



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



UXUA ORTECHO ZUTA

**EFEITO DA ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DE UM GEL CLAREADOR SOBRE A
CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, EFICÁCIA
CLAREADORA, DIFUSÃO E CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



UXUA ORTECHO ZUTA

**EFEITO DA ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DE UM GEL CLAREADOR SOBRE A
CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, EFICÁCIA
CLAREADORA, DIFUSÃO E CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

Araraquara

2017

Ortecho Zuta, Uxua

Efeito da ativação enzimática de um gel clareador sobre a cinética de degradação do peróxido de hidrogênio, eficácia clareadora e citotoxicidade trans-amelodentinária / Uxua Ortecho Zuta.--
Araraquara: [s.n.], 2017

67 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

1. Clareamento dental 2. Peróxido de hidrogênio - Toxicidade.
3. Odontoblastos I. Título

UXUA ORTECHO ZUTA

EFEITO DA ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DE UM GEL CLAREADOR SOBRE A
CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, EFICÁCIA
CLAREADORA, DIFUSÃO E CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestrado

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

3º Examinador: Profa. Dr. André Luis Fraga Briso

Araraquara, 07 de Agosto de 2017

DADOS CURRICULARES

UXUA ORTECHO ZUTA

NASCIMENTO 07/12/1987 – Iquitos/Loreto/Perú

FILIAÇÃO Carlos Tercero Ortecho Guevara
Sadith Elena Zuta de Ortecho

2005 - 2013 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia, UNAP/PERÚ.

2015 – 2017 Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, curso de Mestrado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dedicatória

A DEUS,

Por ter me permitido chegar até aqui; pela força e coragem para não desistir e seguir adiante durante toda esta longa caminhada; pelas oportunidades colocadas em minha vida; por colocar em meu caminho pessoas extraordinárias; por ser meu sustento nos momentos de incertezas; por ter me ajudado a vencer os desafios encontrados; e ser meu guia nesta minha vida.

A MEUS PAIS CARLOS E ELENA

Dedico este trabalho a meus queridos pais Carlos e Elena, com todo meu amor e gratidão; agradeço por acreditarem em mim, pelo amor incondicional, pela confiança e pelo apoio, por serem meu exemplo e minha fonte de inspiração e admiração. Vocês foram e são essenciais em todas as minhas conquistas. “Amo muito a Vocês”.

A MEU IRMÃO BADYR

Obrigada por ser meu apoio; pelo amor e encorajamento para perseguir meus sonhos. “Te amo muito”

AGradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

Não tenho palavras para expressar a gratidão e apreço que eu sinto, muito obrigada por haver aceitado ser minha orientadora, pela confiança, paciência, por tudo seu apoio incondicional e sobre tudo pela a sua amizade. Para mim você é o exemplo de profissional, pesquisadora e pessoa. Muito obrigada por estar presente neste momento e por ter tornado realidade esta fase de minha vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Muito obrigada por ter permitido que eu seja parte da equipe do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP, e poder trabalhar no desenvolvimento deste e de outros projetos de pesquisa junto a uma equipe de pessoas maravilhosas.

À Profa. Dra. Josimeri Hebling

Muito obrigada pelas sugestões, por contribuir de maneira significativa com seu conhecimento, que foram essenciais no desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Obrigada pelas contribuições e seu apoio que foram muito significativos para que a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Fonseca

Obrigada pelo carinho e paciência desde minha chegada a esta faculdade; pela amizade e por me guiar no primeiro período do mestrado, pela oportunidade de participar do maravilhoso grupo sob sua coordenação.

Às colegas de laboratório, Maria Luíza, Ester, Suelen e Taísa

Muito obrigada, meninas, pela ajuda, pelo companheirismo, por terem sempre me auxiliado de diversas maneiras durante a realização deste mestrado, pela amizade e convivência que tornaram os dias mais agradáveis.

À Carla Duque

Muito obrigada pela paciência, confiança, pelos conselhos, aprendizagem do dia a dia, por sempre me estar ajudando de diversas maneiras, e, sobretudo, muito obrigada por sua amizade.

Ao Danny Mendoza

Com quem pude compartilhar inúmeros momentos da minha vida. Obrigada pela motivação para persistir e seguir adiante, pelos conselhos, por ser meu alicerce e meu braço direito. Pelo apoio incondicional, amizade e cuidado. Apesar de nossas diferenças eu sei que podemos sempre contar um com o outro. Muito obrigada por tudo!

A meus amigos, Eddy, Natali, Cristiane, Karem, Yulia e Carmelia

Muito obrigada pela amizade, por todos os momentos que vivemos juntos, pelas conversas e risadas. A companhia de vocês é muito fundamental neste período da minha vida.

A minhas amigas, **Jessica, Irma e Amalia**

Obrigada pela amizade e por todo carinho, pelas conversas e risadas. Pelos momentos que passamos juntas, é bom saber que sempre posso contar com vocês. As adoro meninas!

A meus amigos **Midian e Jorge**

Por seu apoio incondicional, por tornar meus dias mais agradáveis, por sua companhia e pela amizade. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados.

Amo a vocês!

Ao **Daniel Vargas Ysla**

Muito obrigada por tudo, pela amizade e por sempre me estar dando as forças necessárias para continuar adiante, por sua ajuda em tudo momento. Muito obrigada!

À família **Eléspuru Zuta**

Muito obrigada a meus tios **Guido e Lilia** por tudo seu apoio e ajuda incondicional. A minha prima **Oriana** por sempre me estar motivando a persistir. Amo vocês!

À família **Rosario Guevara**

Em especial a minha avó **Melanea**, pelo apoio e carinho. Obrigada por tudo!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)

Representada pelas Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e vice-diretor Prof. Dr. Edison Alves de Campos, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos permitiram minha formação profissional e pessoal neste período de Pós-Graduação.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr-UNESP

Representado pelo seu coordenador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde foi efetivada esta pesquisa.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP

A todos os professores e funcionários, pela paciência, atenção, respeito e disponibilidade durante este período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP

Representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina e vice-coordenadora Prof^a. Dr^a. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves, por toda acessibilidade durante este período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Pelo suporte financeiro (bolsa de mestrado) concedida neste período.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
CNPq**

Pelos auxílios à pesquisa vigentes nesta linha de pesquisa no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr-UNESP, os quais proporcionaram o suporte financeiro para desenvolvimento desta pesquisa.

A lei da mente é implacável.

O que você pensa, você cria;

O que você sente, você atrai;

O que você acredita

Torna-se realidade.

Buda

Ortecho Zuta U. Efeito da ativação enzimática de um gel clareador sobre a cinética de degradação do peróxido de hidrogênio, eficácia clareadora, difusão e citotoxicidade trans-amelodentinária [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

No presente estudo, a enzima horseradish peroxidase (HRP) foi empregada como agente catalizador de um gel contendo 35% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), objetivando a aceleração da sua taxa de decomposição em radicais livres, aumento sobre a eficácia clareadora e minimização da citotoxicidade indireta sobre células pulpares. Três grupos experimentais foram estabelecidos: CN: sem tratamento; PH35%: 35% de H_2O_2 e PH35%+HRP: 35% de H_2O_2 com adição de HRP (10 mg/mL). A cinética de degradação do H_2O_2 e liberação de radicais livres foram avaliados nos períodos de 0, 5, 10 e 15 min, por meio de sondas fluorescentes específicas. A eficácia clareadora foi avaliada em espectrofotômetro UV-vis (ΔE) durante 6 sessões (3x15 min), em discos de esmalte e dentina simulando incisivos inferiores (2,3 mm de espessura). Para análise biológica, o clareamento foi realizado sobre discos adaptados em câmaras pulpares artificiais, sendo o meio de cultura em contato com a dentina (extrato) coletado e aplicado por 1 h sobre células MDPC-23 previamente semeadas (80% confluência). A viabilidade celular (teste de MTT), morfologia (MEV), lesão à membrana citoplasmática (ensaio de live/dead) e estresse oxidativo (carboxy- H_2DCFDA) foram avaliados. Discos não submetidos ao clareamento foram empregados como controle negativo. Observou-se que na presença de HRP houve aceleração da degradação do H_2O_2 com concomitante aumento na formação de radicais livres em comparação ao gel sem adição da enzima. Estes resultados foram correlacionados com o aumento significativo nos valores de ΔE em todas as sessões para o gel com HRP em relação ao grupo PH35%, sendo detectada intensa aceleração do efeito clareador. A citotoxicidade trans-amelodentinária foi significativamente minimizada na presença de HRP, para todos os parâmetros testados. Este efeito foi associado a redução significativa na difusão de H_2O_2 residual e radicais livres pela estrutura dental no grupo contendo HRP em relação ao grupo

PH35%. Concluiu-se que a adição da HRP em géis clareadores a base de H₂O₂ acelera e otimiza o efeito clareador, bem como minimiza a difusão de subprodutos pela estrutura dental, reduzindo o efeito tóxico do produto sobre células odontoblastóides in vitro. Este efeito foi associado a intensa aceleração da decomposição do H₂O₂ no gel clareador, mediado pela HRP.

Palavras-Chave: Clareamento dental. Peróxido de hidrogênio – Toxicidade. Odontoblastos.

Ortecho Zuta U. Effect of enzymatic activation of bleaching gel on hydrogen peroxide degradation rate, bleaching effectiveness, diffusion and trans-enamel/trans-dentinal cytotoxicity [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

In the present study, the horseradish peroxidase (HRP) enzyme was used as a catalytic agent of a 35% hydrogen peroxide (H₂O₂) bleaching gel aiming to accelerate its degradation, increase the bleaching effectiveness and reduce the toxic effects on pulp cells. Three experimental groups were established: CN: no treatment; PH35%: 35% H₂O₂ and PH35%+HRP: 35% H₂O₂ in contact with HRP (10 mg/mL). H₂O₂ degradation rate and free radicals release was assessed after 0, 5, 10 and 15 min, with specific fluorescence probes. Bleaching effectiveness in the presence or absence of HRP was assessed with a UV-vis spectrophotometer (ΔE) on enamel/dentin discs simulating mandibular incisors (2.3 mm thickness) throughout 6 bleaching sessions (3x15 min). For the biological assays, bleaching protocol was performed onto discs adapted to artificial pulp chambers, and the culture medium in contact with dentin surface (extract) was collected and applied for 1 h on odontoblast-like MDPC-23 cells previously seeded (80% confluence). The cell viability (MTT assay), morphology (SEM) cell membrane damage (live/dead assay) and oxidative stress (carboxy-H₂DCFDA) were evaluated. The amount of residual H₂O₂ and free radicals capable to diffuse through the discs was quantified. Discs not subjected to bleaching were used as negative control. According to the results, in the presence of HRP there was acceleration of H₂O₂ degradation associated with increased generation of free radicals in comparison to plain H₂O₂ solution. These results were correlated with increased ΔE values at each bleaching session on HRP-containing gel relative to positive control, resulting in significant acceleration of bleaching effect. The trans-enamel and trans-dentinal cytotoxicity was significantly minimized in the presence of HRP, for all tested parameters. This effect was associated with reduced H₂O₂ and free radicals diffusion through dental structure for the group containing HRP in comparison to positive control. It was concluded that adding HRP to bleaching gels promotes an optimization and acceleration of tooth bleaching, associated with minimization of residual H₂O₂ diffusion

and odontoblast-like cells cytotoxicity, mediated by increased release of highly oxidative molecules on tooth surface.

Key-words: Tooth bleaching. Hydrogen peroxide – Toxicity. Odontoblasts.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	26
3.1 Objetivos Específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Avaliação da Degradação do Gel Clareador na Presença de HRP	27
4.1.1 Quantificação do H₂O₂ residual	27
4.1.2 Produção de radicais livres e radical hidroxila	28
4.2 Avaliação da Eficácia Clareadora	29
4.2.1 Obtenção dos discos de esmalte e dentina	29
4.2.2 Padronização da cor dos discos	30
4.2.3 Procedimento clareador	31
4.2.4 Avaliação da alteração de cor	33
4.3 Avaliação da Citotoxicidade Trans-amelodentinária	35
4.3.1 Cultivo celular	35
4.3.2 Procedimento experimental	35
4.3.3 Viabilidade celular (Teste de MTT)	38
4.3.4 Morfologia celular	39
4.3.5 Lesão à membrana celular	39
4.3.6 Estresse oxidativo	40

4.4 Quantificação da Difusão Trans-amelodentinária	
de Subprodutos do Gel Clareador	40
4.4.1 H₂O₂ residual	40
4.4.2 Difusão de ROS e HO[•]	41
4.5 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Cinética de Degradação do Gel Clareador	43
5.2 Eficácia Clareadora	46
5.3 Citotoxicidade Trans-amelodentinária	48
5.4 Difusão de Subprodutos do Gel Clareador	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os produtos empregados no clareamento dental são baseados no peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa derivada do oxigênio capaz de se difundir pelo esmalte dental e promover a oxidação de componentes orgânicos presentes no tecido dentinário (Goldberg et al.³³, 2010; Eimar et al.²⁹, 2012; Ubaldini et al.⁷⁴, 2013; Carey et al.¹², 2014). Como o H_2O_2 apresenta baixo potencial de oxidação, acredita-se que existe a necessidade desta molécula se dissociar em radicais livres, tais como radicais hidroxila (HO^\bullet), peri-hidroxila (HO_2^\bullet) e superóxido (O_2^\bullet), para que o clareamento ocorra de forma efetiva. No entanto, já foi amplamente demonstrado na literatura que uma grande quantidade de H_2O_2 -livre não reagido é capaz de se difundir pela estrutura dental até a câmara pulpar durante as diferentes terapias clareadoras realizadas na Odontologia Estética (Hanks et al.³⁵, 1993; Benetti et al.¹, 2004; Camargo et al.¹¹, 2007; Marson et al.⁴¹, 2015).

Tradicionalmente, géis com elevadas concentrações de H_2O_2 têm sido empregados no clareamento dental de consultório (30-40% H_2O_2), visando a aceleração do procedimento clareador, obtendo-se, assim, resultados estéticos rápidos (Reis et al.⁴⁸, 2011; He et al.³⁶, 2012; Tay et al.⁷⁰, 2012; Reis et al.⁴⁹, 2013; Santana et al.⁵³, 2014; de Paula et al.²², 2015). No entanto, apesar de estudos clínicos demonstrarem intensa alteração de cor do elemento dental a partir da primeira sessão de clareamento, uma alta incidência de sensibilidade dental é relatada pelos pacientes que se submetem a esta terapia, cuja intensidade varia de moderada a severa (He et al.³⁶, 2012). Evidências científicas têm correlacionado este efeito adverso com maior difusão de H_2O_2 residual pela estrutura de esmalte e dentina, levando a um dano oxidativo nas células pulpares, seguido de ruptura da membrana celular, expressão gênica de mediadores pro-inflamatórios e morte celular por necrose (Bitter et al.⁴, 1998; Schrank et al.⁵⁵, 2005; Cekarini et al.¹⁴, 2007; da Costa et al.²³, 2010; Soares et al.⁵⁸, 2013). Desta forma, apesar dos excelentes efeitos estéticos obtidos com o emprego destes produtos na clínica odontológica, os mesmos têm sido questionados do ponto de vista biológico (Cooper et al.¹⁸, 2010; Lee et al.³⁹, 2013; Cooper et al.¹⁹, 2014; Soares et al.⁵⁹, 2014; Marson et al.⁴¹, 2015; Soares et al.⁶⁰, 2015).

Diante deste cenário, novas alternativas têm sido propostas para minimizar a concentração de H_2O_2 -livre não reagido na estrutura dental durante o clareamento de consultório (de Souza Costa et al.²⁶, 2014). Uma interessante proposta baseia-se no aumento da taxa de decomposição do H_2O_2 em radicais livres, com o objetivo de otimizar a reação do produto com a estrutura dental, minimizando, assim, a presença de H_2O_2 residual com potencial para causar danos oxidativos no tecido pulpar (Duque et al.²⁸, 2014). A velocidade de reação e os subprodutos gerados a partir da decomposição do H_2O_2 podem ser alteradas na presença de metais de transição, os quais promovem a catálise do H_2O_2 em HO^\bullet e HO_2^\bullet por meio das reações de fenton ou like-fenton (Bishop et al.³, 1968; Torres et al.⁷¹, 2010; Travassos et al.⁷³, 2010; Torres et al.⁷², 2013; Duque et al.²⁸, 2014). No entanto estas reações podem resultar em precipitação de sub-produtos escurecidos na superfície dental, reduzindo a efetividade do clareamento (Schrank et al.⁵⁵, 2005; Suty et al.⁶⁸, 2004). Outros estudos têm demonstrado que o uso de extratos naturais ricos em enzimas oxidantes, tais como a peroxidase e a catalase, também apresentam efeito positivo sobre a eficácia clareadora in vitro via aumento na formação de radicais livres, com a vantagem de não haver precipitação de subprodutos na superfície dental (Travassos et al.⁷³, 2010; Gopinath et al.³³, 2013). Assim, no presente estudo objetivou-se avaliar a o efeito da enzima peroxidase sobre a cinética de degradação do H_2O_2 , eficácia clareadora e citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel clareador com 35% de H_2O_2 .

