

EFFECTO DE LA PEROXIDASA SOBRE LA ADHESIÓN DE UNA RESINA
COMPUESTA AL ESMALTE DENTAL POSBLANQUEAMIENTO¹

EFFECT OF PEROXIDASE ON COMPOSITE RESIN ADHESION TO DENTAL
ENAMEL AFTER WHITENING¹

PAULA ALEJANDRA BALDIÓN ELORZA², LAURA NATHALIA VITERI LUCERO³, EDILBERTO LOZANO TORRES³

RESUMEN. Introducción: se ha reportado que el oxígeno residual liberado por los agentes blanqueadores interfieren en la adhesión de las resinas compuestas a la estructura dental, razón por la cual se tiene como objetivo comparar la resistencia de unión al corte (RUC) de una resina compuesta al esmalte dental posblanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38%, antes y después de tratar la superficie con la enzima peroxidasa previo a la adhesión. **Métodos:** se seleccionaron 45 premolares humanos sanos, divididos en tres grupos de 15 dientes cada uno. Grupo 1: control (solo adhesión); grupo 2: blanqueamiento y adhesión; grupo 3: blanqueamiento, aplicación de peroxidasa y adhesión. Posterior al tratamiento se midió la RUC en la máquina de ensayos Shimadzu, para determinar diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos con nivel de confianza de 95% y con valor de $p < 0,05$. **Resultados:** el grupo control obtuvo la RUC de 12,8 Mpa ($\pm 3,2$), el grupo con blanqueamiento tuvo el promedio de 3,5 Mpa ($\pm 1,43$) y el grupo con blanqueamiento y aplicación de peroxidasa presentó promedio de 12,2 Mpa ($\pm 3,12$). **Conclusiones:** los valores de RUC disminuyeron significativamente con la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38%, sin embargo, se logró el aumento significativo al aplicar la peroxidasa previa a la adhesión.

Palabras clave: peroxidasa de rábano silvestre, adhesión dental, blanqueamiento dental, resinas compuestas, peróxido de hidrógeno.

Baldión PA, Viteri LN, Lozano E. Efecto de la peroxidasa sobre la resistencia de unión de una resina compuesta al esmalte dental posblanqueamiento. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 8-21.

ABSTRACT. Introduction: some reports suggest that residual oxygen released by whitening agents interfere with composite resin adhesion to dental structure. The objective of this study is therefore to compare composite resins' shear bond strength to dental enamel after whitening using 38% hydrogen peroxide pre- and post- treatment with peroxidase enzyme before adhesion. **Methods:** a total of 45 healthy human premolars were selected and divided into three groups of 15 teeth each. Group 1: control group (only adhesion); group 2: whitening and adhesion; group 3: whitening, application of peroxidase, and adhesion. After treatment, shear bond strength was measured with a Shimadzu testing machine in order to determine significant statistical differences among the three groups, with a confidence level of 95% and $p < 0.05$. **Results:** the control group obtained a shear bond strength of 12.8Mpa (± 3.2), the whitening group showed an average 3.5 Mpa (± 1.43), and the group treated with whitening and peroxidase presented an average 12.2 Mpa (± 3.12). **Conclusions:** shear bond strength values significantly decreased with application of 38% hydrogen peroxide; however, a significant increase was also obtained by applying peroxidase before adhesion.

Key words: horseradish peroxidase, dental adhesion, dental whitening, composite resins, hydrogen peroxide.

Baldión PA, Viteri LN, Lozano E. Effect of peroxidase on composite resin adhesion to dental enamel after whitening. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 8-21.

- 1 Artículo derivado de una investigación para optar al título de Odontólogo, como proyecto del grupo de Investigación en Materiales Dentales (Grímad). Apoyo financiero de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia dentro de la convocatoria interna para apoyo de la investigación, año 2009.
- 2 Odontóloga, especialista en Rehabilitación Oral, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. Docente, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.
- 3 Odontólogos, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.

- 1 Article derived from a research project to opt to the title of Dentist, as part of a project of the Research Group on Dental Materials (GRIMAD). It obtained financial aid from Universidad Nacional de Colombia's School of Dentistry, as part of its internal call for research proposals in 2009.
- 2 Dentist, specialist in Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Universidad Nacional de Colombia. Professor at the School of Dentistry, Universidad Nacional de Colombia.
- 3 Dentists, School of Dentistry, Universidad Nacional de Colombia.

RECIBIDO: ENERO 17/2012-ACEPTADO: JUNIO 5/2012

SUBMITTED: JANUARY 17/2012-ACCEPTED: JUNE 5/2012

INTRODUCCIÓN

Existe controversia en cuanto a los efectos de los agentes de blanqueamiento sobre los tejidos orales duros y blandos. Se ha intentado promulgar el uso racional y responsable de los mismos, así como la elección de productos que hayan sido sometidos a investigación, parámetros que darán seguridad y éxito en el tratamiento, minimizando los posibles efectos adversos. Las alteraciones del esmalte reportadas en algunos estudios incluyen incremento de la porosidad, formación de fisuras, erosión de la superficie y zonas de desmineralización de las áreas interprismáticas,¹⁻⁶ como también, cambios en su composición química y alteraciones de sus propiedades mecánicas.^{1,7-13} Autores como Dishman y colaboradores¹⁴ y Villarreal y colaboradores,¹⁵ aseguran que los agentes blanqueadores interfieren en la adhesión de las resinas compuestas a la estructura dental, a través de la interacción con el oxígeno residual en forma de radicales libres que permanecen en los tejidos de dos a cuatro semanas después de concluido el tratamiento de blanqueamiento dental,^{7, 8, 10} inhibiendo la capacidad adhesiva de las mismas. Sin embargo, se ha intentado probar algunos métodos que ayuden a inactivar los radicales libres de oxígeno residual para tratar de revertir las consecuencias fisicoquímicas indeseables sobre la estructura dental y la adhesión al sustrato adamantino.^{15, 16} Esperar un lapso de tiempo prudente posterior al tratamiento de blanqueamiento dental¹⁷ o el uso de sustancias antioxidantes,^{15, 18, 19} se han propuesto como estrategias para eliminar el peróxido residual de la estructura dental para poder efectuar restauraciones adhesivas inmediatamente después de terminado el proceso de blanqueamiento, y a la vez, proteger la estructura del esmalte de los posibles efectos adversos del peróxido residual de los agentes de blanqueamiento, como cambios microestructurales,^{2, 4, 5} disminución de la dureza superficial²⁰ y alteración en su composición química.^{7, 9}

Estudios como el de Türkün y colaboradores^{19, 21} y de Gökçe y colaboradores²² han sugerido el uso de ascorbato de sodio como método eficaz para revertir el efecto oxidante de sustancias blanqueadoras, mientras que Rotstein y colaboradores¹⁸ encontraron que, la catalasa aplicada tópicamente por tres minutos fue efectiva en eliminar totalmente el peróxido de hidrógeno residual contenido en las estructuras dentarias después de la aplicación del peróxido de hidrógeno a nivel intracoronal.

