



Nayara Rodrigues Nascimento Oliveira Tavares

**Color change and physicochemical properties of bleached enamel with
hydrogen peroxide, violet light or ozone**

Alteração de cor e propriedades físico-químicas do esmalte clareado com
peróxido de hidrogênio, luz violeta ou ozônio

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica
Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2019

Nayara Rodrigues Nascimento Oliveira Tavares

**Color change and physicochemical properties of bleached enamel with
hydrogen peroxide, violet light or ozone**

Alteração de cor e propriedades físico-químicas do esmalte clareado com
peróxido de hidrogênio, luz violeta ou ozônio

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em
Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Profa Dra. Gisele Rodrigues da Silva

Banca Examinadora: Profa Dra. Gisele Rodrigues da Silva

Profa Dra. Maria Antonieta Veloso C. de Oliveira

Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo

Uberlândia, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- T231c
2019 Tavares, Nayara Rodrigues Nascimento Oliveira, 1991
 Color change and physicochemical properties of bleached enamel
 with hydrogen peroxide, violet light or ozone = Alteração de cor e
 propriedades físico-químicas do esmalte clareado com peróxido de
 hidrogênio, luz violeta ou ozônio [recurso eletrônico] / Nayara Rodrigues
 Nascimento Oliveira Tavares. - 2019.
- Orientadora: Gisele Rodrigues da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1365>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.
1. Odontologia. 2. Dentes - Clareamento. 3. Ozônio. 4. Peróxido de
 hidrogênio. I. Silva, Gisele Rodrigues da, 1982, (Orient.) II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGO				
Data:	Vinte e nove de Julho de 2019	Hora de início:	14:30h	Hora de encerramento:	17:00h
Matrícula do Discente:	11712ODO018				
Nome do Discente:	Nayara Rodrigues Nascimento Oliveira Tavares				
Título do Trabalho:	Color change and physicochemical properties of bleached enamel with hydrogen peroxide, violet light or ozone				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Propriedades físicas e mecânicas dos materiais odontológicos				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Análise clínica e laboratorial do clareamento dentário				

Reuniu-se no Anfiteatro/sala 23 - Bloco 4L - Anexo A, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia assim composta: Professores Doutores: Maria Antonieta Veloso Carvalho de Oliveira (UFU); Hugo Lemes Carlo (UFJF) e Gisele Rodrigues da Silva (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Gisele Rodrigues da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2019, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Maria Antonieta Veloso Carvalho de Oliveira**,



Professor(a) do Magistério Superior, em 29/07/2019, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hugo Lemes Carlo, Usuário Externo**, em 29/07/2019, às 22:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1412767** e o código CRC **63ACEFC8**.

Referência: Processo nº 23117.065118/2019-90

SEI nº 1412767

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, e em primeiro lugar, **à Deus**, por tudo que me proporciona, por permitir que a fé me ampare sempre em todos os momentos. Por me ajudar em cada decisão, e por ter colocado em minha vida minha família e tantas outras pessoas tão especiais.

Aos meus pais, **João Carlos e Marília**, por desde sempre se sacrificarem pela minha educação e das minhas irmãs. Por abrirem mão de tantos sonhos para que nós realizássemos os nossos. Por investir na nossa carreira e sempre nos apoiarem acima de tudo, por serem exemplos sempre. Às minhas irmãs, **Thaís e Marina**, pelo apoio sempre, por serem as melhores irmãs que eu poderia ter, que apoiam e incentivam mesmo sem saber.

Aos meus avós, **Ary e Geraldina**, que hoje, acompanham de longe essa conquista que significa tanto. Que sempre, apoiaram e acompanharam cada etapa, se fizeram presentes em todos os momentos, e são sempre, meus exemplos de força, dedicação, e perseverança. À minha avó **Laurinda**, pelo carinho de vó, pelo afeto, mesmo de longe.

À todos **meus familiares**, e também a família do Lucas, que hoje também é minha, que sempre apoiam e acompanham com tanto carinho cada etapa da minha vida, e mesmo de longe, torcem e se fazem presente.

Ao meu melhor amigo, namorado e hoje marido **Lucas**, por estar comigo a tanto tempo, por acompanhar com tanta parceria e amor nessa longa caminhada, por crescer junto, por me dar a família que eu sempre sonhei, por me fazer esposa e mãe. **Mel**, por seu amor canino, por sua companhia sempre, por mostrar que nossos dias são mais leves. Ao meu mais novo amor, meu filho **Enrico**, agradeço pela força para continuar, por me permitir ser mãe e não desistir da minha carreira profissional e pessoal. Isso tudo também é por você.

Agradeço à todos os **professores que passaram na minha vida, Escola da Criança, Nacional, Cultura Inglesa e Centro Cultural de La Lengua Espanhola**. Foi por causa de vocês que o amor pela docência surgiu, e a dedicação de cada um de vocês trouxe uma marca para formar a profissional que sou hoje.

À **Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Odontologia, Programa de pós graduação e todos os professores**, por ser minha segunda casa, por ter permitido a realização de um sonho, por ter colaborado tanto no meu crescimento pessoal e profissional. Por ter me permitido vivenciar tantas experiências, tenho certeza, que todos que passaram deixaram muitas marcas, e nessa caminhada, ganhei amigos e uma nova família.

À **minha orientadora Gisele**, por ter me acolhido desde a graduação, e por ter abraçado mais esse desafio. Obrigada pelo apoio, e por ter feito mais que uma orientadora, por ter sido exemplo como pessoa e profissional, por ser amiga e ensinar tanto. À Professora **Maria Antonieta**, por ser uma segunda mãe, pela amizade, pela parceria, e por todas as oportunidades e projetos que estivemos juntas. Vocês duas serão sempre seus exemplos como mãe, professoras, profissionais, e sem vocês essa caminhada acadêmica não seria a mesma.

Aos **meus amigos**, desde os mais antigos aos mais recentes. Cada um de vocês que torceu e esperou tanto por esse momento. Por estarem ao meu lado, entenderem as ausências e mesmo assim apoiarem essa decisão. **Aos amigos que a UFU trouxe: Jessica, Vanessa, Lucas, Ramon, Laura, Rodrigo, Marcella, Brenda, e todos os colegas do mestrado**. Obrigada pela amizade e companheirismo, pelo apoio durante esse tempo, por não medirem esforços para ajudar. E em especial à **Alexia**, uma grata surpresa nesse mestrado, por embarcar em cada desafio, por ser muito mais que parceira, uma amiga pra qualquer desafio.

Aos funcionários do **CPbio, Laboratório de Física e Química da Universidade Federal de Uberlândia**, por serem fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores da banca de qualificação, **Carlos Soares, Letícia Davi e Luiz Henrique Raposo, e todos os professores** que contribuíram e enriqueceram este trabalho.

À todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento como docente.

SUMÁRIO

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	1
ABSTRACT/KEYWORDS	2
INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	3
CAPÍTULO 1 - ARTIGO 1	4
CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito clareador e físico-químico no esmalte de luz violeta e ozônio, associado ou não ao peróxido de hidrogênio, comparado a 35% de peróxido de hidrogênio. Blocos de esmalte-dentina de molares humanos foram alocados aleatoriamente para receber um dos seguintes protocolos de clareamento (n = 15): peróxido de hidrogênio a 35%, luz violeta, ozônio, a associação entre peróxido de hidrogênio com ozônio ou luz violeta. Todos os protocolos foram realizados em duas sessões, com intervalo de 48 horas entre eles. A cor (espectrofotômetro) e a composição mineral (espectroscopia Raman) do dente foram medidas antes e após os procedimentos de clareamento. As alterações de cor foram calculadas por ΔE_{ab} e ΔE_{00} , e o índice de clareamento foi calculado nos dois tempos de avaliação. A rugosidade da superfície das amostras branqueadas foi medida por microscópio de força atômica. Os dados foram analisados por ANOVA One way ou ANOVA two way de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os menores valores de alterações de cor (medidos por WI, ΔE_{ab} ou ΔE_{00}) foram observados para luz violeta e ozônio usados na ausência de peróxido de hidrogênio. A luz violeta associada ao peróxido de hidrogênio não foi capaz de melhorar as alterações de cor observadas apenas para o peróxido, mas a combinação de ozônio e peróxido de hidrogênio produz as maiores alterações de cor. Independentemente do protocolo de clareamento, o esmalte branqueado apresentou maiores teores de PO₄ e CO₃-2 do que os observados na linha de base. Não foi observada diferença significativa entre os protocolos de branqueamento testados em relação à rugosidade da superfície do esmalte branqueado. É possível concluir que a luz violeta ou o ozônio tiveram efeitos reduzidos na mudança de cor do esmalte quando usados sozinhos. A terapia com ozônio melhorou o efeito clareador de 35% de peróxido de hidrogênio. Todos os protocolos avaliados resultaram em modificações semelhantes na superfície do esmalte.