2 REVISÃO DA LITERATURA

O clareamento dental é primeira escolha de tratamento para eliminar pigmentações extrínsecas e intrínsecas da estrutura dentária, devido à facilidade técnica e por ser considerado não invasivo, desde que não envolve desgastes da estrutura dental (Briso et al.⁸, 2016). Diversos estudos clínicos demonstram que as diferentes terapias clareadoras são capazes de promover alteração de cor efetiva da estrutura dental, resultando em branqueamento e aumento da luminosidade aparente do dente (Williams et al.⁷⁷, 1992; Perdigão et al.⁴⁶, 2010; Martin et al.⁴³, 2015; Vildosola et al.⁷⁶, 2017). Assim, este procedimento ganhou popularidade entre os pacientes que desejam obter sorrisos mais brancos e perfeitos (Christesenn et al.¹⁶, 2005).

A técnica clareadora mais procurada com a finalidade de obter resultados estéticos em curtos períodos de tempo é o clareamento de consultório (Buchalla et al.⁹, 2007; Reis et al.⁴⁸, 2011). Neste procedimento, são utilizados géis com elevadas concentrações (30-40%) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é aplicado durante 30 a 45 minutos em cada sessão clínica (Briso et al.⁸, 2016). De acordo com estudos clínicos randomizados, intensa alteração de cor ocorre após uma única sessão clareadora empregando-se a técnica de consultório, sendo que um total de até 3 sessões são recomendadas na literatura para obtenção do resultado clínico desejado, dependendo de cada caso em particular. No entanto, estes mesmos estudos clínicos demonstram que cerca de 80-100% dos pacientes submetidos à técnica de clareamento de consultório tradicional relatam sensibilidade dental durante a realização do procedimento, a qual pode se estender por períodos de até 48 horas pós-clareamento. Em cerca de 60% dos casos, a intensidade da sensibilidade é considerada de moderada a severa, podendo resultar até mesmo em interrupção do procedimento (Reis et al.⁴⁷, 2011; Reis et al.⁴⁸, 2011; Kossatz et al.³⁸, 2011; de Almeida et al.²¹, 2012; Tay et al.⁷⁰, 2012; Martin et al.⁴², 2013; de Paula et al.²⁴, 2015).

O H_2O_2 é o componente ativo dos géis clareadores por ser uma molécula com potencial de oxidar componentes orgânicos, bem como por ser capaz de se difundir pelos espaços interprismáticos do esmalte para atingir o tecido dentinário, onde concentram-se os cromóforos responsáveis pela coloração dental (Ubal dini et al.⁷⁴, 2013). No entanto, já foi amplamente demonstrado na literatura que poucos minutos após a aplicação de géis clareadores na superfície do esmalte, ocorre

penetração de H₂O₂ na câmara pulpar (Gökay et al.³⁰, 2000; Gökay et al.³¹, 2004; Gökay et al.³², 2005; Camargo et al.¹¹, 2007; Ubaldini et al.⁷⁴, 2013; Torres et al.⁷², 2013; Marson et al.⁴¹, 2015). Avaliações histopatológicas do tecido pulpar de dentes clareados têm correlacionado esta difusão com a ocorrência de dano oxidativo no tecido pulpar, caracterizado por áreas de necrose tecidual e reação inflamatória (Costa et al.²⁰, 2010; Cintra et al.¹⁷, 2013; Roderjan et al.⁵⁰, 2014; Roderjan et al.⁵¹, 2015). Estudos laboratoriais demonstraram que o H₂O₂ residual proveniente dos géis clareadores promove redução da viabilidade de células pulpares em cultura, associada a indução de estresse oxidativo e ruptura da membrana celular (Sato et al.⁵⁴, 2013; Soares et al.⁵⁹, 2014; Soares et al.⁶², 2015; Soares et al.⁶³, 2015; Soares et al.⁶⁵, 2016).

Os efeitos adversos do clareamento dental estão relacionados diretamente à concentração de H₂O₂ residual capaz de se difundir pela estrutura de esmalte e dentina, sendo que quanto maior a concentração de H₂O₂ no agente clareador e maior tempo de contato com a estrutura dental, maior é a difusão trans-amelodentinária desta molécula (Soares et al.⁵⁴, 2013; Duque et al.²⁸, 2014; Soares et al.⁵⁹, 2014; de Almeida et al.²², 2015; Simões et al.⁵⁶, 2015; Soares et al.⁶⁰, 2015; Soares et al.⁶³, 2015). De acordo com de Oliveira Duque et al.²⁵ (2017), a difusão de H₂O₂ residual e citotoxicidade trans-amelodentinária também é diretamente relacionada com a espessura do substrato dental. Os autores constataram que discos de esmalte/dentina simulando a espessura de incisivos inferiores (2,3 mm) permitiram uma maior difusão de subprodutos do gel clareador, os quais promoveram danos mais intensos às células pulpares em cultura quando comparados aos componentes coletados a partir espécimes simulando pré-molares (4,0 mm de espessura). Dados provenientes de ensaios clínicos e estudos histopatológicos corroboram estes achados laboratoriais, desde que o emprego de géis com 35-38% de H₂O₂ resultou em elevados índices de sensibilidade dental associado a alterações importantes no tecido pulpar em incisivos inferiores, enquanto que os pré-molares não sofrem alterações significativas (Kina et al.³⁷, 2009; Rodrigues et al.⁵², 2009; de Souza Costa et al.²⁶, 2010; de Almeida et al.²¹, 2012; Bonafé et al.⁵, 2013). Desta forma, o clareamento de consultório tradicional pode ser considerado como a terapia clareadora mais agressiva ao complexo dentino-pulpar, especialmente em dentes com pequena espessura de esmalte e dentina, devido a maior probabilidade de difusão de concentrações potencialmente tóxicas de

H₂O₂ na câmara pulpar durante a realização deste tratamento (de Souza Costa et al.²⁶, 2014; Soares et al.⁶⁵, 2016; de Oliveira Duque et al.²⁵, 2017).

De acordo com o discutido acima, a redução da difusão de H₂O₂ residual para a câmara pulpar é considerada como ponto chave para minimização dos efeitos adversos desta terapia sobre o complexo dentino-pulpar. Desta forma, novos parâmetros para o clareamento dental de consultório têm sido estudados com o objetivo de reduzir a penetração do H₂O₂ na câmara pulpar (Soares et al.⁶⁵, 2016). Estudos clínicos demonstraram que a porcentagem de pacientes que relatam sensibilidade dental, bem como a intensidade e duração da mesma pós-tratamento clareador, são reduzidos quando foram empregados géis com concentração de 15-20% de H₂O₂ (Moncada et al.⁴⁴, 2013; Özcan et al.⁴⁵, 2014; Bortolatto et al.⁷, 2014). Minimização da toxicidade de forma concentração/tempo-dependente dos géis de consultório sobre as células pulpares também foi demonstrada in vitro, associado a maior capacidade de recuperação em um curto período de tempo (72 horas) (Soares et al.⁵⁹, 2014; Soares et al.⁶¹, 2015). No entanto, apesar da maior biocompatibilidade observada para estas técnicas alternativas de clareamento, também foi demonstrado que quanto menor a concentração de H₂O₂ no gel clareador e menor o tempo de contato com a superfície dental, ocorre redução da eficácia clareadora, o que pode limitar o emprego clínico destas terapias (Soares et al.⁵⁹, 2014).

O H₂O₂ é considerado como a espécie reativa derivada do oxigênio com menor potencial de oxidação ($E^{\circ}=+1,8V$), medida que demonstra a tendência de uma espécie química em doar elétrons levando à oxidação e fragmentação de substratos orgânicos (Suty et al.⁶⁷, 2004). Acredita-se que o efeito clareador seja resultante da interação dos radicais livres provenientes da decomposição do H₂O₂ com os cromóforos da estrutura dental, tais como radicais hidroxila (HO•), peri-hidroxila (HO₂•) e superóxido (O₂•) (Goldberg et al.³³, 2010; Ubaldini et al.⁷⁴, 2013; Carey et al.¹², 2014). Dentre estas espécies, o HO• é aquele que apresenta maior potencial de oxidação ($E^{\circ}=+2,8V$). Assim, para aumentar a efetividade do H₂O₂ no processo de oxidação de um substrato orgânico, seria interessante potencializar a degradação homolítica desta espécie reativa, gerando a produção de dois mols de HO• para cada mol de H₂O₂. Devido ao elevado potencial oxidativo do HO•, pode-se supor que produtos capazes de liberar maior quantidade deste radical livre poderão apresentar

maior reatividade com a estrutura dental, minimizando o total de H₂O₂-livre não reagido capaz de se difundir em direção a câmara pulpar. Como o HO• é uma espécie transiente e com tempo de meia-vida extremamente curto (10⁻⁹ segundos) (Chen et al.¹⁵, 1993; Bveris et al.¹⁰, 1998). Porém, este efeito ainda não foi demonstrado na literatura.

A fotocatalise do H₂O₂ foi bastante empregada na Odontologia, técnica conhecida como clareamento ativado por luz, cujo princípio era baseado na geração de HO• via degradação homolítica do H₂O₂ de acordo com a seguinte equação: H₂O₂ + hv (luz) → 2HO• (Travares et al.⁷³, 2003). No entanto, estudos in vivo demonstraram que não há diferença na eficácia clareadora quando o gel é utilizado isoladamente ou submetido à ativação com fontes de luz (Reis et al.⁴⁷, 2011; He et al.³⁶, 2012). A limitação desta técnica baseia-se no fato do H₂O₂ apresentar apenas limitado poder de absorção de luz em comprimento de onda acima de 280 nm. Desta forma, para que ocorra a sua fissão homolítica, somente a radiação da faixa ultra-violeta é eficaz, a qual é extremamente danosa aos organismos vivos (Tavares et al.⁶⁹, 2003). Por este motivo, a literatura na área odontológica demonstra que a irradiação de géis clareadores a base de H₂O₂ puro com fontes de luzes no espectro visível apresenta limitado efeito sobre a eficácia clareadora (Reis et al.⁴⁷, 2011; He et al.³⁶, 2012; Tay et al.⁷⁰, 2012; Reis et al.⁴⁹, 2013; Santana et al.⁵³, 2014; de Paula et al.²⁴, 2015). Na realidade, estudos in vitro demonstraram que ocorre uma maior penetração de H₂O₂ na câmara pulpar após clareamento com um gel com 35% de H₂O₂ ativado com aparelho de luz LED/Laser (Camargo et al.¹¹, 2009). No estudo realizado por Dias Ribeiro et al.²⁷ (2009), foram observados maiores efeitos tóxicos sobre células odontoblastóides quando o gel com 35% de H₂O₂ foi aplicado na superfície de esmalte associado à ativação por luz halógena. Além disso, Caviedes-Buchelli et al.¹³ (2008) observaram que os pré-molares clareados com um gel contendo 35% de H₂O₂ ativado por luz apresentaram maior expressão de substância P (neuropeptídeo), o que não aconteceu com o grupo clareado sem ativação com luz. Segundo os autores, a fotoativação do gel clareador resultou no desencadeamento de uma reação inflamatória mais intensa no tecido pulpar. Estes dados científicos têm sido corroborados por diversos estudos clínicos, onde foi observada maior prevalência e intensidade de sensibilidade pós-clareamento nos protocolos onde a luz estava associada (Reis et al.⁴⁷, 2011; He et al.³⁶, 2012). Assim, de acordo com a literatura, a

ativação física do gel clareador com luz vai de encontro com o conceito de otimização da reação do agente clareador com a estrutura dental e minimização da difusão de H₂O₂ residual potencialmente tóxico até a câmara pulpar.

A formação de HO• em maior escala pode ser facilmente obtida via reação de Fenton e like-Fenton, a qual envolve a catálise do H₂O₂ em HO• na presença do íon ferrosos (Fe²⁺), ou de outros metais de transição, tais como o manganês, cobre e cobalto. A decomposição catalítica do H₂O₂ nesta situação pode ser representada pela reação global demonstrada na seguinte equação: $H_2O_2 + S \rightarrow S^* + HO\cdot + HO^-$, onde S representa um sítio ativo do catalisador e S* o sítio oxidado (Sun et al.⁶⁷, 2015). Resultados promissores do ponto de vista estético têm sido demonstrados ao incorporar metais de transição a agentes clareadores, tais como sulfato de ferro, gluconato de manganês e cloridrato de manganês (Torres et al.⁷¹, 2010; Travassos et al.⁷³, 2010; Gopinath et al.³⁴, 2013; Torres et al.⁷², 2013; Duque et al.²⁸, 2014). Duque et al.²⁸ (2014) observaram que a adição do sulfato de ferro em um gel com 35% de H₂O₂ promoveu aumento significativo na eficácia clareadora, associado a redução na difusão de H₂O₂ pela estrutura dental e minimização em torno de 15% no efeito citotóxico sobre células odontoblastóides. No entanto, o emprego de ferro como catalizador pode resultar em precipitação de hidróxido de ferro (Fe(OH)²⁺) via reação do H₂O₂ com íons férricos (Schrank et al.⁵⁵, 2005; Suty et al.⁶⁸, 2004). Dados recentes do nosso grupo demonstraram intensa deposição de subprodutos de coloração marrom, formação excessiva de bolhas e elevação da temperatura de géis a base de H₂O₂ na presença de ferro como ativador químico, o que foi associado a limitado efeito positivo sobre a eficácia clareadora (Duque et al.²⁸, 2014)

O emprego de ativadores enzimáticos também tem sido proposto, visando o aumento na liberação de radicais livres a partir da decomposição do H₂O₂, incluindo a liberação de HO•. (Torres et al.⁷¹, 2010; Travassos et al.⁷³, 2010; Gopinath et al.³⁴, 2013; Torres et al.⁷², 2013; Duque et al.²⁸, 2014). Pesquisadores observaram um efeito promissor quando extratos de raízes de plantas ricas nas enzimas oxidantes peroxidase e catalase, tais como a amoreira (*Morus nigra*) e a batata doce (*Ipomoea batatas*), foram adicionadas ao gel clareador (Travassos et al.⁷³, 2010; Gopinath et al.³⁴, 2013). Na presença de peroxidase, a taxa de degradação do H₂O₂ em íons

hidroxila é intensificada, conforme reação a seguir (Travassos et al.⁷³, 2010): $2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{HO}^\bullet$ (Torres et al.⁷¹, 2010).

Dentre as inúmeras fontes da enzima peroxidase, a horseradish peroxidase (HRP) obtida a partir da raiz da *A Armoracia rusticana*, tem sido amplamente estudada e aplicada em bioquímica devido a sua elevada reatividade com o H_2O_2 , sendo a fração purificada desta enzima amplamente comercializada (Berglund et al.², 2002; Veitch et al.⁷⁵, 2004). Desta forma, o uso da HRP como agente catalisador em géis clareadores apresenta-se como uma alternativa com elevado potencial para promover aumento da eficácia clareadora e da biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar de géis clareadores.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de degradação, eficácia clareadora, citotoxicidade e difusão trans-amelodentinária de subprodutos de um gel clareador com 35% de H_2O_2 que recebeu a adição da enzima hesehardish peroxidase (HRP) em sua composição.

3.1 Objetivos Específicos

1 - Avaliar a cinética de degradação do H_2O_2 mediado pela enzima HRP num gel clareador contendo 35% de H_2O_2 , bem como determinar a liberação de radicais livres e radical hidroxila pelo produto;

2 - Avaliar a eficácia clareadora de um gel associado ou não a HRP aplicado por 6 sessões (3x15 minutos) sobre a superfície de discos de esmalte/dentina;

3 - Avaliar a viabilidade, integridade da membrana e o possível estresse oxidativo induzido após exposição de células odontoblastóides MDPC-23 aos componentes da difusão trans-amelodentinária de um gel clareador associado ou não a HRP;

4 - Avaliar a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 residual e radicais livres após aplicação de um gel clareador com 35% de H_2O_2 , contendo ou não HRP, sobre os discos de esmalte/dentina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Avaliação da Degradação do Gel Clareador na Presença de HRP

4.1.1 Quantificação do H₂O₂ residual

A análise do H₂O₂ residual foi realizada na fase líquida de um gel clareador comercial com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP 35%; FGM, Joinville, SC, Brasil), na presença ou ausência da enzima hoserhardish peroxidase (HRP; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), de acordo com os grupos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos estabelecidos para análise da degradação do gel clareador.