INTRODUCTION

There exists some controversy on the effects of whitening agents on both soft and hard oral tissues. A rational and responsible use of such agents has been promoted, as well as selecting products that have been thoroughly studied, in order to provide safe and successful treatments while minimizing side unwanted effects. Enamel alterations reported by some studies include increased porosity, fissure formation, surface erosion, and demineralization zones at interprismatic areas,¹⁻⁶ as well as alterations in terms of chemical composition and mechanical properties.^{1, 7-13} Authors such as Dishman et al¹⁴ and Villarreal et al¹⁵ maintain that whitening agents interfere with composite resin adhesion to dental structure due to interaction with residual oxygen in form of free radicals that remain on tissues two to four weeks after completing the dental whitening procedure,^{7, 8, 10} thus blocking their adhesive properties. Nevertheless, some methods for neutralizing residual oxygen free radicals have been tested in order to reverse the unwanted physicochemical effects on both dental structure and enamel substrate adhesion.^{15, 16} Some strategies, such as waiting for a reasonable time after dental whitening¹⁷ or using antioxidant substances^{15, 18, 19} have been suggested as a way to removing residual peroxide from dental structures in order to perform adhesive restorations right after the whitening procedure while at the same time protecting the enamel from possible unwanted side effects of the whitening agents' residual peroxide, such as microstructural changes,^{2, 4, 5} surface weakening,²⁰ or alteration of its chemical composition.^{7, 9}

Studies such as the ones by Türkün et al^{19, 21} and Gökçe et al²² have suggested the use of sodium ascorbate as an effective method to revert the oxidant effect of whitening substances; similarly, Rotstein et al¹⁸ found out that catalase locally used for three minutes was effective for totally eliminating the residual hydrogen peroxide remaining on dental structures after application of hydrogen peroxide at the intracoronal area.

Este estudio pretendió evaluar comparativamente el efecto de un tratamiento antioxidante con la enzima peroxidasa sobre la resistencia de unión inmediata de una resina compuesta al esmalte dental expuesto a un agente de blanqueamiento con base en peróxido de hidrógeno de alta concentración (38%).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se hizo un estudio de tipo experimental cuantitativo *in vitro*, para el cual se seleccionaron 45 dientes premolares humanos sanos, con formación radicular completa recién extraídos por razones ortodónticas, se verificó ausencia de caries, fracturas, desgastes, defectos del esmalte y restauraciones previas, las muestras fueron mantenidas en el medio de almacenamiento durante un periodo no mayor a tres meses. Se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas para la recolección, manejo y desecho de las muestras, según la resolución N.º 008430 de 1993 del Ministerio de Salud,²³ en la cual este estudio se clasifica como una investigación de riesgo mínimo, para la que fue necesario diligenciar un formato firmado por cada paciente, quien dio su consentimiento para la donación de sus dientes específicamente para este estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Las muestras se fijaron en cloramina al 0,5% por 24 h y luego fueron almacenadas en agua destilada hasta el momento de las pruebas. Los dientes fueron embebidos en moldes de resina acrílica para conformar sostenedores en forma de cubo para facilitar la colocación de las muestras en la máquina de ensayos Shimadzu AG-SI Series. El área adhesiva se delimitó previamente mediante el empleo de un círculo de papel *Contact*® con un agujero en el centro del mismo de 2 mm de diámetro. Después se aplicó ácido fosfórico al 37% para hacer el acondicionamiento superficial al esmalte, se secó con papel absorbente y luego se aplicaron dos capas de adhesivo Tetric N-Bond® (Ivoclar/Vivadent, Alemania, *Liechtenstein*) con un aplicador hasta obtener una superficie brillante, se aireó suavemente y se fotopolimerizó durante 20 s en cada superficie (M-D-V) con la lámpara Bluephase C8 G2® (Ivoclar/Vivadent, Alemania, *Liechtenstein*) en el programa *Low* o de baja potencia, según las instrucciones del fabricante.

The purpose of this study was to comparatively evaluate the effect of antioxidant treatments with peroxidase on composite resins' immediate bond strength to dental enamels that have been exposed to whitening agents with high concentrations (38%) of hydrogen peroxide.

MATERIALS AND METHODS

This was an *in vitro* experimental quantitative study on 45 healthy human premolars with complete root formation, recently extracted for orthodontic reasons and with no caries, fractures, dental wear, enamel faults, or previous restorations. The samples were stored in proper conditions for a period no greater than three months. Ethical considerations of sample collection, handling and disposal were respected, thus complying with Ministry of Health Resolution 008430 of 1993,²³ which considers this study to be of minimum risk; patients provided a signed consent for donating their teeth specifically for this study, which was approved by the Ethics Committee of Universidad Nacional de Colombia's School of Dentistry.

The samples were fixed on 0.5% chloramine for 24 h, and later stored on distilled water until the tests began. The teeth were introduced in acrylic resin casts in order to shape cube-like supports that later facilitated their insertion in the Shimadzu AG-SI Series testing machine. The adhesive area was previously delimited by means of a *Contact*® paper circle with a central hole of 2 mm in diameter. 37% phosphoric acid was later added to adequately prepare the enamel surfaces; they were dried with paper towels, and two layers on Tetric N-Bond® adhesive (Ivoclar/Vivadent, Germany, *Liechtenstein*) were later applied for the surfaces to get a bright shade. The samples were kindly ventilated and each of them (M-V-D) was photopolymerized during 20 seconds with a Bluephase G2® lamp (Ivoclar/Vivadent, Germany, *Liechtenstein*) on low mode, following the manufacturer's instructions.

Las muestras fueron separadas en tres grupos; grupo 1: adhesión, limpieza de la superficie con bicarbonato de sodio y agua, aplicación de ácido fosfórico al 37%, lavado, secado, adhesivo y resina; grupo 2: blanqueamiento-adhesión, aplicación de peróxido de hidrógeno al 38% (Opalescence X-tra Boost®/Ultradent Products, South Jordan, USA); siguiendo las indicaciones del fabricante, se mezcló la jeringa activadora con el agente blanqueador para hacer dos aplicaciones consecutivas de 15 min cada una, formando una capa no mayor a 1 mm de espesor; limpieza de la superficie con bicarbonato de sodio y agua, aplicación de ácido fosfórico al 37%, lavado, secado, adhesivo, resina; grupo 3: blanqueamiento-enzima; el antioxidante enzimático utilizado fue peroxidasa de rábano picante (Peroxidase from horseradish type I/ SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA), que contiene 50-150 unidades/mg sólido, la cual fue disuelta en un *buffer* de fosfato, dando una concentración final de peso volumen de 472 mg/ml a pH de 6,9 a 7, la solución fue almacenada a -20 °C hasta el momento de su utilización, momento en el cual se aplicó una capa delgada en la superficie dental con un aplicador y se dejó actuar durante 15 min. Luego, se hizo el lavado de las muestras con agua destilada, se secó la superficie con papel absorbente y se hizo el proceso de adhesión convencional.