Palavras chaves: clareamento, peróxido de hidrogênio, estrutura morfológica, ozônio, luz violeta

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the bleaching effect and physicochemical on enamel of a violet light and ozone, associate or not to hydrogen peroxide, compared to 35% hydrogen peroxide. Enamel-dentin blocks from human molars were randomly allocated to receive one of following bleaching protocols (n=15): 35% hydrogen peroxide, violet light, ozone, the association between hydrogen peroxide with ozone or violet light. All protocols were performed in two sessions with a 48h interval between them. Color (spectrophotometer) and mineral composition (Raman spectroscopy) of tooth were measured before and after the bleaching procedures. Color changes were calculated by ΔE_{ab} and ΔE_{00} , and whitening index was calculated in both assessment times. Surface roughness of bleached specimens was measured by atomic force microscope. Data were analyzed by One-way ANOVA or two-way repeated measure ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Lowest values of color changes (either measured by WI, ΔE_{ab} or ΔE_{00}) were observed for violet light and ozone used in absence of hydrogen peroxide. Violet light associate to hydrogen peroxide was unable to improve the color changes observed for the peroxide alone but combining ozone and hydrogen peroxide yield the highest color changes. Irrespective of bleaching protocol, the bleached enamel presented higher contents of PO_4 and CO_3^{2-} than those observed at baseline. No significant difference was observed between the tested bleaching protocols regarding the surface roughness of bleached enamel. It is possible to conclude that either violet light or ozone had reduced effects on the enamel color change when used alone. Ozone therapy improved the bleaching effect of 35% hydrogen peroxide. All evaluated protocols resulted in similar modification on enamel surface.

Key-words: bleaching, hydrogen peroxide, morphological structure, ozone, violet light

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O tema estética dental quando abordado no Brasil, se refere a dentes alinhados e brancos, sendo fundamental para a aparência tão supervalorizada, além de ser um fator de autoestima crucial para os relacionamentos interpessoais. Dessa forma, podemos afirmar que a procura por dentes brancos pode estar relacionada a razões sociais, profissionais e psicológicas. (Zanjani VA et al., 2015; AL-Omiri MK et al., 2016).

Alterações na cor da estrutura dentária podem ser decorrentes de fatores extrínsecos ou intrínsecos. As manchas extrínsecas geralmente são adquiridas do meio e estão associadas a substâncias, corantes como café e tabaco, ao acúmulo de placa e ao uso de alguns tipos de medicamentos. Essas manchas são superficiais e de fácil remoção. As alterações intrínsecas podem ser congênitas - relacionadas à formação dos dentes - ou adquiridas através de um trauma dental, mortificação pulpar e fluorose. Os pigmentos estão incorporados na estrutura dental e são removidos apenas pelo clareamento ou por procedimentos mais invasivos que implicam no desgaste e/ou restauração dos dentes (de Geus et al, 2018; Schemel-Suarez, 2017).

Atualmente a maior preocupação na área da estética dental é desenvolver técnicas de clareamento que não produzam efeitos colaterais como a sensibilidade dentinária, ou alterações na superfície do esmalte relacionadas à alteração química e morfológica. (Lago et al. 2016). Há técnicas que usam apenas a luz para clareamento dentário, sem a utilização do gel. A luz violeta, (LED) tem sido usada atualmente tanto em conjunto com o gel quanto isoladamente. O LED violeta representa uma nova modalidade de clareamento dental que não utiliza gel, mas apenas luz visível, que no comprimento de onda adequado promove a quebra das moléculas pigmentadas gerando clareamento dental (Gallinari et al. 2018).

A renovação na área vai além, com o surgimento das técnicas de ozonioterapia na odontologia. O ozônio é um gás natural que é composto por três átomos de oxigênio (O₃). É um agente altamente oxidante, capaz de participar em diversas reações químicas com substâncias orgânicas e inorgânicas. O seu uso clínico se dá através de uma mistura de oxigênio e ozônio puro, com uma taxa de 0,05 a 5% de ozônio e 95 a 99,95% de oxigênio. A eficácia da exposição a curto prazo ao ozônio foi demonstrada em diferentes estudos, mas ainda há necessidade de padronização do seu protocolo de uso (Zanjani et al., 2015; Al-Omiri et al., 2016).

Diante das condições gerais e no intuito de melhorar os resultados clínicos obtidos e minimizar os efeitos colaterais promovidos pelos procedimentos de clareamento com peróxido de hidrogênio, ozônio e luz violeta, este estudo visa avaliar a eficácia de diferentes técnicas de clareamento e seus efeitos na rugosidade e estrutura química do esmalte.

1. CAPÍTULO 1

Artigo 1

Ozone or violet light can improve tooth color change and physicochemical properties of bleached enamel with hydrogen peroxide?

Tooth bleaching with hydrogen peroxide, violet light or ozone

***Artigo a ser enviado para o periódico Operative Dentistry**

Clinical Relevance

Bleaching protocols using violet light and ozone results in similar effects on physicochemical properties of bleached enamel than those observed for 35% hydrogen peroxide, but these alternative approaches require their association with hydrogen peroxide to yield improved bleaching effect.

ABSTRACT

Purpose: To assess the bleaching effect and physicochemical on enamel of a violet light and ozone, associate or not to hydrogen peroxide, compared to 35% hydrogen peroxide.

Methods and Materials: Enamel-dentin blocks from human molars were randomly allocated to receive one of following bleaching protocols (n=15): 35% hydrogen peroxide, violet light, ozone, the association between hydrogen peroxide with ozone or violet light. All protocols were performed in two sessions with a 48h interval between them. Color (spectrophotometer) and mineral composition (Raman spectroscopy) of tooth were measured before and after the bleaching procedures. Color changes were calculated by ΔE_{ab} and ΔE_{00} , and whitening index was calculated in both assessment times. Surface roughness of bleached specimens was measured by atomic force microscope. Data were analyzed by One-way ANOVA or two-way repeated measure ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Results: Lowest values of color changes (either measured by WI, ΔE_{ab} or ΔE_{00}) were observed for violet light and ozone used in absence of hydrogen peroxide. Violet light associate to hydrogen peroxide was unable to improve the color changes observed for the peroxide alone but combining ozone and hydrogen peroxide yield the highest color changes. Irrespective of bleaching protocol, the bleached enamel presented higher contents of PO_4 and CO_3^{2-} than those observed at baseline. No significant difference was observed between the tested bleaching protocols regarding the surface roughness of bleached enamel.

Conclusions: Either violet light or ozone had reduced effects on the enamel color change when used alone. Ozone therapy improved the bleaching effect of 35% hydrogen peroxide. All evaluated protocols resulted in similar modification on enamel surface.

Key-words: bleaching, hydrogen peroxide, morphological structure, ozone, violet light

INTRODUCTION

Tooth bleaching is commonly procedure used to improve the esthetic appearance of patients because is a simple, effective and conservative method. Patients that were submitted to tooth bleaching have better assessment of a psychological adjustment and social relationship.^{1, 2}

Despite the at-home techniques are largely used by patients, in-office bleaching technique remains being performed mainly when the use of trays are contra-indicated. Due the use of highly-concentrated peroxides, higher risk of tooth sensibility has been observed for in-office techniques than those performed at-home.³ The presence of peroxides and their sub-products can reach the pulpal chamber activating the TRPA1 channel (transient receptor potential cation channel with ankyrin domain-type), associated with pain caused by oxidizing agents, including hydrogen peroxide.⁴ Furthermore, some effects on enamel such as increasing roughness, decreasing mechanical properties and increasing demineralization have been mentioned after the use highly-concentrated peroxides over the enamel.⁵ Therefore, several studies have proposed others techniques for tooth bleaching, including the use of reduced peroxide concentrations, whiteners whit higher pH and/or containing calcium or⁶ desensitizers agents,⁶ and the use violet light,⁷ or ozone.⁸ All these protocols claim for reducing or minimizing the tooth sensitivity or phisyochemycal damages on dental structures.