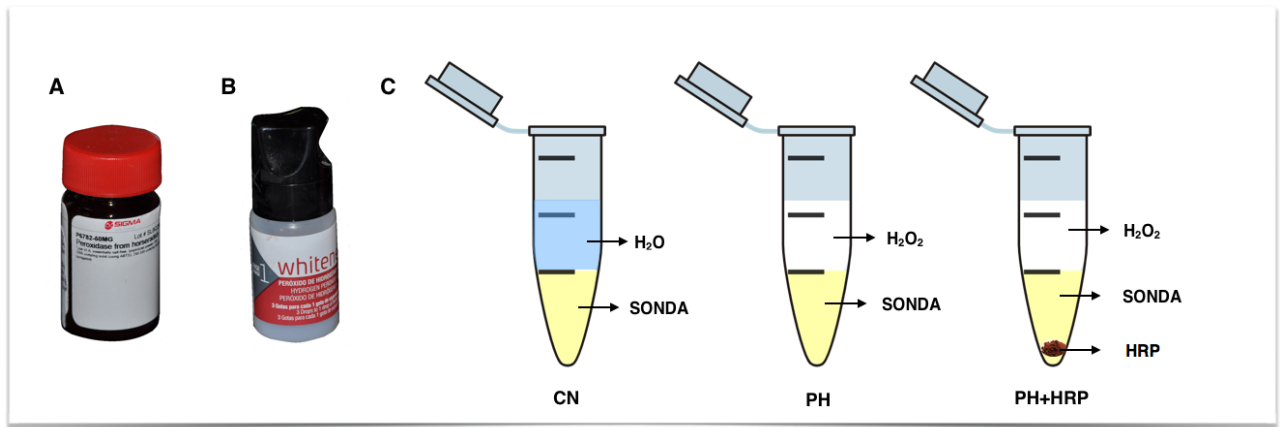
Grupos	Tratamento
CN	Sem Tratamento (Controle Negativo - Blank)
PH35%	H ₂ O ₂ 35%
PH35%+HRP	H ₂ O ₂ 35% + HRP (10 mg/mL)

Fonte: Elaboração própria

Para tanto, as reações foram realizadas em tubos de 1,5 mL (Axygen®, Corning Inc. Nova Iorque, NY, EUA), conforme demonstrado na Figura 1. No grupo PH35%, a sonda fluorescente red peroxidase infra-red fluorescent probe do kit Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay (Sigma-Aldrich Corp) foi pipetada nos tubos, seguido da adição da fase H₂O₂. Já para o grupo PH35%+HRP, inicialmente adicionada a HRP aos tubos, seguido de pipetagem da sonda e finalmente da fase H₂O₂. No grupo CN, foi adicionada água ultra-pura em substituição ao H₂O₂ presente na reação, sendo que este grupo foi empregado como blank durante as leituras de emissão de fluorescência. Uma alíquota da reação foi então transferida para placas

de 96 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), sendo a emissão de fluorescência monitorada após 0, 5, 10 e 15 minutos de incubação, com excitação em 640 nm e emissão em 680 nm (Synergy H1, Biotek, Winooski, VT, EUA).

Figura 1 – Imagens representativas dos grupos estabelecidos para análise da degradação do gel clareador



A- Enzima HRP (Sigma-Aldrich Corp.); B- Fase líquida do gel clareador com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP 35%; FGM); C- Representação esquemática dos tubos para reação com a sonda fluorescente em cada grupo.

Fonte: Elaboração própria

4.1.2 Produção de radicais livres e radical hidroxila

As amostras dos grupos foram preparadas conforme descrito para o teste de H₂O₂ residual (n=4). Para quantificação do total de radicais livres produzido, as soluções foram incubadas a 37°C com a sonda carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) na concentração de 1 mM (1:1), sendo a emissão de fluorescência avaliada com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm (Synergy H1, Biotek) após 0, 5, 10 e 15 minutos, sendo grupo controle negativo empregado como blank. Para quantificação da liberação de HO•, foi empregada a sonda fluorescente do kit OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (HORAC) Activity Assay (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA), cujo princípio baseia-se na oxidação da sonda pelo HO• via transferência de um átomo de oxigênio. Desta forma, na presença de HO•, a fluorescência da reação é reduzida. As amostras (20 µL) foram incubadas com

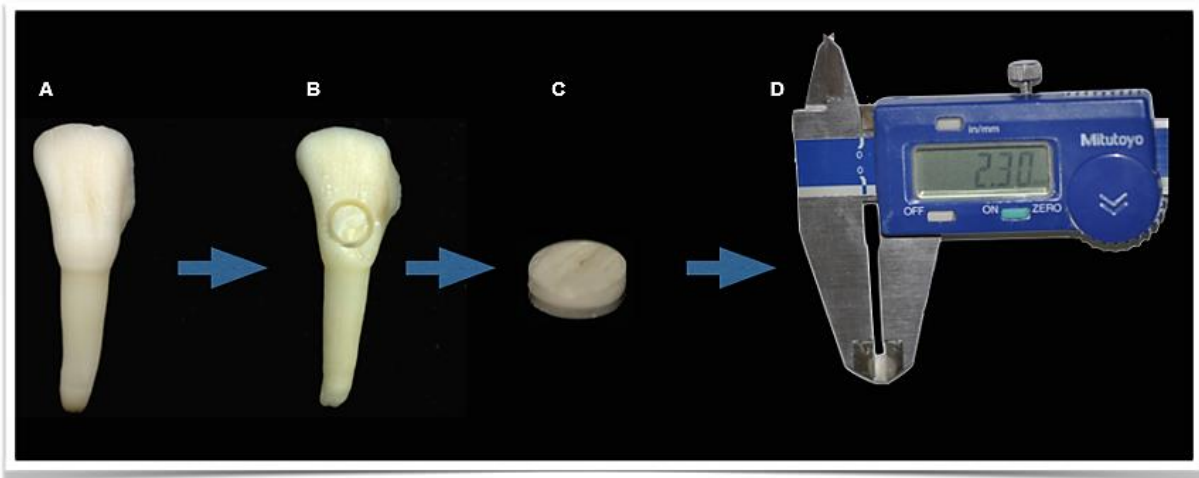
a 140 µL sonda, sendo a fluorescência monitorada a 480 nm excitação e 530 nm emissão (Synergy H1, Biotek) após 0, 5, 10 e 15 minutos de incubação em temperatura ambiente. A produção de HO• foi calculada por meio da seguinte equação: Produção de HO• = emissão de fluorescência no grupo controle negativo (100% de fluorescência) – emissão de fluorescência no grupo experimental.

4.2 Avaliação da Eficácia Clareadora

4.2.1 Obtenção dos discos de esmalte e dentina

Discos de esmalte e dentina foram obtidos a partir da face vestibular de incisivos bovinos. Dentes com trincas no esmalte, hipoplasia, alterações morfológicas, desgaste excessivo do terço incisal ou cárie foram excluídos. Os dentes foram cortados por meio de uma broca diamantada trefina (Dinser broca diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil) em um ambiente submerso em água a 4°C. O diâmetro dos discos foi padronizado em 5,6 mm, sendo a espessura estabelecida em 2,3 mm (Figura 2), de maneira a simular a espessura de incisivos inferiores humanos, conforme estabelecido por de Oliveira Duque et al.²⁵, (2017). Para estabelecimento desta espessura, a superfície dentinária foi desgastada com lixas d'água de granulação 400 e 600, por meio de movimentos circulares padronizados (T469-SF-Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil). Foi realizada profilaxia da superfície de esmalte com pedra-pomes e água para eliminação de pigmentos superficiais, e a superfície de dentina foi tratada com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético; Sigma-Aldrich Corp.) 0,5 N por 30 segundos para remoção da smear layer.

Figura 2 - Imagens representativas da obtenção de discos de esmalte e dentina bovinos com 5,6 mm de diâmetro e 2,3 mm de espessura, simulando um incisivo inferior



A- Incisivo bovino íntegro; B- Obtenção de disco de esmalte/dentina bovino a partir do terço médio do dente; C- Disco de esmalte/dentina obtido; D- Mensuração e padronização da espessura desejada por meio de espécímetro.

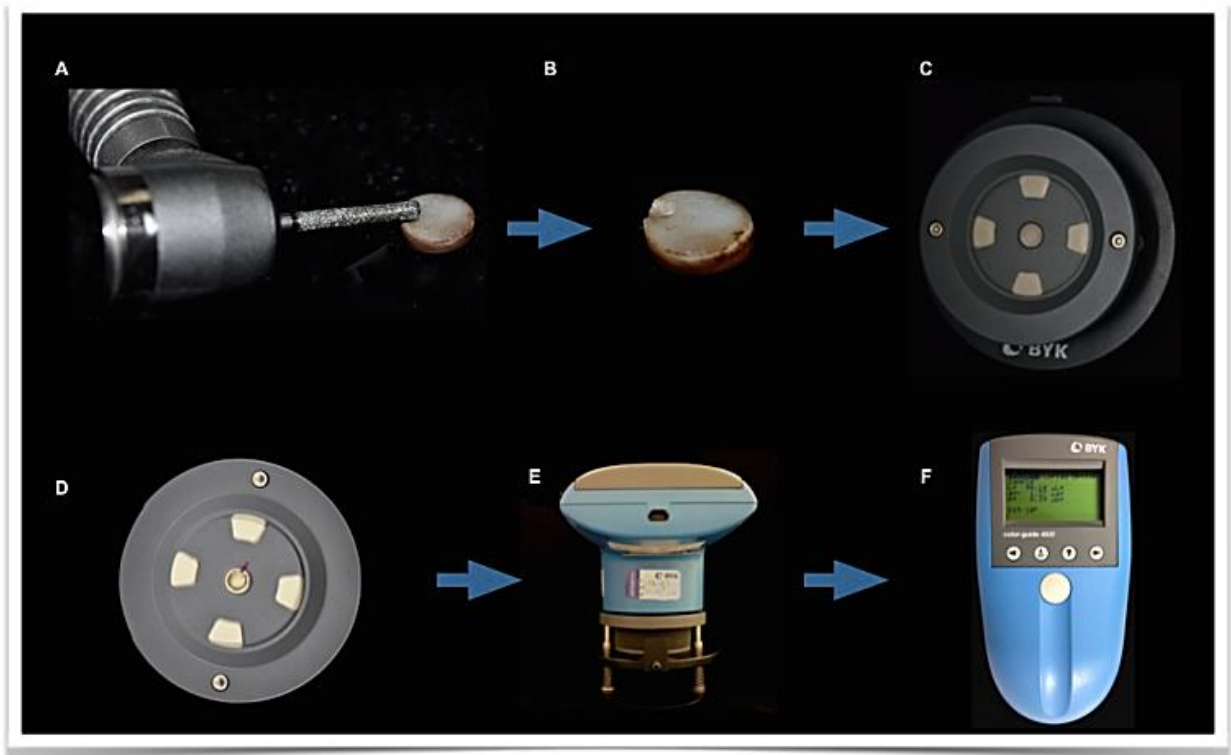
Fonte: Elaboração própria

4.2.2 Padronização da cor dos discos

Para este ensaio, os discos foram submetidos a um protocolo de manchamento extrínseco com chá preto, conforme descrito por de Oliveira Duque et al.²⁵ (2017). Os discos foram incubados em infusão de chá-preto (200 mg/mL) por 24 horas a 37°C, seguido de profilaxia na superfície de esmalte com solução de pedrapomes e água para remover os pigmentos superficiais, e incubação por 24 horas em água deionizada para eliminação dos pigmentos não absorvidos pela dentina. Em seguida, foi realizada uma marcação na borda dos discos com broca diamantada acoplada a motor de alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 3A e 3B). Este procedimento foi realizado para padronização do posicionamento dos discos em todas as leituras realizadas. Os valores das coordenadas L^* e b^* (Comission Internationale de l'Eclairage) foram mensurados com espectrofotômetro de reflexão UV-Vis (Color Guide 45/0; BYK-Gardner GmbH, Geretsried, BAV, Germany), com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação 45/0°. Para tanto, os discos foram posicionados de forma padronizada em uma matriz de silicone branco, de maneira

que apenas a superfície de esmalte permaneceu exposta (Figura 3C e 3D). O espectrofotômetro foi posicionado sobre o espécime com o auxílio de um suporte fornecido pelo aparelho, sendo realizada três leituras para obtenção de uma média (Figura 3E e 3F). Discos com os valores médios de L^* e b^* similares foram selecionados e distribuídos entre os grupos.

Figura 3 - Imagens ilustrativas da análise da alteração de cor dos discos



A- Marcação dos discos para padronização do posicionamento na matriz de silicone; B- Espécime padronizado; C- Posicionamento dos discos de esmalte/dentina na matriz de silicone adaptada ao suporte para leitura da cor; D- Detalhe da padronização de posicionamento dos discos; E- Espectrofotômetro posicionado sobre os discos para leitura; F- Espectrofotômetro com os resultados da leitura de cor.

Fonte: Elaboração própria

4.2.3 Procedimento clareador

Os discos foram distribuídos de acordo com os grupos demonstrados na Tabela 2 (n=8). A manipulação do gel clareador no grupo PH35% (Whiteness HP 35%; FGM) foi realizada conforme recomendação do fabricante. Para tanto, 1 gota do espessante (50 μ L) foi proporcionada no compartimento de manipulação. Em seguida,

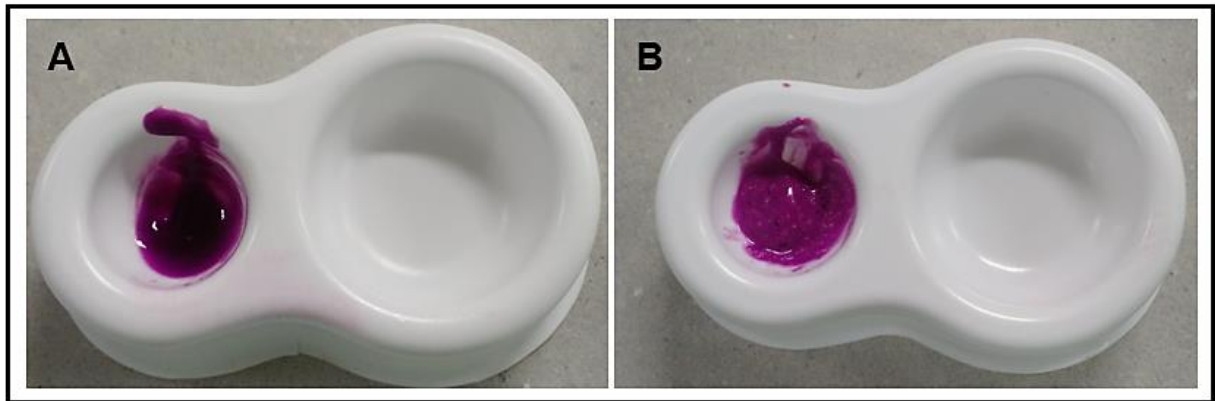
3 gotas da fase líquida contendo 35% de H₂O₂ (100 µL) foram adicionadas, sendo o produto misturado por 15 segundos (Figura 4A). Para manipulação do gel no grupo PH35%+HRP, um total de 1 mg da HRP (Sigma-Aldrich Corp.) foi incorporada a 1 gota do espessante (50 µL), seguido de homogeneização manual. Em seguida, 3 gotas da fase líquida contendo 35% de H₂O₂ (100 µL) foram adicionadas ao espessante, sendo o produto misturado por 15 segundos, gerando um produto contendo 10 mg de HRP para cada 1 mL de H₂O₂ (Figura 4B). Este procedimento foi realizado imediatamente antes de cada aplicação de 15 minutos do produto sobre a superfície dental. Um total de 40 µL dos géis clareadores foram aplicados sobre o esmalte, com auxílio de pipeta acoplada a ponteira com êmbolo, específica para líquidos viscosos (MICROMAN® E, Gilson Inc. Middleton WI, EUA). O grupo CN foi considerado como controle negativo, onde nenhum tratamento foi realizado sobre o esmalte.

Tabela 2 - Grupos de acordo com a concentração do gel clareador

Grupos	Tratamento	Número de Sessões/Tempo
CN	Sem Tratamento (Controle Negativo)	-
PH35%	Gel com H ₂ O ₂ 35%	3 x 15 minutos
PH35%+HRP	Gel H ₂ O ₂ 35% + HRP (10 mg/mL de H ₂ O ₂)	3 x 15 minutos

Fonte: Elaboração própria

Figura 4 - Imagens representativas do aspecto dos géis clareadores imediatamente após a manipulação nos grupos PH35% (A) e PH35%+HRP (B)



Fonte: Elaboração própria

4.2.4 Avaliação da alteração de cor

Após distribuição dos discos entre os grupos (n=8), os mesmos foram incubados em ambiente úmido para promover o mesmo padrão de umidade. Para tanto, a dentina foi mantida em contato com algodão umedecido em água deionizada, enquanto que o esmalte permaneceu embebido em algodão com solução tipo saliva (Soares et al.⁵⁷, 2011) (Figura 5). Os espécimes foram incubados por 72 horas a 37°C, sendo então realizada a leitura inicial de cor (baseline) com o espectrofotômetro de reflexão UV-vis para mensuração das coordenadas L* a* b* (CIE).

Figura 5 - Imagem representativa do procedimento de padronização da umidade dos discos



Fonte: Elaboração própria

Os espécimes foram então submetidos ao clareamento, conforme descrito na Tabela 2. Ao término da última aplicação do gel clareador, este foi sugado, sendo a superfície de esmalte lavada com água deionizada e seca com algodão. Os espécimes foram incubados em ambiente úmido por 72 horas, sendo então realizada a leitura da cor para cálculo do ΔE , conforme descrito anteriormente, sendo aplicada a seguinte equação: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. Um total de seis sessões clareadoras foram realizadas com intervalos de 72 horas, sendo os discos mantidos em ambiente úmido no intervalo das sessões para padronização da umidade. O ΔE em cada sessão foi calculado baseado no valor do baseline para cada espécime individualmente.