Posterior a los tratamientos de superficie y adhesión de la resina compuesta, cada muestra fue probada en la máquina de ensayos universales Shimadzu AG-IS Series, ubicando la lámina de corte a 0,5 mm de la interfase adhesiva para aplicar la carga de 50 N, a velocidad constante de 1 mm/min, hasta producir la fractura de espécimen y así, registrar los valores en los que se produjo la falla. Teniendo en cuenta el área de adhesión ($A = \pi r^2$) en mm² y la magnitud de la carga registrada en Newtons, se calculó el correspondiente esfuerzo en Mpa (N/mm²), consignando los datos en una tabla que relacionaba las dos variables del estudio: tratamiento de la superficie por grupo y la fuerza de adhesión al esmalte dental (resistencia de unión al corte en Mpa).

Los datos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica basada en rangos de ANOVA Kruskal-Wallis de una vía para contrastar la hipótesis de igualdad de las medianas de los tratamientos y posteriormente la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para contrastar la hipótesis de igualdad de los grupos de interés,

The samples were sorted out in three groups: group 1: adhesion, surface cleansing with sodium bicarbonate and water, application of 37% phosphoric acid, rinsing, drying, adhesive, resin; group 2: whitening-adhesion, application of 38% hydrogen peroxide (Opalescence X-tra Boost®/Ultradent Products, South Jordan, USA)—following the manufacturer's instructions, the whitening agent was mixed in an activator syringe, and two consecutive applications of 15 min each were performed until obtaining a layer no greater than 1 mm in thickness—, surface cleansing with sodium bicarbonate and water, application of 37% phosphoric acid, rinsing, drying, adhesive, and resin; group 3: whitening-enzyme; the enzymatic antioxidant used was horseradish peroxidase (Peroxidase from horseradish type I/ SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) containing 50-150 units/mg solid, which was dissolved in a phosphate buffer, producing a final concentration of 472 mg/ml weight/volume at a pH of 6.9 to 7. This solution was stored at a temperature of -20 °C until it was used; at that moment, a thin layer of it was applied to the dental surface, letting it work for 15 min. Distilled water was used to rinse the samples; their surfaces were dried with paper towels, and a conventional adhesion process was performed.

After surface treatment and composite resin adhesion, each sample was tested at the Shimadzu AG-IS Series universal testing machine, setting the section sheet at 0,5 mm from the adhesive interface. A load of 50 N was applied at a constant speed of 1 mm/min until fracturing the sample; the values at which this fissure occurred were recorded. Considering adhesion area ($A = \pi r^2$), given in mm, as well as the load magnitude (in newtons), the corresponding strength was calculated in Mpa (N/mm²); the obtained data were recorded in a table displaying the two variables of this study: Surface treatment per group and adhesion to dental enamel (shear bond strength in Mpa).

Data analysis was performed by means of a non-parametric test based on ANOVA Kruskal-Wallis one-way ranks in order to contrast the hypothesis of equality of treatment medians, and later with a non-parametric Mann-Whitney test to contrast the hypothesis of equality of the groups under study,

con el empleo del paquete estadístico Social Sciences Statistical Package SPSS, 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se aplicaron medidas de tendencia central (media y desviación estándar) para resumir la presentación de los datos por grupo. Considerándose valores de $p < 0,05$ como diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo control y los grupos tratados con blanqueador y la enzima peroxidasa.

RESULTADOS

Con un nivel de significancia de 5% (nivel de confianza de 95%) se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medianas entre tratamientos. Se encontró evidencia estadísticamente significativa de disminución de la RUC de la resina compuesta al esmalte luego de aplicar peróxido de hidrógeno al 38% en comparación con el grupo control ($p = 0,003$). Además, aumento en la RUC hallada en el grupo del blanqueamiento con posterior aplicación de la peroxidasa al compararla con la RUC del grupo con blanqueamiento y adhesión inmediata ($p = 0,0025$); y se observó recuperación del valor de RUC inicial al no encontrar diferencia estadística entre el grupo control de solo adhesión y el grupo en que se aplicó la peroxidasa ($p = 0,069$) (tabla 1).

Los resultados encontrados demuestran que en el grupo 1 (adhesión), se obtuvo mayor promedio de resistencia de unión al corte con valor de 12,8 Mpa ($\pm 3,2$), con respecto al grupo 2 (blanqueamiento-adhesión) en el que se observó disminución en los valores de resistencia de unión del 72,65% en comparación con el grupo 1 con promedio de 3,5 Mpa ($\pm 1,43$).

by using the Social Sciences Statistical Package SPSS, 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Central tendency measures (mean and standard deviation) were used to condense data presentation per group. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant differences among the control group and the groups treated with whitener and peroxidase enzyme.

RESULTS

With a 5% significance level (95% confidence level), the null hypothesis of equality of means among treatments is rejected. This studied yielded statistically significant evidences of decreased composite resin shear bond strength to enamel after applying 38% hydrogen peroxide in comparison to the control group ($p = 0.003$). There were also signs of increased shear bond strength in the group treated with whitening and subsequent application of peroxidase in comparison to the shear bond strength of the group treated with whitening followed by immediate adhesion ($p = 0.0025$); and recovery of the initial shear bond strength value was observed as no statistical difference occurred between the control group (with adhesion only) and the group exposed to peroxidase ($p = 0.069$) (table 1).

These results show that group 1 (adhesion) presented a greater shear bond strength, with a value of 12.8 Mpa (± 3.2) in comparison to group 2 (whitening-adhesion), which shear bond strength values decreased 72.65% in comparison to group 1, with an average of 3.5 Mpa (± 1.43).

Tabla 1. Valores de mediana y promedio de resistencia de unión al corte de la resina compuesta al esmalte dental en MPa

Grupo/tratamiento	N	Mediana	Promedio
1/control	15	13,016	12,8 ($\pm 3,2$)
2/blanqueamiento	15	4,640	3,5 ($\pm 1,43$)
3/blanqueamiento-enzima	15	10,166	12,2 ($\pm 3,12$)

Table 1. Median and average values of composite resin shear bond strength to dental enamel (in Mpa)

Group/treatment	N	Median	Average
1/control	15	13.016	12.8 (± 3.2)
2/whitening	15	4.640	3.5 (± 1.43)
3/whitening-enzyme	15	10.166	12.2 (± 3.12)

Al aplicar la peroxidasa posblanqueamiento en el grupo 3 se obtuvo recuperación del 95,3% con respecto al grupo 1 con promedio de 12,2 Mpa ($\pm 3,12$) (figuras 1 y 2).