The violet light-emitting diodes (LED) and the ozone have been described as techniques that allows performing the bleaching process associated or not to peroxides, and it can be used even for patients with dentin hypersensitivity.⁹ It has been described that wavelength range of violet light coincides with the absorption peak of pigment molecules, which are breakdowned into smaller and colorless components.^{7, 10} The ozone (trioxygen) is a strong oxidizing agent, and it has been demonstrated that this agent have similar bleaching ability to hydrogen peroxide 37.5% or carbamide peroxide 45% on tetracycline stained teeth.¹¹ Furthermore, ozone seems to produce less effect on enamel surface and tooth sensitivity.^{8, 12, 13}

Since lack information is available regarding the effectiveness of violet light and ozone on tooth bleaching procedure, this study aimed to assesses the bleaching effect and physicochemical on enamel of a violet light and ozone, associate or not to hydrogen peroxide, compared to 35% hydrogen peroxide. The null hypothesis were that (1) the use of ozone or violet light does not interfere the bleaching effectiveness, and (2) does not alter roughness or mineral composition of bleached enamel when compared to use of 35% hydrogen peroxide alone.

MATERIALS AND METHODS

Specimens Preparation

Seventy-five third molars free of cracks and caries, structural defects or restorations were used in this study. The teeth were extracted after authorization from the committee. The teeth were cleaned with periodontal curettes and ultrasound followed by prophylaxis with rubber cup and pumice. The teeth were cleaned and stored in deionized water until use, for no more than 1 month.

Enamel-dentin blocks (7 mm x 7 mm x 4mm of thickness) was removed from vestibular surface of molars. These blocks were included in acrylic resin cylinders and randomly allocated according bleaching protocol (n=15) (Table 1). For all protocols, two bleaching sessions were performed with 48 hours interval of them¹⁴ and in a controlled room temperature.

Measurements of Color Change

The specimens` color was measured using a visible/ultraviolet reflection spectrophotometer (Ci64UV, X-Rite, Grand Rapids, MI, USA) using the color system established by the Commission Internationale de L'Eclairage (CIE), which is based on the dimensions L* (white to black) a* (red to green) and b* (yellow to blue). The color was measured at baseline and 7 days after ending the bleaching procedures placing the specimens in the same position for both measurements . Specimens were positioned in focus on a clear acrylic stand, and the measurements were performed with a standard illuminant D65, in the wavelength ranging from 400 to 700 nm, and with the specular light included (SPIN mode). Due to sphere geometry of spectrophotometer, the object was illuminated diffusely, and the detector received the reflected light at an 88 angle from the surface of the enamel. The color measurements were performed in triplicate over a white background ($L^*_{\text{white}} = 95.2$, $a^*_{\text{white}} = 21.2$, $b^*_{\text{white}} = 5.03$), and the average used in data analysis. The whitening indexes (WI) were calculated at baseline and after bleaching protocols using the following formula: $WI = 0.551L^* - 2.324a^* - 1.1b^*$.¹⁵ Overall color changes from baseline were calculated using both ΔE_{ab} and ΔE_{00} formulas.¹⁶

Raman Analysis

Before and after the bleaching protocols, the enamel surface of specimens was analyzed using Raman spectroscopy (RFS 100/S, Bruker Inc., Karlsruhe, Germany). The analyses before treatment were used as a control (baseline). To excite the spectra, a focused 1064.1nm beam of an air-cooled Nd:YAG laser source was used. Maximum incident laser power on the sample surface was ~ 100 mW and spectrum resolution was 4 cm⁻¹. The Raman spectra were obtained using 100 scans and one spectrum was collected for each sample, using a central point on the enamel surface. The lower limit

of laser penetration depth was ~ 500 nm. Frequency of spectra ranged from $400\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ in the region of interest, thereby allowing a characterization of both mineral (hydroxyapatite) and organic constituents. The peaks analyzed were in the following Raman vibrational stretching modes corresponding to 431 cm^{-1} , 581 cm^{-1} , 960 cm^{-1} and 1025 cm^{-1} phosphate (PO) and carbonate (CA) (1070 cm^{-1}).¹⁷

For the Raman analysis, the specimens were positioned over a glass slide in the sample holder compartment, and an IR354 lens collected radiation over 90° on the enamel surface. The obtained spectra, in the readings before and after treatment, were analyzed using analytical software (Microcal Origin 5.0 Software, Inc., Northampton, MA, USA). The luminescent background was removed using baseline correction for each spectrum collected before performing relative comparison studies of organic and inorganic content. The spectra were corrected in baseline and then normalized by the mean. The band fitting of characteristic peaks was performed using a combined Gaussian+ Lorentzian function to determine the exact position, peak intensities and areas, as previously reported.^{17, 18}

Atomic Force Microscope Analysis

Atomic force microscope (AFM) SPM-9600 (Shimadzu, Tokio, Japão) was used to evaluate the topography of the specimens, within an area of $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$, scanning of $0,30\text{Hz}$, in two different positions in the center of the sample. All AFM measurements were conducted with the tip working in AC-mode (tapping mode) and the average values from AFM roughness (S_a) measurements were submitted to statistical analysis. The force between the AFM tip and the sample surface was kept constant by the microscope feedback system while the sample surface was scanned below the AFM tip and the vertical piezoelectric ceramic motion was recorded. Cantilevers with a constant spring of 48 N/m and with monolithic silicon tips smaller than 10 nm radius (model Tap190Al-G, Sunnyvale, CA, USA) were used. The WSxMV 3.1 software (Gwyddion) transformed the obtained data in 3D images for subsequent analysis of the results. The results were 3D images of the surface of each specimen were made before and after the application of the bleaching techniques

Statistical analysis

Data were tested for normal distribution (Shapiro–Wilk) and equality of variances (Levene's test), followed by parametric statistical tests. One-way ANOVA followed by Tukey's test were used for ΔE_{ab} and ΔE_{00} parameters and ratio PO/CA. Two-way RM ANOVA were used for PO, CA, WI and surface roughness parameters. The significance level was set at 95% for all analyses. All analyses were performed using the SigmaPlot.12.5 statistical software package (Systat Software Inc., Germany).

RESULTS

Measurement of Color Changes

For WI data, two-way repeated measures ANOVA on ranks showed the assessment time, was significant ($P < 0.001$). The results for WI are presented in Table 2. Similar WI values at baseline was observed between the specimens allocated for each protocol, demonstrating that the randomization was able to balance the initial color of specimens among the treatments. The use of hydrogen peroxide increased WI either used alone or associated with ozone or violet light. Using only ozone or violet light was unable to yield some WI increase. One-way ANOVA demonstrated that the bleaching protocols affected the WI changes ($p < 0.001$). Mean WI change values demonstrated that clinically relevant changes were only observed in presence of hydrogen peroxide. Compared to the use of hydrogen peroxide alone, only the association of this agent with ozone was able to significantly improve the mean values of WI increase.

One-way ANOVA showed that the bleaching protocol affected both ΔE_{ab} and ΔE_{00} ($p < 0.001$ for both outcomes). Table 3 presents the results of the overall color changes according to the bleaching protocols. Hydrogen peroxide associated with ozone presented highest values of ΔE_{ab} , and violet light alone the lowest. Hydrogen peroxide used alone or associated with violet light yield similar ΔE_{ab} . The use of ozone isolated resulted in similar ΔE_{ab} to both hydrogen peroxide and violet light. Highest overall color change was observed by associating ozone and hydrogen peroxide when data of ΔE_{00} were analyzed, but without statistical difference for violet light associated to hydrogen peroxide. However, the values of ΔE_{00} observed for hydrogen peroxide alone were increased only when this whitener was associated to ozone. Either ozone or violet light used alone resulted in the lowest values of ΔE_{00} .

