

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



Espetroscopia de Raios X na Detecção de Alterações Elementares no Esmalte Dentário
Após Branqueamento

João José Gomes Godinho

Dissertação

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2013

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA**



**Espetroscopia de Raios X na Detecção de Alterações Elementares no Esmalte Dentário
Após Branqueamento**

João José Gomes Godinho

Dissertação Orientada
Pelo Prof. Doutor António Mata

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2013

Para vocês, Francisco Pardal e António Silva,
pois a Inspiração é tão grande como a Saudade...

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Professor Doutor António Mata** por ter proporcionado a oportunidade para realizar este trabalho experimental. Os seus ensinamentos e o seu exemplo de vida foram essenciais para o apurar do meu sentido crítico e “sede” de conhecimento que ao longo destes anos levaram a novas conquistas e a atingir metas que pensei serem inalcançáveis.

Ao **Doutor João Silveira**, pelo incansável empenho e dedicação característicos de uma pessoa que é mais que um mentor, é um amigo. Espero estar sempre à altura do tudo o que me foi transmitido.

À **Professora Doutora Maria Luísa de Carvalho** e à **Doutora Sofia Pessanha** pela disponibilidade e acessibilidade que foram essenciais nas horas que passei no **Centro de Física Atómica**.

Ao **Professor Doutor Duarte Marques** por ter feito despertar em mim o meu “*lado experimental*” com todos os seus conhecimentos e por me ter acolhido nesta que é a minha segunda família - O **Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral (GIBBO)**, no qual aprendi a ser melhor com o rigor dos melhores, a todos o meu muito obrigado.

À **Filipa Bombert** por estar a meu lado nos bons e nos maus momentos, característicos deste percurso académico, estes momentos não seriam a mesma coisa sem a dedicação e espírito de entrega, característicos de alguém tão especial.

À **Mariana Albergaria** para a qual as palavras não bastam para agradecer tudo o que ganhei depois de passado o tempo das “pipetas e *falcons*”.

Ao **Miguel Oliveira**, dupla na qual a confiança e espírito de entre-ajuda estarão sempre presentes. Se a faculdade é um caminho, contigo este tornou-se uma via-rápida.

À **Rita Pereira**, com a qual poderei sempre contar pois, mais do que os laços de sangue, existem pessoas que para mim são como família.

Aos meus Amigos e, principalmente ao **André Fazeres** e ao **Hugo Ribeiro**, aos quais agradeço toda a amizade incondicional e apoio. Para vocês *aquele abraço*.

Aos meus amigos na faculdade que acompanharam este percurso e estiveram lá dia após dia tornando o difícil quase fácil.

À minha **Família** por sempre ter acreditado nas minhas capacidades e por não me deixar esquecer as minhas origens.

À minha **Mãe** que é mais do que um exemplo para mim, é uma fonte inesgotável de dedicação e para com ela terei uma dívida eterna e o melhor farei para retribuir.

Ao meu **Pai**, *companheiro* e pessoa pelo qual a cada dia que passa tenho mais e mais orgulho por tudo o que alcança e pela forma como me ensina a ser melhor pessoa acreditando na humildade e no trabalho como vigas-mestre de uma casa que ainda estou a construir a base.

Ao meu **irmão António**, por todos os dias me aturar e ainda assim olhar para mim como exemplo. Acredites ou não o meu maior orgulho é o potencial que reside em ti e saber que sejam quais forem as tuas escolhas, tu serás sempre “*O meu puto*”.

E por fim, a todas as outras pessoas que, por lapso, não referi mas que sem duvida fazem parte deste pequeno grande projeto chamado *Vida*.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo-piloto do tipo ensaio autocontrolado foi avaliar se existem alterações no conteúdo elementar do esmalte dentário quando é aplicada a técnica de branqueamento com peróxido de carbamida a 10% .

Métodos: Utilizaram-se seis dentes anteriores higidos, extraídos por motivos ortodônticos ou periodontais e preservados em solução de cloramina 0,5% (w/w) num máximo de 6 meses. Foram realizados cortes dos dentes com recurso a um micrótomo de forma a obter amostras da face vestibular com 8 x 2 mm. As amostras foram então tratadas com o produto de branqueamento (Opalescence PF 10) conforme as instruções do fabricante e armazenadas em saliva artificial entre cada aplicação.

Foi determinado o conteúdo elementar de cada amostra, antes e após o tratamento, por meio de micro energia dispersiva espectrometria de raios-x (μ -EDXRF). O equipamento consiste num tubo de raio x XTF5011 de OXFORD com um ânodo de Mo e um detector de silício, com uma área ativa de 50 mm² e uma espessura de janela de 12.5 μ m. A radiação emitida pelo tubo de raios-x é focada por meio de uma lente policapilar, permitindo um ponto focal de 100 μ m.

A análise quantitativa das amostras foi realizada utilizando software WinAXIL. A análise estatística (teste t-student emparelhado) foi realizada com recurso ao SPSS v. 21. Os resultados de Ca e P são expressos em % (w/w) e o Zn em ppm (w/w).

Resultados: As medições registadas após o branqueamento para Ca (31,49%), P (17,8%) e Zn (200,2 ppm) mostraram um decréscimo estatisticamente significativo ($P < 0.05$) do conteúdo mineral quando comparado com os valores registados antes do tratamento Ca (32.81%), P (19,91%) e Zn (226,3 ppm).

Conclusão: O procedimento de branqueamento realizado *in vitro* reduz o conteúdo mineral do esmalte. São necessários mais estudos que avaliem a significância clínica do presente estudo.

Palavras-chave: branqueamento dentário, esmalte dentário, EDXRF, análise elementar, peróxido de carbamida.

Abstract

Objective: The purpose of this self-control pilot study was to assess whether the elemental content in tooth enamel is altered by a bleaching procedure the teeth with 10 % carbamide peroxide bleaching gel.

Methods: Six anterior healthy teeth, extracted for periodontal or orthodontic reasons and preserved in a 0.5% (w/w) chloramine solution for no longer than 6 months were used. Sound vestibular surfaces of teeth were isolated. Cuts were made in order to obtain 8mm x 2mm samples. Samples were then treated with the bleaching product (Opalescence PF 10%) accordingly to manufacturer instructions and stocked in artificial inorganic saliva between each application.

The elemental content of each samples, before and after treatment were determined by means of micro Energy Dispersive X-Ray Spectrometry (μ -EDXRF). The equipment consists on an X-ray tube OXFORD XTF5011 with a Mo anode and a Silicon Drift Detector Vortex-60EX® with an active area of 50mm² and a 12.5 μ m thickness Be window. The radiation emitted by the X-ray tube is focused by means of polycapillary optics, allowing a focal spot of 100 μ m.

The quantitative analysis of the samples was carried out using WinAXIL software package. Statistical analysis (paired-sample t-Student Test) was performed by SPSS V. 21. Results of Ca and P are expressed in % (w/w) and Zn in ppm (w/w).

Results: Measurements registered after bleaching for Ca (31,49%), P (17,8%) e Zn (200,2 ppm) showed a statistic significantly decrease ($P < 0.05$) in mineral content when compared with values registered before treatment Ca (32.81%), P (19,91%) e Zn (226,3 ppm).

Conclusion: The bleaching procedure performed *in vitro* reduced the mineral content of enamel. More studies are needed to assess the clinical significance of the present study.

Key words: tooth whitening, tooth enamel, EDXRF, elemental analysis, Carbamide Peroxide.

Índice

1. Notas Introdutórias 4

1.1 Esmalte dentário 5

1.1.1 Formação do esmalte dentário 5

1.1.2 Características histológicas do esmalte dentário 6

1.2 Mecanismo de ação do branqueamento dentário 7

1.3 Técnicas de Branqueamento Dentário 9

1.3.2 Branqueamento de dentes vitais 9

1.3.2.1 Branqueamento em consultório (ou in-office) 9

1.3.2.2 Branqueamento em ambulatório (ou at home) 10

1.3.2.3 Branqueamento com produtos em regime de venda livre (ou over-the-counter) 10

1.4 Efeitos do branqueamento dentário 11

1.4.1 Efeitos adversos do branqueamento dentário 11

1.4.2 Efeitos do branqueamento nos tecidos moles 11

1.4.3 Efeitos do branqueamento na polpa dentária 12

1.4.4 Efeitos do branqueamento nos tecidos mineralizados 13

1.4.4.1 Efeitos na microdureza 13

1.4.4.2 Efeitos na microrugosidade 14

1.4.4.3 Efeitos na morfologia 14

1.5 EDXRF 15

1.5.1 Breve abordagem sobre os fundamentos dos Raios X 15

1.5.2 Espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia - EDXRF 15

1.5.3 Aplicabilidade em estudos no esmalte dentário 16

2. Objetivo 18

3. Materiais e Métodos 18

3.1 Materiais 18

3.1.1 Amostras 18

3.1.2 Reagentes 18

3.1.3 Padrões utilizados 18

3.1.4 Produto de branqueamento utilizado 19

3.1.5 Aparelho de espectroscopia utilizado (EDXRF) 19

3.2 Tarefas a desenvolver 20

3.3 Métodos 20

3.3.1 Preparação das soluções 20

3.3.2 Preparação das amostras 21

3.3.3 Aplicação do produto de branqueamento 22

3.3.4 Leitura das amostras no aparelho de espectroscopia e conversão dos espectros 22

3.3.5 Análise estatística 24

4. Resultados 25

5. Discussão 29

6. Conclusão 32

7. Referências Bibliográficas 33

8. Anexos 42

8.1 Anexo 1 - Bone Meal 1486 43

8.2 Anexo 2 - Bone Bovine 05-02 e Bone Caprine 05-03 45

8.3 Anexo 3 - Bone Ash 1400 49

1. Notas Introdutórias

Na sociedade contemporânea, a estética tem vindo a assumir um papel preponderante, tendo-se tornado uma das principais preocupações, apresentando-se com regras e padrões bem estabelecidos (Mata *et al.*, 2009). Na prática da Medicina Dentária o branqueamento dentário tem vindo a evoluir em simultâneo com o aumento da sua popularidade junto da população (Demarco *et al.*, 2009). Para ir ao encontro desta procura, os fabricantes têm aumentado a quantidade de produtos disponíveis, alterando a sua forma de apresentação bem como as técnicas e as concentrações dos mesmos.

O branqueamento dentário é considerado o tratamento menos evasivo em dentes escurecidos, quando comparado com outras técnicas, tais como a aplicação de facetas, coroas ou mesmo resinas compostas (Cardoso *et al.*, 2010; Fugaro *et al.*, 2004). No entanto, existem ainda algumas incertezas relacionadas com o efeito dos princípios ativos do branqueamento na estrutura dentária, nomeadamente ao nível da superfície dos tecidos mineralizados (Joiner, 2007; Maia *et al.*, 2008).

Com a realização desta monografia pretende-se avaliar os efeitos induzidos pela utilização de produtos de branqueamento na superfície do esmalte através da determinação das alterações elementares por fluorescência de raios-x por energia dispersiva.

1.1 Esmalte dentário

O esmalte é o tecido mais duro do corpo humano, sendo constituído por cerca de 96% de matéria inorgânica, 1% de matéria orgânica e 3% de água. A componente inorgânica do esmalte é composta principalmente por cristais de hidroxiapatite composta pelos elementos Ca, P, O e H. Nestes cristais também podem ser encontrados outros elementos como o estrôncio, o magnésio, o chumbo e o flúor devido à sua incorporação ou absorção ao longo da vida, sendo estes denominados por elementos traço da composição elementar do esmalte (Junqueira *et al.*, 2008).