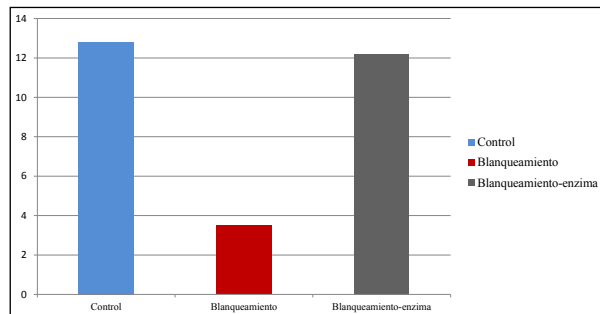


Figura 1. Comparación de los valores promedio de resistencia de unión al corte de los grupos de prueba en Mpa

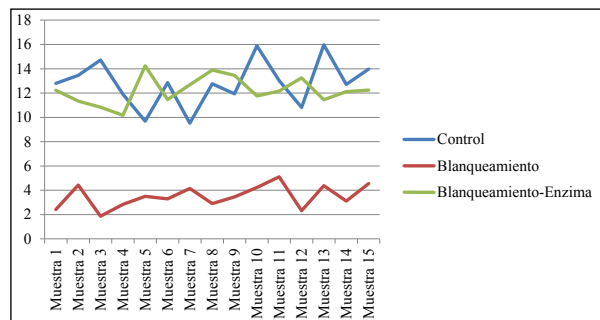


Figura 2. Comportamiento de los valores en Mpa de la resistencia de unión al corte por grupo

DISCUSIÓN

Se ha reportado que los agentes blanqueadores con base en peróxido pueden inducir cambios morfológicos y estructurales en la interfase resina-esmalte, interfiriendo con la adhesión de las resinas compuestas a la estructura dental.^{8, 10, 14, 15}

El propósito del estudio fue determinar el efecto de la enzima peroxidasa sobre la adhesión de una resina compuesta al esmalte dental previamente expuesto a peróxido de hidrógeno al 38%; con este fin se hicieron pruebas de adhesión aplicando una carga tangencial a tres grupos; grupo 1: grupo control en el cual se hizo únicamente adhesión, grupo 2: adhesión posterior al blanqueamiento y grupo 3: blanqueamiento, tratamiento con peroxidasa y adhesión inmediata.

Application of peroxidase after whitening in group 3 produced a recovery of 95.3% in comparison to group 1 with an average of 12.2 Mpa (± 3.12) (figures 1 and 2).

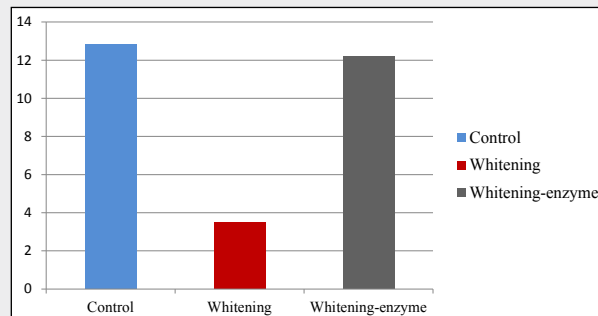


Figure 1. Comparison of average shear bond strength values among the groups under study (in Mpa)

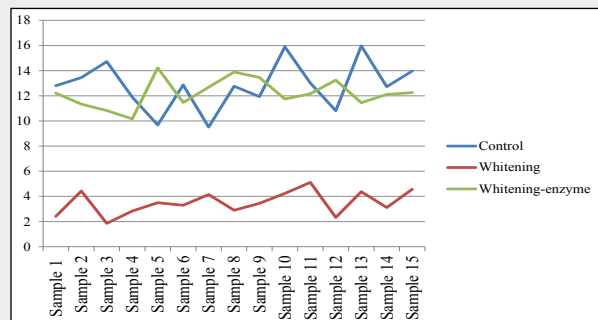


Figure 2. Behavior of shear bond strength values (in Mpa) per group

DISCUSSION

Several reports have suggested that peroxide-based whitening agents may produce morphological and structural changes at the resin-enamel interface, thus interfering with composite resins adhesion to dental structure.^{8, 10, 14, 15}

The purpose of this study was to determine the effect of peroxidase enzyme on composite resins' adhesion to dental enamels previously exposed to 38% hydrogen peroxide; to this end, several adhesion tests were performed by applying a tangential load on three groups: group 1: control group, treated with adhesion only; group 2: whitening with subsequent adhesion, and group 3: whitening, treatment with peroxidase, and immediate adhesion.

Se logró demostrar la disminución de 8,93 Mpa en la resistencia de unión al corte de la resina adherida inmediatamente al esmalte blanqueado, en comparación con el grupo control en donde solo se hizo adhesión, esto confirma que el uso de agentes blanqueadores con base en peróxido de hidrógeno de alta concentración durante los tiempos establecidos por el fabricante genera una reducción de la resistencia de unión de las resinas compuestas al esmalte dental. La fundamentación del análisis de dicho efecto ha sido sustentada por autores como Bulut y colaboradores,²⁴ Miles y colaboradores²⁵ y McGuckin y colaboradores²⁶ por la presencia de peróxido residual u oxígeno liberado por los agentes de blanqueamiento que inhiben el proceso de polimerización de los sistemas adhesivos y las resinas compuestas, y por una alteración de la estructura superficial del esmalte asociada a una erosión de la capa aprismática, y a una pérdida del contenido de calcio y fósforo.^{15, 27} Esta disminución de la fuerza adhesiva ha llevado a sugerir, por parte de autores como Miranda y colaboradores²⁸ y Shinohara y colaboradores,²⁹ que los procedimientos restaurativos deben postergarse de dos a cuatro semanas después del blanqueamiento dental, ya que la reducción en la resistencia de unión de la resina compuesta al esmalte recién blanqueado ha demostrado ser transitoria.³⁰ Esto se atribuye a que el esmalte pasa por un proceso de remineralización,³¹ que permite el remplazo de iones de fosfato, calcio y otros minerales perdidos, por los mismos elementos u otros iones provenientes de la saliva; incluyendo los de fluoruro, que van a fomentar la formación de cristales aportando una matriz más consolidada para la adhesión. La sobresaturación en la saliva de iones calcio y fosfato, tiene un papel importante en el proceso de remineralización, sin embargo, autores como Larsen y colaboradores³² reportan que este proceso requiere tiempo, porque a pesar de que la saliva y las soluciones remineralizantes se encuentran sobresaturadas con respecto a la apatita del esmalte, la cantidad total de calcio y fosfato disueltos es pequeño, así que después de la precipitación de los minerales disueltos solo 1/20.000-1/30.000 del volumen de la solución de mineralización está ocupado por mineral. Además, que los gradientes de concentración de la solución de mineralización en el esmalte son bajos, lo que indica la lenta difusión dentro de la estructura,³² razón por la cual es prudente esperar el tiempo recomendado por autores como Shinohara y colaboradores,²⁹ Basting y colaboradores³³ y Cavalli y colaboradores³⁴ para recuperar una superficie de esmalte con menores cambios aparentes.