The behavior of parameters L^* , a^* and b^* according to bleaching protocols and assessment times are shown in Figure 1. Some increase on lightness within the bleaching procedure was observed for the use hydrogen peroxide associate to ozone and violet light alone, whereas a reduction on lightness was observed when only ozone was applied on enamel. In general, the bleaching protocols resulted in reduction on redness (except ozone alone) and yellowness.

Structural Chemical Analysis

Table 4 shows the Y values for each peak before and after bleaching. The spectrum for enamel surfaces and the results of peak area are shown in Figure 2. The two-way repeated measure showed that the five groups had the same peak positions but the intensities were different in the peak 1025 cm^{-1} PO_4 ($P = 0.025$) and 1070 cm^{-1} CO_3^{2-} ($P = <0.001$) in relation to time, with an increasing after bleaching, regardless techniques (Figure 2).

For the Phosphate peaks at 431cm^{-1} , 581 cm^{-1} and 960 cm^{-1} there is not a statistically significant difference in bleaching protocols, assessment time and the interaction between them. The phosphate carbonate ratio for the peaks of 431, 581 and 960 was reduced after bleaching, regardless of the group. For the 1025 peak there was no change.

Surface roughness analysis

The values for average roughness (Sa) were analyzed and the differences in the median values among the treatment groups had not statistically significant difference ($P = 0.171$). Representative images were present in Figure 3.

DISCUSSION

The use of alternative therapies avoiding the use of hydrogen peroxide in the dental bleaching procedure has been increased aiming to reduce tooth sensitivity and preserving of structural normality of the dental substrate. This study evaluated five bleaching protocols, including very controversies ozone and violet light with or no association with hydrogen peroxide, comparing its efficacy and results with the hydrogen peroxide gel used in isolation. The results were evaluated using the ΔE , which describes color change on three dimensions of color, L^* , a^* , and b^* (CIELab System) values above 3.3 are considered clinically discernible color changes proving the effectiveness of bleaching procedures.^{13, 19}

Therefore, the first hypothesis of the study was rejected. The proposed whiteness index (WI) is a simple linear formulation, obtained using the values of the three CIELab chromatic coordinates.²⁰ It represents a significant step for the assessment of color change in bleaching, since in addition to avoiding subjective factors in the dental color measurement and correlates to perception of tooth whiteness. Using this method, the results are more clinically relevant and has clearer interpretation: high positive values of the WI index indicate higher whiteness values.¹⁵ Observing the WI results after bleaching protocols, it was observed that violet light and ozone alone promoted no changing on WI parameters. Additionally, the low values of ΔE were also presented by these groups (below 3.3), suggesting that the degree of bleaching induced by these protocols has low visual perception, and also low effectiveness of the bleaching, when used in isolation.

HP tested protocol promoted increasing on WI parameter; when used in isolation or associated with other protocols. A tendency of more intensive increasing was observed when HP was used in association ozone, especially when analyzed the ΔE parameter. Ozone acts as a potentiator, an effect that can be analyzed not only by the change in ΔE and the change in values of a^* b^* (blue/yellow pigment) but also by WI, which represents the clinical result of the bleaching effect. Ozone is an unstable gas that rapidly releases nascent oxygen molecules to form oxygen and can oxidize the components responsible for tooth discoloration, chromophore groups may be broken by ozone,

forming smaller molecules, resulting in a tooth bleaching effect by one of three mechanisms (bonding mechanism, substitution mechanism or cleavage mechanism).²¹

The protocol using ozone associated with peroxide has reduced the time HP use, as described in Table 1. The time of the gel was reduced by 1/4 of the time used with the peroxide alone, and even then, there were satisfactory alterations with respect to WI and ΔE . Using a shorter time gel on the tooth surface would minimize structure risks caused by the bleaching procedure. Besides that, ozone use has been associated with no pain after bleaching with hydrogen peroxide.⁹ Comparing clinically the efficacy of 35% hydrogen peroxide with and without ozone application for 60 seconds, the association of the two products obtained more satisfactory results, teeth lighter, larger values of L.^{8, 21} The efficacy of short-term exposure to ozone has been demonstrated in different studies in controversy way. One of them used ozone for stains caused by tetracycline, being effective in three to five minutes at a concentration of 2100 ppm \pm 5% and flow rate of 615cc / min.¹¹ Other laboratorial study, with similar concentration and flow rate, found ozone has no synergistic effect when is used simultaneously with hydrogen peroxide.²² Thus, the most effective ozone bleaching protocol is not yet well established, and these differences between them, such as gas pressure, time and use can alter results, and effectiveness may be associated with these factors. Thus, studies would be needed in order to clarify better which times of gas use and pressure would be safer for clinical use in patients.

The proposal of the use of Violet light is based on the advantage that light sources accelerate the decomposition and form a greater amount of free radicals.²³ The results show that the association with 35% hydrogen peroxide with violet light does not increase the effectiveness of bleaching, and according to the current literature, it is shown that for high concentrations of peroxide this association is not necessary. After 7 days of lightening with violet light, the value of ΔE found below 3.3 shows that there was not enough color change to be considered acceptable for the minimum bleaching effect, and this is due to the low penetration power of violet light, it is not possible to cross the crystals of hydroxyapatite and to break the chromophores molecules.²⁴ Thus, activation by light for office bleaching does not improve the bleaching efficacy, as was found by other authors,^{25, 26} showing that clinically there is an increase in the cost of the procedure without bringing benefits.

To establish the effectiveness of bleaching is mandatory to combine the efficiency with no alteration on tooth substrate. In this study, changes on in the structure of the enamel after bleaching were observed. Therefore, the second hypothesis was rejected, because all bleaching protocol can modify the mineral composition of enamel after bleaching, however they were not able to modify the surface roughness. Superficial roughness is clinically relevant as this results in extrinsic staining, bacteria adhesion (*S. Mutans*), plaque maturation, and periodontal disease, irrespective of etiological factors.²⁷ Pigments adhere to the rough surfaces, especially to those of bleached enamel, more easily than to the original tooth surfaces, resulting in more discoloration, and research suggest that repeating the bleaching procedure may increase the adhesion of *S. Mutans*.²⁸

The pH of the bleaching gel was considered to be responsible for the change in the enamel, and gels at high concentrations, with lower pH and less stable tend to promote greater changes in dental structure.²⁹ This is probably the case when bleaching products substances of acid pH of at least 5.2, because this pH is sufficient to lead to enamel demineralization, with changes in mineral and organic composition. However, the bleaching product used in the present study was Whitniss HP Automix Whitening, that it presents a more stable pH,³⁰ and presents in the formulation a source of soluble calcium in the bleaching agent, which aims to contribute to the maintenance of the integrity of the dental enamel when it is bleached,³¹ because mineral loss is minimized by the addition of F and Ca to bleaching agents.³² Therefore, this may be the reason for no increasing on surface roughness structure in the enamel. This shows that the protocols used are safe with respect to the change in surface morphology. Protocols where it is used only or violet light or ozone are not able to change the surface since the bleaching procedure is not effective.

Considering the chemical changes, the best way to evaluate would be through Raman spectroscopy, a nondestructive method used to analyze the molecular composition of different substances, it is ideal for analyzing inorganic surface tissue (for example the concentration of molecules of phosphate and carbonate). It is possible to obtain information about minerals through the observation of their energy via excitation of the vibrational modes.¹⁸ The analysis of the samples in Raman is able to identify information about the chemical and molecular composition of the enamel, through the peaks that indicate the presence of carbonate and phosphate.³³

Gaps are presented between the hydroxyapatite crystals, making the enamel molecules susceptible to substitutions. Carbonate ions are able to replace hydroxyl or phosphate ions.¹⁸ The carbonate composes 2-5% of the enamel, and can be considered as an important factor that influences the mechanical properties of the enamel. The increase of the carbonate reduces the crystallinity of the enamel, also reducing the hardness and modulus. The lower the crystallinity, the more susceptible becomes the enamel to the acid attack, caries and demineralization, and this leads to smaller changes with respect to surface roughness.³³

On the other hand, the increase of the phosphate in the surface of the enamel presents beneficial effects with respect to the chemical structure. Phosphate has been proved to exert cariostatic action, reduces enamel solubility, and acts as a buffer in neutralizing salivary, bacterial, plaque, and food pH values. Phosphates interfered with enzymatic processes on enamel surfaces to increase host resistance, decreases bacterial adhesion, and interferes with synthesis of extracellular polysaccharide formation. Finally, phosphate maintains plaque calcium and phosphorus level.³⁴

In summary, the present study demonstrated that alternative protocols such as violet light and ozone without hydrogen peroxide do not have satisfactory effects on the color of enamel. Peroxide is essential for these techniques to be effective. In addition, the enamel presented no clinically significant changes in its chemical and morphological structure in any of the protocols used.

