

Letícia Cunha Amaral Gonzaga de Almeida

Avaliação da alteração de cor, difusão de
peróxido de hidrogênio e citotoxicidade trans-
amelodentinária causadas por diferentes
técnicas de clareamento dental

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do Câmpus de Araçatuba –
Unesp, para a obtenção do Grau de “Doutor
em Odontologia” - Área de Concentração
Dentística.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso

ARAÇATUBA – SP

2013

Dedicatória

Dedicatória

À **Deus**, que abriu as portas para eu ir mais longe do que poderia imaginar, que me sustenta, me guia e mais do que tudo que eu possa conquistar, a única coisa que me importa é alegrar seu coração.

Ao meu marido **João Paulo (Branco)**, amor da minha vida, meu incentivador, minha alegria, se não fosse seu apoio e sua compreensão, com certeza não teria como realizar mais essa conquista.

Ao meu pequenininho, meu filho **Pedro**, que está comigo há tão pouco tempo e já amo infinito.

Aos meus pais **Lívia e Ney**, que não pouparam nenhum esforço para me ver crescer, que me deram a maior herança que alguém pode receber e ninguém pode roubar: o estudo. Que sempre me apoiaram em tudo, cada conquista minha é de vocês que são meu alicerce.

À minha irmã **Camila**, minha companheira que amo tanto.

Amo muito vocês, sem vocês nada disso teria sentido. Muito obrigado por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida!

Agradecimentos

Especiais

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **André Luiz Fraga Briso**, obrigada por todos esses anos de convívio, pelo aprendizado, pela atenção e compreensão. Obrigada pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, pela oportunidade de tê-lo mais uma vez me orientando e por mais essa etapa da minha formação profissional concluída.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto de Souza Costa** que me recebeu no seu laboratório na Faculdade de Odontologia de Araraquara e me ofereceu tudo que foi necessário para a realização da parte de citotoxicidade desta pesquisa. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pelo privilégio de aprender um pouco de uma metodologia nova com alguém tão experiente no assunto.

Agradecimientos

Agradecimentos

A **Deus** pela sua bondade, amor incondicional, por ser a força e motivação que movem minha vida, o princípio do meu caráter e por me presentear com tantas conquistas e pessoas queridas.

Ao **Branco**, meu amigo, companheiro, cada dia ao seu lado é especial. Quanto mais eu te conheço e convivo com você, mais eu te admiro e tenho a certeza de que quero passar toda minha vida ao seu lado. Obrigada por me apoiar durante toda essa fase de pós-graduação me sustentando em todos os sentidos, sempre com amor e compreensão. Obrigada por me acalmar e “levantar” nos momentos difíceis e construir comigo uma família linda. Te amo muito!

Ao meu presentinho, **Pedro**, que tão pequeno me ensinou o que é amor incondicional. Um bebezinho que tirava minhas noites de sono e dava tanto trabalho e eu me pegava olhando para você dormindo e pensava como eu posso amar tanto.... eu entendi que da mesma forma, não precisamos fazer nada para Deus nos amar, ele simplesmente nos ama, é incondicional! Obrigada por me tornar uma pessoa melhor, menos egoísta, mais simples. Obrigada por mudar minha vida e trazer muito mais alegria e sentido a ela. Meu amor cresce com você.

À minha **mãe Lívia**, você é um exemplo para mim, de dedicação, de uma mulher guerreira, sábia, virtuosa e vitoriosa. Agora posso entender um pouco mais de tudo que você passou comigo, nos momentos difíceis quando eu era bebê. Obrigada por abrir mão muitas vezes dos seus sonhos em favor dos meus, e por fazer dos meus sonhos os seus. Obrigada por me incentivar, instruir, a ser sempre meu porto seguro e por me ajudar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu **pai Ney**, como você é especial!! Agradeço a Deus por ter me dado você como pai, eu tenho MUITO orgulho de ser sua filha. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, carinho, por ser esse exemplo de honestidade e homem segundo o coração de Deus. Obrigada por não medir esforços para me ver feliz e por ser meu alicerce.

À minha irmã **Camila**, por todos os momentos e alegrias compartilhados, por me apoiar e por ser minha companheira.

Aos meus **avós Dormeval e Julieta** que são um exemplo para mim, de vida, de caráter, de fé, de perseverança e de família. Sei que vocês vibram com cada vitória minha e essa conquista também é de vocês, os amo muito e não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês representam para mim.