1.1.1 Formação do esmalte dentário

O primeiro sinal do desenvolvimento dentário é o aparecimento de condensações focais de células migratórias da crista neural imediatamente sob o epitélio oral da futura crista alveolar designadas de lâminas dentárias, que tem forma de C e que, conseqüentemente irão dar origem aos vários botões dentários (Sandler, 2004).

O epitélio e o mesênquima adjacente à membrana basal organizam-se e passam por um processo diferenciação celular e histológico, que passa pelas fases de botão, capuz e de sino (Simmer *et al.*, 1995).

Numa primeira fase - de botão - observa-se uma invaginação do epitélio oral em que a camada sofre uma condensação de ectomesênquima. Em seguida, a superfície dos botões começa a invaginar, iniciando-se a fase de capuz, onde se forma o epitélio dentário externo, epitélio dentário interno e o retículo estrelado. O mesênquima vai originar a papila dentária e o folículo dentário. Por fim, na fase de sino, ocorre morfo e histodiferenciação observando-se uma diminuição da divisão celular que contrasta com uma maior diferenciação celular (Sandler, 2004).

As células do epitélio dentário interno diferenciam-se em ameloblastos e por indução recíproca com os odontoblastos dá-se início ao crescimento de longos prismas de esmalte. Concomitantemente ao crescimento dos cristais, existe a remoção da matéria orgânica prismática. Embora esta seja abundante na fase inicial da amelogenese, em termos de volume e peso por um mecanismo de reabsorção não completamente

esclarecido, a quantidade e importância diminuí gradualmente até que apenas 1% do peso do esmalte maduro corresponda à componente orgânica (Bartlett *et al.*, 1999).

1.1.2 Características histológicas do esmalte dentário

O esmalte é o tecido que reveste a coroa anatômica do dente e está descrito como o único tecido epitelial mineralizado. O esmalte, como foi visto anteriormente, é produzido por células provenientes da ectoderme denominadas ameloblastos que são responsáveis pela mineralização da matriz orgânica e consequentemente pela formação dos prismas que se estendem desde a junção amelodentinária até à superfície da coroa do dente (Junqueira *et al.*, 2008).

O esmalte consiste em colunas alongadas - prismas de esmalte - que estão unidas entre si pelo esmalte interprismático. Tanto os prismas de esmalte como o esmalte interprismático são formados por cristais de hidroxiapatite diferindo apenas na orientação dos cristais, paralelos ao longo eixo do cristal e com uma angulação de 40 a 65°, respetivamente. Cada prisma estende-se em toda a espessura da camada de esmalte e possui um trajeto sinuoso (Simmer *et al.*, 1995).

Esta organização histológica é responsável pelas propriedades mecânicas do dente e ao mesmo tempo pela sua irreversibilidade estrutural. Não apresentando células no seu arranjo estrutural, ao contrário do que sucede com os restantes tecidos conjuntivos mineralizados do organismo, não existe qualquer *turn-over* celular ou da sua estrutura. As únicas alterações que se podem observar na estrutura cristalina, ocorrem a nível superficial pelo facto da superfície do esmalte se encontrar em contato com um fluido supersaturado em fosfato de cálcio - a saliva (Amerongen e Veerman, 2002). Desta forma, as modificações que ocorrem a nível da superfície do esmalte tornar-se-ão irreversíveis caso a capacidade reparadora / remineralizante da saliva não supere o dano provocado ao esmalte dentário.

1.2 Mecanismo de ação do branqueamento dentário

As pigmentações dentárias variam de acordo com a sua localização, etiologia e com a afinidade à estrutura dentária, podendo ser divididas em intrínsecas, extrínsecas ou uma combinação de ambas (Dahl & Pallesen, 2003).

No caso das pigmentações intrínsecas, estas podem ser causadas por incorporação de pigmentos na dentina ou no esmalte, durante a odontogénese, devido ao uso de antibióticos (tetraciclina), após a erupção dentária, por traumatismos, envelhecimento, necrose pulpar, cárie dentária ou mesmo procedimentos iatrogénicos (Bizhang *et al.*, 2009; Zimmerli *et al.*, 2010). As pigmentações extrínsecas estão associadas à deposição de materiais cromatogénicos na superfície do esmalte (Demarco *et al.*, 2009). Estes materiais podem ser encontrados no tabaco ou em subprodutos que advêm de determinados alimentos como o chá, o café, o vinho, entre outros (Bizhang *et al.*, 2009). Existem ainda algumas pigmentações que resultam da combinação dos dois tipos de pigmentações (Zantner *et al.*, 2006).

Atualmente, o tratamento para as pigmentações contempla, na maioria dos casos, a destartarização e o polimento profilático, mas pode ser necessário realizar outro tipo de técnicas tais como o branqueamento dentário (Bizhang *et al.*, 2009; Benbachir *et al.*, 2008).

Os produtos de branqueamento possuem como principal princípio ativo o peróxido de hidrogénio (PH) ou a sua forma modificada, com ligação a um grupo ureia, o peróxido de carbamida (PC) (Dahl & Pallesen, 2003). O peróxido de hidrogénio apresenta uma elevada capacidade oxidante devido à capacidade de gerar em radicais livres como o hidroxilo (OH⁻), perhidroxilo (HOO⁻) e aniões de oxigénio (O₂⁻ e O⁻) -
Figura 1.

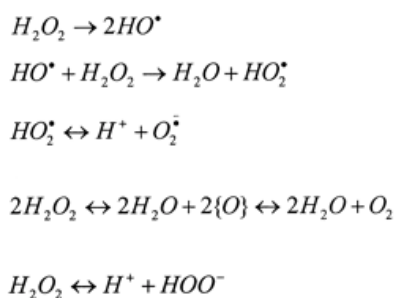


Figura 1 - Reações químicas de decomposição do peróxido de hidrogénio (Dahl & Pallesen, 2003 adaptado).

As técnicas de branqueamento baseiam-se em reações de oxidação-redução, em que os radicais livres de oxigénio se difundem e reagem com os pigmentos, decompondo-os devido ao seu elevado poder oxidativo (Mata *et al.*, 2009; Matis *et al.*, 2009b). A exposição de forma contínua aos radicais livres leva a uma quebra da estrutura anelar e à saturação das ligações dos agentes cromatogénicos conduzindo assim, à produção de compostos lineares de menores dimensões (Joiner, 2006).

Relativamente ao PC, existe libertação de ureia que irá levar, através da sua degradação em dióxido de carbono e amónia, ao aumento do pH. Esta característica é vantajosa, na medida em que diminui a energia mínima necessária à degradação do PH, levando a uma maior taxa de libertação de PH e conseqüentemente de radicais livres (Dahl & Pallesen, 2003).

Apesar do mecanismo de branqueamento não estar totalmente esclarecido, a teoria mais aceite é a de que este está dependente da concentração do produto, da natureza dos radicais livres, da taxa de libertação e difusão nos tecidos dentários e ainda da sua capacidade de reação com os pigmentos (Dahl & Pallesen, 2003; Matis *et al.*, 2009a; Gomes *et al.*, 2009).

1.3 Técnicas de Branqueamento Dentário

Atualmente as técnicas de branqueamento dentário dividem-se em dois grandes grupos: branqueamento de dentes vitais e não vitais. Estes dois tipos de branqueamento são distintos tanto na abordagem que necessitam como no quadro clínico que os define, embora possam ser combinados numa técnica de branqueamento simultâneo (Mata *et al.*, 2009).

Dado o objetivo deste trabalho, foi apenas abordado o branqueamento de dentes vitais.

1.3.2 Branqueamento de dentes vitais

Atualmente existe uma ampla oferta de produtos branqueadores disponíveis para dentes vitais, podendo ser divididos em três categorias: branqueamento em consultório (administrado pelo profissional de saúde oral), em ambulatório (dispensado pelo profissional de saúde oral) e de venda livre ao público (autoadministrado) (Kossatz *et al.*, 2011; Paravina *et al.*, 2007).

1.3.2.1 Branqueamento em consultório (ou *in-office*)

Esta técnica apresenta-se como uma boa alternativa quando os pacientes têm como objetivo o tratamento rápido e sem ser necessária muita cooperação. Assim, para diminuir o tempo de tratamento recorre-se a uma técnica denominada *power bleaching* onde normalmente são utilizadas concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogénio e de peróxido de carbamida (22-50% e 35-40%, respetivamente), esta técnica pode ainda ser complementada com o uso de fontes de calor, luz *laser* ou luz de alta intensidade (Goldstein, 1997; Mata *et al.*, 2009).

As principais vantagens deste tipo de branqueamento são o reduzido tempo de aplicação - entre uma e duas sessões -, o total controlo e supervisão por parte do Médico Dentista permitindo a prevenção da ingestão de material e o aparecimento de lesões químicas nos tecidos moles e, por fim, a maior potencialização dos resultados imediatos, aumentando tanto a motivação como a satisfação dos pacientes (Gurgan *et al.*, 2010; Marques, 2008). Como desvantagens estão reportadas a hipersensibilidade

dentária e as queimaduras químicas dos tecidos gengivais (Golberg *et al.*, 2010; Markowitz, 2010).

1.3.2.2 Branqueamento em ambulatório (ou *at home*)

A técnica de branqueamento em ambulatório ou *nightguard vital bleaching* corresponde à utilização durante várias horas ao longo do dia, de uma moldeira individual confeccionada na primeira consulta (Auschill *et al.*, 2005). Esta técnica, inicialmente descrita por Haywood e Heymann, compreende a utilização de PC a 10% (Haywood e Heymann, 1989). Mais tarde, foram introduzidas modificações a esta técnica, não só nas concentrações de PC (10% a 22%, mas também de PH (5,5% a 7,5%), reduzindo assim o tempo de tratamento (aplicações de 2 a 8 horas por dia durante 14 dias). Esta técnica está indicada essencialmente para pacientes com uma boa *compliance* e para os quais a duração do tratamento não se apresenta como uma das principais prioridades (Mata *et al.*, 2009).

Os reduzidos efeitos adversos, a baixa toxicidade e a boa estabilidade de cor ao final de 6 meses levam a considerar esta técnica como um método eficiente e seguro para branquear os dentes (Auschill *et al.*, 2005; Marques, 2008).

É importante referir ainda a combinação entre o branqueamento em consultório e o branqueamento em ambulatório onde o principal objetivo é potenciar ambas as técnicas, recorrendo-se primeiro à aplicação *in-office* e depois à técnica *nightguard vital bleaching* (Mata *et al.*, 2009).

1.3.2.3 Branqueamento com produtos em regime de venda livre (ou *over-the-counter*)

Os produtos em regime de venda livre representam as técnicas branqueadoras às quais o paciente pode recorrer sem necessitar da intervenção do médico dentista (Zantner *et al.*, 2007). Atualmente, podem ser apresentados sob diversas formas, nomeadamente em gel, tiras, moldeiras standartizadas e vernizes, contendo sempre baixas concentrações de PC ou PH e podendo ser adquiridos em farmácias, parafarmácias ou supermercados.

Segundo o Comité Científico para o uso de produtos pelo consumidor, a concentração máxima de PH para a utilização destes produtos é de 0,1% (SCCP, 2004).