The tests demonstrated a shear bond strength decrease of 8.93 Mpa of the resin immediately adhered to the whitened enamel in comparison to the control group, which was treated with adhesion only. This proves that using whitening agents with high concentrations of hydrogen peroxide during the times indicated by manufacturers reduces the composite resin's bond strength to dental enamel. This phenomenon has been analyzed by authors such as Bulut et al,²⁴ Miles et al,²⁵ and McGuckin et al,²⁶ who have explained this effect by the presence of residual peroxide or oxygen released by whitening agents—which inhibit the polymerization process of adhesion systems and composite resins—as well as by alterations of the enamel surface structure associated to erosion of the aprismatic layer and to lack of calcium and phosphorous.^{15, 27} This adhesion strength decrease has led some authors, such as Miranda et al²⁸ and Shinohara et al,²⁹ suggest that restorative procedures should be postponed two to four weeks after whitening, since reduction of composite resins bond strength to enamels that have been recently whitened has proven to be temporary.³⁰ This is explained because the enamel suffers a process of remineralization³¹ that allows replacing ions of phosphate, calcium, and other lost minerals to the same elements or to other ions present in saliva. And this includes fluoride ions which favor the formation of crystals, thus providing a more stable base for adhesion. Supersaturation of calcium and phosphate ions in saliva plays an important role in the process of remineralization; however, authors such as Larsen et al³² suggest that this process requires time because, even though saliva and remineralizing solutions are supersaturated in comparison to the apatite present in the enamel, the total dissolved amount of calcium and phosphate is small, and therefore after precipitation of dissolved minerals only 1/20.000-1/30.000 of the mineralization solution volume is occupied by mineral. Moreover, the concentration gradients of the enamel mineralization solution are small, which explains the slow diffusion inside the structure,³² this is why it seems reasonable to wait the time recommended by authors such as Shinohara et al,²⁹ Basting et al,³³ and Cavalli et al³⁴ in order to recover an enamel surface with less apparent changes.

Situaciones clínicas tales como, restauraciones antiguas en el sector anterior que afectan la apariencia estética, necesidad de inicio de un tratamiento de ortodoncia o simplemente la disponibilidad de tiempo del paciente para un tratamiento cosmético que requiera procedimientos adhesivos posblanqueamiento,^{25, 35} ponen al clínico en una postura difícil en el momento de decidir si acceder a hacer el tratamiento restaurador, antes de esperar el tiempo prudente para hacer la adhesión posblanqueamiento dental. Por esta razón, ha surgido la necesidad de buscar la forma de permitir al clínico hacer restauraciones adhesivas inmediatamente después de un blanqueamiento dental sin el riesgo al fracaso de las mismas.

Villarreal y colaboradores¹⁵ reportan que el uso complementario de sustancias antioxidantes reducen el efecto adverso sobre la resistencia de unión de las resinas al esmalte acondicionado y sobre los cambios en su morfología y composición química. Antioxidantes enzimáticos como la catalasa y la superóxido dismutasa,^{15, 18, 36} y no enzimáticos³⁷ como el ascorbato de sodio al 10% han sido probados como agentes inactivadores del oxígeno residual, capaces de reversar el efecto negativo de los agentes blanqueadores sobre la resistencia de unión al esmalte dental, obteniendo hasta el momento buenos resultados.^{19, 21, 24, 38} Rotstein y colaboradores¹² demostraron que la aplicación de catalasa por tres minutos tiene la capacidad de eliminar totalmente el peróxido de hidrógeno residual y lo recomiendan como protocolo posblanqueamiento intracameral en dientes no vitales para eliminar el oxígeno de la cámara pulpar y de los tejidos periodontales circundantes para disminuir su daño potencial.

Lai y colaboradores³⁹ Türkün y colaboradores¹⁹ y Feiz y colaboradores³⁸ comprobaron que con la inmersión de las muestras en agua por 24 horas³⁹ y el uso de un agente antioxidante como el ascorbato de sodio se inhibe la disminución en la resistencia de unión de las resinas compuestas posblanqueamiento.

La peroxidasa también ha sido probada en estudios por Bowles y colaboradores⁴⁰ y Gimeno y colaboradores,⁴¹ quienes demostraron que durante o inmediatamente después del tratamiento blanqueador con peróxido de hidrógeno, su uso puede prevenir efectos nocivos sobre los tejidos blandos de la cavidad oral y la pulpa dentaria. Masaki y colaboradores,⁴² Spector y colaboradores⁴³

Clinical situations such as old restorations in the anterior sector—that affect aesthetic appearance—, the need of starting orthodontic treatment or simply patient's availability for a cosmetic treatment that requires adhesive post-whitening procedures,^{25, 35} mean a difficult situation to the clinician at the moment of deciding whether to perform restorative treatment instead of waiting for some reasonable time to proceed with post-whitening adhesion. In consequence, dentists need to find a way of performing adhesive restorations right after the whitening procedure without risk of failing.

Villarreal et al¹⁵ maintain that the concomitant use of antioxidant substances reduces the adverse effect on resins' bond strength to enamel as well as morphological and chemical changes. Enzymatic antioxidants, such as catalase and superoxide dismutase,^{15, 18, 36} and non-enzymatic antioxidants,³⁷ such as 10% sodium ascorbate, have been tested as inhibitors of residual oxygen, and have proven to be able to reverse the negative effects of whitening agents on bond strength to enamel, with satisfactory results so far.^{19, 21, 24, 38} Rotstein et al¹² demonstrated that applying catalase for three minutes may totally remove residual hydrogen peroxide, and they recommend this as an intracameral post-whitening protocol in non-vital teeth to eliminate oxygen from both pulpal chamber and periodontal neighboring tissues in order to reduce potential damage.

Lai et al,³⁹ Türkün et al,¹⁹ and Feiz et al³⁸ demonstrated that submerging samples in water for 24 hours³⁹ and using an antioxidant agent as sodium ascorbate inhibits the decrease of composite resins bond strength after whitening.

Peroxidase has also been tested in studies by Bowles et al⁴⁰ and Gimeno et al,⁴¹ who demonstrated that its use during or immediately after whitening with hydrogen peroxide may prevent harmful effects on soft tissues of the oral cavity and the pulp canal. The studies by Masaki et al,⁴² Spector et al,⁴³

y Björkman y colaboradores⁴⁴ hicieron investigaciones sobre cultivos celulares de fibroblastos, células epiteliales y tiroideas demostrando un efecto protector de tejidos mediante la utilización de catalasa y peroxidasa frente a los radicales libres de oxígeno.

Al evaluar la acción antioxidante de la enzima peroxidasa, bajo las condiciones de este estudio, se observó el aumento en la resistencia de unión al corte al aplicarla sobre la superficie dental inmediatamente posterior al blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38%, demostrando la recuperación significativa de la fuerza adhesiva de la resina compuesta al esmalte dental por medio de la eliminación de los radicales liberados por el agente blanqueador gracias a su acción enzimática en procesos de oxidorreducción,^{15, 16, 18} lo que indica que la actividad enzimática de la peroxidasa permite la eliminación del peróxido residual. Por tratarse de una molécula de tamaño del orden de 40.000 Da, tiene la capacidad de penetrar a través de la matriz adamantina entre las varillas del esmalte y quizá, hasta los túbulos dentinales, permitiendo la interacción con las moléculas de oxígeno, causando su oxidación y degradándose a subproductos como el agua, evitando así, la inhibición en el proceso de polimerización de las resinas compuestas y sistemas adhesivos al conformarse una red tridimensional estable de enlaces carbono-carbono de los grupos metacrilato.^{38, 39}