À minha **família**, que mesmo longe, estão sempre presente, são os responsáveis pelo que sou hoje, pela minha formação pessoal. Sem vocês com certeza eu não teria chegado até aqui. Obrigada por tudo.

À **família do Branco**, que hoje é minha família também. Obrigada por me receberem de braços abertos e me ajudarem e apoiarem sempre que precisei.

Aos meus **amigos** de Araçatuba, em especial Natália e Henrique, Camila e Cadu, Joyce; obrigada por serem minha família aqui, obrigada por todos os momentos de descontração e alegria, e obrigada pelo apoio nas horas difíceis. Amo vocês, presentes para mim. Amigos são a família que escolhemos.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, na pessoa do Sr Reitor Júlio Cesar Durigan.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa de sua Diretora, Prof. Dra. Ana Maria Pires Soubhia e vice-diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi pelos anos de aprendizado nesta unidade.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa da sua Coordenadora Profa. Maria José, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado em Odontologia.

Ao do **Departamento de Odontologia Restauradora** na pessoa do seu chefe André Luiz Fraga Briso.

À **CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo período de bolsa de Demanda Social concedida.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora: **Peterson, Cláudia, Rosa, Nelci, Neusa e Grazi**, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo carinho e por deixarem o departamento mais alegre e agradável para trabalhar.

Ao **Prof. Renato H. Sundfeld**, pelos conselhos e ensinamentos. É inspirador ver sua paixão pelo ensino, se todos os professores do Brasil tivessem esse mesmo amor, a educação e o nosso país seriam bem melhores.

Ao **Prof. Paulo H. dos Santos**, pelos ensinamentos e seu incentivo desde a iniciação científica que aumentaram meu interesse pela pesquisa. Obrigada pelos conselhos, pela colaboração em todos os meus trabalhos e pela disposição em ajudar sempre. Sem seu apoio eu teria desistido no caminho.

Aos **Professores da Disciplina de Dentística**, Silvio José Mauro, Ricardo Okida, Laumer Quintela, pela colaboração, por todo aprendizado e por terem despertado em mim o interesse por esta disciplina que amo.

À **Profa. Sandra Rahal**, pelo incentivo e apoio sempre, por compartilhar seus conhecimentos e experiências, pelas conversas, conselhos e por todo carinho.

Ao **Prof. Marcelo Giannini e Sandrine Berger**, pelos ensinamentos sobre a metodologia de quantificação de Peróxido de Hidrogênio, muito obrigada pela disposição em ajudar.

À **Diana Gabriela Soares**, que me ajudou com toda a parte do experimento de citotoxicidade. Obrigada pelo tempo investido em mim e no nosso trabalho, obrigada pela dedicação, pela paciência e pela oportunidade de aprender tanto com você. Torço muito por você e tenho certeza que será uma professora e pesquisadora muito bem sucedida.

A todos os alunos do **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** que me receberam tão bem em Araraquara.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (processo 2010/10378-2- bolsa de doutorado), pelo auxílio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

À **Fernanda e Marjorie**, meninas vocês foram fundamentais na realização deste trabalho. Obrigada pelo empenho e dedicação com que me ajudaram em cada etapa da pesquisa, obrigada pela companhia nas viagens à Ilha Solteira, Araraquara, Birigui e Andradina. Obrigada pela paciência e por fazerem os meus dias de trabalho no laboratório mais divertidos. Com certeza essa conquista é de vocês também!!! Muito obrigada.

À **Vanessa Rahal**, por todos esses anos de convívio na pós-graduação. Vanis, muito obrigada por toda ajuda, pelas nossas conversas, pelas risadas, por sujar de sangue suas mãozinhas delicadas para pegar dentes conosco no frigorífico, pelos lanchinhos, pela disposição em ajudar sempre e pela sua amizade.

Aos **funcionários da biblioteca**, pela atenção e colaboração durante a elaboração deste trabalho.

À **Ana Paula Guedes e Fernanda Garcia** pela amizade, pela companhia, pelos almoços na Deli, pelas risadas, pelas conversas gostosas e desabafos. Já estou com saudade de vocês.