No entanto, estas técnicas são sugestiva de uma eficácia duvidosa, devido à utilização de baixas concentrações de agente branqueador e por não serem controladas pelo Médico Dentista (Silveira et al, 2005).

1.4 Efeitos do branqueamento dentário

1.4.1 Efeitos adversos do branqueamento dentário

Todas as técnicas de branqueamento apresentam vantagens e desvantagens, sendo que cabe ao Médico Dentista decidir qual a técnica que melhor se adequa ao paciente (Auschill *et al.*, 2005).

Os efeitos adversos mais relatados pelos pacientes são a sensibilidade dentária e a irritação gengival (Browning *et al.*, 2008; Haywood *et al.*, 1994). Outros efeitos secundários associados ao branqueamento dentário são a irritação pulpar, alterações na estrutura dentária, infiltração marginal das restaurações, reabsorção radicular externa e redução da força adesiva de resinas compostas (Nour El-din *et al.*, 2006).

A sensibilidade dentária está associada à passagem do peróxido, contido no produto de branqueamento, através do esmalte e da dentina para a polpa, podendo esta sensibilidade conduzir a uma pulpite reversível (Hanks *et al.*, 1993; Kossatz *et al.*, 2011).

Quanto à irritação gengival, esta está normalmente associada à forma da moldeira individual ou à aplicação indevida dos produtos de branqueamento (Jorgensen & Carroll, 2002). De forma a evitar a irritação gengival deve ser feito o ajuste da moldeira ou a modificação da técnica para evitar o contato do produto com os tecidos moles (Auschill *et al.*, 2005; Jorgensen & Carroll, 2002).

1.4.2 Efeitos do branqueamento nos tecidos moles

Para além dos efeitos adversos descritos anteriormente é importante referir que os produtos de branqueamento são cáusticos para as mucosas, podendo assim levar a queimaduras, a desconforto oral, desidratação das mucosas e alongamento das papilas filiformes (Dahl & Pallesen, 2003; Gerlach *et al.*, 2002).

A incidência destas lesões estão normalmente relacionadas com concentrações de PH e PC maiores ou tratamentos mais prolongados.

Por outro lado, a existência de enzimas como a catalase, sistema glutatíon peroxidase e a superóxido dismutase são capazes de degradar o PH, decompondo-o em água e oxigénio que neutralizam os efeitos dos radicais livres libertados pelo PH (Amerongen & Veerman, 2002; Naik *et al.*, 2006).

Vários estudos indicam que deve ser feita uma correta adaptação das moldeiras de branqueamento usando, sempre que possível, a menor concentração, quer de PH quer de PC. O isolamento dos dentes com dique de borracha, quando são usadas concentrações mais elevadas de PH, ajuda a prevenir os efeitos nefastos recorrentes dos produtos de branqueamento (Naik *et al.*, 2006).

1.4.3 Efeitos do branqueamento na polpa dentária

Alguns estudos demonstram que a resposta pulpar ao branqueamento dentário pode variar desde uma reação inflamatória leve a uma inflamação aguda ou mesmo a uma necrose parcial do tecido do polpa coronária (Soares *et al.*, 2012).

Em relação às concentrações e número de aplicações, os estudos indicam que independentemente do número de aplicações numa superfície de esmalte, o gel de branqueamento PC 10% não causa citotoxicidade, no entanto produtos com PC 16% podem provocar citotoxicidade mesmo após uma única aplicação sobre esmalte (Soares *et al.*, 2011; Lima *et al.* 2010). Por outro lado, existem estudos que indicam que a aplicação sequencial de produtos de branqueamento a PC 10% promovem toxicidade para as células, sendo que esta toxicidade é maior do que a toxicidade observada após uma única aplicação usando um produto a PH 35% (Lima *et al.*, 2013).

Assim, no que diz respeito à polpa dentária, a informação sobre os efeitos do branqueamento ainda é escassa e a existente apresenta grande controvérsia (Fugaro *et al.*, 2004).

1.4.4 Efeitos do branqueamento nos tecidos mineralizados

Embora existam vários estudos que comprovam a eficácia do branqueamento dentário *in vivo* e *in vitro*, existem ainda preocupações quanto a um possível enfraquecimento do esmalte pelos agentes branqueadores (Sun *et al.*, 2000). Por outro lado, ainda residem muitas dúvidas no caráter das lesões provocadas pelo branqueamento nos tecidos mineralizados (Pugh *et al.*, 2005).

1.4.4.1 Efeitos na microdureza

Neste ponto a literatura é extensa mas nem por isso convergente, havendo uma heterogeneidade de resultados. Esta contradição nos resultados deve-se em grande parte às diferenças de protocolos experimentais (Attin *et al.*, 2009). Existem alguns estudos em que se observa uma redução na microdureza do esmalte e da dentina após branqueamento ambulatorio enquanto que, por outro lado, existem estudos nos quais não foram observados efeitos significativos (Faraoni-Romano *et al.*, 2008). Em relação ao branqueamento em consultório, assiste-se à mesma controvérsia, havendo estudos que reportam uma diminuição da microdureza do esmalte, e por outro lado estudos que mostram que não se observam qualquer tipo de alterações durante o branqueamento (Faraoni-Romano *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

Comparando os estudos *in vivo* vs *in vitro*, os estudos *in vivo* parecem demonstrar menos alterações da microdureza do esmalte do que os estudos *in vitro* (Attin *et al.*, 2009).

Também é importante referir que um número significativo de tratamentos branqueadores resultam na redução de microdureza do esmalte quando se utiliza saliva artificial em vez de saliva humana para o armazenamento das amostras de esmalte nos intervalos entre as aplicações de branqueamento (Attin *et al.*, 2009).

1.4.4.2 Efeitos na microrugosidade

Tal como acontece na microdureza, os resultados dos vários estudos são contraditórios. Assim, apesar de Pinto e colaboradores referirem que existem alterações na rugosidade superficial do esmalte após a aplicação de produtos de branqueamento contendo percentagens de PC entre 10% e 37% e de PH entre 7,5% e 35% (Pinto *et al.*, 2004), existem estudos que reportam o oposto (Cadenaro *et al.*, 2008; Faraoni-Romano *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2001).

1.4.4.3 Efeitos na morfologia

A superfície do esmalte pode ter duas configurações, prismática e aprismática. A primeira encontra-se presente nas camadas mais internas, onde os cristais de hidroxiapatite estão dispostos segundo um padrão resultante de variações abruptas das orientações dos cristais, nomeadamente na periferia dos prismas de esmalte. Na segunda camada, a mais externa, os cristais de esmalte não se apresentam dispostos segundo um padrão (Cheng *et al.*, 2009; Finke *et al.*, 2000).

Quando são libertados radicais livres provenientes dos produtos de branqueamento, estes vão incidir essencialmente na estrutura química dos tecidos mineralizados, desmineralizando-os (Price *et al.*, 2000). Quando as alterações provocadas são mínimas, correspondendo apenas a alterações da ultra-estrutura do esmalte, ocorre uma remineralização por parte dos iões da saliva (Parkinson *et al.*, 2010). No entanto, devido ao aumento das concentrações ou do tempo de exposição, pode existir uma maior modificação na estrutura dos tecidos mineralizados.

Não existe consenso na literatura face às alterações morfológicas após branqueamento (Dahl & Pallesen, 2003). Se, por um lado existem estudos que apresentam uma diminuição significativa nas concentrações relativas de alguns elementos no esmalte, tais como cálcio e fósforo (Perdigão *et al.*, 1998). Por outro a maioria dos estudos referenciados nas revisões referem nos seus resultados que não existe alterações morfológicas na superfície do esmalte, quer utilizando produtos de altas quer de baixas concentrações de PH e PC. (Gultz *et al.*, 1999; Mielczarek *et al.*, 2008).

1.5 EDXRF

1.5.1 Breve abordagem sobre os fundamentos dos Raios X

No decurso de elaboração de experiências realizadas em tubos onde se produzem descargas de gases rarefeitos, Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, descobriu pela primeira vez uma radiação ionizante, a qual denominou de raios X. Como principais vantagens esta radiação apresenta a facilidade em atravessar a matéria, a produção de luminescência em algumas substâncias e o fato de não ser desviada por campos magnéticos (Bushong *et al.*, 1993).

O processo de ionização dos átomos por parte da radiação X está amplamente estudado e caracteriza-se por processos que envolvem a excitação de elétrons que circundam o núcleo do átomo, levando a que este absorva energia e a liberte em seguida sob forma de energia voltando, assim, ao seu estado fundamental (Bushong *et al.*, 1993). Esta emissão de energia apresenta um espectro específico para cada átomo, levando ao aparecimento de riscas características associadas às transições dos elétrons nos vários níveis de energia e a intensidade das mesmas. O grupo de riscas mais intenso designa-se por α , o segundo por β e o terceiro por γ .

Desde essa altura, muito se tem estudado sobre a radiação X e, paralelamente, começaram a aparecer técnicas que utilizam essa radiação para revelação e detecção de estruturas, sejam elas macrométricas (radiografias) ou micrométricas (quantificação atômica).

1.5.2 Espectroscopia por fluorescência de raios X dispersiva em energia - EDXRF

O estudo das interações entre a radiação e a matéria no contexto físico-químico é denominado de espectroscopia. O princípio utilizado neste método é muito simples, através de uma fonte de radiação X ionizam-se os níveis internos dos átomos constituintes da amostra e estes libertam a sua energia através de um espectro com várias riscas (picos) (Grieken & Markowicz, 2002).

O equipamento utilizado para fazer este tipo de análise designa-se por espetómetro de fluorescência de raios X e tem como principal função medir a intensidade de cada risca característica de um determinado comprimento de onda.

Assim, a espectroscopia por fluorescência de raios X é um método de análise elementar qualitativo e quantitativo. No primeiro, o objetivo é a identificação de cada linha existente no espectro, sendo que a mais intensa corresponde ao grupo $K\alpha$. No método quantitativo o objetivo é a determinação da quantidade relativa dos elementos presentes na amostra em partes por milhão (ppm) ou em percentagem em relação a todos os constituintes, dependendo da concentração dos elementos. Esta análise é obtida por comparação com padrões devidamente identificados e quantificados para identificação dos elementos da amostra, onde se obtém um espectro de raios X fluorescentes dessa amostra.

1.5.3 Aplicabilidade em estudos no esmalte dentário

Análises não-destrutivas de elementos major e de elementos-traço presentes em amostras biológicas são de grande importância, pois ao serem analisadas de forma destrutiva, inviabilizam a possibilidade de comparar o antes e o após de um processo biológico (Rautray *et al.*, 2009).

As concentrações de elementos e o seu possível papel na saúde oral tem sido estudados através de técnicas como PIXE, RBS e EDXRF (Carvalho *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2009). Estas técnicas são utilizadas devido à sua sensibilidade para os elementos-traço em várias amostras (Beck, 2005; Bennun *et al.*, 2002).

O PIXE aparenta ser adequado para este tipo de análise, uma vez que exige a preparação de uma amostra reduzida e oferece a possibilidade de estudar diferentes pontos ao longo do dente. No entanto, é uma técnica fundamentalmente destrutiva, logo não se pode analisar a mesma amostra antes e depois do processo biológico (Carvalho *et al.*, 1998; Proteasa *et al.*, 2008).

A grande vantagem da *Rutherford back-scattering* (RBS) neste contexto é que fornece informações diretas sobre a composição da amostra (Bailey *et al.*, 2009).