CONCLUSION

- Considering the protocols used, violet light and ozone when used alone do not have satisfactory effects on the change in enamel color.
- The protocol that uses ozone with hydrogen peroxide presents the highest ΔE .
- The bleaching was no influence the enamel roughness, but it increases intensities in the peak 1025 cm^{-1} PO_4 and 1070 cm^{-1} CO_3^{-2} , regardless of the technique.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

REGULATORY STATEMENT

This study was conducted in accordance with all the provisions of the local human subjects oversight committee guidelines and policies of Dental School of Patos de Minas. The approval code for this study is #79760717.5.0000.8078.

REFERENCES

1. Polydorou, O; Wirsching, M; Wokewitz, M; Hahn P (2013) Three-Month Evaluation of Vital Tooth Bleaching Using Light Units — A Randomized Clinical Study Operative Dentistry **38(1)** 21–32, <https://doi.org/10.2341/12-041-C>.
2. Moritz BCALA (2016) Enamel Surface Changes After Exposure to Bleaching Gels Containing Carbamide Peroxide or Hydrogen Peroxide Operative Dentistry **41(1)** 1–9, <https://doi.org/10.2341/15-010-L>.
3. Rezende M, Loguercio AD, Kossatz S, & Reis A (2016) Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: A multi regression and logistic analysis Journal of Dentistry **45** 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.11.003>.
4. Markowitz K (2010) Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? Medical Hypotheses **74(5)** 835–840, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.11.044>.
5. Lago ADN, Ferreira WDR, & Furtado GS (2017) Dental bleaching with the use of violet light only: Reality or Future? Photodiagnosis Photodynamic Therapy **17(October 2017)** 124–126, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.11.014>.
6. Rezende M, Chemin K, Vaez SC, Peixoto AC, Rabelo J de F, Braga SSL, Faria-e-Silva AL, Silva GR da, Soares CJ, Loguercio AD, & Reis A (2018) Effect of topical application of dipyrone on dental sensitivity reduction after in-office dental bleaching: A randomized, triple-

- blind multicenter clinical trial *Journal of the American Dental Association* **149(5)** 363–371, <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.11.003>.
7. Gallinari M, Fagundes T, da Silva L, de Almeida Souza M, Barboza A, & Briso A (2019) A New Approach for Dental Bleaching Using Violet Light With or Without the Use of Whitening Gel: Study of Bleaching Effectiveness *Operative Dentistry* **44(5)** 521–529, <https://doi.org/10.2341/17-257-l>.
 8. Al-Omiri MK, Al Nazeh AA, Kielbassa AM, & Lynch E (2018) Randomized controlled clinical trial on bleaching sensitivity and whitening efficacy of hydrogen peroxide versus combinations of hydrogen peroxide and ozone *Scientific Reports* **8(1)** 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20878-0>.
 9. Rastelli AN de S, Dias HB, Carrera ET, de Barros ACP, dos Santos DDL, Panhóca VH, & Bagnato VS (2018) Violet LED with low concentration carbamide peroxide for dental bleaching: A case report *Photodiagnosis Photodynamic Therapy* **23** 270–272, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.021>.
 10. Zanin F (2016) Recent Advances in Dental Bleaching with Laser and LEDs *Photomedicine and Laser Surgery* **34(4)** 135–136, <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4111>.
 11. Tessier, J; Rodriguez, PN; Lifshitz, F; Friedman, SM; Lanata E (2010) The use of ozone to lighten teeth. An experimental study. *Acta Odontologica Latinoamericana* **23(2)** 84–89.
 12. Azarpazhooh A, & Limeback H (2008) The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature *Journal of Dentistry* **36(2)** 104–116, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.11.008>.
 13. Santana MS, Bridi EC, Navarro RS, de Lima CJ, Fernandes AB, do Amaral FL, França FM, Turssi CP, & Basting RT (2016) Dental bleaching with ozone: effects on color and enamel microhardness *Acta Odontologica Latinoamericana* **29(1)** 68–75.
 14. De Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, Loguercio AD, & Reis A (2015) In-office bleaching with a two- and seven-day intervals between clinical sessions: A randomized clinical trial on tooth sensitivity *Journal of Dentistry* **43(4)** 424–429, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.009>.
 15. Pérez MDM, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD, & Herrera LJ (2016) Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space *Dental Materials* **32(3)** 461–467, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.008>.
 16. Miotti LL, Santos IS, Nicoloso GF, Pozzobon RT, Susin AH, & Durand LB (2017) The use of resin composite layering technique to mask discolored background: A CIELAB/CIEDE2000 analysis *Operative Dentistry* **42(2)** 165–174, <https://doi.org/10.2341/15-368-L>.
 17. Taube F, Marczewski M, & Norén JG (2015) Deviations of inorganic and organic carbon content in hypomineralised enamel *Journal of Dentistry* **43(2)** 269–278, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.003>.

18. Vargas-Koudriavtsev T, & Herrera-Sancho ÓA (2017) Effect of tooth-bleaching on the carbonate concentration in dental enamel by Raman spectroscopy *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **9(1)** e101–e106, <https://doi.org/10.4317/jced.53145>.
19. Association AD (2006) Guidelines Dentist-dispensed Home-use Tooth Bleaching Products .
20. Araujo FS, Barros MCR, Santana MLC, de Jesus Oliveira LS, Silva PFD, Lima G da S, & Faria-e-Silva AL (2018) Effects of adhesive used as modeling liquid on the stability of the color and opacity of composites *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **30(5)** 427–433, <https://doi.org/10.1111/jerd.12378>.
21. AL-Omiri MK, Hassan RSA, AlZarea BK, & Lynch E (2016) Effects of combining ozone and hydrogen peroxide on tooth bleaching: A clinical study *Journal of Dentistry* **53** 88–93, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.08.002>.
22. Zanjani VA, Ghasemi A, Torabzadeh H, Jamali M, Razmavar S, & Baghban AA (2015) Bleaching effect of ozone on pigmented teeth *Dental Research Journal* **12(1)** 20–24, <https://doi.org/10.4103/1735-3327.150295>.
23. de Oliveira BP, Souza Rastelli AN, Salvador Bagnato V, & Hugo Panhoca V (2017) Dental Bleaching Using Violet Light Alone: Clinical Case Report *Dentistry* **7(11)** 459, <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000459>.
24. Harlow JE, Rueggeberg FA, Labrie D, Sullivan B, & Price RB (2016) Transmission of violet and blue light through conventional (layered) and bulk cured resin-based composites *Journal of Dentistry* **53** 44–50, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.06.007>.
25. Maran BM, Ziegelmann PK, Burey A, de Paris Matos T, Loguercio AD, & Reis A (2019) Different light-activation systems associated with dental bleaching: a systematic review and a network meta-analysis *Clinical Oral Investigation* **23(4)** 1499–1512, <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02835-x>.
26. SoutoMaior JR, de Moraes S, Lemos C, Vasconcelos B do E, Montes M, & Pellizzer EP (2019) Effectiveness of Light Sources on In-Office Dental Bleaching: A Systematic Review and Meta-Analyses *Operative Dentistry* **44(3)** E105–E117, <https://doi.org/10.2341/17-280-L>.
27. Varanda E, Do Prado M, Simão RA, & Dias KRHC (2013) Effect of in-office bleaching agents on the surface roughness and morphology of different dental composites: An AFM study *Microscopy Research and Technique* **76(5)** 481–485, <https://doi.org/10.1002/jemt.22190>.
28. Khoroushi M, Shirban F, Doustfateme S, & Kaveh S (2015) Effect of three nanobiomaterials on the surface roughness of bleached enamel *Contemporary Clin Dentistry* **6(4)** 466–470, <https://doi.org/10.4103/0976-237X.169853>.
29. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, & Rees JS (2004) The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: An in vitro study *Journal of Dentistry* **32(4)** 295–299, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.01.003>.
30. Trentino AC, Soares AF, Duarte MAH, Ishikiriama SK, & Mondelli RFL (2015) Evaluation of

