross-sectional analysis. *Dent Mater J.* 2009; 28(3): 315-23.
8. Efeoglu N, Wood DJ, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 900-4.
9. Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Shen X, Hu, Y, Hu J. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Opt.* 2008; 13(1): 14 -19.
10. Elfallah HM, Bertassoni LE, Charadram N, Rathsam C, Swain MV. Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. *Acta Biomater.* 2015; 20: 120-8.
11. Attin T, Müller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. *Oper Dent.* 2004; 29(2): 188-95.
12. Hairul Nizam BR, Lim CT, Chng HK, Yap AU. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *J Biomech.* 2005; 38(11): 2204-11.
13. Zimmerman B, Datko L, Cupelli M, Alapati S, Dean D, Kennedy M. Alteration of dentin-enamel mechanical properties due to dental whitening treatments. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010; 3(4): 339-46.
14. Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent.* 2007; 35(9): 755-9.
15. Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF, Brancalion ML, Arruda MA, Berger SB, Giannini M. Effects of bleaching agents containing fluoride and calcium on human enamel. *Quintessence Int.* 2010; 41(8): 157-65.

16. Borges AB, Guimarães CA, Bresciani E, Ramos CJ, Borges AL, Rocha Gomes Torres C. Effect of incorporation of remineralizing agents into bleaching gels on the microhardness of bovine enamel in situ. *J Contemp Dent Pract*, 2014; 15(2): 195-201.
17. Cunha AG, De Vasconcelos AA, Borges BC, Vitoriano Jde O, Alves-Junior C, Machado CT, Dos Santos AJ. Efficacy of in-office bleaching techniques combined with the application of a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste at different moments and its influence on enamel surface properties. *Microsc Res Tech*. 2012; 75(8): 1019-25.
18. Bayrak S, Tunc ES, Sonmez IS, Egilmez T, Ozmen B.. Effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) application on enamel microhardness after bleaching. *Am J Dent*. 2009; 22(6): 393-6.
19. Yesilyurt C, Sezer U, Ayar MK, Alp CK, Tasdemir T. The effect of a new calcium-based agent, Pro-Argin, on the microhardness of bleached enamel surface. *Aust Dent J*. 2013; 58(2): 207-12.
20. Da Costa Soares MU, Araújo NC, Borges BC, Sales Wda S, Sobral AP. Impact of remineralizing agents on enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(2): 343-8.
21. Deng M, Wen HL, Dong XL, Li F, Xu X, Li H, Li, JY, Zhou XD. Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. *Inter J Oral Sci*. 2013; 5(2): 103-10.
22. Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Braz Oral Res*. 2004; 18(4): 306-11.
23. Ayres APA, Berger SB, André CB, Giannini M. Avaliação da microdureza do esmalte dental bovino após técnicas de clareamento caseiro, de consultório e a associação das técnicas com agentes de baixa e alta concentração de peróxidos. *RPG*. 2012; 19(4): 147-52.
24. Cervantes A, Bolanho A, Amélia M, Araújo M. Estudo da microdureza do esmalte bovino submetido ao tratamento clareador ativado por diferentes fontes de luz. *Ciênc Odontol Bras*, 2006; 9(3): 78-86.
25. Da Costa Sares MUS, Franco MSP. Tratamento do esmalte com substancias remineralizantes apos clareamento dental: avaliação da microdureza e da morfologia do substrato tratado, disponível em: http://www.editorarealize.com.br/revistas/conacis/trabalhos/Modalidade_4datahora_12_03_2014_16_34_33_idinscrito_2432_1171957b7ee8075958a106dbde495d06.pdf
26. De Moraes IQS, Silva LNB, Porto ICCM, Neto CFL, Dos Santos NB, Fragozo LSM. Effect of in office bleaching with 35% hydrogen peroxide with and without addition of calcium on the enamel surface. *Microsc Res Tech*, *in press* DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.22561>
27. Alexandrino L, Gomes Y, Alves E, Costi H, Rogez H, Silva C. Effects of a bleaching agent with calcium on bovine enamel. *Eur J Dent*. 2014 Jul-Sep; 8(3): 320-5.
28. China ALP, Souza NM, Gomes YSBL, Alexandrino LD, Silva CM. Effect of fluoride gels on microhardness and surface roughness of bleached enamel. *Open Dent J*. 2014; 8: 188-193.

29. Delbem AC et al. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. *Caries Res.* 2009; 43(5): 359-65.
30. Oliveira R, Paes Leme AF, Giannini, M. Effect of a Carbamide Peroxide Bleaching Gel Containing Calcium or Fluoride on Human Enamel Surface Microhardnes. *Braz Dent J.* 2005; 16(2): 103-6.
31. Antón ARS, Lima MJL, Araújo RPC. Dentifrício peróxido de hidrogênio: ação clareadora? *Rev Odonto ciênc.* 2009; 24(2): 161-7.
32. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Loguércio AD, Hebling J, Costa CA. Mineral Loss and Morphological Changes in Dental Enamel Induced by a 16% Carbamide Peroxide Bleaching Gel. *Braz Dent J.* 2013; 24(5): 517-21.
33. White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(6): 604-9.
34. Zeczkowski M, Tenuta LMA, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. *J Dent S.* 2015; 43(9): 1154-61.