A fluorescência de raios X (EDXRF) apresenta várias vantagens relativamente a outros métodos de análise, nomeadamente a simplicidade de interpretação; o facto de ser um método não destrutivo; a preparação da amostra ser mínima, permitindo exemplares com variedade de tamanhos e formatos; a capacidade de analisar vários elementos simultaneamente em tempo real; o limite de sensibilidade ser da ordem de 1 µg/g e ser pouco dispendioso. (Carvalho *et al.*, 1998; Bailey *et al.*, 2009; Oprea *et al.*, 2009).

Tratando-se de um método não destrutivo, permite a análise da amostra antes e após a aplicação do produto de branqueamento, tornando esta técnica ideal no âmbito deste estudo.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo-piloto foi avaliar se existem alterações no conteúdo elementar do esmalte dentário quando é aplicado um produto de branqueamento com peróxido de carbamida a 10% .

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Amostras

Seis dentes anteriores, hígidos, extraídos por razões periodontais ou por motivos ortodônticos conservados no banco de dentes da Unidade de Investigação em Ciências Orais e Bioquímicas (UICOB) em solução de Cloramina a 4°C, por um período inferior a 6 meses.

3.1.2 Reagentes

Cloramina T3-H₂O (C₇H₇ClNNaO₂S(3H₂O): M=281,695 g/mol

NaCl: M=58,44 g/mol

KCl: M=74,56 g/mol

CaCl₂.2H₂O: M=142,02 g/mol

KH₂PO₄: M=136,09 g/mol

Ureia: M=96,5162 g/mol

NH₄Cl: M=52,49 g/mol

NaHCO₃: M=84,01 g/mol

KSCN: M=97,18 g/mol

Na₂SO₄.10H₂O: M=322,19 g/mol

3.1.3 Padrões utilizados

Bone Meal 1489 (anexo 1)

Bone Caprine 05-03 (anexo 2)

Bone Bovine 05-02 (anexo 2)

Bone Ash 1400 (anexo 3)

3.1.4 Produto de branqueamento utilizado

Opalescence PF 10% (peróxido de carbamida), Ultradent, USA.

3.1.5 Aparelho de espectroscopia utilizado (EDXRF)

Para a determinação da composição elementar, utilizou-se um espectrômetro de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) - Figura 2, com micro-feixe. O sistema de μ -EDXRF consiste num tubo de raio X com ânodo de molibdénio (Mo) e com janela (lateral) de berílio (Be) (modelo XTF5011, OXFORD) e um detetor de silício (com tecnologia *silicon drift*, SDD), refrigerado termoeletricamente (efeito peltier), tendo uma área ativa de 50 mm², janela de Be com uma espessura de 25 μ m e largura a meia altura para a linha $K\alpha$ do Fe de: FWHM=160 eV (modelo 60EX, Vortex). O feixe proveniente do tubo é focalizado com recurso a uma lente policapilar até se obter um *spot* de 100 μ m. O ângulo formado entre o detetor e o tubo de raios X é de 45 graus.

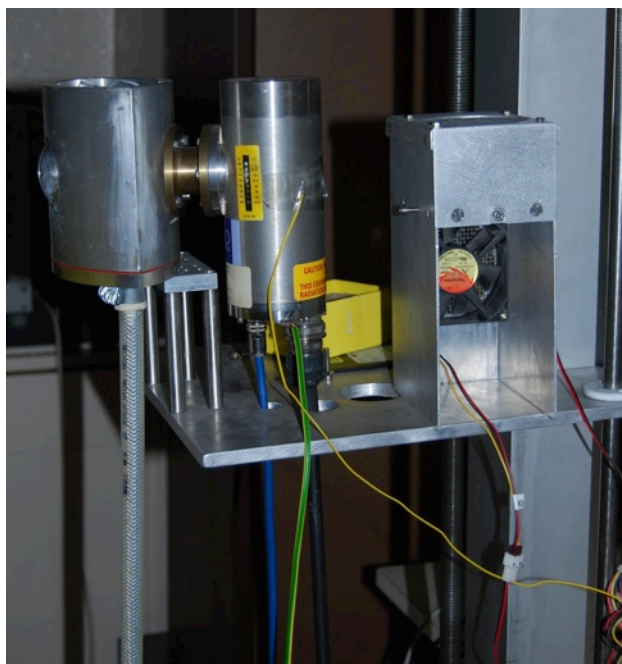


Figura 2 - Espectrômetro de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF).

3.2 Tarefas a desenvolver

3.2.1 Avaliar a existência de alterações no conteúdo elementar do esmalte dentário quando é feito branqueamento com peróxido de carbamida a 10% .

Produto a aplicar nas amostras: Opalescence PF 10% (Ultradent, USA)

Variáveis de desfecho:

- a) Elementos atômicos da amostra
- b) Quantidade de elementos presentes, em percentagem (w/w) ou p.p.m.

Modelo Experimental: Espectroscopia por fluorescência de raios X através de energia dispersiva

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação das soluções

O objetivo deste protocolo prende-se com a preparação das soluções que servem para armazenamento das amostras pré-branqueamento (Cloramina T3-H₂O) e durante o branqueamento (Saliva Artificial - SAGF).

Para preparar 1,5 Litros de Solução Cloramina T3-H₂O, foram pesadas 10g de Cloramina T3-H₂O e foram adicionadas num recipiente com 1,5 L de água destilada, agitando-se de forma a homogeneizar a solução.

Para preparar 1 Litro de Saliva Artificial SAGF realizou-se a técnica descrita por Gal e colaboradores, adicionando-se a um balão volumétrico de um litro, 500 mL de água destilada e um magneto. Em seguida foram adicionados 125,6mg de NaCl, 963,9mg de KCl, 227,8mg de CaCl₂.2H₂O, 654,mg de KH₂PO₄, 200mg de Ureia, 178mg de NH₄Cl, 630,8mg de NaHCO₃, 189,2mg KSCN e 763,2mg de Na₂SO₄.10H₂O. Por fim, foi adicionada água destilada até perfazer 1L.

3.3.2 Preparação das amostras

Após retirar o dente da solução de armazenamento (Cloramina T3-H₂O 0,5%), este foi observado minuciosamente com o auxílio de uma lupa binocular (Meiji Techno EMZ 8RT, Japão). Em seguida, o dente foi colocado num suporte apropriado de forma a proceder-se aos cortes no micrótomo (Isomet 1000, Buehler, EUA) - Figura 3.

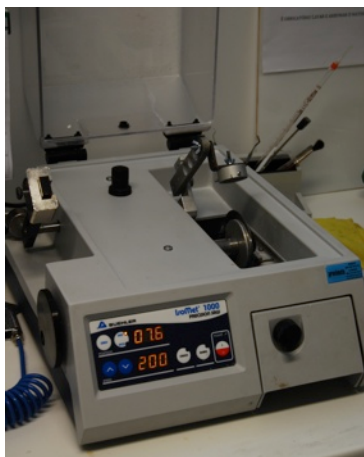


Figura 3 - Micrótomo (Isomet 1000, Buehler, EUA).

Deste procedimento foram obtidas amostras da face vestibular de 8mm de comprimento por 2 mm de largura, sendo que cada dente apenas originou uma amostra - Figura 4 e 5.

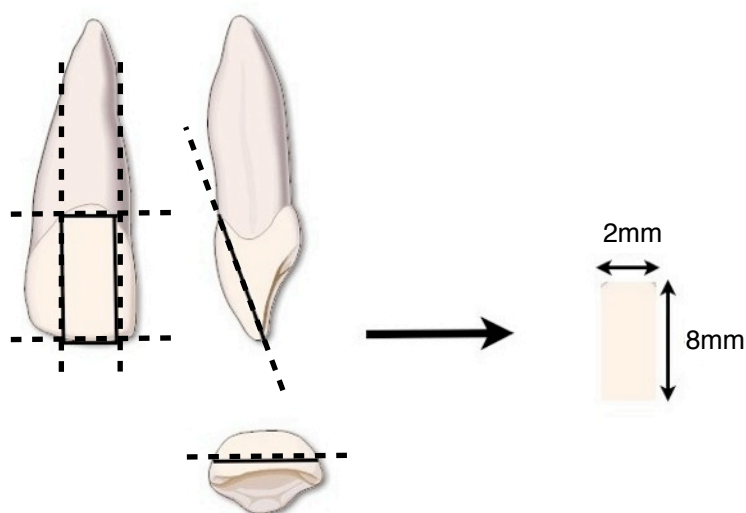


Figura 4 - Representação esquemática dos cortes efetuados para obtenção das amostras.



Figura 5 - Amostra de esmalte dentário inserida no suporte após corte.

As amostras já cortadas, foram colocadas em frascos de armazenamento devidamente identificados e com solução de Cloramina T3-H₂O 0,5% - Figura 6.

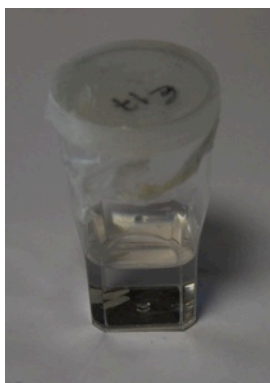


Figura 6 - Frasco de armazenamento das amostras contendo Cloramina T3-H₂O 0,5%.

3.3.3 Aplicação do produto de branqueamento

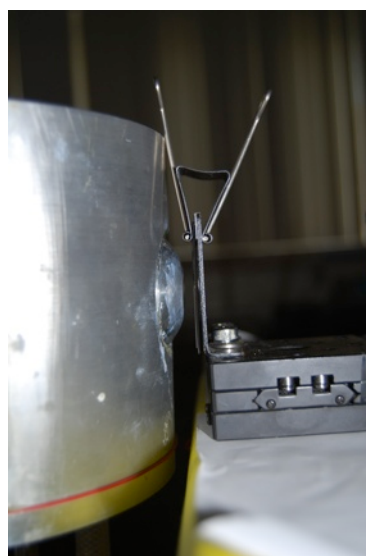
Este protocolo tem como objetivo a aplicação do produto de branqueamento nas amostras para serem posteriormente lidas no aparelho de EDXRF.

Após serem retiradas as amostras da Cloramina/Saliva artificial, estas foram colocadas com a superfície vestibular do esmalte para cima e foram realizados 14 aplicações (em dias consecutivos) de 8 horas cada. Nos intervalos de aplicação, as amostras foram novamente colocadas em saliva artificial.

3.3.4 Leitura das amostras no aparelho de espectroscopia e conversão dos espectros

Este protocolo visa realizar a análise das amostras, obtendo espectros para serem posteriormente trabalhados em *software* apropriado.

Retiraram-se as amostras dos frascos de armazenamento, inserindo-as posteriormente no suporte e colocando-as no porta-amostras - Figura 7 e 8.



Figuras 7 e 8 - Amostra no suporte para ser efetuada a medição no aparelho EDXRF.

No programa PI-SpecA (National Instruments, USA) programou-se para tempo de aquisição 300s. No programa Control_V4 as definições utilizadas foram: 15 kV e 1 mA.

No início de cada dia de protocolo foram realizadas medições dos 4 padrões: Bone Meal 1489; Bone Caprine 05-03; Bone Bovine 05-02; Bone Ash 1400. Analisados os padrões mediram-se as amostras, onde foram analisados 16 pontos em cada amostra, reposicionando o feixe com recurso ao parafuso micrométrico.

Em seguida todos os ficheiros foram processados em *software* próprio (Winaxil, Cabera, USA) de forma a extrair os valores dos registos obtidos.