Rocha y colaboradores⁴⁵ reportaron que la aplicación de catalasa y glutatión peroxidasa mejoraron la resistencia de unión al esmalte en comparación con el grupo control positivo con aplicación de peróxido de hidrógeno, sin embargo, la catalasa demostró mejor actividad que la peroxidasa. Este resultado lo atribuyen al mecanismo de acción de la catalasa, el cual requiere un número reducido de moléculas para generar su acción enzimática. A pesar de esto, los autores afirman que ambas enzimas no tuvieron la capacidad de neutralización completa pues la resistencia de unión fue significativamente más baja que la del grupo control negativo, infiriendo que el uso de una solución más concentrada probablemente podría presentar mejores resultados. Concepto que aclararía el porqué de la diferencia en los resultados con respecto a este estudio. Rocha y colaboradores⁴⁵ utilizaron una peroxidasa de eritrocitos de bovino de 680 unidades/mg de proteínas con una concentración de 10 mg/ml, mientras que en este estudio se hizo la aplicación de peroxidasa de rábano picante de 150 unidades/mg de proteínas con una concentración de 472 mg/ml, aumentando la cantidad final de peso volumen de la enzima,

and Björkman et al⁴⁴ on fibroblasts, epithelial and thyroid cell cultures demonstrated a protective effect on tissues thanks to the use of catalase and peroxidase in presence of oxygen free radicals.

In this study, an increase of shear bond strength was observed when applying peroxidase enzyme on the dental surface right after whitening with 38% hydrogen peroxide, as it demonstrated a significant recovery of composite resin adhesive properties by elimination of radicals released by the whitening agent, thanks to its enzymatic action in reduction-oxidation processes.^{15, 16, 18} This shows that the peroxidase enzymatic activity enables elimination of residual peroxide. Being a molecule of 40.000 Da in size, it has the capacity of penetrating the enamel matrix through its rods, and probably even reaching the dentinal tubules, thus allowing interaction with oxygen molecules, causing their oxidation and degrading into sub-products such as water, therefore avoiding inhibition of the polymerization process of composite resins and adhesive systems by conforming a stable tridimensional net of carbon-carbon bonds of methacrylate groups.^{38, 39}

Rocha et al⁴⁵ reported that applying catalase and glutathione peroxidase may increase bond strength to the enamel in comparison to a positive control group with application of hydrogen peroxide; nevertheless, catalase proved to have better activity than peroxidase. They explain this finding by the catalase's mode of action, which requires a reduced number of molecules to produce its enzymatic effect. However, the authors point out that none of the two enzymes has the capacity of entirely neutralize harmful effects, as bond strength was significantly lower than in the negative control group, thus concluding that using a more concentrated solution might yield better results. This would explain the difference with the results of the present study. Rocha et al⁴⁵ used peroxidase of bovine erythrocytes of 680 units/mg of proteins at a concentration of 10 mg/ml, while for the present study we applied horseradish peroxidase of 150 units/mg of proteins at a concentration of 472 mg/ml, increasing the final quantity of weight/volume of the enzyme,

arrojando mejores resultados en la recuperación de la resistencia de unión al esmalte dental posblanqueamiento.

Para que se cumplan las condiciones inherentes en las reacciones enzimáticas, las enzimas deben manipularse bajo condiciones que no favorezcan su desnaturalización, puesto que esta conduce a su inactivación. El uso de agentes antioxidantes enzimáticos, como la catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, presentan mayor sensibilidad de la técnica para su aplicación clínica comparado a los antioxidantes no enzimáticos. La actividad enzimática está condicionada a los siguientes factores: el efecto de la concentración enzimática, la temperatura, el pH del medio y su agitación. El efecto de la concentración de la enzima determina la velocidad de la reacción por la proporcionalidad entre la cantidad de enzima *versus* el sustrato, la velocidad de la reacción disminuye, a medida que aumenta la concentración del sustrato. Con respecto al control de la temperatura, la mayoría de reacciones enzimáticas ocurren a temperaturas entre 0 y 60 °C, la temperatura óptima está usualmente relacionada con la temperatura del medio ambiente celular de la cual es derivada la enzima, para la activación de la peroxidasa esta temperatura es de 37 °C. Su estructura proteica terciaria se mantiene gracias a enlaces de naturaleza física no covalentes, los cuales son altamente sensibles a cambios de temperatura. Otro factor importante es el efecto del pH, la enzima peroxidasa tiene pH óptimo característico de 6,9 a 7,0; los cambios en las concentraciones de los iones H⁺ y OH⁻ modifican el pH de la solución alterando las interacciones entre las moléculas de proteínas y, por tanto, su estructura tridimensional y su actividad. Y por último, el efecto de la agitación, condición en la que cuando se agitan violentamente, forman espuma por la baja tensión superficial que presentan las soluciones de proteínas, lo que hace que se favorezca su desnaturalización.^{15, 46-48}

Es necesario considerar que el protocolo planteado para el procesamiento del preparado enzimático y conservación de la peroxidasa, que permitió que la actividad catalítica se llevara a cabo sobre el sustrato de peróxido de hidrógeno residual y los radicales libres en la superficie dental, contiene parámetros de preparación, conservación y aplicación de la enzima específicos, que aumentan la sensibilidad y dificultad de la técnica clínica, ya que podría alterarse fácilmente su actividad catalítica debido a su naturaleza biológica, razón por la cual es importante evaluar la aplicabilidad del protocolo de manejo clínico de la peroxidasa de rábano picante (*Horseradish* Tipo I/SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)

with better results in terms of recovery of bond strength to dental enamel following whitening.

To meet the inherent conditions in enzymatic reactions, enzymes must be handled under conditions that favor their denaturation, as a way to producing their inactivation. Using enzymatic antioxidant agents, such as catalase, peroxidase, and superoxide dismutase, offers greater technical sensitivity for clinical application in comparison to non-enzymatic antioxidants. Enzymatic activity is conditioned by the following factors: effect of enzymatic concentration, temperature, pH of the solution, and its shaking. The effect of enzymatic concentration determines the reaction speed due to the proportion enzyme quantity/substrate. Reaction speed decreases as substrate concentration increases. In terms of temperature control, most enzymatic reactions occur at temperatures ranging from 0 to 60 °C. Optimum temperature is usually related to the temperature of the cellular environment from which the enzyme derives; for peroxidase activation, this temperature is 37 °C. It keeps its protein tertiary structure thanks to non-covalent bonds of a physical nature, which are highly sensitive to changes in temperature. Another important factor to consider is pH effect. Peroxidase enzyme has a characteristic optimum pH of 6,9 to 7,0; changes in the concentrations of H⁺ and OH⁻ modify the solution's pH altering the interaction among the molecules' proteins, and therefore also their tridimensional structure and their activity. Finally, let's consider the shaking effect. When strongly shaken, they grow foam due to the low surface tension of protein solutions, which favors their denaturation.^{15, 46-48}