4.3 Avaliação da Citotoxicidade Trans-amelodentinária

4.3.1 Cultivo celular

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (papila molar de ratos), foram semeadas em placas de 24 ou 96 compartimentos (KASVI Imp.) com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO. Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) em uma atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, para obtenção de um padrão de 80% de confluência.

4.3.2 Procedimento experimental

Discos não submetidos ao manchamento, tiveram a superfície de esmalte limpa com pedra-pomes/água em baixa rotação e a superfície de dentina foi tratada com solução de EDTA 0,5 N durante 30 segundos seguido de lavagem com água deionizada, para remoção da smear layer. Os discos foram adaptados a câmaras pulpares artificiais (CPAs), por meio de dois anéis de silicone. A região dos anéis de silicone foi selada com cera utilidade de forma a impedir o contato do gel clareador com esta região (Figura 6), sendo os conjuntos esterilizados por óxido de etileno (ACECIL. Com. Ind. Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Figura 6 - Imagens ilustrativas da montagem dos discos na CPA

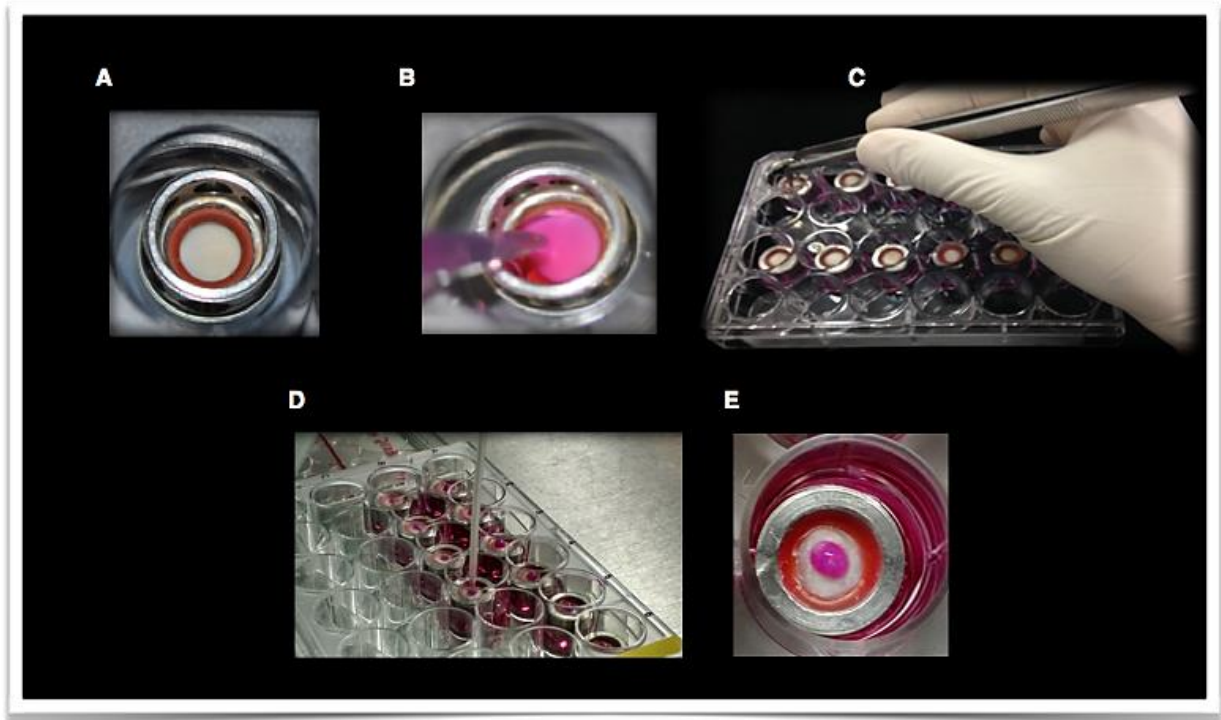


A- CPA; B- Anéis de silicone; C- Disco adaptado ao primeiro anel de silicone; D- CPA com segundo anel de silicone; E- Disco adaptado à CPA; F- Vista da superfície de dentina; G- Vista da superfície de esmalte, após selamento das margens do disco com cera.

Fonte: Elaboração própria

Os conjuntos disco/CPA foram posicionados em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp.) com a superfície de dentina voltada para cima. Em seguida, 2 mL de meio de cultura sem SFB foram adicionados, as CPAs foram giradas e 1 mL de meio de cultura foi removido para exposição do esmalte. Este procedimento foi realizado com o objetivo de evitar a formação de bolhas na dentina, de forma que 1 mL de meio permaneceu em contato com a dentina, e o esmalte exposto para receber os tratamentos de acordo com a Tabela 2 (Figura 7).

Figura 7 - Imagens ilustrativas da sequência do procedimento clareador

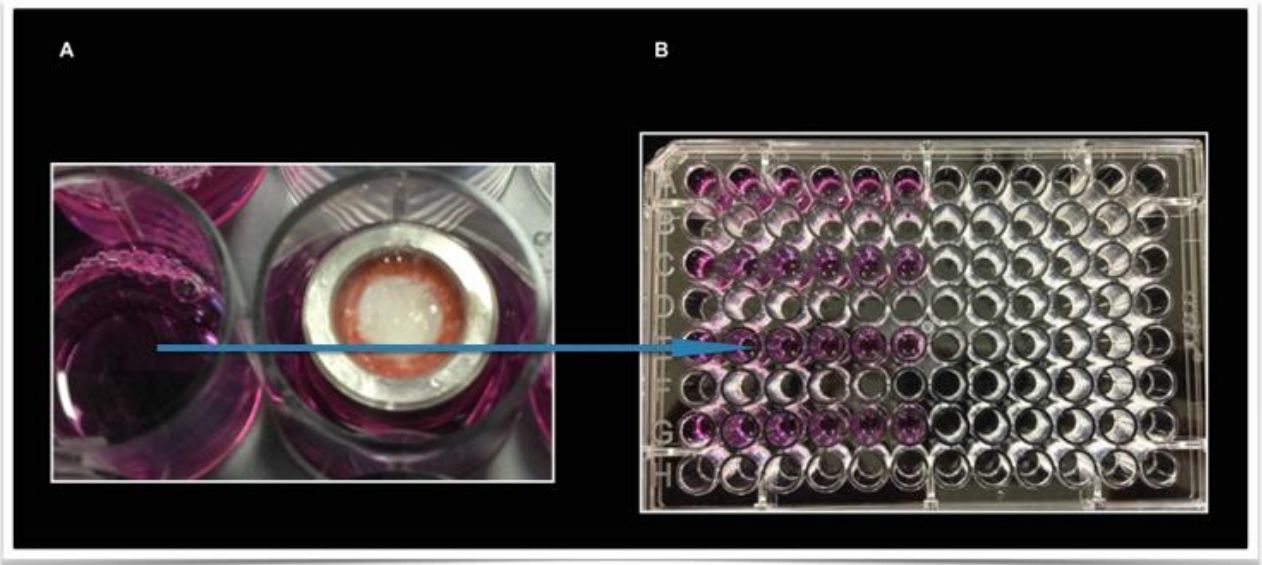


A- Conjunto disco/CPA posicionado de forma invertida na placa de 24 compartimentos; B- Adição de 2 mL de meio de cultura; C- Conjunto disco/CPA sendo girado na placa de 24 compartimentos; D- Aplicação do gel clareador no esmalte com pipeta específica; E- Gel clareador aplicado sobre o esmalte.

Fonte: Elaboração própria

Imediatamente após o término do procedimento clareador, o meio de cultura em contato com a dentina, agora denominado de extrato, foi coletado, homogeneizado e distribuído em alíquotas de 500 μL ou de 100 μL , as quais foram aplicadas nas células semeadas em placas de 24 ou 96 compartimentos (KASVI Imp.), respectivamente (Figura 8). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 com os extratos por 1 hora, sendo então submetidas às análises descritas a seguir.

Figura 8 - Representação esquemática das alíquotas do extrato sendo aplicadas sobre as células previamente semeadas em placas de 24 ou 96 compartimentos



A- Extrato obtido pós- clareamento; B- Extrato aplicado nas células MDPC-23 previamente semeadas.

Fonte: Elaboração própria

4.3.3 Viabilidade celular (Teste de MTT)

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Corp.). Este método é baseado na habilidade da enzima desidrogenase succínica das células viáveis em quebrar a estrutura do sal de tetrazolium, produzindo cristais de formazan de coloração roxa. Imediatamente após o período de contato com os extratos, as células semeadas em placas de 96 compartimentos (n=10) foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂ em 90 µL de meio de cultura DMEM sem SFB e 10 µL de solução de MTT (Sigma-Aldrich Corp.) na concentração de 5 mg/mL de PBS. Após este período, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N, sendo a absorbância mensurada a 570 nm (Synergy H1, Biotek). O valor médio de absorbância obtido no grupo CN foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo a porcentagem de viabilidade nos demais grupos calculados a partir deste parâmetro.

4.3.4 Morfologia celular

Para esta análise, as células foram semeadas sobre lamínulas de vidro posicionadas no fundo de placas de 24 compartimentos (n=3). O mesmo procedimento experimental foi realizado. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por uma hora em 1 mL de glutaraldeído 2,5% em PBS (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

1. Lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
2. Pós-fixadas em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% (60 minutos; Sigma-Aldrich Corp.).
3. Lavadas por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
4. Lavada uma vez em 1 mL de água destilada (5 minutos).
5. Desidratadas em 1 mL de soluções com concentração crescente de etanol (1 lavagem de 30 minutos com etanol 30%, 50% e 70%; 2 lavagens de 30 minutos com etanol 95% e 100%).
6. Lavadas por três vezes com 200 µL de HMDS (1,1,1,3,3,3,- Hexamethyldisilazane; Sigma-Aldrich Corp.) durante 20 minutos.

As lamínulas foram então posicionadas sobre stubs metálicos com tinta carbono e mantidas em dessecador com sílica gel durante 72 horas, para serem em seguida metalizadas com ouro (40 segundos) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6610; JEOL Ltd., Akishima, TYO, Japão).

4.3.5 Integridade da membrana celular

Foi empregado o kit Live/Dead® (Invitrogen), o qual baseia-se no emprego de dois marcadores fluorescentes. Em células com membrana celular rompida, o marcador ethidium homodimer-1 (EthD-1) penetra nas células e se liga aos

nucleotídeos, emitindo fluorescência (vermelho). Este marcador não é capaz de atravessar a membrana celular íntegra marcando, portanto, apenas as células com lesão de membrana celular. O marcador Calcein AM é capaz de fluorescer em células com atividade de esterases citoplasmáticas, independente da condição da membrana celular (verde). Após exposição aos extratos (n=4), as células semeadas em placas de 24 compartimentos foram lavadas em PBS, e incubadas com meio de cultura suplementado com Calcein AM e EthD-1, na concentração de 1:1000 durante 45 min. Em seguida, as amostras foram avaliadas em microscópio de fluorescência para obtenção de imagens representativas de cada grupo. A intensidade de fluorescência das células marcadas positivamente com EthD-1 (células com lesão à membrana celular) foi avaliada em 528 nm de excitação e 616 nm de emissão, enquanto que as células marcadas com Calcein AM foram avaliadas em 494 nm de excitação e 517 nm de emissão (Synergy H1, Biotek). Os valores de fluorescência para EthD-1 foram normalizados pelo Calcein AM para determinar o valor relativo de células com lesão a membrana celular para cada grupo.

4.3.6 Estresse oxidativo

Células semeadas em placas de 96 compartimentos foram pré-tratadas com a sonda fluorescente carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen) na concentração de 5 µM durante 30 minutos a 37°C, sendo então expostas aos extratos (n=10). Imediatamente após, a fluorescência foi avaliada a 492 nm de excitação e 517 nm de emissão (Synergy H1, Biotek), sendo os valores normalizados pela média do grupo CN.

4.4 Quantificação da Difusão Trans-amelodentinária de Subprodutos do Gel Clareador

4.4.1 H₂O₂ residual

Para quantificação da difusão de H₂O₂ (n=10), os discos de esmalte/dentina posicionados nas CPAs, foram colocados em placas de 24 compartimentos e realizado o tratamento clareador. Uma alíquota de 100 µL do extrato após o

clareamento foi coletada e transferida para tubos de ensaio contendo 900 μL de solução tampão acetato (2 M, pH 4,5). Em seguida, 500 μL desta solução foram transferidos para tubos contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL; Sigma-Chemical Corp., St Louis, MO, EUA). Os tubos foram então agitados, sendo adicionado 50 μL de solução a 1 mg/mL da enzima HRP (Sigma-Chemical Corp.). Este método baseia-se na reação do H_2O_2 com o corante violeta leucocristal, catalizado pela enzima HRP. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de peróxido, tornando possível avaliar a quantidade de peróxido difundida. A absorbância da solução resultante foi medida pelo espectrofotômetro com comprimento de onda de 596 nm (Synergy H1, Biotek). Uma curva padrão de H_2O_2 foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em μg de H_2O_2 por mL de extrato, sendo o grupo CN empregado como blank.

4.4.2 Difusão de ROS e HO^\bullet

Para esta análise, as CPAs foram posicionadas em placas de 24 compartimentos contendo 1 mL de PBS suplementado com 100 μM da sonda carboxy- H_2DCFDA (Invitrogen) ou com a sonda fluorescente do kit HORAC (Cell Biolabs Inc.), para quantificação dos radicais livres e HO^\bullet , respectivamente ($n=4$). Em seguida, o clareamento foi realizado na superfície de esmalte (3x15 min) e imediatamente após o término da terceira aplicação do gel clareador, a fluorescência das soluções foram mensuradas (Synergy H1, Biotek). Os valores foram normalizados pelo grupo CN em ambos os testes, conforme descrito anteriormente.

4.5 Análise Estatística

A presença de H_2O_2 residual, formação de radicais livres e HO^\bullet no gel clareador ao longo do tempo (0, 5, 10 e 15 min) para cada produto foram avaliadas pelo teste ANOVA a dois critérios com medidas repetidas, complementados pelo teste de Tukey para comparações entre os períodos de análise para cada grupo, e pelo teste de Sidak para comparações entre os grupos dentro de cada período de análise.

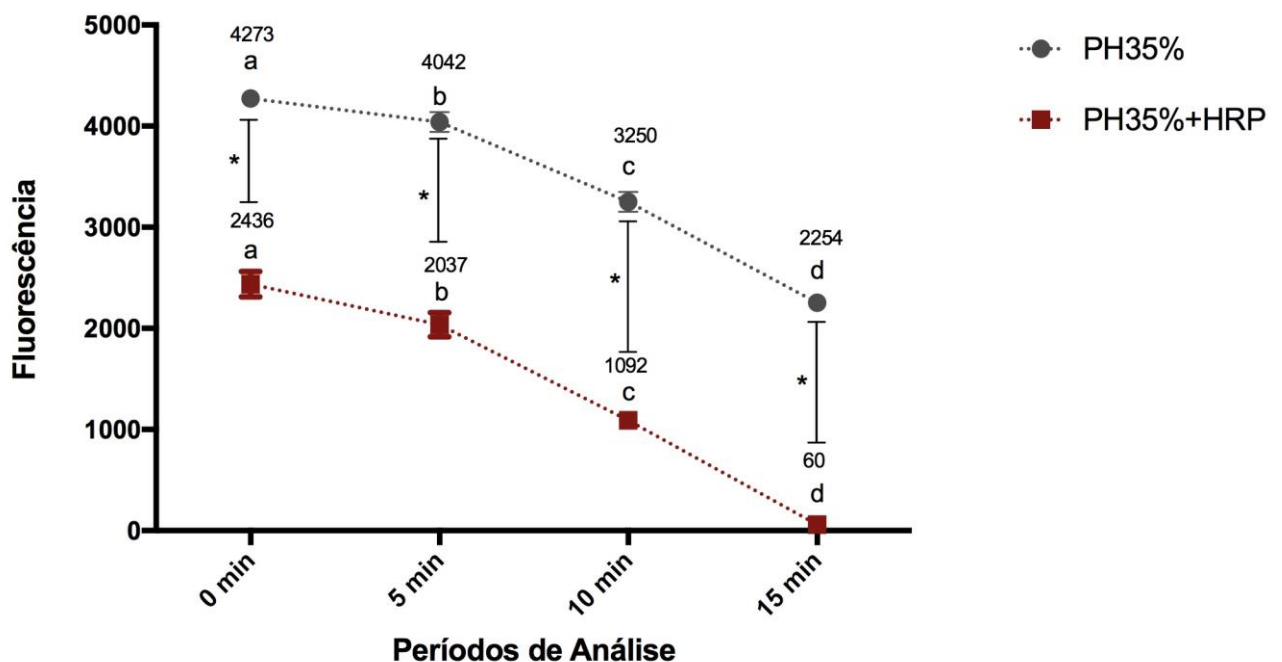
Os valores de ΔE foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios para comparações entre os grupos dentro de cada sessão, sendo análise de medidas repetidas empregada para a análise do efeito das sessões clareadoras para cada grupo. O teste de Tukey foi empregado para identificação das diferenças para ambas as variáveis protocolo clareador e sessões de clareamento. O teste de Dunnet foi empregado para comparação dos valores de ΔE em cada sessão do grupo PH35%+HRP com os valores de ΔE em S1, S3 e S6 do grupo PH35%. Os dados numéricos obtidos nos testes de viabilidade celular, marcação para Etdh-1 e estresse oxidativo foram avaliados pelos testes de ANOVA a 1 critério, complementado pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. As análises da quantificação de H_2O_2 , radicais livres e HO^\bullet entre os grupos PH35% e PH35%+HRP foram realizadas pelo teste t'Student. Todas as análises estatísticas realizadas empregaram um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de Degradação do Gel Clareador

Os resultados da detecção de H_2O_2 residual estão demonstrados na Figura 9. Foi possível observar que em ambos os grupos houve redução significativa do H_2O_2 no decorrer do tempo, entre todos os períodos de análise. Observa-se ainda que na presença de HRP houve redução significativa do H_2O_2 detectado nas soluções, a qual foi em torno 1,75, 1,98, 2,97 e 37,56 vezes após 0, 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, em comparação à solução sem adição da enzima.