3.3.5 Análise estatística

Para determinação dos resultados e da análise recorreu-se a um *software* de análise estatística adequado (SPSS v.21, SPSS Inc, Chicago, IL USA).

Os resultados são indicados pela média, desvio padrão e erro padrão da média, encontrando-se expressos em percentagem da concentração (w/w) no caso dos elementos Ca e P ou em partes por milhão (p.p.m.) no caso do Zn. As diferenças relativas às médias dos valores antes e depois do branqueamento foram analisadas com recurso ao teste de t-Student para amostras emparelhadas.

4. Resultados

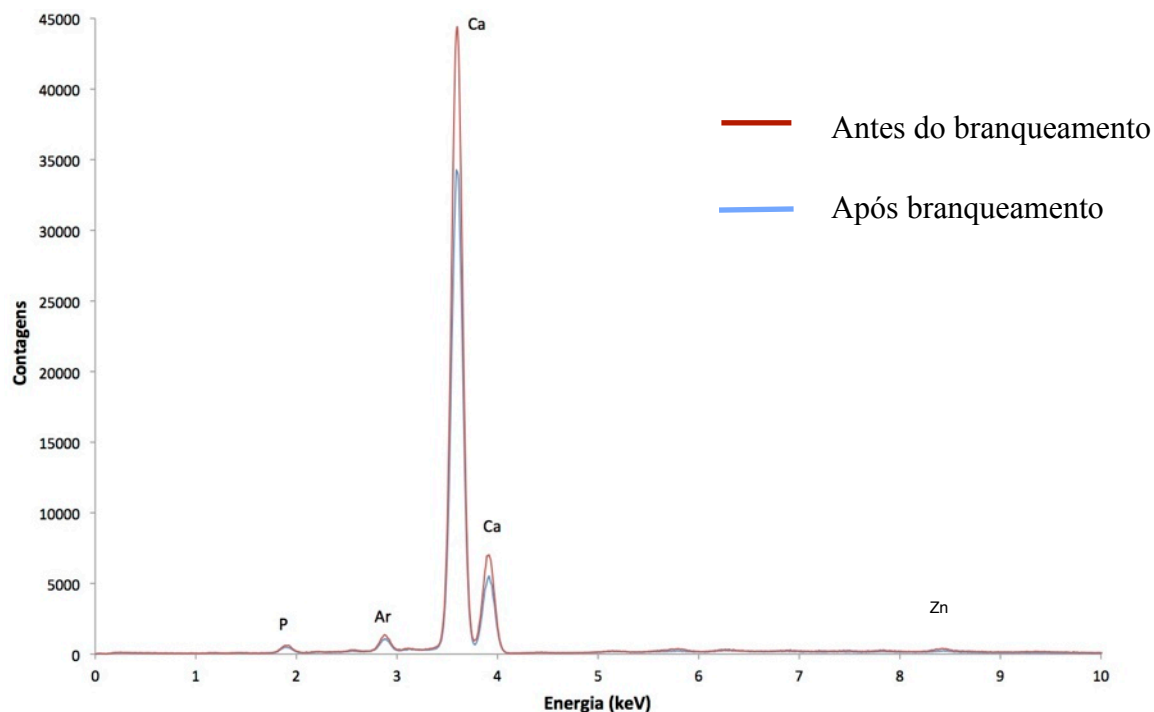


Figura 9 - Gráfico-tipo da contagem do número de fótons antes e após a aplicação do produto de branqueamento. Observa-se a existência dos elementos major (Ca e P) e dos elementos-traço (Zn em todas as amostras; Al e Fe em algumas das amostras) e pode-se observar, ainda, a diminuição das contagens dos vários elementos antes e após a aplicação do produto de branqueamento.

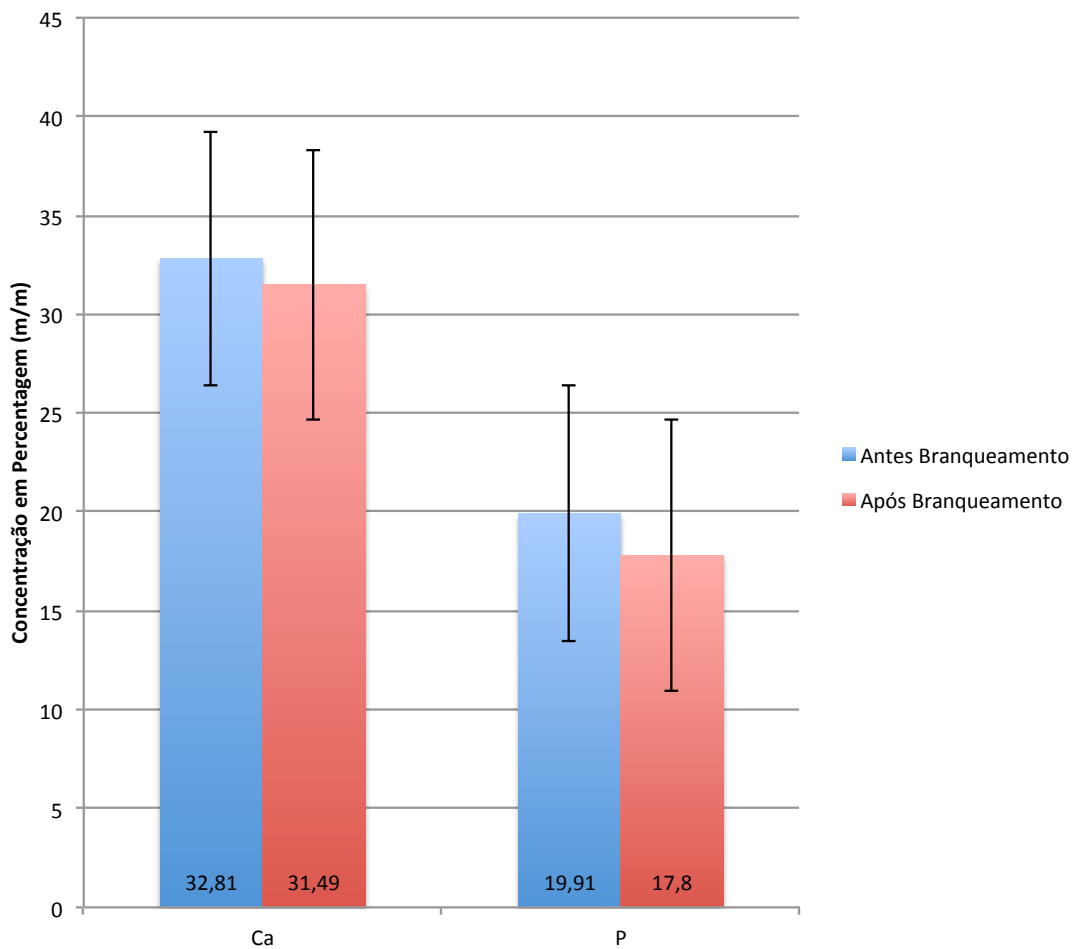


Figura 10 - Gráficos de barras onde estão representados os valores das médias obtidos para os elementos Ca e P, concentração expressa em percentagem (m/m) e os respetivos desvios padrão.

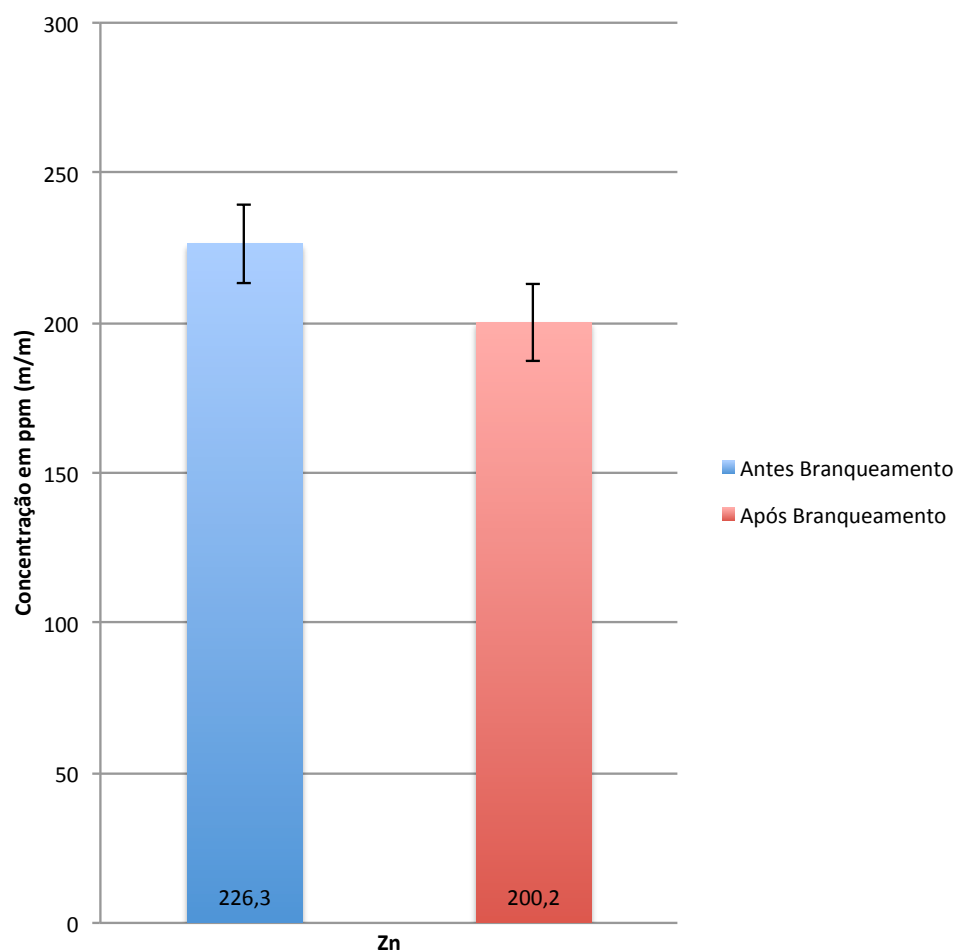


Figura 11 - Gráficos de barras onde estão representados os valores das médias obtidos para o elemento Zn, concentração expressa em ppm e respetivo desvio padrão.

Elementos		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Zn	Antes Branqueamento	226.3 ppm	51	77.3	10.8
	Após Branqueamento	200.2 ppm	51	37.9	5.3
Ca	Antes Branqueamento	32.81 % (m/m)	53	3.93	0.54
	Após Branqueamento	31.49 % (m/m)	53	3.10	0.43
P	Antes Branqueamento	19.91 % (m/m)	45	3.76	0.56
	Após Branqueamento	17.80 % (m/m)	45	3.55	0.53

Tabela 1 - Média, desvio padrão e erro padrão da média dos resultados obtidos para os vários elementos (Zn, Ca e P), concentração expressa em percentagem (m/m) e em ppm (m/m), respetivamente.