- pH levels and surface roughness after bleaching and abrasion tests of eight commercial products *Photomedical Laser Surgery* **33(7)** 372–377, <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3869>.
31. Borges AB, Torres CRG, De Souza PAB, Caneppele TMF, Santos LFTF, & Magalhães AC (2012) Bleaching gels containing calcium and fluoride: Effect on enamel erosion susceptibility *International Journal of Dentistry*, <https://doi.org/10.1155/2012/347848>.
 32. Cavalli V, Rosa DA da, Silva DP da, Kury M, Liporoni PCS, Soares LES, & Martins AA (2018) Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels *Journal of Applied Oral Science* **26** e20170589, <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0589>.
 33. Xu, C; Reed, R; Gorski, JP; Wang, Y; Walker M (2011) The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties *Journal of Materials Science* **47(23)** 8035–8043, <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>. Predictive.
 34. Venkatesan S, Narayan G, Ramachandran A, & Indira R (2012) The effect of two bleaching agents on the phosphate concentration of the enamel evaluated by Raman spectroscopy: An ex vivo study *Contemporary Clinical Dentistry* **3(6)** 172, <https://doi.org/10.4103/0976-237x.101081>.

TABLE 1. Bleaching protocols tested.

Group	Bleaching protocols
HP	35% hydrogen peroxide (Whitniss HP Automixx, FGM, Joinville, Santa Catarina, Brazil). The gel was applied on enamel for 40 min. Subsequently, the bleaching gel was removed and enamel was washed with distilled water.
VL	Twenty cycles of 60 seconds irradiation from violet light with a wavelength of 405-410 nm (Bright Maxx Whitening Light Source, MMOptics, Ltda, São Paulo, Brazil), was performed on specimens. Each cycle involved one minute of irradiation followed by 30 seconds of rest. The equipment was positioned at 8 cm from the samples, with an angle of 90°.
VL+HP	Ten cycles of 60 seconds irradiation from violet light was performed on specimens. the equipment was positioned at 8 cm from the samples, with an angle of 90° After, HP was applied and more ten cycles was performed with gel on surface.
OZ	The specimens were placed in a sealed package and was exposed to ozone gas for 20 min, 60 microgram/mL concentration and 1L/min flow using an ozone machine (Ozone Generator Philozon Med Plus, Balneário Camburiú, SC, Brazil).
OZ + HP	After 10 minutes ozone exposure (OZ group), HP was applied by 10 minutes, the samples were washed with distilled water, and another 10 minutes of OZ application was performed.

TABLE 2 - Whitening indexes (standard deviation) of composite colors measured in each assessment time to 5 different bleaching protocols (n=15).

Bleaching protocols	Color parameters	
	Baseline	After bleaching
HP	30.0 (5.8) Ba	34.9 (3.2) Aab
VL	30.8 (5.8) Ba	31.5 (6.7) Bb
OZ	30.7 (4.9) Ba	34.0 (4.8) Bb
HP+VL	31.0 (7.6) Ba	37.5 (5.4) Aab
HP+OZ	29.7 (7.3) Ba	38.7 (5.8) Aa

Different letters (uppercase for comparing the bleaching effect – in lines; lowercase for comparing bleaching protocols – in columns) indicate significant difference (P<0.05).

TABLE 3 – Means and standard deviation of color parameters of the teeth after bleaching (n=15).

Bleaching protocols	ΔE
HP+OZ	6.5 ± 2.0 A*
HP+VL	4.6 ± 2.1 B*
HP	4.0 ± 1.6 BC*
OZ	2.5 ± 0.8 CD
VL	2.3 ± 1.3 D

Distinct letters indicate statistically significant difference ($P < 0.05$). * Values with clinically relevant change to ΔE

TABLE 4 – Means and standard deviation of Y values for phosphate and carbonate peaks before and after bleaching

	Baseline					After Bleaching				
	431 cm^{-1}	581 cm^{-1}	960 cm^{-1}	1025 cm^{-1}	1070 cm^{-1}	431 cm^{-1}	581 cm^{-1}	960 cm^{-1}	1025 cm^{-1}	1070 cm^{-1}
HP+OZ	0,032	0,036	0,305	0,016	0,072	0,032	0,036	0,302	0,017	0,081
	0,003	0,001	0,011	0,001	0,001	0,004	0,002	0,006	0,001	0,002
HP+VL	0,031	0,037	0,310	0,016	0,081	0,029	0,036	0,298	0,016	0,090
	0,002	0,001	0,022	0,001	0,001	0,002	0,002	0,015	0,002	0,001
HP	0,032	0,035	0,298	0,015	0,082	0,033	0,035	0,308	0,015	0,081
	0,002	0,002	0,010	0,001	0,002	0,004	0,002	0,015	0,001	0,003
OZ	0,034	0,038	0,302	0,016	0,074	0,032	0,037	0,301	0,017	0,079
	0,003	0,002	0,011	0,001	0,001	0,002	0,002	0,007	0,001	0,001
VL	0,032	0,038	0,308	0,016	0,074	0,032	0,036	0,296	0,016	0,080
	0,004	0,004	0,014	0,001	0,001	0,006	0,001	0,008	0,001	0,003

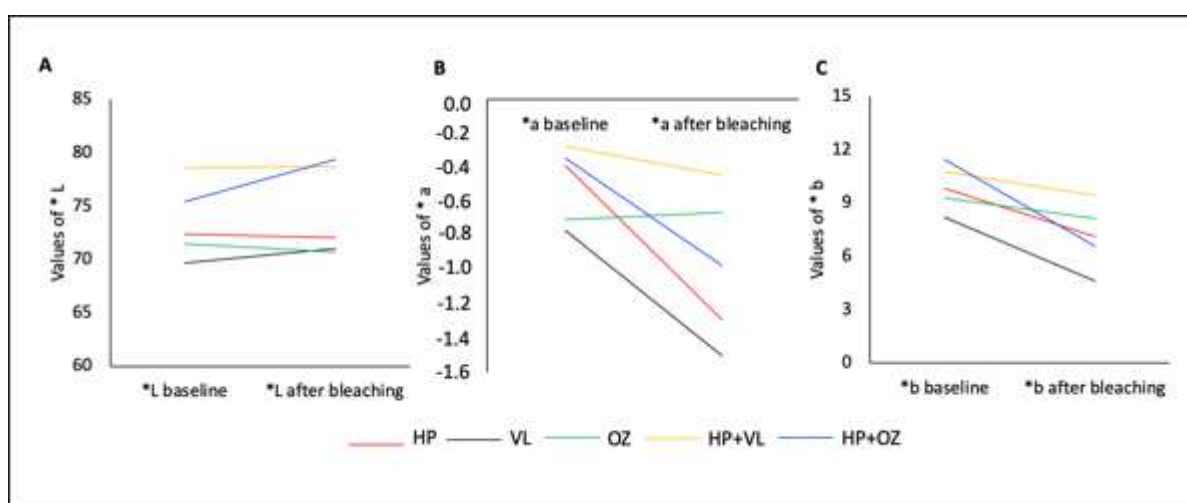


Fig. 1. Baseline and after bleaching values of * L , * a and * b.