Figura 9 - Cinética de degradação do H_2O_2 ao longo do período de 15 minutos para a solução de H_2O_2 na presença ou ausência de HRP

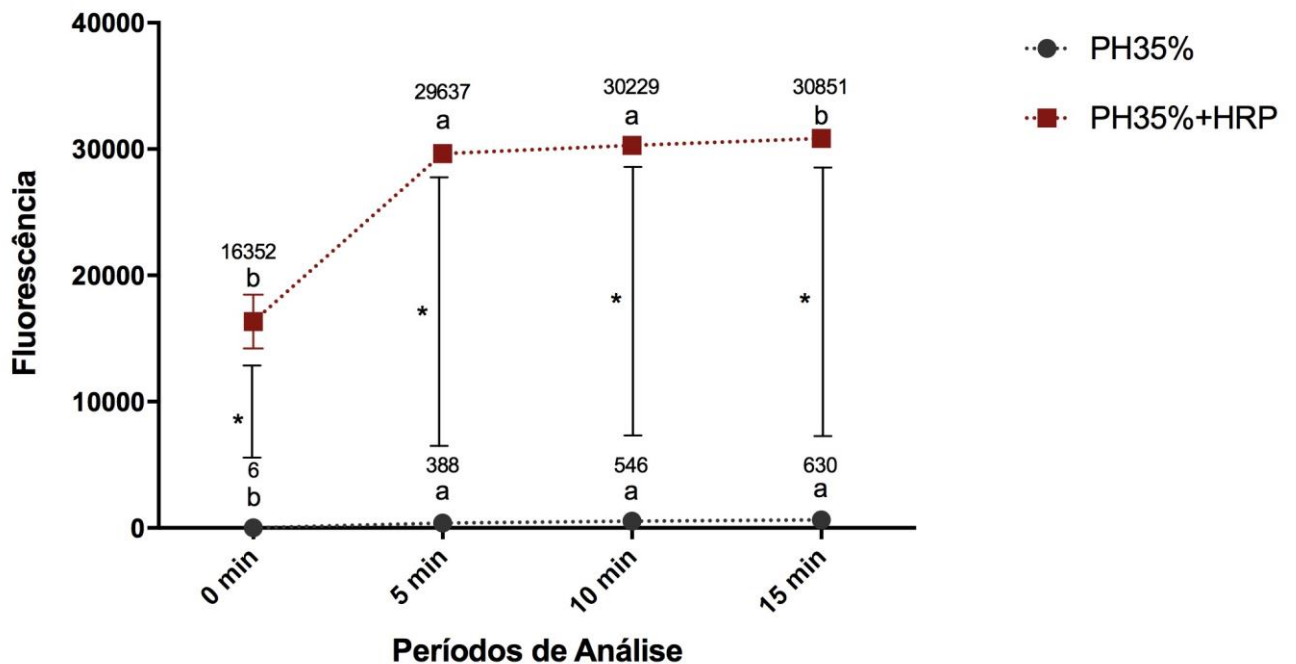


Números representam valores médios da emissão de fluorescência da sonda red peroxidase normalizada pelo controle negativo em cada período de análise. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Sidak, $p < 0,05$). * demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Aumento significativo na produção de radicais livres foi observado em ambos os grupos no período de 5 minutos (Figura 10). A produção destes radicais foi significativamente superior no grupo PH35%+HRP em comparação ao grupo PH35%, em todos os períodos de análise.

Figura 10 - Cinética de liberação de radicais livres ao longo do período de 15 minutos para a solução de H₂O₂ na presença ou ausência de HRP

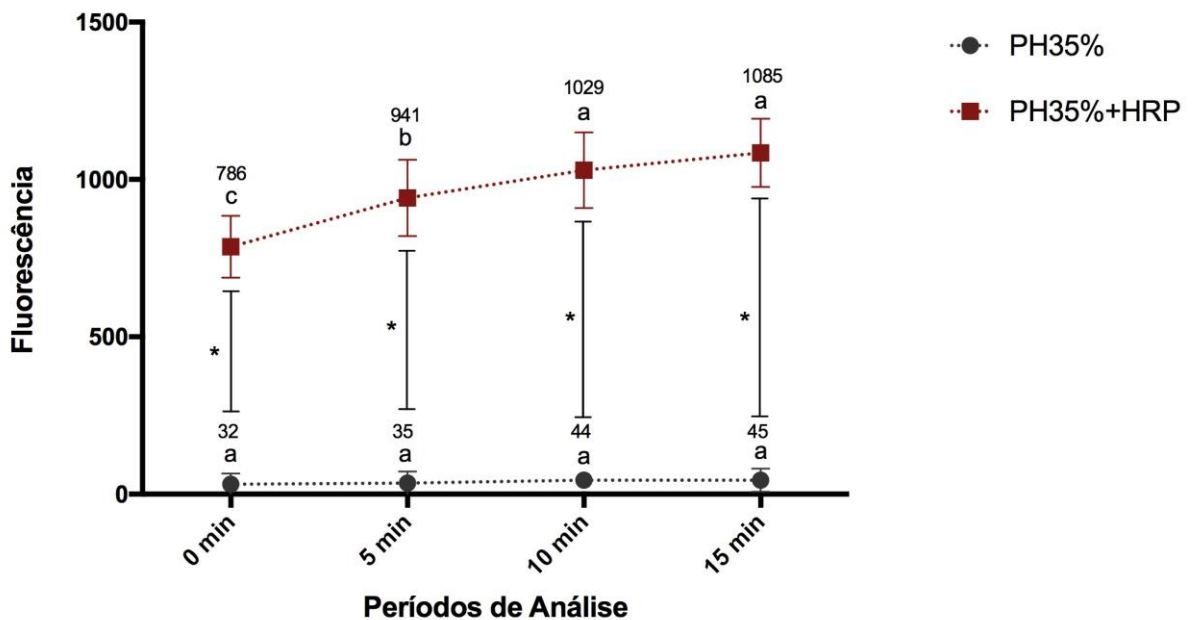


Números representam valores médios da emissão de fluorescência da sonda carboxy-H₂DCFDA normalizada pelo controle negativo em cada período de análise. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Sidak, $p < 0,05$). * demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Com relação à produção de HO^\bullet , foi possível observar que no grupo PH35% não houve alteração na formação deste radical ao longo do tempo. Já no grupo PH35%+HRP, houve um aumento significativo na produção de HO^\bullet ao longo do tempo, até o período de 10 minutos, sendo observada diferença significativa com o grupo PH35% em todos os períodos de análise (Figura 11).

Figura 11 - Cinética de liberação de radical hidroxila ao longo do período de 15 minutos para a solução de H_2O_2 na presença ou ausência de HRP



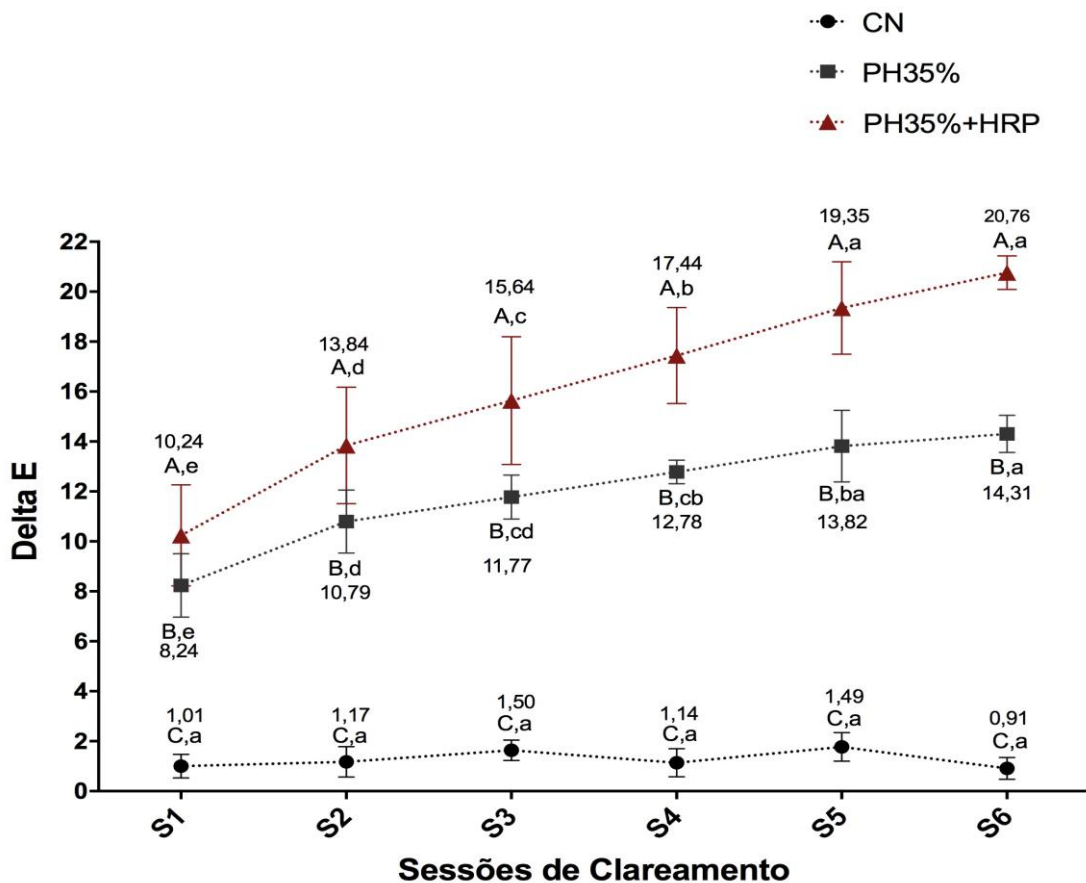
Números representam valores médios do delta de fluorescência da sonda HORAC em relação ao controle negativo em cada período de análise. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Sidak, $p < 0,05$). * demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

5.2 Eficácia Clareadora

Os valores de ΔE aumentaram significativamente para os grupos PH35% e PH35%+HRP em relação a CN, para todos os períodos de análise. Aumento gradual nos valores de ΔE no decorrer das sessões clareadoras (S) foi observado para ambos os grupos clareados. Para o grupo PH35%, aumento significativo no ΔE foi observado a cada duas sessões, enquanto que para o grupo PH35%+HRP, este aumento foi observado entre cada sessão, até a 5ª sessão clareadora (Figura 12).

Figura 12 - Valores de delta E para cada grupo nas diferentes sessões de clareamento (S1 a S6)

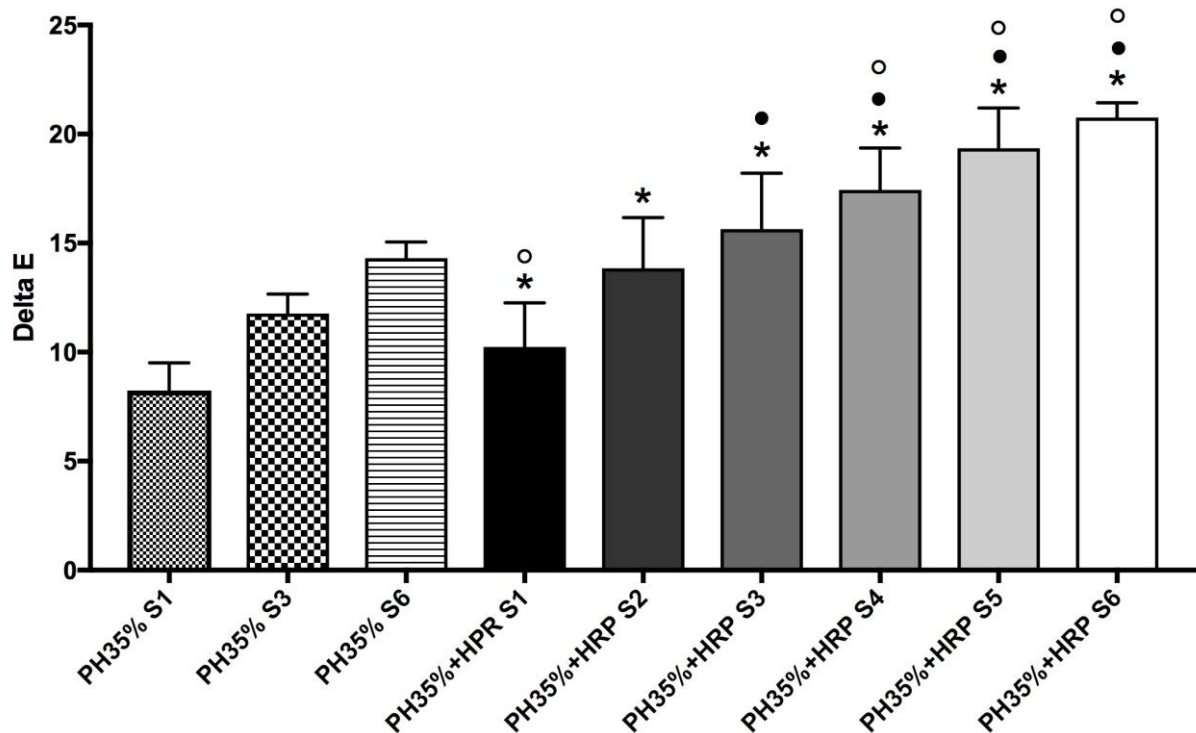


Números são valores médios de delta E em cada sessão clareadora. Letras minúsculas permitem comparações entre as sessões de clareamento para cada grupo (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Sidak). Letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos dentro de cada sessão de clareamento (ANOVA a dois critérios com medidas repetidas; teste de Tukey). Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Para determinação do efeito da HRP sobre a aceleração do procedimento clareador, foi realizada uma comparação estatística dos valores de ΔE de cada sessão do grupo PH35%+HRP com os valores de ΔE do grupo PH35% nas sessões 1^a, 3^a e 6^a (Figura 13). Foi possível observar que o efeito clareador de 1^a e 2^a sessões do gel contendo HRP foi estatisticamente similar ao efeito observado na 3^a e 6^a sessões, respectivamente, do grupo PH35%. A partir da 4^a sessão com o gel contendo HRP, foi observado aumento significativo nos valores de ΔE em comparação com aquele obtido para o grupo PH35% na 6^a sessão.