Elementos		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de confiança da diferença		Significância
					Min.	Máx.	
Zn	antes - após Branqueamento	26.08 ppm	78.41	10.98	4.02	48.13	0,021
Ca	antes - após Branqueamento	1.32 % (m/m)	4.64	0.64	0.04	2.60	0,043
P	antes - após Branqueamento	2.11 % (m/m)	4.45	0.66	0.77	3.45	0,003

Tabela 2 - Média, desvio padrão, intervalo de confiança e nível de significância dos resultados obtidos para os vários elementos (Zn, Ca e P). Observa-se que as diferenças encontradas para os 3 elementos são estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5. Discussão

De forma a determinar se existem alterações na composição elementar da superfície do esmalte dentário após aplicação de um produto de branqueamento realizou-se a leitura e análise das amostras de esmalte com recurso à técnica de EDXRF antes (*self-control*) e após branqueamento. Os resultados obtidos neste estudo-piloto mostram que existe uma diminuição estatisticamente significativa da quantidade dos elementos Ca, P e Zn após a aplicação do produto de branqueamento dentário quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos estão de acordo com as principais referências bibliográficas sobre o tema (Bailey *et al.*, 2009; Oprea *et al.*, 2009; Rautray *et al.*, 2009). No que diz respeito à análise qualitativa, a presença de elementos como o Ca, P, Zn, Al e Fe está em consonância com os estudos de Rautray e Proteasa (Rautray *et al.*, 2009; Proteasa *et al.*, 2008). No entanto, Rautray e colaboradores referem que nas amostras analisadas foram encontrados outros elementos tais como Pb, o que pode estar relacionado com a incorporação de metais pesados na estrutura da hidroxiapatite (Rautray *et al.*, 2009).

Relativamente à análise quantitativa, verificou-se uma diminuição das concentrações de Ca, P e Zn, após a aplicação de um produto de branqueamento dentário com PC 10%. Neste estudo confirmou-se a tendência para a perda de concentração de Ca e P, no entanto os valores obtidos foram inferiores aos descritos por Potočnik e colaboradores, que referem uma perda percentual de 15,13% (w/w) de Ca e de 1,34% (w/w) de P (Potočnik *et al.*, 2000).

Os prismas de esmalte são compostos por cristais de hidroxiapatite que na sua composição apresenta como principais elementos o Cálcio (Ca), o Fósforo (P) e o oxigénio (O) e em menor quantidade os elementos hidrogénio (H) e flúor (F) (Simmer *et al.*, 1995). Neste estudo não foram registados os elementos O, H e F devido à sensibilidade da tecnologia utilizada, a qual apenas permite a detecção de elementos com peso atómico superior a 11 (Christensen *et al.*, 2012).

Na organização estrutural do esmalte dentário, os prismas de esmalte, que correspondem à componente inorgânica dispõem-se paralelamente e a componente orgânica está presente nos espaços interprismáticos (Simmer *et al.*, 1995). No entanto, a

camada de esmalte superficial é aprismática como resultado da finalização do processo de maturação e dos sucessivos e contínuos processos de *turn-over* mineral por ação da saliva supersaturada em fosfato de cálcio (Amerongen e Veerman, 2002). Por consequente e tendo em conta o protocolo de aplicação dos produtos de branqueamento e de medição espectral das amostras, as variações referentes aos elementos detetáveis reportar-se-ão quase indubitavelmente às modificações superficiais do esmalte, ou seja, a nível do esmalte aprismático. Embora a literatura científica reporte que as alterações elementares da superfície dentária por ação do produto de branqueamento seja muito escassa, existem diversos estudos que reportam a inexistência de alterações morfológicas detetadas através por microscopia eletrónica de varrimento (Yurdukuru *et al.*, 2003).

A perda de estrutura mineral do esmalte leva a que sejam necessários mecanismos compensatórios na cavidade oral, no sentido de minimizar os efeitos adversos do branqueamento sobre os tecidos dentários, nomeadamente o aumento de sensibilidade e a possibilidade de dano pulpar. Neste processo de remineralização do esmalte, a saliva tem um papel preponderante, uma vez que conduz à incorporação de novos iões na estrutura do esmalte. Seria importante identificar em estudos futuros o fenómeno de remineralização e tentar quantificá-lo mediante o *follow-up* das amostras por períodos fixos de tempo, após a última aplicação do produto de branqueamento.

Embora os fatores habitualmente determinantes para o paciente quando escolhe o agente branqueador sejam o preço e a eficácia, é da responsabilidade do Médico Dentista verificar se o produto que vai ser utilizado pelos seus pacientes é eficaz bem como assegurar que este apresenta uma concentração e composição adequadas para a utilização clínica (Martin *et al.*, 2007). Também é importante a discussão com o paciente à cerca dos prós e contras deste procedimento (JADA, 2009).

O EDXRF é uma técnica de espectroscopia que possibilita a quantificação de elementos numa determinada amostra (Christensen *et al.*, 2012). Esta técnica é vantajosa na medida em que é não-destrutiva, permitindo a utilização das próprias amostras como controlo (estas podem ser analisadas antes e depois do branqueamento). No âmbito da Medicina Dentária, esta técnica tem sido utilizada principalmente na área forense, para identificar e caracterizar indivíduos, embora também possa ser empregue para observar as interações do meio externo com o esmalte, nomeadamente a

incorporação de elementos traço, como é o caso dos metais pesados (Zaichick *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos neste estudo-piloto, apesar de serem estatisticamente significativos, são sugestivos de um reduzido efeito clínico.

O presente estudo é do tipo *in vitro* pelo que nos restringimos a extrapolar consequências para a superfície do esmalte dentário *in vivo*. Apesar desta limitação não nos escusamos a apresentar algumas dificuldades técnicas com que nos deparamos.

O presente estudo utilizou produtos de branqueamento cedidos sem interesses por parte do fabricante (Opalescence 10% PF, Ultradent Inc., USA), cujas amostras fornecidas foram provenientes do mesmo lote (lote #1092012). Será relevante comparar os resultados obtidos neste estudo com resultados de estudos futuros provenientes da utilização de produtos de outros lotes.

Uma das limitações que tem vindo a ser apresentada noutros estudos semelhantes, é a não utilização de saliva nos procedimentos experimentais. No protocolo embora não tenha sido utilizada saliva humana foi utilizada, conforme descrita nos materiais e métodos, saliva artificial inorgânica.

Dadas estas limitações, torna-se necessária a realização de mais estudos que contemplem todas as questões anteriormente levantadas, em particular a realização de mais estudos *in vitro* onde sejam analisados vários produtos de branqueamento e em que hajam períodos de *follow-up* (num tentativa de observar o efeito de remineralização da saliva). Posteriormente, devem ser realizados estudos *in vivo* onde se sejam testados vários protocolos para confrontação com os resultados *in vitro*, no sentido de averiguar as implicações da aplicação destes produtos no esmalte dos pacientes.

6. Conclusão

Tendo em consideração as limitações deste estudo, podem retirar-se as seguintes conclusões:

(1) Observa-se a existência de elementos químicos major (Ca e P) e elementos traço Zn (em todas as amostras), Al e Fe (apenas em algumas das amostras).

(2) Após a aplicação do produto de branqueamento com PC 10% observa-se uma diminuição da quantidade dos elementos Ca, P e Zn presentes nas amostras.

Serão necessários, mais estudos sobre as alterações elementares do esmalte dentário utilizando um número de amostras maior, utilizando outros produtos de branqueamento e realizando períodos de *follow-up* quando finalizado o tratamento.

7. Referências Bibliográficas

1. Amerongen, A. V., & Veerman, E. C. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12-22.
2. Attin, T., Schmidlin, P. R., Wegehaupt, F., & Wiegand, A. (2009). Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: A review. *Dental Materials*, 25(2), 143-157.
3. Ausschill, T. M., Hellwig, E., Schmidale, S., Sculean, A., & Arweiler, N. B. (2005). Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (otc, in-office, at-home). *Operative Dentistry*, 30(2), 156-163.
4. Bailey, M. J., Coe, S., Grant, D. M., Grime, G. W., & Jeynes, C. (2009). Accurate determination of the ca:P ratio in rough hydroxyapatite samples by sem-eds, pixe and rbs—a comparative study. *X-Ray Spectrometry*, 38(4), 343-347.
5. Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (1999). Proteinases in developing dental enamel. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10(4), 425-441.
6. Beck, L. (2005). Improvement in detection limits by using helium ions for particle-induced x-ray emission. *X-Ray Spectrometry*, 34(4), 393-399.
7. Benbachir, N., Ardu, S., & Krejci, I. (2008). Spectrophotometric evaluation of the efficacy of a new in-office bleaching technique. *Quintessence International*, 39(4), 299-306.
8. Bennun, L., Greaves, E. D., & Blostein, J. J. (2002). New procedure for intensity and detection limit determination in spectral trace analysis: Application for trace mercury by txrf. *X-Ray Spectrometry*, 31(4), 289-295.

9. Bizhang, M., Chun, Y. H., Damerou, K., Singh, P., Raab, W. H., & Zimmer, S. (2009). Comparative clinical study of the effectiveness of three different bleaching methods. *Operative Dentistry*, 34(6), 635-641.
10. Browning, W. D., Chan, D. C., Myers, M. L., Brackett, W. W., Brackett, M. G., & Pashley, D. H. (2008). Comparison of traditional and low sensitivity whiteners. *Operative Dentistry*, 33(4), 379-385.
11. Bushong, S. C. (1993). *Radiologic science for technologists: Physics, biology and protection* (5th ed.).
12. Cadenaro, M., Breschi, L., Nucci, C., Antonioli, F., Visintini, E., Prati, C., . . . Di Lenarda, R. (2008). Effect of two in-office whitening agents on the enamel surface in vivo: A morphological and non-contact profilometric study. *Operative Dentistry*, 33(2), 127-134.
13. Cardoso, P. C., Reis, A., Loguercio, A., Vieira, L. C., & Baratieri, L. N. (2010). Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. *Journal of the American Dental Association*, 141(10), 1213-1220.
14. Carvalho, M. L., Casaca, C., Marques, J. P., Pinheiro, T., & Cunha, A. S. (2001). Human teeth elemental profiles measured by synchrotron x-ray fluorescence: Dietary habits and environmental influence. *X-Ray Spectrometry*, 30(3), 190-193.
15. Carvalho, M. L., Pinheiro, T., Barreiros, M. A., Casaca, C., Cunha, A. S., & Chevallier, P. (1998). Amalgam components drift in teeth-toxicity risks: A preliminary approach. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 136, 913-918.

- 16.Cheng, Z. J., Wang, X. M., Cui, F. Z., Ge, J., & Yan, J. X. (2009). The enamel softening and loss during early erosion studied by afm, sem and nanoindentation. *Biomed Mater*, 4(1), 015020.
- 17.Christensen, A. M., Smith, M. A., & Thomas, R. M. (2012). Validation of x-ray fluorescence spectrometry for determining osseous or dental origin of unknown material. *Journal of Forensic Sciences*, 57(1), 47-51.
- 18.Dahl, J. E., & Pallesen, U. (2003). Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14(4), 292-304.
- 19.Demarco, F. F., Meireles, S. S., & Masotti, A. S. (2009). Over-the-counter whitening agents: A concise review. *Braz Oral Res*, 23 Suppl 1, 64-70.
- 20.Faraoni-Romano, J. J., Da Silveira, A. G., Turssi, C. P., & Serra, M. C. (2008). Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: Effect on dental microhardness and roughness. *J Esthet Restor Dent*, 20(6), 395-402; discussion 403-394.
- 21.Finke, M., Jandt, K. D., & Parker, D. M. (2000). The early stages of native enamel dissolution studied with atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 232(1), 156-164.
- 22.Fugaro, J. O., Nordahl, I., Fugaro, O. J., Matis, B. A., & Mjor, I. A. (2004). Pulp reaction to vital bleaching. *Operative Dentistry*, 29(4), 363-368.
- 23.Gal, J. Y., Fovet, Y., & Adib-Yadzi, M. (2001). About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta*, 53(6), 1103-1115.
- 24.Gerlach, R. W., Zhou, X., & McClanahan, S. F. (2002). Comparative response of whitening strips to a low peroxide and potassium nitrate bleaching gel. *American Journal of Dentistry*, 15 Spec No, 19A-23A.