Ao **Laércio, Anas (Coró e Estrelinha) e Nayara**, pelo convívio e companhia às viagens ao frigorífico, que deixaram essa dura (e nojenta) tarefa mais divertida.

Aos meus colegas e amigos do departamento **Lucas, André, Aline, Rafael, Laura, Mariana**, obrigada pela troca de experiências e por colaborar de uma forma ou de outra com essa etapa da minha vida.

Aos **funcionários da Sessão de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela paciência, atenção e ajuda.

A todos os meus **amigos** que me apoiaram, ampararam em momentos de dificuldade e compartilharam bons momentos de descontração. Em fim, a todos que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

Epígrafe

Epígrafe

“Confia no SENHOR e faze o bem; habitarás na terra, e verdadeiramente serás alimentado.

Alegra-te no SENHOR, e te concederá os desejos do teu coração.

Entrega o teu caminho ao SENHOR; confia nele, e ele tudo fará.”

Salmos 37:3-5

de Almeida LCAG. Avaliação da alteração de cor, difusão de peróxido de hidrogênio e citotoxicidade trans-amelodentinária causados por diferentes técnicas de clareamento dental [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

Resumo

Tem sido demonstrado que o tempo que o clareador permanece sobre o esmalte, a concentração do produto, a espessura do esmalte e da dentina presente em cada grupo de dentes, podem influenciar na penetração do peróxido na câmara pulpar e que esta ocorrência pode estar relacionada à inflamação da polpa e que nem sempre esses fatores estão associados à maior efetividade da técnica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a alteração de cor, a citotoxicidade e a difusão do H_2O_2 causados por diferentes protocolos de clareamento dental. O presente estudo foi dividido em dois capítulos, no capítulo 1 foram estudados protocolos de clareamento de consultório: peróxido de hidrogênio a 35% (PH35%), três aplicações de 15 minutos ou uma aplicação de 45 minutos; e peróxido de hidrogênio a 20% (PH20%) uma aplicação de 45 minutos. No capítulo 2 foram estudados protocolos caseiros: peróxido de carbamida 10% (PC10%), por 3 horas ou 1,5 horas e peróxido de hidrogênio 6% (PH6%), por 1,5 horas ou 45min. Para tanto, discos de esmalte/dentina foram clareados por 7, 14 e 21 dias pela técnica caseira ou receberam 3 sessões de clareamento de consultório, uma por semana. A alteração de cor dos espécimes (ΔE) foi analisada por espectrofotometria de reflexão UV. Discos adaptados a câmaras pulpares artificiais foram posicionados em compartimentos contendo 1 ml de tampão acetato ou meio de cultura, de forma que a superfície dentinária permaneceu em contato direto com estas soluções. Imediatamente após o clareamento, o total de PH foi quantificado no tampão acetato e o meio de cultura foi aplicado por 1h em células MDPC-23, previamente semeadas em placas de acrílico. O metabolismo celular foi avaliado pelos teste MTT e a morfologia celular foi

avaliada através de microscopia eletrônica de varredura. No capítulo 1 os resultados mostraram que ao final do tratamento a alteração cromática foi semelhante em todos os protocolos clareadores, observando-se que apesar de ter ocorrido penetração de peróxido de hidrogênio menos intensa no grupo tratado com menor concentração de peróxido, todos os protocolos causaram decréscimo do metabolismo e alteração na morfologia celular. No capítulo 2 foi verificado que o PC10% por 3 horas foi mais efetivo, enquanto que o tratamento com o PH6% por 45 minutos apresentou a menor variação de cor. Os grupos tratados com PC10% por 1,5 horas e PH6% por 45 minutos causaram a menor penetração de peróxido, e o tratamento com o PH6% por 1,5 horas possibilitou a maior difusão. Não houve alteração no metabolismo celular para os protocolos caseiros. De forma geral, concluiu-se que os protocolos de consultório apresentaram a mesma efetividade clareadora e foram igualmente citotóxicos; não há necessidade das reaplicações do produto clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35%; a redução da exposição do esmalte dental aos peróxidos na técnica caseira prejudica o clareamento; a alteração de cor ocorre de forma gradativa e contínua até a terceira semana de tratamento; nenhum protocolo caseiro causou efeitos tóxicos às células MDPC-23.

Palavras-chave: Clareamento de dente. Peróxidos. Microscopia eletrônica de varredura.