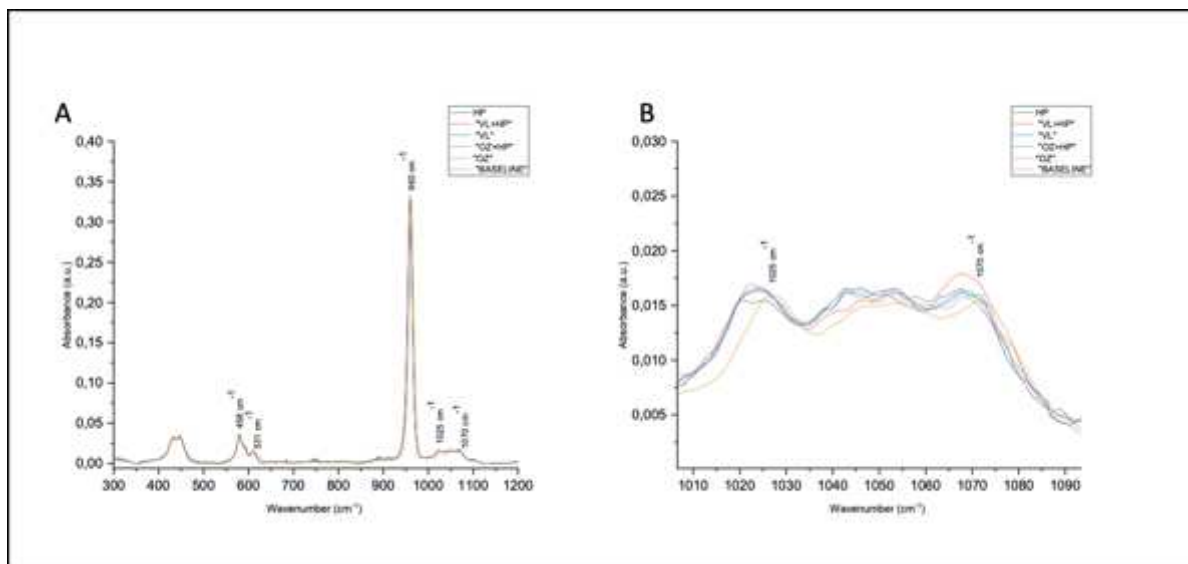


Fig. 2. A. Typical Raman spectrum with the phosphate and carbonate peaks. B. Raman spectrum for peaks 1025 cm^{-1} - phosphate and 1070 cm^{-1} carbonate

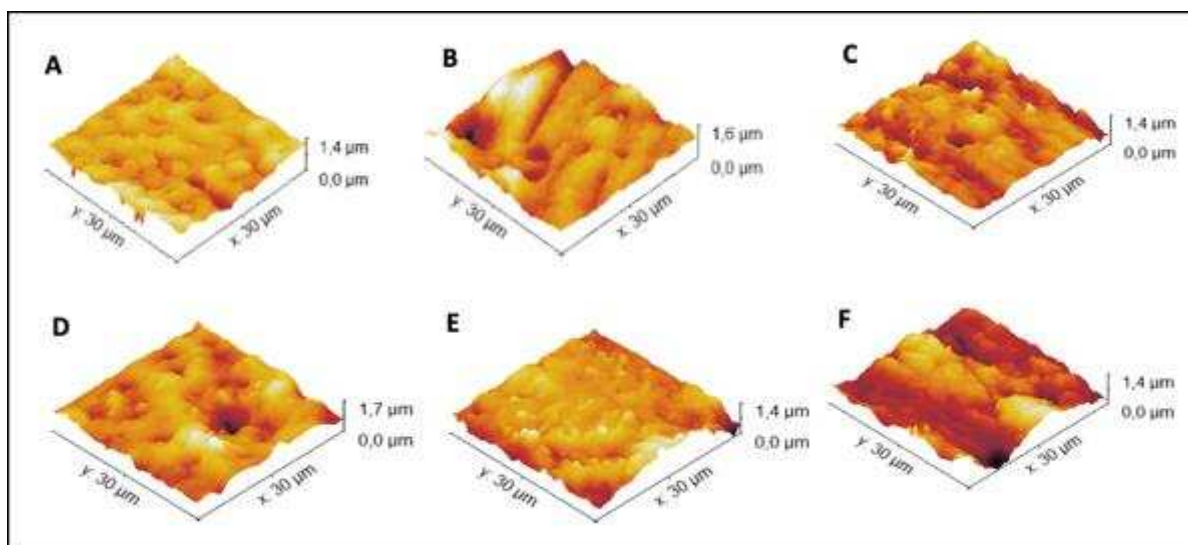


Figure 6: Atomic force microscopy images. A: Baseline; and sample submitted to: B. Hydrogen peroxide bleaching C. violet light bleaching; D. Violet light + hydrogen Peroxide bleaching E. Ozone bleaching F. Ozone +hydrogen peroxide bleaching.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo avaliou cinco protocolos de clareamento, incluindo muitas controvérsias sobre ozônio e luz violeta com ou sem associação com peróxido de hidrogênio, comparando sua eficácia e resultados com o gel de peróxido de hidrogênio usado isoladamente. Os resultados foram avaliados usando o ΔE , que descreve a mudança de cor em três dimensões de cor L^* , a^* e b^* (Sistema CIELab), e valores acima de 3,3 são considerados alterações de cor clinicamente discerníveis, comprovando a eficácia dos procedimentos de clareamento (Santana et al, 2016; ADA 2006). Utilizando também o índice de brancura proposto (WI) os resultados são mais relevantes clinicamente já que altos valores positivos do índice WI indicam dentes mais claros (Pérez et al, 2016). Os resultados do WI após protocolos de clareamento, mostraram que a luz violeta e o ozônio por si só não promoveram alterações no WI. Além disso, os baixos valores de ΔE também foram apresentados por esses grupos (abaixo de 3,3), sugerem que o grau de clareamento induzido por esses protocolos apresenta baixa percepção visual e também baixa efetividade do clareamento, quando utilizado isoladamente.

O protocolo testado pelo peróxido de hidrogênio promoveu o aumento do parâmetro WI; quando usado isoladamente ou associado a outros protocolos. Observou-se uma tendência de aumento mais intensivo quando o HP foi utilizado em associação ao ozônio, principalmente quando analisado o parâmetro ΔE . O ozônio atua como potenciador, um efeito que pode ser analisado não apenas pela mudança de ΔE e pela mudança nos valores de b^* (pigmento azul / amarelo), mas também por WI, que representa o resultado clínico do efeito de clareamento. O ozônio é um gás instável que libera rapidamente moléculas de oxigênio nascentes para formar oxigênio e pode oxidar os componentes responsáveis pela descoloração dos dentes; os grupos cromóforos podem ser quebrados pelo ozônio, formando moléculas menores, resultando em um efeito clareador (Al-Omiri et al, 2016).

O protocolo que utiliza ozônio associado ao peróxido reduziu o tempo de uso do peróxido de hidrogênio em 1/4 do tempo usado apenas com o peróxido e, mesmo assim, houve alterações satisfatórias em relação ao para WI e ΔE . Usar um gel de tempo mais curto na superfície do dente minimizaria os riscos de estrutura causados pelo procedimento de clareamento. A eficácia da exposição a curto prazo ao ozônio foi demonstrada em diferentes estudos de maneira controversa, o protocolo mais eficaz de clareamento com ozônio ainda não está bem estabelecido e essas diferenças entre eles, como pressão de gás, tempo e uso, podem alterar os resultados e a eficácia pode estar associada a esses fatores. Assim, seriam necessários estudos para esclarecer melhor quais tempos de uso e pressão de gás seriam mais seguros para uso clínico em pacientes.

A proposta do uso da luz violeta baseia-se na vantagem de que as fontes de luz aceleram a decomposição e formam uma quantidade maior de radicais livres (de Oliveira et al, 2017). Os resultados mostram que a associação de peróxido de hidrogênio a 35% à luz violeta não aumenta a eficácia do clareamento, e de acordo com a literatura atual, mostra-se que, para altas concentrações de peróxido, essa associação não é necessária. Após 7 dias de clareamento com luz violeta, o valor de ΔE

encontrado abaixo de 3,3 mostra que não houve mudança de cor suficiente para ser considerada aceitável como mínimo efeito de clareamento, e isso se deve ao baixo poder de penetração da luz violeta em atravessar os cristais de hidroxiapatita e romper as moléculas de pigmentos cromóforos (Harlow et al, 2016). Assim, a ativação da luz para clareamento de consultório não melhora a eficácia do clareamento, como foi encontrado por outros autores, mostrando que clinicamente há um aumento no custo do procedimento sem trazer benefícios (Maran et al, 2019; SoutoMaior et al, 2019).