25. Goldberg, M., Grootveld, M., & Lynch, E. (2010). Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: A review. *Clinical Oral Investigations*, 14(1), 1-10.
26. Goldstein, R. E. (1997). In-office bleaching: Where we came from, where we are today. *Journal of the American Dental Association*, 128 Suppl, 11S-15S.
27. Gomes, M. N., Francci, C., Medeiros, I. S., De Godoy Froes Salgado, N. R., Riehl, H., Marasca, J. M., & Muench, A. (2009). Effect of light irradiation on tooth whitening: Enamel microhardness and color change. *J Esthet Restor Dent*, 21(6), 387-394.
28. Grieken, R. V., & Markowicz, A. (2002). *Handbook of x-ray spectrometry* (2nd ed.). New York.
29. Gultz, J., Kaim, J., Scherer, W., & Gupta, H. (1999). Two in-office bleaching systems: A scanning electron microscope study. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 20(10), 965-968, 970; quiz 972.
30. Gurgan, S., Cakir, F. Y., & Yazici, E. (2010). Different light-activated in-office bleaching systems: A clinical evaluation. *Lasers Med Sci*, 25(6), 817-822.
31. Hanks, C. T., Fat, J. C., Wataha, J. C., & Corcoran, J. F. (1993). Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *Journal of Dental Research*, 72(5), 931-938.
32. Haywood, V. B., & Heymann, H. O. (1989). Nightguard vital bleaching. *Quintessence International*, 20(3), 173-176.
33. Haywood, V. B., Leonard, R. H., Nelson, C. F., & Brunson, W. D. (1994). Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. *Journal of the American Dental Association*, 125(9), 1219-1226.

- 34.JADA (2009). For the Dental Patient: Tooth whitening – what you should know. 40: 384.
- 35.Joiner, A. (2006). The bleaching of teeth: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 34(7), 412-419.
- 36.Joiner, A. (2007). Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *Journal of Dentistry*, 35(12), 889-896.
- 37.Jorgensen, M. G., & Carroll, W. B. (2002). Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *Journal of the American Dental Association*, 133(8), 1076-1082; quiz 1094-1075.
- 38.Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). *Histologia básica* (11th edition ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 39.Kossatz, S., Dalanhol, A. P., Cunha, T., Loguercio, A., & Reis, A. (2011). Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Operative Dentistry*, 36(3), 251-257.
- 40.Leonard, R. H., Jr., Eagle, J. C., Garland, G. E., Matthews, K. P., Rudd, A. L., & Phillips, C. (2001). Nightguard vital bleaching and its effect on enamel surface morphology. *J Esthet Restor Dent*, 13(2), 132-139.
- 41.Lima, A. F., Lessa, F. C., Mancini, M. N., Hebling, J., Costa, C. A., & Marchi, G. M. (2010). Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of h₂o₂ released from bleaching agents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 109(4), e70-76.

- 42.Lima, A. F., Ribeiro, A. P., Soares, D. G., Sacono, N. T., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2013). Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like mdpc-23 cells. *Acta Odontologica Scandinavica*.
- 43.Maia, E., Baratieri, L. N., Caldeira de Andrada, M. A., Monteiro, S., Jr., & Vieira, L. C. (2008). The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: An in situ study. *Journal of Dentistry*, 36(1), 2-7.
- 44.Markowitz, K. (2010). Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? *Medical Hypotheses*, 74(5), 835-840.
- 45.Marques, D. N. (2008). *Efectos del peróxido de hidrógeno en la fisiología celular de la cavidad oral: Estudio funcional y clínico*. Universidad de Extremadura.
- 46.Martin, J. M., Torno, V., Vaz, M. V., Vieira, S., Rosa, E. A., & Mazur, R. F. (2007). Specific concentration evaluation of 16% carbamide peroxide compounded at dispensing pharmacies. *Braz Oral Res*, 21(4), 318-322.
- 47.Mata, A. D., D. Marques, *et al.* (2009). in *Branqueamento Dentário. Estética em Medicina Dentária*. J. C. Ramos. Coimbra, Edição de autor: 16-32.
- 48.Matis, B. A., Cochran, M. A., & Eckert, G. (2009a). Review of the effectiveness of various tooth whitening systems. *Operative Dentistry*, 34(2), 230-235.
- 49.Matis, B. A., Cochran, M. A., Wang, G., & Eckert, G. J. (2009b). A clinical evaluation of two in-office bleaching regimens with and without tray bleaching. *Operative Dentistry*, 34(2), 142-149.
- 50.Mielczarek, A., Klukowska, M., Ganowicz, M., Kwiatkowska, A., & Kwasny, M. (2008). The effect of strip, tray and office peroxide bleaching systems on enamel surfaces in vitro. *Dental Materials*, 24(11), 1495-1500.

51. Naik, S., Tredwin, C. J., & Scully, C. (2006). Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology*, 42(7), 668-674.
52. Nour El-din, A. K., Miller, B. H., Griggs, J. A., & Wakefield, C. (2006). Immediate bonding to bleached enamel. *Operative Dentistry*, 31(1), 106-114.
53. Oprea, C., Szalanski, P. J., Gustova, M. V., Oprea, I. A., & Buzguta, V. (2009). Xrf detection limits for dental tissues of human teeth. *Vacuum*, 83, Supplement 1(0), S166-S168.
54. Paravina, R. D., Johnston, W. M., & Powers, J. M. (2007). New shade guide for evaluation of tooth whitening--colorimetric study. *J Esthet Restor Dent*, 19(5), 276-283; discussion 283.
55. Parkinson, C. R., Shahzad, A., & Rees, G. D. (2010). Initial stages of enamel erosion: An in situ atomic force microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 171(3), 298-302.
56. Perdigão, J., Franci, C., Swift, E. J., Jr., Ambrose, W. W., & Lopes, M. (1998). Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *American Journal of Dentistry*, 11(6), 291-301.
57. Pinto, C. F., Oliveira, R., Cavalli, V., & Giannini, M. (2004). Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Braz Oral Res*, 18(4), 306-311.
58. Potocnik, I., Kosec, L., & Gaspersic, D. (2000). Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *Journal of Endodontics*, 26(4), 203-206.

59. Preoteasa, E. A., Preoteasa, E., Kuczumow, A., Gurban, D., Harangus, L., Grambole, D., & Herrmann, F. (2008). Broad-beam pixe and μ -pixe analysis of normal and in vitro demineralized dental enamel. *X-Ray Spectrometry*, 37(5), 517-535.
60. Price, R. B., Sedarous, M., & Hiltz, G. S. (2000). The pH of tooth-whitening products. *Journal / Canadian Dental Association. Journal de l'Association Dentaire Canadienne*, 66(8), 421-426.
61. Pugh, G., Jr., Zaidel, L., Lin, N., Stranick, M., & Bagley, D. (2005). High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: Effects on enamel and pulp. *J Esthet Restor Dent*, 17(1), 40-45; discussion 46-47.
62. Rautray, T. R., Das, S., & Rautray, A. C. (2010). In situ analysis of human teeth by external pixe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(14), 2371-2374.
63. Sadler, T. W. (2004). *Langman's medical embryology* (9th Edition ed.). Philadelphia, EUA: Lippincott, Williams & Wilkins.
64. Scientific Committee on Consumer Products (European Commission) (2005). *Opinion on hydrogen peroxide in tooth whitening products*. SCCP/0844/04.
65. Silveira J.M.; Marques D.S.; Marques J.R.; Amaral J.R.; Mata A.D. (2005, Novembro). *Branqueamento Dentário: Venda Livre Versus Recomendação Profissional - Estudo in-vitro*. Poster apresentado no XIV Congresso da Ordem dos Médicos Dentistas, Lisboa, Portugal.
66. Simmer, J. P., & Fincham, A. G. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 6(2), 84-108.

67. Soares, D. G., Ribeiro, A. P., da Silveira Vargas, F., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2012). Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clinical Oral Investigations*.
68. Soares, D. G., Ribeiro, A. P., Sacono, N. T., Coldebella, C. R., Hebling, J., & Costa, C. A. (2011). Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like mdpc-23 cells. *International Endodontic Journal*, 44(2), 116-125.
69. Sun, G. (2000). The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dental Clinics of North America*, 44(4), 831-850.
70. Yurdukoru, B., Akoren, A. C., & Unsal, M. K. (2003). Alterations in human enamel surface morphology following the use of an office bleaching agent and consecutive application of 37% phosphoric acid in vivo. *Journal of Clinical Dentistry*, 14(4), 103-107.
71. Zaichick, V., Ovchjarenko, N., & Zaichick, S. (1999). In vivo energy dispersive x-ray fluorescence for measuring the content of essential and toxic trace elements in teeth. *Applied Radiation and Isotopes*, 50(2), 283-293.
72. Zantner, C., Beheim-Schwarzbach, N., Neumann, K., & Kielbassa, A. M. (2007). Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dental Materials*, 23(2), 243-250.
73. Zantner, C., Derdilopoulou, F., Martus, P., & Kielbassa, A. M. (2006). Randomized clinical trial on the efficacy of 2 over-the-counter whitening systems. *Quintessence International*, 37(9), 695-706.
74. Zimmerli, B., Jeger, F., & Lussi, A. (2010). Bleaching of nonvital teeth. A clinically relevant literature review. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin*, 120(4), 306-320.

8. Anexos

8.1 Anexo 1 - Bone Meal 1486



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1486

Bone Meal

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating analytical methods used for the determination of selected major, minor, and trace elements in bone and in material of a similar matrix. It consists of steamed bone meal that was sieved and blended to a high degree of homogeneity.

The base material for this SRM was obtained from a commercial supplier. The entire material lot was sieved through a nominal 355 μm sieve (45 mesh), blended in the NIST cone blender, radiation sterilized and bottled into units of 50 g.

Certified and Non-certified Concentrations of Constituent Elements: The certified concentrations of the constituent elements are shown in Table 1. These concentrations are based on the results of a definitive analytical method or the agreement of results by at least two independent methods. Non-certified concentrations, for information only, are provided in Table 2.

NOTICE AND WARNINGS TO USERS:

Expiration of Certification: This certification is valid for five years from the date of shipment. Should any of the certified values significantly change before then, purchasers will be notified by NIST. Please return the attached registration form to facilitate notification.

Storage: The material should be kept tightly closed in its original bottle away from sunlight or ultraviolet radiation.

Use: The bottle should be mixed well by rotating the bottle before each use. Samples of this SRM should be dried under vacuum for 24 h or for 2 h at 105 °C in a conventional drying oven. A minimum sample of 150 mg of the dried material should be used to relate analytical determinations to the certified values in this certificate.

Dissolution Procedure: Samples may be dissolved by heating with hydrofluoric and nitric acids, followed by heating to dryness with perchloric acid, cooling, and adding dilute nitric acid.

Coordination of the analyses was performed by W.F. Koch of the NIST Inorganic Analytical Research Division.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.B. Schiller and L.M. Oakley of the NIST Statistical Engineering Division.