Figura 13 - Análise estatística dos valores meios de delta E para o grupo PH35% nas sessões S1, S3 ou S6 e para o grupo PH35%+HRP nas sessões S1 a S6 (ANOVA a um critério; teste de Dunnett)



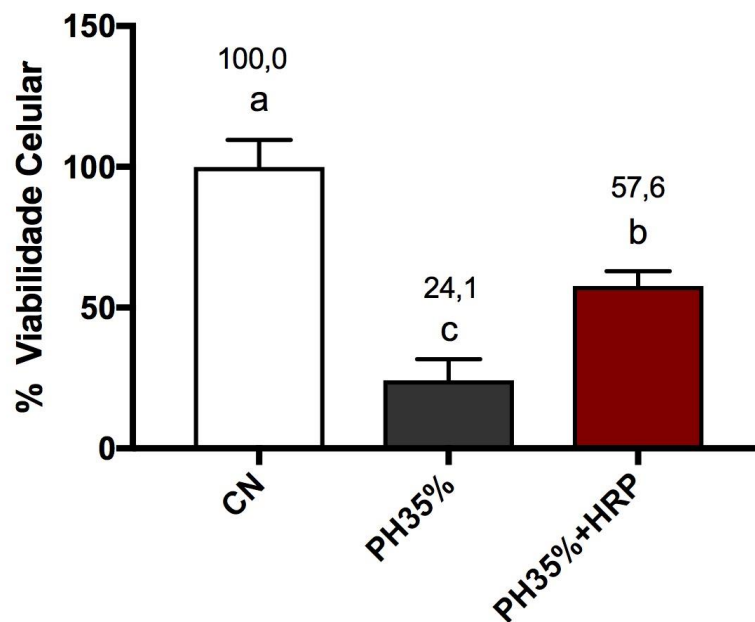
* Demonstra diferença significativa com grupo PH35% em S1; * Demonstra diferença significativa com grupo PH35% em S3; ° Demonstra diferença significativa com grupo PH35% em S6 ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

5.3 Citotoxicidade Trans-amelodentinária

Observou-se redução significativa da viabilidade celular, em torno de 75,9% e 42,4% para os grupos PH35% e PH35%+HRP, respectivamente, em comparação com CN. No entanto, o grupo PH35%+HRP apresentou valores de viabilidade celular significativamente superiores ao grupo PH35% (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da viabilidade celular

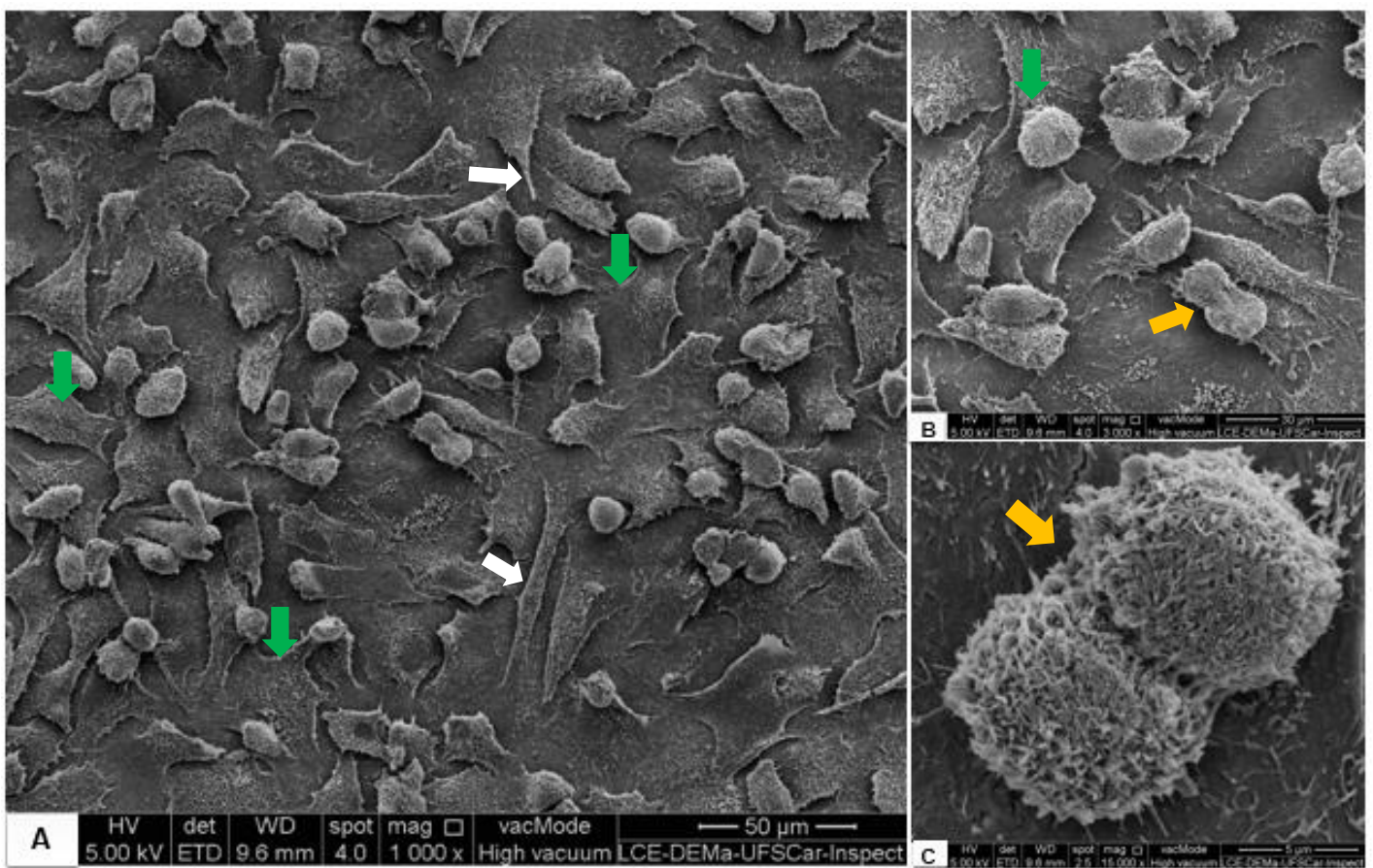


Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a um critério; teste de Tukey. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Os dados da viabilidade celular foram corroborados pelas imagens obtidas em MEV, onde observa-se alteração da morfologia e número de células aderidas ao substrato de vidro nos grupos clareados em relação ao controle negativo, sendo estes efeitos menos intensos no grupo contendo HRP (Figuras 15, 16 e 17).

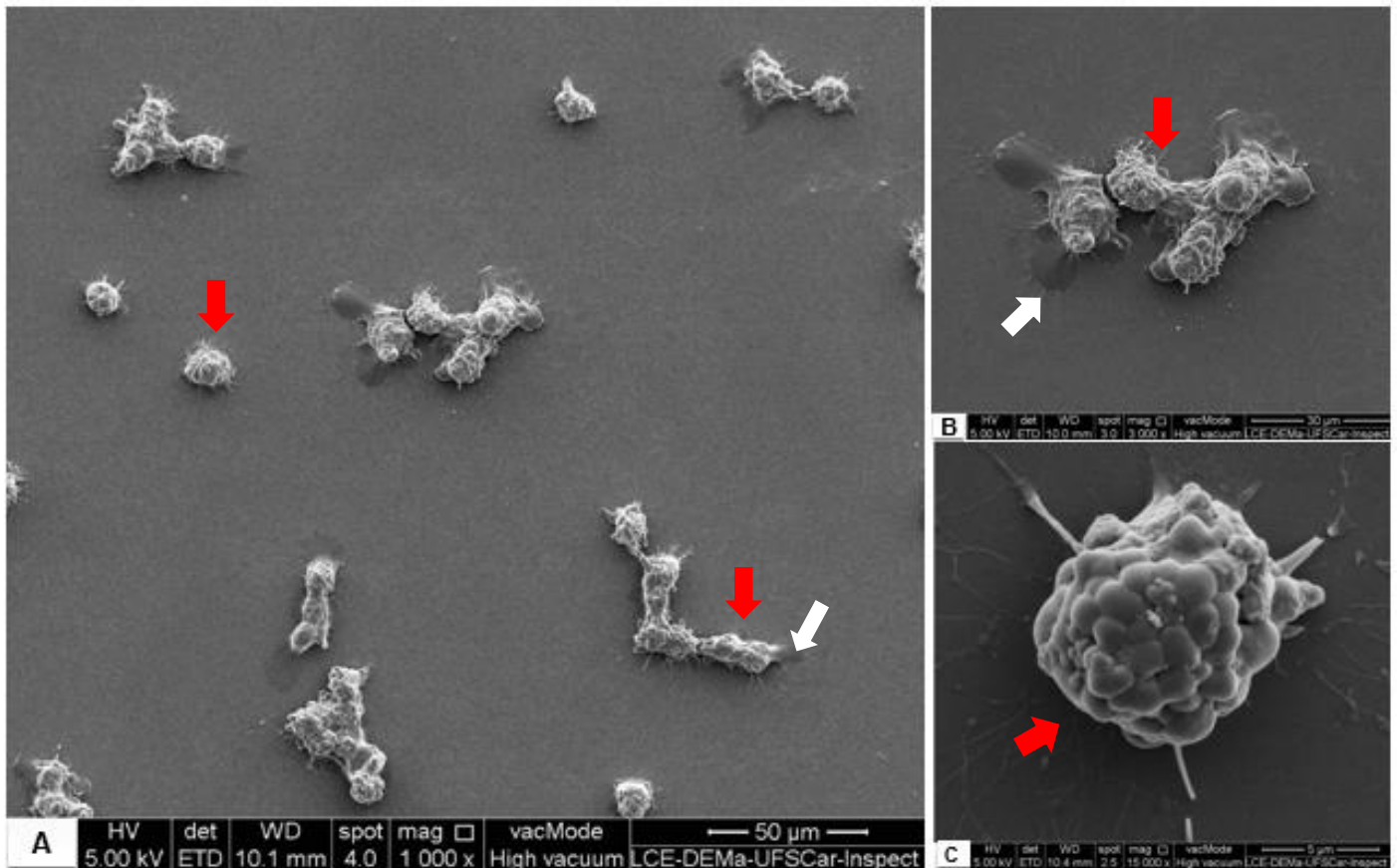
Figura 15- Imagem em MEV representativa do grupo CN (1000x, 3000x e 15000x)



É possível observar um grande número de células MDPC-23 recobrendo a lamínula de vidro em toda a sua extensão. As células apresentam uma morfologia triangular/poligonal (setas verdes), típica deste tipo celular, exibindo prolongamentos citoplasmáticos (setas brancas), recobrendo toda a superfície da lamínula de vidro. Corpos celulares arredondados podem ser visualizados sobre as células aderidas à lamínula, os quais são similares ao processo de mitose (setas amarelas).

Fonte: Elaboração própria

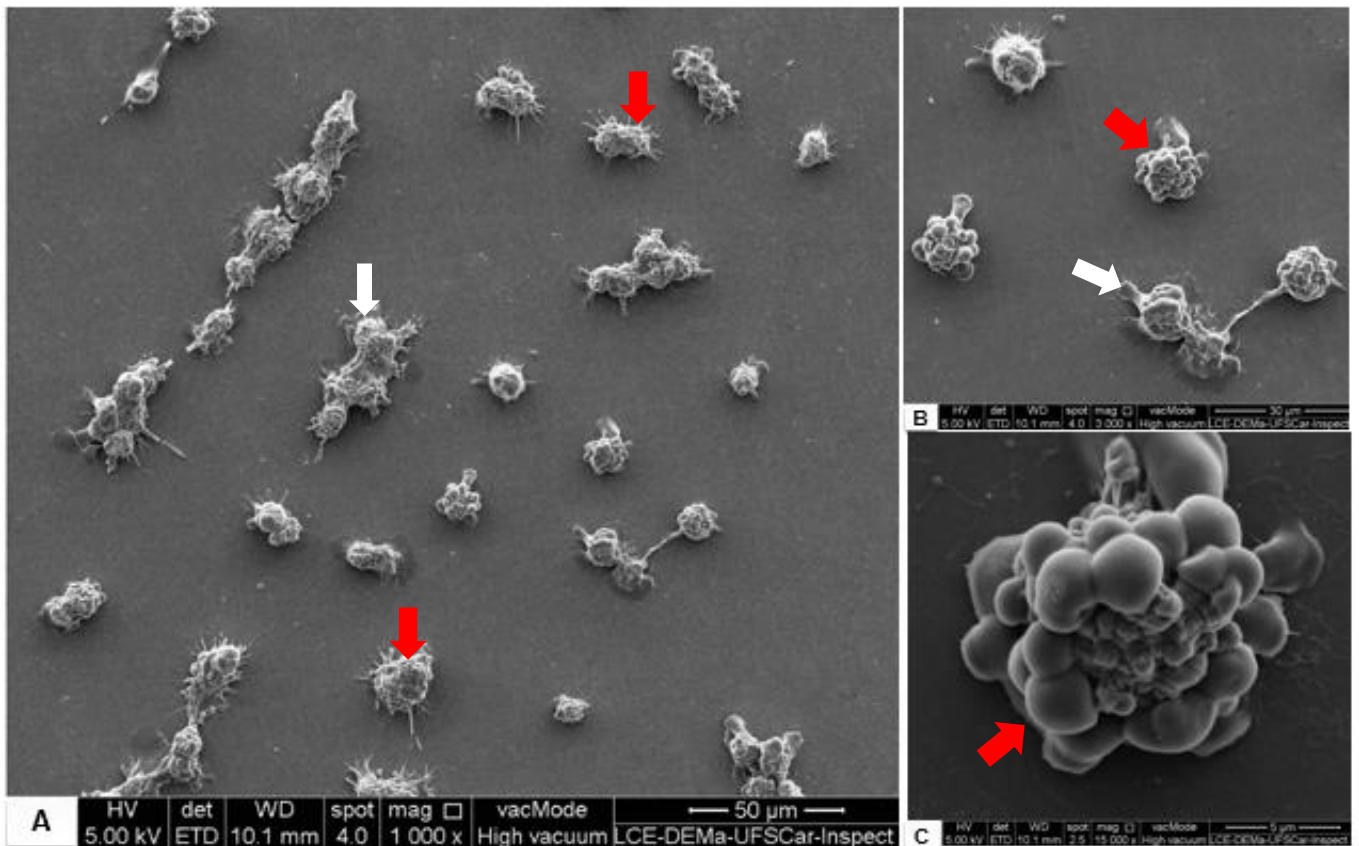
Figura 16 - Imagem representativa do grupo PH35% (1000x, 3000x e 15000x)



Extensa redução no número de células aderidas à lamínula de vidro pode ser observada quando comparado ao CN. Alteração evidente na morfologia celular, onde as mesmas apresentam-se arredondadas e com superfície irregular, similar a corpos apoptóticos (setas vermelhas). Pequenos prolongamentos celulares que mantêm as células remanescentes aderidas ao substrato de vidro podem ser observados (setas brancas)

Fonte: Elaboração própria

Figura 17 - Imagem representativa do grupo PH35%+HRP (1000x, 3000x e 15000x)

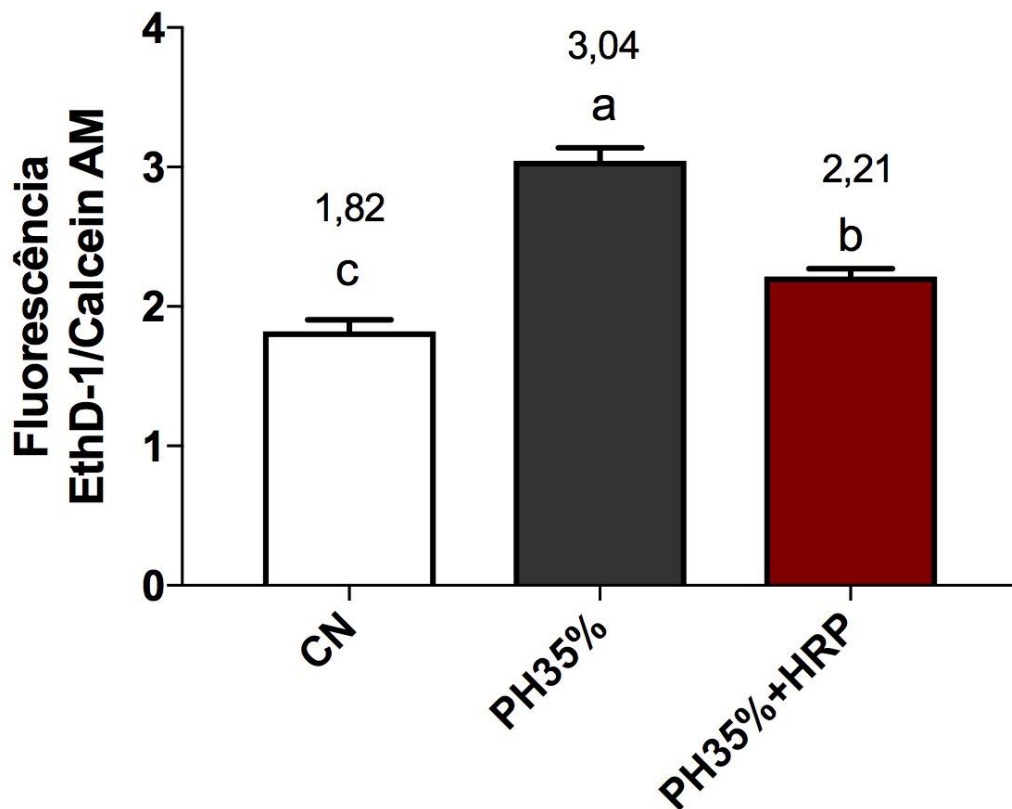


Assim como no grupo tratado com PH35%, foi possível observar uma redução expressiva na quantidade de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro, bem como alterações morfológicas significativas similares a corpos apoptóticos (setas vermelhas) e pequenos prolongamentos citoplasmáticos (setas brancas). No entanto, de uma forma geral o número de células MDPC-23 que permanecem aderido ao substrato de vidro foi visualmente maior no grupo PH35%+HRP em comparação ao grupo PH35%.

Fonte: Elaboração própria

O ensaio de live/dead demonstrou que houve aumento significativo no número de células marcadas positivamente com EthD-1 nos grupos clareados em relação a CN, sendo que este número foi significativamente inferior para o grupo PH35%+HRP em comparação com PH (Figura 18 e 19).