Para estabelecer a eficácia do clareamento é obrigatório combinar a eficiência sem alterar o substrato dentário. Neste estudo, foram observadas alterações na estrutura do esmalte após o clareamento, e protocolo de clareamento pode modificar a composição mineral do esmalte após o clareamento, porém não foi capaz de modificar a rugosidade da superfície. A rugosidade superficial é clinicamente relevante, pois os pigmentos aderem às superfícies rugosas, especialmente às do esmalte clareado, mais facilmente do que nas superfícies originais dos dentes, resultando em mais descoloração, e pesquisas sugerem que repetir o procedimento de clareamento pode aumentar a adesão de S. Mutans (Khoroushi et al, 2015).

Os os géis em altas concentrações, com pH mais baixo e menos estável, tendem a promover maiores alterações na estrutura dentária.²⁹ Esse é provavelmente o caso do clareamento com substâncias de pH ácido de pelo menos 5,2, porque esse pH é suficiente para levar à desmineralização do esmalte, com alterações na composição mineral e orgânica. Entretanto, o produto clareador utilizado no presente estudo foi o Whitening HP Automix Whitening, que apresenta pH mais estável (Trentino et al, 2015), e apresenta na formulação uma fonte de cálcio solúvel no agente clareador, que visa contribuir para a manutenção da integridade do esmalte dentário quando clareado (Borges et al, 2012), porque a perda mineral é minimizada pela adição de F e Ca aos agentes clareadores (Cavalli et al, 2018). Portanto, esse pode ser o motivo de não aumentar a estrutura da rugosidade da superfície do esmalte. Isso mostra que os protocolos utilizados são seguros com relação à mudança na morfologia da superfície. Protocolos em que é usado apenas ou luz violeta ou ozônio não são capazes de alterar a superfície, pois o procedimento de clareamento não é eficaz.

Considerando as alterações químicas, a melhor maneira de avaliar seria através da espectroscopia Raman, onde é possível identificar informações sobre a composição química e molecular do esmalte, através dos picos que indicam a presença de carbonato e fosfato.³³São apresentadas lacunas entre os cristais de hidroxiapatita, tornando as moléculas do esmalte suscetíveis a substituições. Os íons carbonato são capazes de substituir os íons hidroxila ou fosfato (Vargas-Koudriavtsev et al, 2017). O carbonato compõe 2-5% do esmalte e pode ser considerado como um fator importante que influencia as propriedades mecânicas do esmalte. Nos resultados encontrados, independente do grupo, houve aumento de fosfato e carbonato. O aumento do carbonato reduz a cristalinidade do esmalte, reduzindo também a dureza e o módulo. Quanto menor a cristalinidade, mais suscetível se torna o esmalte ao ataque ácido, cárie e desmineralização, e isso leva a alterações menores em relação à rugosidade da superfície (Xu et al, 2011).

Por outro lado, o aumento do fosfato na superfície do esmalte apresenta efeitos benéficos em relação à estrutura química. Foi comprovado que o fosfato exerce ação cariostática, reduz a solubilidade do esmalte e atua como um amortecedor na neutralização dos valores de pH salivar, bacteriano, de placa e de alimentos. Os fosfatos interferiram com os processos enzimáticos nas superfícies de esmalte para aumentar a resistência do hospedeiro, diminuir a adesão bacteriana e interferir na síntese da formação de polissacarídeos extracelulares (Venkatesan et al, 2012).

Em resumo, o presente estudo demonstrou que protocolos alternativos, como luz violeta e ozônio sem peróxido de hidrogênio não tem efeitos satisfatórios na cor do esmalte. O peróxido é essencial para que essas técnicas sejam eficazes. Além disso, o esmalte não apresentou alterações clinicamente significativas em sua estrutura química e morfológica em nenhum dos protocolos utilizados.

CONCLUSÃO

Considerando os protocolos utilizados, a luz violeta e o ozônio, quando utilizados isoladamente, não têm efeitos satisfatórios na alteração da cor do esmalte. O protocolo que usa ozônio com peróxido de hidrogênio apresenta o ΔE mais alto. Nenhuma técnica de clareamento influenciou a rugosidade do esmalte, mas aumenta as intensidades no pico 1025 cm^{-1} Fosfato e 1070 cm^{-1} Carbonato, independentemente da técnica.

REFERÊNCIAS

- Zanjani VA, Ghasemi A, Torabzadeh H, Jamali M, Razmavar S, & Baghban AA. Bleaching effect of ozone on pigmented teeth. **Dent Res J**. 2015;12(1):20–24.
- de Geus JL, Beltrame FL, Wang M, Avula B, Khan IA, Loguercio AD, Kossatz S, Reis A. Determination of nicotine content in teeth submitted to prophylaxis and in-office bleaching by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Clin Oral Investig*. 2018; 22(9):3043-3051.
- Schemel-Suárez M, López-López J, Chimenos-Küstner E. Dental pigmentation and hemochromatosis: A case report. **Quintessence Int**. 2017;48(2):155-159.
- Lago ADN, Ferreira WDR, Furtado GS. Dental bleaching with the use of violet light only: Reality or Future? **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2017;17:124-126.
- Gallinari M, Fagundes T, da Silva L, de Almeida Souza M, Barboza A, & Briso A. A New Approach for Dental Bleaching Using Violet Light With or Without the Use of Whitening Gel: Study of Bleaching Effectiveness. **Oper Dent**, 2019;44(5):521–529.
- AL-Omiri MK, Hassan RSA, AlZarea BK, & Lynch E. Effects of combining ozone and hydrogen peroxide on tooth bleaching: A clinical study. **J Dent**, 2016;53:88–93.
- Santana MS, Bridi EC, Navarro RS, de Lima CJ, Fernandes AB, do Amaral FL, França FM, Turssi CP, & Basting RT. Dental bleaching with ozone: effects on color and enamel microhardness. **Acta Odontol Latinoam**, 2016, 29(1):68–75.
- Association AD. Guidelines Dentist-dispensed Home-use Tooth Bleaching Products, 2006.
- Pérez MDM, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD, & Herrera LJ. Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. **Dent Mater**, 2016, 32(3):461–467.
- de Oliveira BP, Souza Rastelli AN, Salvador Bagnato V, & Hugo Panhoca V. Dental Bleaching Using Violet Light Alone: Clinical Case Report. **Dent**, 2017, 7(11): 459.
- Harlow JE, Rueggeberg FA, Labrie D, Sullivan B, & Price RB. Transmission of violet and blue light

through conventional (layered) and bulk cured resin-based composites. **J Dent**, 2016, 53:44–50.

Maran BM, Ziegelmann PK, Burey A, de Paris Matos T, Loguercio AD, & Reis A. Different light-activation systems associated with dental bleaching: a systematic review and a network meta-analysis. **Clin Oral Investig**, 2019, 23(4):1499–1512.

SoutoMaio JR, de Moraes S, Lemos C, Vasconcelos B do E, Montes M, & Pellizzer EP. Effectiveness of Light Sources on In-Office Dental Bleaching: A Systematic Review and Meta-Analyses. **Oper Dent**, 2019, 44(3):E105–E117.

Khoroushi M, Shirban F, Doustfateme S, Kaveh S. Effect of three nanobiomaterials on the surface roughness of bleached enamel. **Contemp Clin Dent**, 2015, 6(4):466–470.

Trentino AC, Soares AF, Duarte MAH, Ishikiriama SK, Mondelli RFL. Evaluation of pH levels and surface roughness after bleaching and abrasion tests of eight commercial products. **Photomed Laser Surg**, 2015, 33(7):372–377.

Cavalli V, Rosa DA da, Silva DP da, Kury M, Liporoni PCS, Soares LES, Martins AA. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. **J Appl Oral Sci**, 2018, 26: e20170589.

Vargas-Koudriavtsev T, & Herrera-Sancho ÓA. Effect of tooth-bleaching on the carbonate concentration in dental enamel by Raman spectroscopy. **J Clin Exp Dent**, 2017, 9(1):e101–e106.

Xu, C; Reed, R; Gorski, JP; Wang, Y; Walker M. The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties. **J Mater Sci**, 2011, 47(23):8035–8043.

Venkatesan S, Narayan G, Ramachandran A, & Indira R. The effect of two bleaching agents on the phosphate concentration of the enamel evaluated by Raman spectroscopy: An ex vivo study. **Contemp Clin Dent**, 2012, 3(6):172.