The technical and support aspects involved in the certification and issuance of this SRM were coordinated through the Standard Reference Materials Program by R. Alvarez and T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899
December 18, 1992

William P. Reed, Chief
Standard Reference Materials Program

(over)

Material Source: The material for this SRM was obtained from the Espoma Company, Millville, NJ.

Homogeneity Assessment: Samples from randomly selected bottles of SRM 1486 were tested for homogeneity using x-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium, and potassium.

Certified Concentrations and Uncertainties: The certified value is the weighted mean of method results from a definitive analytical method or the weighted mean of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty is the half-width of a 95% confidence interval for the mean, with an allowance for systematic differences between methods.

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>	<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Calcium	26.58 ± 0.24	Iron	99 ± 8
Magnesium	0.466 ± 0.017	Lead	1.335 ± 0.014
Phosphorus	12.30 ± 0.19	Potassium	412 ± 4
		Strontium	264 ± 7
		Zinc	147 ± 16

Non-certified Concentrations: Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined but not certified are provided as additional information on the composition.

Table 2. Non-certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>	<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Silicon	(<0.02)	Aluminum	(<1)
Sodium	(0.5)	Arsenic	(0.006)
Carbon (Total)	(18.6)	Cadmium	(0.003)
Moisture		Copper	(0.8)
2 h @ 105 °C	(2.4)	Fluorine	(800)
-----		Manganese	(1)
Loss in Ignition		Selenium	(0.13)
@ 1000 °C	(31.5)		

8.2 Anexo 2 - Bone Bovine 05-02 e Bone Caprine 05-03



STATE OF NEW YORK
DEPARTMENT OF HEALTH

Wadsworth Center

The Governor Nelson A. Rockefeller Empire State Plaza

P.O. Box 509

Albany, New York 12201-050

Certificate of Analysis

Reference Materials 05-01 through 04

Lead in Bovine or Caprine Bone

New York State (NYS) Caprine and Bovine Reference Materials (RM) 05-01 through 04 are intended primarily for use in evaluating the accuracy of bone lead measurements performed using analytical methods such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and atomic absorption spectrometry (AAS). A complete set of RMs (05-01 through 04) consists of four vials of bone powder at four concentration levels: a base level and three elevated levels that contain endogenous lead. Certified values are provided only for lead. Each vial contains approximately 5 g of dried bone.

Certified Values: The certified concentrations of lead for each level of NYS RM 05-01 through 04 are listed in Table 1. These values represent the mean of results based on measurements using a single primary method based on isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICP-MS) and were confirmed *via* interlaboratory comparison using methods based on ICP-MS and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) [1]. The certified lead concentration data are expressed in units of micrograms per gram ($\mu\text{g/g}$) dry weight.

Information Values: Information values for lead isotope ratios and additional elements are provided in Table 2. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the RM user, but for which insufficient information is available to adequately assess the uncertainty associated with the value, or the value is derived from a limited number of analyses. Information values for NYS RM 05-01 through 04 were determined *via* interlaboratory comparison using ICP-MS (lead isotopes), and ICP-MS and GFAAS methods (additional elements). The informational data are expressed in units of micrograms per gram ($\mu\text{g/g}$) dry weight.

Expiration of Certification: No expiration is issued.

Maintenance of RM Certification: NYS will monitor this RM over the period of its certification.

The technical project leader responsible for the overall direction and coordination of measurements leading to the certification of this material was P.J. Parsons, Ph.D. of the New York State Department of Health's Wadsworth Center,

The ID-ICP-MS analyses were performed by D.J. Bellis, Ph.D. of the Wadsworth Center. The collection, preparation, homogeneity assessment, and exploratory analyses were performed by D.J. Bellis, K.M. Hetter, and C. Geraghty, of the Wadsworth Center.

Patrick J Parsons, Ph.D., Director
Trace Elements/Lead Poisoning Laboratory
Wadsworth Center, NYS DOH Albany, NY 12201
Certificate Issue Date: 1 August 2008

NIEHS provided funding to support the development of this RM through Grant# RO1 ES12424-04.

NOTICE AND WARNING TO USERS

This RM is derived from bovine (cow) or caprine (goat) bones collected at the New York State Department of Health's Wadsworth Center according to a protocol approved by the Center's Institutional Animal Care and Use Committee. The Wadsworth Center is fully accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, has an approved Animal Welfare Assurance (#A3183-01) with the Public Health Service, and is registered as a Class R Research Facility (#21-R-0124) with the United States Department of Agriculture. The Wadsworth Center affirms that the donor animals were sourced in the United States

Storage: The bone should be stored at room temperature away from direct sunlight.

Instructions For Use: A minimum aliquot size of 200 mg is recommended. Certified values were obtained after a dry-weight correction based on 2 hours drying at 105°C. Experimental studies indicate that drying under vacuum desiccation for 24 hours produces comparable results.

SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS

Source: The source of bones for these RM was cows and goats that had been orally dosed with lead acetate according to a standard protocol established for blood lead proficiency testing purposes [2]. Major caprine and bovine long bones (tibia, femur, humerus, radius) were harvested post mortem and adhering tissues removed.

Preparation: The bones were scraped with tantalum-fabricated tools and then subsequently cleaned with hydrogen peroxide to remove remaining tissue and marrow. The bones were shattered using the brittle fracture technique followed by grinding in a knife mill and then in an ultracentrifugal mill [3]. Batches of powdered bone were homogenized using a turbula mixer and then sample scooped into vials. To test for homogeneity, vials were selected based on a randomized sampling plan from each of the four levels. Lead content was determined in 200-g samples by ID-ICP-MS. Lead measurements were also obtained using GFAAS. Statistical analysis of the analytical results indicated satisfactory homogeneity for each level within the precision limits of the analytical methods [3].

ID-ICP-MS Analysis: Twenty-four vials of each concentration level, selected based on a randomized sampling plan, were analyzed by a high accuracy method based on ID-ICP-MS [1].

CERTIFIED REFERENCE VALUES AND UNCERTAINTIES:

The certified reference values for lead (Table 1) were the mean of the results obtained by the definitive method of double (reverse spike) isotope dilution inductively coupled mass spectrometry.

Table 1. Certified Reference Values for Lead

	Lead concentration ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)
NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone	1.09 \pm 0.03
NYS RM 05-02 Lead in Bovine Bone	16.1 \pm 0.3
NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	13.2 \pm 0.3
NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone	31.5 \pm 0.7

^aThe uncertainty in the certified value is calculated as $U = kuc$, where uc is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO Guide [4] and k is the coverage factor. The value of uc is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the measurement uncertainty, additional Type B uncertainties, and for Level 1, material heterogeneity. The coverage factor, k , is equal to 2. The expanded uncertainty, $U = kuc$, is defined as an interval estimated to have a level of confidence of 95 %.

INFORMATION VALUES:

Information values for lead isotope ratios (Table 2) were determined *via* an interlaboratory study. Values are mean of these methods. Methods included ICP-MS, HR-ICP-MS and MC-ICP-MS.

Table 2. Information Values for Lead Isotopes

	$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$
NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone	0.0535	0.8330	2.042
NYS RM 05-02 Lead in Bovine Bone	0.0527	0.8320	2.033
NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	0.0548	0.8544	2.070
NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone	0.0552	0.8622	2.079

Information values for additional elements (Table 3) were established *via* an interlaboratory study. Methods included ICP-OES, ICP-MS, and HR-ICP-MS.

Table 3. Information Values for Additional Elements

	($\mu\text{g g}^{-1}$) NYS RM 05-01 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-02 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone
Al	290	360	170	170
Ba	100	100	97	120
Ca	267,000	260,000	261,000	264,000
Fe		3.2		2.9
K	220			210
Li		0.89	0.49	0.50
Mg	4,400	4,200	4,200	4,300
Mn	2.1	2.2	1.3	1.6
Mo	0.64			
Na	6,900	6,800	6,800	6,900
P	124,000	120,000	122,000	125,000
Sr	170	160	150	150
Zn	85	80	79	81

REFERENCES

- [1] Bellis DJ, Hetter KM, Verostek MF, and Parsons PJ. Characterization of candidate reference materials for bone lead via interlaboratory study and double isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2008, 23, 298-308.
- [2] Parsons, PJ, Reilly, AA, Esernio-Jenssen, D, Werk, LN, Mofenson, HC, Stanton, NV, Matte, TD, Evaluation of blood lead proficiency testing: Comparison of open and blind paradigms, *Clinical Chemistry* 2001, 47, 322-330.
- [3] Hetter KM, Bellis DJ, Geraghty C, Todd AC and Parsons PJ. Development of candidate reference materials for the measurement of lead in bone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391, 2011-2021.
- [4] Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.

8.3 Anexo 3 - Bone Ash 1400



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1400

Bone Ash

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating analytical methods for the determination of selected major, minor, and trace elements in bone and in material of a similar matrix. It consists of bone ash that was blended to a high degree of homogeneity and bottled in 50 g units.

Certified and Non-certified Concentrations of Constituent Elements: The certified concentrations of the constituent elements are shown in Table 1. These concentrations are based on the results of a definitive analytical method or the agreement of results by at least two independent analytical methods. Non-certified concentrations, for information only, are provided in Table 2.

NOTICE AND WARNINGS TO USERS:

Expiration of Certification: This certification is valid for five years from the date of shipment from NIST. Should any of the certified values significantly change before then, purchasers will be notified by NIST. Please return the attached registration card to facilitate notification.

Storage: The material should be kept tightly closed in its original bottle away from sunlight or ultraviolet radiation.

Use: The bottle should be mixed well by rotating the bottle before each use. The sample should be dried for 4 hours at 105 °C in a conventional drying oven. A minimum sample of 1.50 mg of the dried material should be used to relate analytical determinations to the certified values on this certificate.

Dissolution Procedure: Samples may be dissolved by heating with hydrofluoric and nitric acids, followed by heating to dryness with perchloric acid, cooling, and adding dilute nitric acid.

Coordination of the analyses was performed by W.F. Koch of the NIST Inorganic Analytical Research Division.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.B. Schiller and L.M. Oakley of the NIST Statistical Engineering Division.

The technical and support aspects involved in the certification and issuance of this SRM were coordinated through the Standard Reference Materials Program by R. Alvarez and T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899
December 18, 1992

William P. Reed, Chief
Standard Reference Materials Program

(over)

Material Source: The material for this SRM was produced by the Monsanto Co., St Louis, MO.

Homogeneity Assessment: Samples from randomly selected bottles of SRM 1400 were tested for homogeneity using x-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium, and potassium.

Certified Concentrations and Uncertainties: The certified value is the mean of method results from a definitive analytical method or the weighted mean of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty is the half-width of a 95% confidence interval for the mean with an allowance for systematic differences between methods.

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>	<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Calcium	38.18 ± 0.13	Iron	660 ± 27
Magnesium	0.684 ± 0.013	Lead	9.07 ± 0.12
Phosphorus	17.91 ± 0.19	Potassium	186 ± 8
		Strontium	249 ± 7
		Zinc	181 ± 3

Non-certified Concentrations: Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined but are not certified are provided as additional information on the composition.

Table 2. Non-certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>	<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Silicon	(0.13)	Aluminum	(530)
Sodium	(0.6)	Arsenic	(0.4)
Moisture		Cadmium	(0.03)
2 h @ 105 °C	(0.2)	Copper	(2.3)
-----		Fluorine	(1250)
Loss on Ignition		Manganese	(17)
@ 1000 °C	(0.87)	Selenium	(0.08)