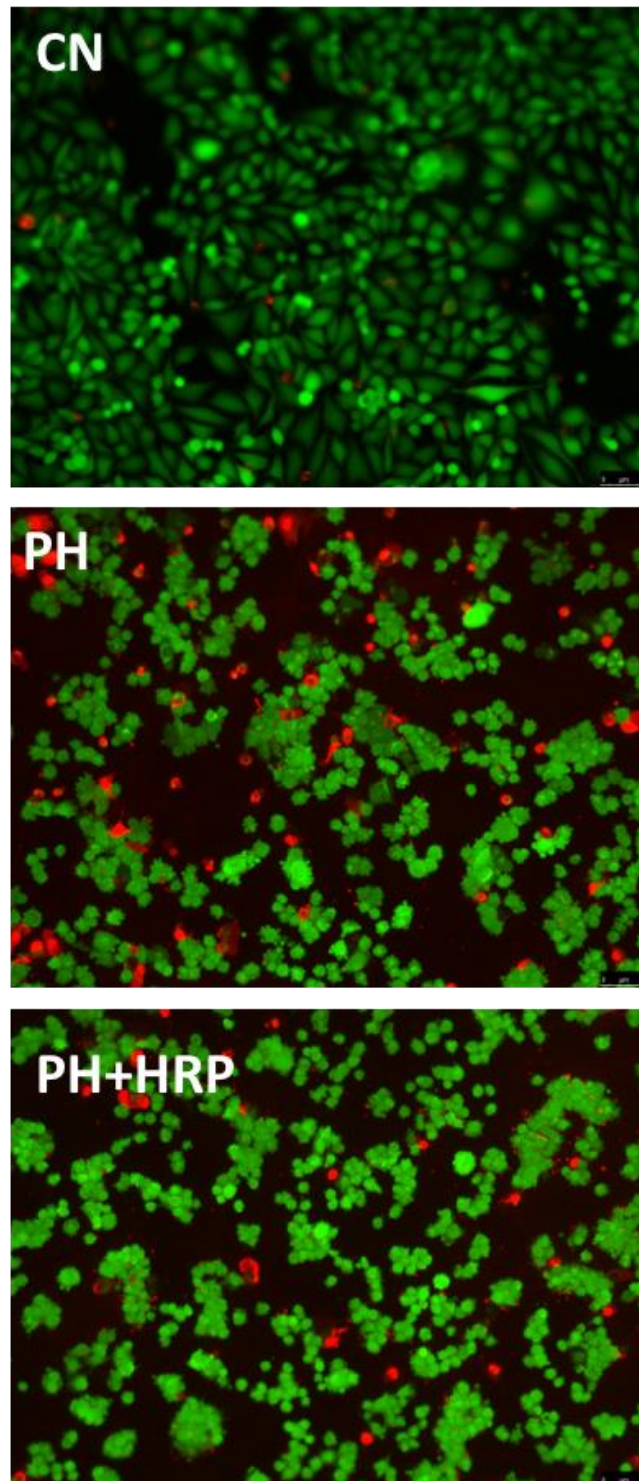
Figura 18 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da emissão de fluorescência relativa para EthD-1



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a um critério; teste de Tukey. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Figura 19- Imagens representativas do ensaio de live/dead para cada grupo

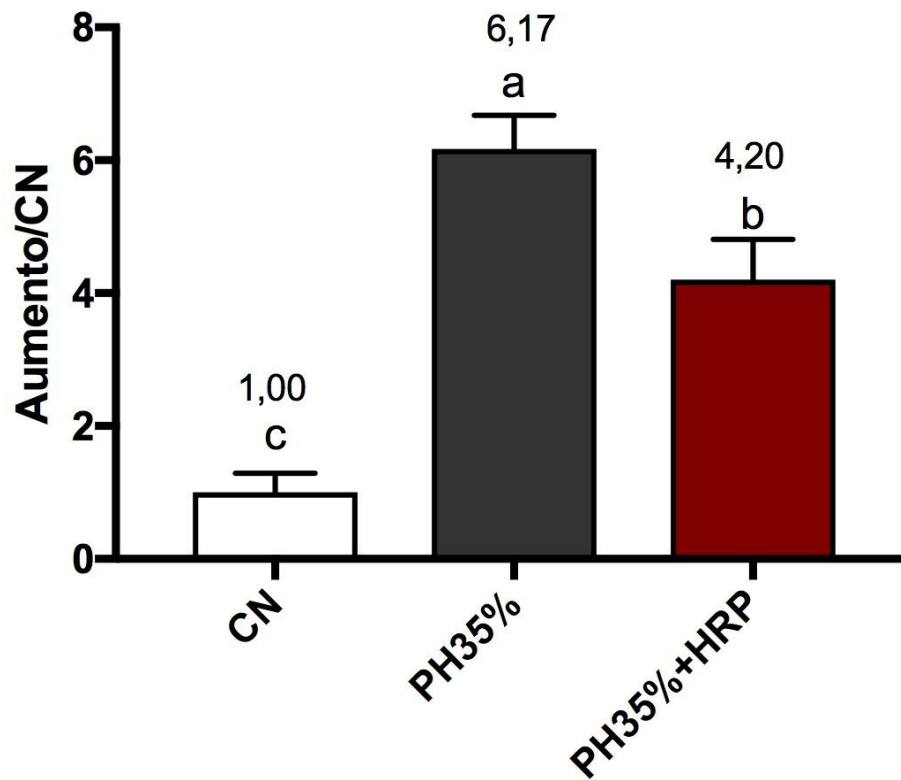


Fluorescência em verde demonstra marcação positiva para Calcein AM e fluorescência em vermelho demonstra marcação positiva para EthD-1 (20x).

Fonte: Elaboração própria

Aumento significativo no estresse oxidativo em relação a CN também foi observado para os grupos clareados, com o grupo PH35%+HRP apresentando os menores valores (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da emissão de fluorescência normalizada pelo controle negativo (CN) da sonda carboxy-H₂DCFDA



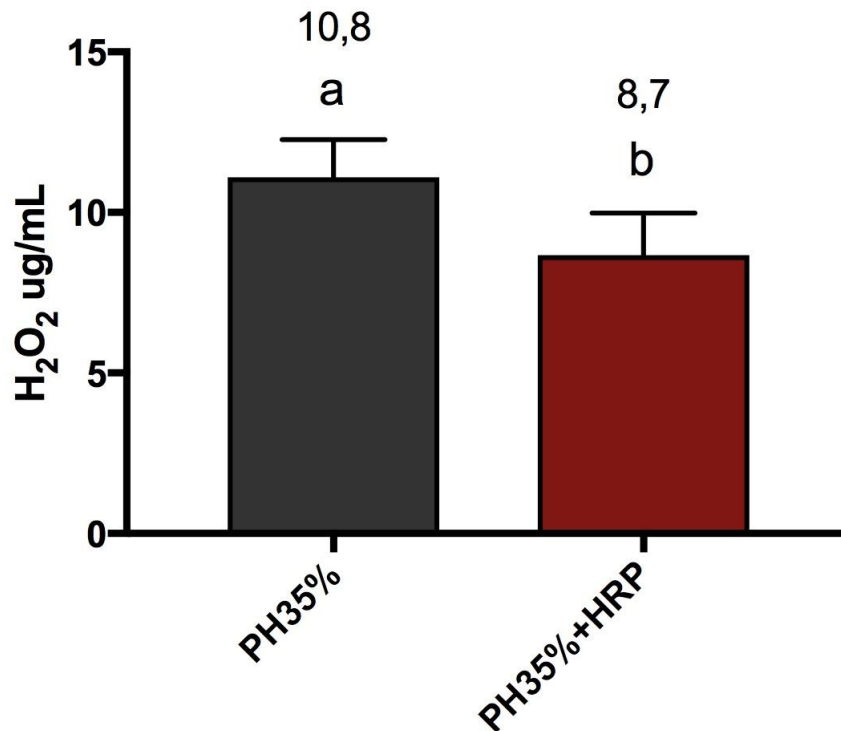
Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a um critério; teste de Tukey. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

5.4 Difusão de Subprodutos do Gel Clareador

Houve redução significativa na difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 e de radicais livres (sonda carboxy- H_2DCFDA) na presença de HRP (Figuras 21 e 22). Foi detectado ainda que o HO^\bullet foi capaz de se difundir pelos discos de esmalte/dentina, sendo valores numericamente superiores observados no grupo PH35%+HRP em comparação com o grupo PH35%; porém, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (Figura 23).

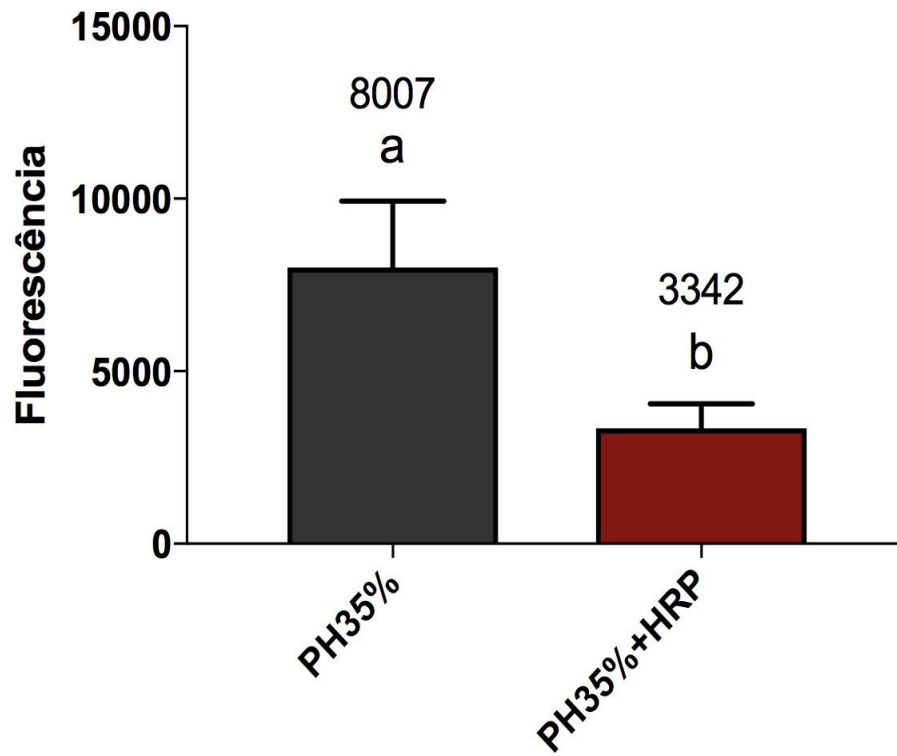
Figura 21 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da concentração de H_2O_2 nos extratos



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (teste t'Student. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

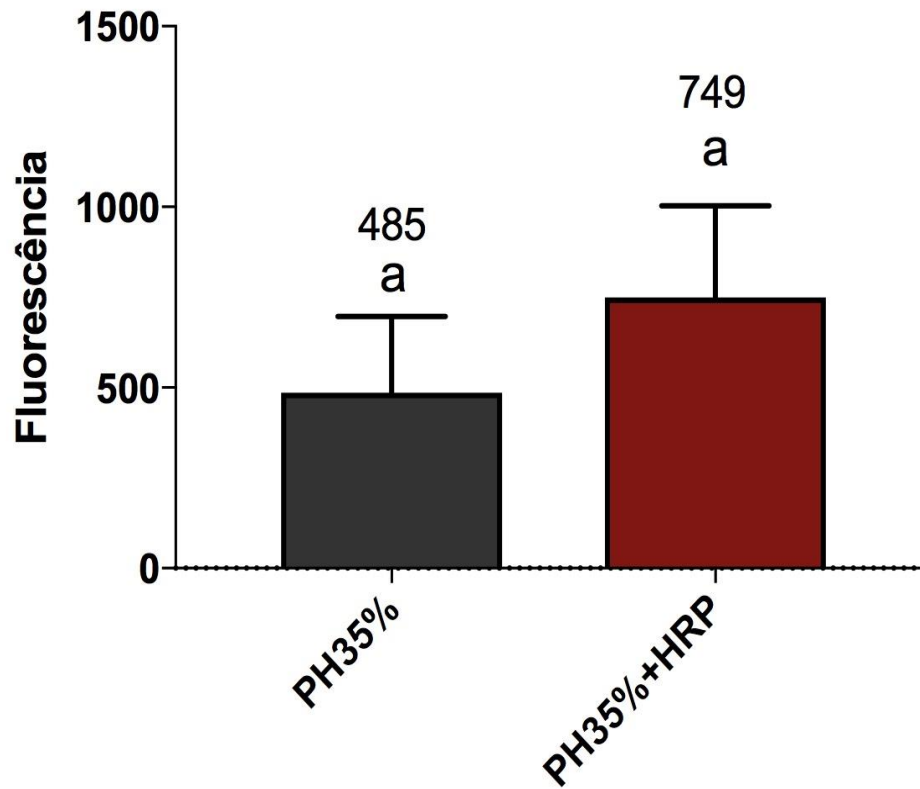
Figura 22 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da emissão de fluorescência normalizada pelo controle negativo (CN) da sonda carboxy-H₂DCFDA para mensuração de radicais livres



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (teste t'Student. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

Figura 23 - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão do delta de fluorescência da sonda HORAC para mensuração do radical HO* em relação ao controle negativo (CN)



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (teste t'Student. $p < 0,05$).

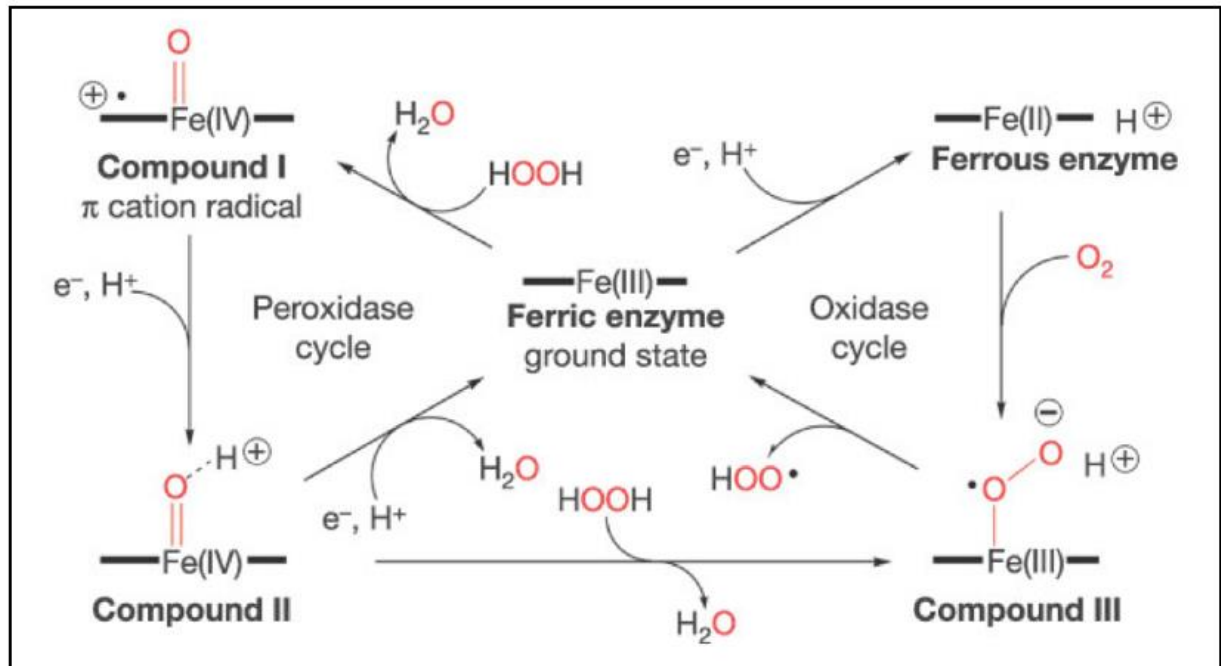
Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A redução na difusão de H_2O_2 pela estrutura dental é considerada como ponto chave para a obtenção de protocolos de clareamento biocompatíveis com o complexo dentino-pulpar, especialmente em dentes com pequena espessura de esmalte e dentina, como os incisivos inferiores, os quais são os mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do clareamento dental (Costa et al.²⁰, 2010, de Souza Costa et al.²⁶, 2014). Com o objetivo de aumentar a reatividade do gel clareador com a estrutura dental e minimizar a difusão de componentes tóxicos até o tecido pulpar, no presente estudo foi proposta a incorporação da enzima hoserhardish peroxidase (HRP) a um gel comercial com 35% de H_2O_2 .

Os ensaios de cinética de degradação do gel clareador contendo HRP demonstraram claramente que ocorre uma aceleração da taxa de decomposição do H_2O_2 na presença desta enzima, bem como há intenso aumento na formação de radicais livres. Este efeito pode estar associado ao ciclo catalítico mediado pela HRP na presença de H_2O_2 que resulta na formação de diversos intermediários com elétrons desemparelhados na camada externa (Berglund et al.², 2002; Veitch et al.⁷⁵, 2004), os quais apresentam elevado efeito oxidante, conforme demonstrado na Figura 24.

