

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/01/2018.



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; Cecarini 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 .

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, Müjdecı A, Algn E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004; 30(12): 887-9.
32. Gökay O, Müjdecı A, Algn 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.