It is necessary to consider the protocol suggested for processing both enzymatic solution and peroxidase conservation, which allows catalytic activity to be performed on the substrate of residual hydrogen peroxide and free radicals in the dental surface. This protocol includes explicit guidelines for preparation, conservation, and application of the enzyme, which increase sensitivity and make the clinical technique difficult as its catalytic activity may be easily altered due to its biological nature. It is therefore important to assess applicability of this protocol for clinical handling of horseradish peroxidase (*Horseradish* Type I/SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)

en nuestro medio, pues fue evidente su elevado costo y dificultad de consecución, al igual que ocurre con cualquier tipo de enzima antioxidante de características similares como la catalasa u otros tipos de peroxidasa derivadas de sangre, levadura o habichuela. La presentación de la peroxidasa de polvo liofilizado requirió una preparación en una solución amortiguadora de fosfato, a pH de 7 como medio estable para que hiciera su acción catalítica sin desnaturalizarse, y poder conseguir una preparación líquida o gel de fácil aplicación, además fue necesario el riguroso almacenamiento a -20°C , transporte cuidadoso de la enzima, y el tiempo de espera prolongado para el envío del producto a nuestro país; estas limitaciones hacen sugerir la posibilidad de búsqueda de nuevas alternativas para la producción de la enzima a menor costo, con facilidades de adquisición y distribución, aislando la enzima directamente de productos que se puedan obtener de forma práctica o con un proceso sencillo de separación de la misma en el laboratorio.

Los hallazgos se consideran importantes en cuanto a su alcance, ya que aportan evidencia significativa para ahondar en procedimientos clínicos que disminuyan los efectos nocivos de los agentes blanqueadores, pues pese a las múltiples investigaciones que demuestran las alteraciones a niveles fisiológico,⁴⁹⁻⁵³ químico,^{7, 9, 54} mecánico^{1, 8-11, 13, 20, 55} y estructural^{1-3, 6, 12} por acción de peróxidos, sigue siendo uno de los tratamientos estéticos más solicitados por los pacientes y más ejecutados por los odontólogos en la actualidad.

RECOMENDACIONES

Se recomiendan estudios para encontrar una alternativa de aplicación de la peroxidasa evaluando la actividad catalítica cuantitativamente, en cuanto a la velocidad de reacción y tiempo, al igual que la evidencia microscópica de su acción sobre los cambios microestructurales del esmalte dental.

Se necesita determinar las constantes catalíticas y el tiempo de vida media de la peroxidasa con respecto al peróxido de hidrógeno al 38% de uso odontológico sobre la superficie del esmalte dental, para tener un parámetro o determinar la cantidad de unidades catalíticas más cercanas que aseguren la eliminación total del peróxido de hidrógeno residual y sus radicales libres.

in our context, as it is very costly and hard to get, just as happens with other types of antioxidant enzymes with similar characteristics, such as catalase or other kinds of peroxidase derived from blood, yeast, or green beans.

The presence of lyophilized powder peroxidase demanded preparation of a phosphate shock-absorbing solution, at a pH of 7, as a stable suspension for the enzyme to perform its catalytic action without denaturing, and thus obtaining an easy-to-apply liquid or gel. Also, it was necessary to rigorously store the enzyme at -20°C and to carefully transport it, and to wait a very long time to have the product shipped to our country. These limitations suggest the need of finding new alternatives for enzyme production at lower costs and easier ways to acquire and distribute the products, by directly isolating the enzyme from products easily obtained and with simple separation lab procedures.

The findings of this study are considered important as they provide significant evidence to examine in greater detail the clinical procedures that allow reducing the harmful effects of whitening agents, since despite the abundant studies that prove the physiological,⁴⁹⁻⁵³ chemical^{7, 9, 54} mechanical,^{1, 8-11, 13, 20, 55} and structural^{1-3, 6, 12} alterations produced by peroxides, it is still one of the most requested procedures by patients and one of the most practiced by dentists currently.

RECOMMENDATIONS

Further studies are recommended in order to find an alternative to peroxidase application, qualitatively assessing the catalytic activity in terms of speed of reaction and time, as well as microscopic evidence of its action on the enamel's microstructural changes.

It is necessary to determine the catalytic constants and the mean life of peroxidase in relation to 38% hydrogen peroxide applied on the enamel surface for dentistry purposes, in order to obtain a parameter and to determine the amount of the closest catalytic units that guarantee entire removal of residual hydrogen peroxide and its free radicals.

CONCLUSIONES

Entre de las limitaciones de este estudio se puede concluir que:

Existe una significativa reducción estadística en la resistencia de unión al corte de la resina compuesta adherida al esmalte dental sometido a blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38%.

Hay recuperación en los valores de resistencia de unión al corte de las resinas compuestas al aplicar la enzima peroxidasa sobre la superficie dental inmediatamente posterior a la aplicación del peróxido de hidrógeno al 38%.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero para la elaboración de este estudio dentro de la convocatoria interna de la Facultad, año 2009.

CORRESPONDENCIA

Paula Alejandra Baldión Elorza
Cra. 30 N.º 45-03
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología
Ciudad Universitaria
Teléfono: 316 50 00, Ext. 16015
Fax: 623 08 59
Bogotá, Colombia
Correo electrónico: pabaldione@unal.edu.co

CONCLUSIONS

Limitations of the present study include, among others:

There is a significant statistical reduction of the shear bond strength of composite resins adhered to enamels that have been subjected to whitening with 38% hydrogen peroxide.

Recovery of shear bond strength values of composite resins occurs when applying the enzyme peroxidase on the dental surface right after application of 38% hydrogen peroxide.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Universidad Nacional de Colombia's School of Dentistry for its financial aid to this study as part of the School's internal call for proposals.

CORRESPONDING AUTHOR

Paula Alejandra Baldión Elorza
Cra.30 N.º 45-03
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología
Ciudad Universitaria
Phone number: 316 50 00, Ext. 16015
Fax: 623 08 59
Bogotá, Colombia
Email address: pabaldione@unal.edu.co

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Akal N, Over H, Olmez A, Bodur, H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. *J Clin Pediatric Dent* 2001; 25: 293-296.
2. Cavalli V, Arrais CAG, Giannini M. Scanning electron microscopy observations of human bleached enamel surface. *Acta Microsc* 2001; 1 (supl A): 41-42.
3. Flaitz CM, Hicks MJ. Effects of carbamide peroxide whitening agents on enamel surfaces and caries-like lesion formation: An SEM and polarized light microscopic in vitro study. *J Dent Child* 1996; 63: 249-256.
4. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent* 1999; 27: 509-515.
5. Perdigão J, Francci C, Swift Jr EJ, Ambrose WW, Lopes M. Ultramorphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *Am J Dent* 1998; 11: 291-301.
6. Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Inter* 1993; 24: 39-44.
7. Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil* 1997; 24: 282-286.
8. Cavalli V, Giannini M, Carvalho R. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater* 2004; 20: 733-739.

9. Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent* 2001; 14: 63-66.
10. Murchison DR, Charlton DG, Moore BK. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent* 1992; 17: 181-185.
11. Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure and mineral content. *J Endod* 2000; 26: 203-206.
12. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996; 22: 23-26.
13. Seghi RR, Denry I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel. *J Oral Rehabil* 1992; 71: 1340-1344.
14. Dishman MV, Covey DA, Baughan LW. The effects of peroxide bleaching on resin composite to enamel bond strength. *Dent Mater* 1994; 10(1): 33-36.
15. Villarreal B, Einer N. Función de las sustancias antioxidantes sobre esmalte blanqueado con peróxido de hidrógeno ante la adhesión inmediata de resina compuesta y sus cambios estructurales y morfológicos superficiales. *Rev Paul Odontol* 2004; 26(3): 27-31.
16. Hakan B, Murat T, Aysegül D. Effect of an antioxidizing agent on the shear bond strength of brackets bonded to bleached human enamel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 29(2): 266-272.
17. Van der Vyver PJ, Lewis SB, Marais JT. The effect of bleaching agent on composite/enamel bonding. *J Dent Assoc S Afr* 1997; 52(10): 601-603.
18. Rotstein I. Role of catalase in the elimination of residual hydrogen peroxide following tooth bleaching. *J Endod* 1993; 19(11): 567-569.
19. Türkün M, Kaya AD. Effect of 10% sodium ascorbate on the shear bond strength of composite resin to bleached bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2004; 31(12): 1184-1191.
20. Attin T, Muller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. *Oper Dent* 2004; 29(2): 188-195.
21. Türkün M, Celik EU, Kaya AD, Arici M. Can the hydrogel form of sodium ascorbate be used to reverse compromised bond strength after bleaching? *J Adhes Dent* 2009; 11(1): 35-40.
22. Gökçe B, Cömlekoglu ME, Ozpinar B, Türkün M, Kaya AD. Effect of antioxidant treatment on bond strength of a luting resin to bleached enamel. *J Dent* 2008; 36(10): 780-785.
23. Colombia. Ministerio de Salud. Resolución N.º 8430 de 1993 (4 de octubre). Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Título II. De la investigación en seres humanos. Capítulo I. De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos: artículos 5.º al 16. [en línea] [fecha de acceso 15 de octubre de 2011] Disponible en: http://www.dib.unal.edu.co/promocion/etica_res_8430_1993.pdf
24. Bulut H, Turkun M, Demirbas AK. Effect of an antioxidizing agent on the shear bond strength of brackets bonded to bleached human enamel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(2): 266-272.
25. Miles PG, Pontier J, Bahiraei D, Close J. The effect of carbamide peroxide bleach on the tensile bond strength of ceramic brackets: an in vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994; 106(4): 371-375.
26. McGuckin RS, Thurmond BA, Osovitz S. Enamel shear bond strengths after vital bleaching. *Am J Dent* 1992; 5(4): 216-222.
27. Torneck CD, Titley KC, Smith DO, Adibfar A. Effect of water leaching on the adhesion of composite resin to bleached and unbleached bovine enamel. *J Endod* 1991; 17(4): 156-160.
28. Miranda AM, Bermejo GN, Bazán JE, Saravia MA. Efectos de un blanqueamiento dental con ozono y otro con peróxido de carbamida al 22% sobre la fuerza de adhesión al esmalte en diferentes intervalos de tiempo. *Acta Odontol Venez* 47(4): 69-77.
29. Shinohara MS, Peris AR, Pimenta LA, Ambrosano GM. Shear bond strength evaluation of composite resin on enamel and dentin after non vital bleaching. *J Esthet Restor Dent* 2005; 17(1): 22-29.
30. Sung EC, Chan SM, Mito R, Caputo AA. Effect of carbamide peroxide bleaching on the shear bond strength of composite to dental bonding agent enhanced enamel. *J Prosthet Dent* 1999; 82(5): 595-599.
31. Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing agents on enamel surface properties. *J Dent* 2008; 36(9): 718-725.
32. Larsen MJ, Fejervik O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Eur J Oral Sci* 1989; 97(4): 285-296.
33. Basting RT, Rodrigues JA, Serra MC, Pimenta LA. Shear bond strength of enamel treated with seven carbamide peroxide bleaching agents. *J Esthet Restor Dent* 2004; 16(4): 250-259.
34. Cavalli V, Reis AF, Giannini M, Ambrosano GM. The effect of elapsed time following bleaching on enamel bond strength of resin composite. *Oper Dent* 2001; 26: 597-602.
35. Nour El-din AK, Miller BH, Griggs JA, Wakefield C. Immediate bonding to bleached enamel. *Oper Dent* 2006; 31(1): 106-114.
36. Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267(6): 696-701.
37. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 1992; 669: 7-20.

38. Feiz A, Khoroushi M, Gheisarifar M. Bond strength of composite resin to bleached dentin: effect of using antioxidant versus buffering agent. *J Dent* 2011; 8(2): 60-66.
39. Lai S, Tay F, Cheung G, Mak Y, Carvalho R, Wei S et al. Reversal of compromised bonding enamel. *J Dent Res* 2002; 81(7): 477-481.
40. Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod* 1992; 18(11): 527-534.
41. Gimeno I, Riutord P, Tauler P, Tur JA, Pons A. The whitening effect of enzymatic bleaching on tetracycline. *J Dent* 2008; 36: 795-800.
42. Masaki H, Okano Y, Sakurai H. Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Arch Dermatol Res*. 1998; 290(3): 113-118.
43. Spector A, Yang Y, Ho YS, Magnenat JL, Wang RR, Ma W et al. Variation in cellular glutathione peroxidase activity in lens epithelial cells, transgenics and knockouts doesnot significantly change the response to H₂O₂ stress. *Exp Eye Res* 1996; 62(5): 521-540.
44. Björkman U, Ekholm R. Hydrogen peroxide degradation and glutathione peroxidase activity in cultures of thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 111(1): 99-107.
45. Rocha C, Fuzuko A, Buhler A. The effects of anti-oxidants agents as neutralizers of bleaching agents on enamel bond strength. *Braz J Oral Sci* 2006; 5(16): 971-976.
46. Fleschin S, Fleschin M, Nita S, Pavel E, Magearu V. Free radical mediated protein oxidation in Biochemistry. *Roun Biotechnol Lett* 2000; 5: 479-495.
47. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 390-408.
48. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
49. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J* 2006; 200: 371-376.
50. Haywood VB, Leonard RH, Nelson CF, Brunson WD. Effectiveness, side effects and long-term status of night guard vital bleaching. *J Am Dent Assoc* 1994; 125(9): 1219-1226.
51. Dias AP, Sacono NS, Campos FR, Rosetti FL, Nogueira I, Coldebella CR et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 458-464.
52. Dalh JE, Pallesen U. Tooth bleaching —A critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 292-304.
53. Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz J, Shklar G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. *J Periodontol* 1986; 57: 685-688.
54. Attin T, Kocabiyik M, Buchalla W, Hannig C, Becker K. Susceptibility of enamel surfaces to demineralization after application of fluoridated carbamide peroxide gels. *Caries Res* 2003; 37: 93-99.
55. Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A, Rotstein I. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the micro hardness of human enamel and dentin. *J Endod* 1994; 20: 61-63.