Figura 24 - Processo de decomposição do H₂O₂ mediado pela enzima peroxidase



A HRP apresenta um centro metálico férrico [Fe(III)] no estado fundamental. Quando o H₂O₂ reage com este centro férrico, um dos átomos de oxigênio (O) é transferido ao centro metálico, havendo liberação de uma molécula de água (H₂O), gerando um centro reativo com radical catiônico (+), denominado de composto I [Fe(IV)=O•]. A reação do composto I com uma molécula de hidrogênio (H⁺), a qual pode ser proveniente da quebra do H₂O₂, resulta na formação com composto II, uma espécie oxiferril [Fe(IV)=OH⁺]. Ambos compostos I e II apresentam elevado potencial oxidante. A adição de mais uma molécula H⁺ ao composto II leva ao reestabelecimento do centro metálico Fe(III) no estado fundamental, com liberação de uma molécula de H₂O. No entanto, na presença de H₂O₂, o composto II pode tornar-se um radical livre denominado composto III, onde o centro metálico retorna ao estado Fe(III), porém apresenta um radical di-oxigênio [(•O-O-Fe(III))], o qual e também apresenta atividade oxidante. O composto III pode retornar ao estado férrico pela reação com um H⁺, havendo liberação de radical perhidroxila HO₂•. Alternativamente, o centro férrico pode reagir com um H⁺, tornando-se um centro ferroso [Fe(II)], o qual pode reagir com oxigênio (O₂) havendo formação do composto III, que encerra o ciclo reagindo com um H⁺ para retornar ao estado férrico com liberação de um radical HO₂•.

Fonte: Berglund et al.² (2002)

Segundo Travassos et al.⁷³ (2010), a peroxidase promove a degradação do H₂O₂ e formação de HO• a partir da seguinte reação: $2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{HO}^\bullet$ (Travassos et al.⁷³, 2010). Esta espécie é extremamente reativa, desde que a mesma

apresenta potencial oxidativo cerca de 1,6 vezes superior ao H_2O_2 (Suty et al.⁶⁸,2004). Foi demonstrado aumento em 42,1% na eficácia clareadora (ΔE) de um gel com 35% de H_2O_2 , após uma sessão de 3x10 minutos, quando foi realizada incorporação de um extrato rico em peroxidase no produto (Travassos et al.⁷³,2010). Gopinath et al.³⁴ (2013) avaliaram a alteração de cor dental proporcionada por géis contendo 35% e 10% de H_2O_2 , com ou sem adição de extrato rico em catalase e peroxidase ao gel. A maior alteração de cor foi observada nos grupos que receberam a aplicação de gel contendo catalase/peroxidase, independente da concentração de H_2O_2 . Nestes estudos, os autores especularam que o efeito positivo da peroxidase sobre a eficácia clareadora foi resultante da elevação na quantidade de HO^\bullet liberado.

No presente estudo, foi observado aumento intenso na formação de HO^\bullet na solução de H_2O_2 em contato com HRP, comprovando que a interação da enzima com H_2O_2 resulta na formação desta molécula reativa. Este efeito foi correlacionado com o significativo aumento na efetividade clareadora observado no grupo PH35%+HRP em comparação com o grupo PH35%, corroborando os dados presentes na literatura (Travassos et al.⁷³, 2010; Gopinath et al.³⁴, 2013). Foi constatado que o gel tradicional com 35% de H_2O_2 promoveu alteração de cor ocorreu após a primeira sessão; no entanto, alteração de cor significativa ao longo do tempo apenas a cada duas sessões clareadoras para este produto. Por outro lado, houve aumento significativo nos valores de ΔE entre todas as sessões, até a 5ª sessão de clareamento para o gel contendo HRP. Comparando-se cada sessão de clareamento entre os géis com ou sem HRP, pudemos observar aumento na eficácia clareadora na presença de HRP em torno de 24,3%, 28,3%, 32,9%, 36,5%, 40,0% e 29,7% da 1ª para a 6ª sessão, respectivamente. De acordo com a análise estatística empregada, uma única sessão clareadora na presença de HRP promoveu alteração de cor similar aquela obtida após três sessões com o gel tradicional. Após duas sessões com o gel contendo HRP, observou-se o mesmo grau de clareamento causado pelo gel tradicional após seis sessões. Ainda, a partir da 4ª sessão clareadora com o gel contendo HRP, observou-se aumento significativo nos valores de ΔE em relação ao gel tradicional na 6ª sessão. Assim, o gel com HRP conseguiu promover clareamento

da estrutura dental acima do patamar obtido com o gel tradicional, demonstrando o importante potencial oxidativo do produto na presença desta enzima.

No presente estudo, associado ao efeito positivo com relação a eficácia clareadora, observou-se também redução na difusão de H_2O_2 pela estrutura dental quando o agente clareador foi ativado com HRP. Outros pesquisadores também constataram que quando um ativador químico capaz de acelerar a taxa de decomposição do H_2O_2 em radicais livres é adicionado a agentes clareadores, a difusão do H_2O_2 pela estrutura dental é significativamente reduzida comparado ao mesmo gel sem ativador (Torres et al.⁷², 2013). Assim, acredita-se que essas substâncias reajam com o H_2O_2 ou atuem em sua reação de decomposição, acelerando a formação de radicais livres, o que torna o processo de clareamento mais rápido e eficiente, minimizando a difusão de H_2O_2 residual pela estrutura dental (Duque et al.²⁸, 2014). No presente estudo, também foi demonstrado que apesar de uma maior quantidade de radicais livres terem sido formados no gel clareador contendo HRP, menor quantidade foi capaz de se difundir pela estrutura dental em comparação com o gel tradicional. Devido a elevada reatividade, estas espécies são consideradas como transientes e com tempo de meia-vida extremamente curto (Bveris et al.¹⁰, 1998). Assim, pode-se supor que estas espécies se formaram na superfície dental, porém não houve tempo suficiente para que os mesmos se difundissem por toda espessura dos discos de esmalte/dentina sem que houvesse reação com os cromóforos locais.

Com relação a análise dos efeitos biológicos, também foi possível constatar que a HRP minimizou o efeito tóxico mediado pelo procedimento clareador tradicional. O estresse oxidativo foi reduzido em cerca de 32% nas células MDPC-23 expostas aos extratos associados à HRP em comparação ao grupo PH35%, resultando em valor de viabilidade celular em torno de 139% superior. Vale salientar que no presente estudo foram empregados discos de esmalte/dentina com 2,3 mm de espessura, simulando incisivos inferiores humanos. Esta condição metodológica foi empelada para que fosse possível avaliar uma condição crítica in vivo, desde que estes dentes são os mais susceptíveis aos efeitos adversos dos agentes clareadores dentais (de Souza Costa et al.²⁶, 2010; Roderjan et al.⁵⁰, 2014; Roderjan et al.⁵¹, 2015). De Oliveira Duque et al.²⁵ (2017) demonstraram que os extratos obtidos com o gel com 35% de H_2O_2 aplicado sobre os discos com 4,0 mm de espessura, simulando pré-molares

humanos, foram cerca de 55,6% menos citotóxicos sobre as células pulpares humanas do que os extratos obtidos a partir da aplicação do mesmo produto em discos com 2,3 mm de espessura. No entanto, é importante ressaltar que o gel com 35% de H₂O₂, associado ou não aos ativadores químicos, promoveram efeitos tóxicos significativos sobre as células odontoblastóides em cultura, mediados por um estresse oxidativo seguido de lesão à membrana celular. O estabelecimento de resposta inflamatória aguda, como consequência deste processo, tem sido demonstrado em estudos prévios (de Souza Costa et al.²⁶, 2010; Cintra et al.¹⁷, 2013; Roderjan et al.⁵⁰, 2014), associado à elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias (Soares et al.⁶⁰, 2015; Soares et al.⁶², 2016), ativação de proteases teciduais (Sato et al.⁵⁴, 2010) e necrose tecidual localizada (Costa et al.²⁰, 2010; Cintra et al.¹⁷, 2013; Roderjan et al.⁵⁰, 2014). Na presente pesquisa, a linhagem MDPC-23 foi selecionada devido ao fato da mesma apresentar fenótipo similar aos odontoblastos, os quais são as primeiras células a entrarem em contato com os componentes de géis clareadores capazes de se difundir pela estrutura de esmalte/dentina (de Souza Costa et al.²⁶, 2014). No entanto, estudos prévios demonstram que estas células são mais resistentes aos efeitos tóxicos dos géis clareadores do que culturas de células pulpares obtidas de seres humanos (Soares et al.⁵⁹, 2014; Duque et al.²⁸, 2014). Desta forma, apesar dos resultados do presente estudo serem animadores, devemos considerar que a terapia com géis contendo elevadas concentrações de H₂O₂ e aplicados por períodos de 45 minutos sobre a superfície dental, representa risco de toxicidade para as células pulpares, independente da sua associação com ativadores químicos. Assim, foi demonstrado no presente estudo que a reatividade do H₂O₂ aumenta na presença de HRP. Contudo, novos experimentos devem ser realizados para determinar a proporção ideal de H₂O₂/HRP presente num gel clareador, para que a adição este produto seja extremamente eficaz e que não cause danos à pulpa ou alteração à estrutura do esmalte e dentina.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada no presente estudo, pode-se concluir que a adição da enzima horseradish peroxidase como agente catalisador em géis clareadores com 35% de H_2O_2 acelera e otimiza o efeito clareador do produto. Isto ocorre devido ao aumento da taxa de degradação do H_2O_2 em radicais livres, o que minimiza a difusão de H_2O_2 residual pela estrutura dental, reduzindo o efeito tóxico sobre células pulpares em cultura.

REFERÊNCIAS*

1. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37(2): 120-4.
2. Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szöke H, Henriksen A, Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature.* 2002; 417(6887): 463-8.
3. Bishop DF. Hydrogen peroxide catalytic oxidation of refractory organics in municipal wastewaters. *Ind Eng Chem Proc Des Dev.* 1968; 7(1): 110–7.
4. Bitter NC. A scanning electron microscope study of the long-term effect of bleaching agents on the enamel surface in vivo. *Gen Den.* 1998; 46(1): 84-8.
5. Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent.* 2013; 41(4): 363-9.
6. Bonafé E, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Effectiveness of a desensitizing agent before in-office tooth bleaching in restored teeth. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(3): 839-45.
7. Bortolatto JF, Pretel H, Floros MC, Luizzi AC, Dantas AA, Fernandez E, et al. Low concentration H₂O₂/TiON in office bleaching a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2014; 93(7 Suppl): 66S-71S.
8. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa CA. Tooth whitening: complications from the use of peroxides. Switzerland: Springer; 2016. p. 45-79.
9. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser: a systematic review. *Dent Mater.* 2007; 23(5): 586–96.
10. Bveris A. Biochemistry of radicals: from electron to tissues. *Medicine.* 1998; 58(4): 350-6.
11. Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33(9): 1074-7.
12. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract.* 2014; (14Supl): 70-6.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

13. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod*. 2008; 34(12): 1462-5.
14. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(2): 93-104.
15. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent*. 1993; 69(1): 46-8.
16. Christesenn GJ. Are snow-white teeth really so desirable?. *J Am Dent Assoc*. 2005; 136(7): 933-5.
17. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod*. 2013; 39(12): 1576-80.
18. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010; 38(9): 687-97.
19. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014; 40(4Suppl): S46-51.
20. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): e59-64.
21. de Almeida LC, de Souza Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam*. 2012; 25(1): 3-8.
22. de Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari Mde O, de Souza Costa CA, Santos PH, et al. At-home bleaching: color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Braz Dent J*. 2015; 26(4): 378-83.
23. da Costa JB, McPharlin R, Paravina RD, Ferracane JL. Comparison of at-home and in-office tooth whitening using a novel shade guide. *Oper Dent*. 2010; 35(4): 381-8.
24. de Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, et al. In-office bleaching with a two-and seven-day intervals between clinical sessions: a randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent*. 2015; 43(4): 424-9.
25. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Invest*. 2017 Jan 14. [Epub ahead of print].

26. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
27. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, 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(3): 458-64.
28. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(6): 1631-7.
29. Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent.* 2012; 40(2): e25-33.
30. Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tuncbilek M, Ertan R Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000; 26(2): 92-4.
31. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004; 30(12): 887-9.
32. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005; 38(8): 516-20.
33. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undersirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig.* 2010; 14(1): 1-10.
34. Gopinath S, James V, Vidhya S, Karthikeyan K, Kavitha S, Mahalaxmi S. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent.* 2013; 16(1): 45-9.
35. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72(5): 931-8.
36. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2012; 40(8): 644-53.
37. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43(7): 572-80.
38. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent.* 2011; 36(3): 251-7.

39. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39(2): 236-41.
40. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74(5): 835-40.
41. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, et al. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent.* 2015; 40(1): 72-9.
42. Martin J, Fernandez E, Bahamondes V, Werner A, Elphick K, Oliveira OB Jr, et al. Dentin hypersensitivity after teeth bleaching with in-office systems: randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2013; 26(1): 10-4.
43. Martin J, Vildosola P, Bersezio C, Herrera A, Bortolatto J, Saad JRC, et al. Effectiveness of 6% hydrogen peroxide concentration for tooth bleaching: a double-blind, randomized clinical trial. *J Dent.* 2015; 43(8): 965-72.
44. Moncada G, Sepúlveda D, Elphick D, Contente M, Estay J, Bahamondes V, et al. Effects of light activation, agent concentration and tooth thickness on dental sensitivity after bleaching. *Oper Dent.* 2013; 38(5): 467-76.
45. Özcan M, Abdin S, Sipahi C. Bleaching induced tooth sensitivity: do the existing enamel craze lines increase sensitivity? a clinical study. *Odontology.* 2014; 102(2): 197-202.
46. Perdigão J. Dental whitening – revisiting the myths. *Northwest Dent.* 2010; 89(6):19–21, 23–6.
47. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light activated bleaching. *Oper Dent.* 2011; 36(1): 12-7.
48. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent.* 2011; 36(6): 590-6.
49. Reis A, Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2013; 38(4): 386-93.
50. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B.* 2014; (4): 178-85.
51. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.

52. Rodrigues LM, Vansan LP, Pécora JD, Marchesan MA. Rodrigues LM1, Vansan LP, Pécora JD, Marchesan MA. Permeability of different groups of maxillary teeth after 38% hydrogen peroxide internal bleaching. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 303-6.
53. Santana MA, Nahsan FP, Oliveira AH, Loguécio AD, Faria-e-Silva AL. Randomized controlled trial of sealed in-office bleaching effectiveness. *Braz Dent J.* 2014; 25(3):207-11.
54. Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, et al. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res.* 2013; 92(2): 187-92.
55. Schrank SG, José HJ, Moreira RF, Schröder HF. Applicability of Fenton and H₂O₂/UV reactions in the treatment of tannery wastewaters. *Chemosphere.* 2005; 60(5): 644-55.
56. Simões RC, Soares D, de Souza Costa CA, Santos PD, Cintra L, Briso A. Effect of diferente light sources and enamel preconditioning on color change, H₂O₂ penetration, and cytotoxicity in bleached teeth. *Oper Dent.* 2015; 41(1): 83–92.
57. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J.* 2011; 44(2): 116-25.
58. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(8): 1901-9.
59. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42(2): 185-98.
60. Soares DG, Sacono NT, Ribeiro AP, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, et al. Responses of dental pulp cells to a less invasive bleaching technique applied to adhesive-restored teeth. *J Adhes Dent.* 2015; 17(2): 155-61.
61. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(5): 1013-20.
62. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent.* 2015; 43(6): 750-6.
63. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(9): 1428-36.

64. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human pulpal responses to peroxides. In: Perdigão J. Tooth whitening: an evidence-based perspective. Berlin: Springer; 2016. p. 81-97.
65. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2016; 49(1): 26-36.
66. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent*. 2004; 32(4): 295-9.
67. Sun B, Guan X, Fang J, Tratnyek PG. Activation of manganese oxidation with bisulfite for enhanced oxidation of organic contaminants: the involvement of Mn(III). *Environ Sci Technol*. 2015; 49(20):12414-21.
68. Suty H, De Traversay C, Cost M. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol*. 2004; 49(4): 227-33.
69. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, et al. Light augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(2): 167-75.
70. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2012; 25(4): 199-204.
71. Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy--in vitro study. *J Dent*. 2010; 38(10): 838-46.
72. Torres CR, Souza CS, Borges AB, Huhtala MF, Caneppele TM. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 193241.
73. Travassos AC, Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010; 35(3): 287-94.
74. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 661-5.
75. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004; 65(3): 249-59.
76. Vildosola P, Vera F, Ramirez J, Rencoret J, Pretel H, Oliveira OB, Jr., et al. Comparison of effectiveness and sensitivity using two in-office bleaching protocols for a 6% hydrogen peroxide gel in a randomized clinical trial. *Oper Dent*. 2017; 42(3): 244-52.

77. Williams HA, Rueggeberg FA, Meister LW Bleaching the natural dentition to match the color of existing restorations: case reports. *Quintessence Int.* 1992; 23(10): 673–7.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 07 de agosto de 2017.

Uxua Ortecho Zuta