Evaluation of color change, diffusion of hydrogen peroxide and trans- enamel and trans-dentinal cytotoxicity caused by different techniques of dental bleaching [Thesis]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista

Abstract

It has been shown that the time that the bleach gel keeps on the enamel, the product concentration, the thickness of enamel and dentin in each group of teeth, among other factors, can influence the penetration of peroxide in the pulp chamber and that this occurrence may be associated with pulp inflammation and tooth sensitivity, and these factors are not associated with higher effectiveness of the technique. Thus, the aim of this study was to evaluate the color change, the cytotoxicity and the diffusion of H_2O_2 caused by different bleaching protocols. This study was divided into two chapters, in chapter 1 in-office bleaching protocols were studied: 35 % hydrogen peroxide (35% HP), three applications of 15 minutes or an application of 45 minutes; and 20% hydrogen peroxide (20%HP) an application of 45 minutes. At-home protocols were studied in chapter 2: 10% carbamide peroxide (10 % CP) for 3 hours or 1.5 hours; and 6% hydrogen peroxide (6% HP) for 1.5 hours or 45 min . Therefore, disks of enamel / dentin were bleached for 7, 14 and 21 days by the at-home technique or received 3 in office bleaching sessions, one per week. The color alteration of the specimens (ΔE) was analyzed by spectrophotometry UV reflection. Discs adapted to artificial pulp chambers were placed in wells containing 1 ml of acetate buffer or culture medium, so that the dentine surface remained in contact with these solutions. Immediately after the bleaching, the total of HP was measured in acetate buffer and culture medium was applied for 1h at MDPC -23 cells previously seeded in acrylic plates. Cell metabolism was assessed by

MTT assay and cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy. In chapter 1 the results showed that at the end of the treatment the color change was similar in all bleaching protocols, noting that although there was less intense penetration of hydrogen peroxide in the group treated with lower concentrations of peroxide, all protocols caused decrease in metabolism and cell morphology alterations. In chapter 2 was verified that the 10% CP for 3 hours was more effective, whereas treatment with 6%HP for 45 minutes had the lowest color variation. The groups treated with 10% CP for 1.5 hours and 6% HP for 45 minutes caused the lowest peroxide penetration, and treatment with 6% HP for 1.5 hours resulted in the highest diffusion. There was no change in cell metabolism for at-home protocols. Overall, it was concluded that the in-office protocols presented the same bleaching effectiveness and were equally cytotoxic, the reapplication of the bleaching product based on hydrogen peroxide 35% are unnecessary; reducing the exposure of dental in at-home technique affects the bleaching; the color change occurs gradually and continuously until the third week of treatment, at-home protocols did not cause toxic effects to the MDPC-23 cells.

Key-words: Tooth bleaching. Peroxide. Microscopy, Electron, Scanning.

Sumário

1. Introdução Geral	19
2. Capítulo 1 – <i>Alteração de cor, difusão de peróxido de hidrogênio e citotoxicidade causados por protocolos de clareamento dental de consultório</i>	23
2.1 Resumo	24
2.2 Introdução	25
2.3 Materiais e Métodos	27
2.4 Resultados	31
2.5 Discussão	32
2.6 Conclusões	36
2.7 Referências	42
2. Capítulo 1 – <i>Clareamento caseiro: alteração de cor, difusão de peróxido de hidrogênio e citotoxicidade</i>	47
3.1 Resumo	49
3.2 Introdução	50
3.3 Materiais e Métodos	51
3.4 Resultados	54
3.5 Discussão	55
3.6 Conclusões	59
3.7 Referências	60
Anexos	65

Introdução Geral

1-Introdução Geral

Vários fatores podem alterar a estética do sorriso, incluindo as alterações na forma, textura, posição e cor dos dentes. Para o tratamento de dentes escurecidos, o clareamento dental tem se destacado por ser o procedimento estético menos invasivo, podendo ser realizado com uma elevada taxa de sucesso.

Uma série de métodos e posologias são descritos para o clareamento de dentes vitais, no entanto, o clareamento caseiro, utilizando o peróxido de carbamida (PC) a 10%, é a forma mais bem aceita e documentada na literatura, sendo considerada segura, eficaz, e apontada como o padrão ouro para a comparação com outras terapias clareadoras.

O PC em contato com os tecidos dentais se dissocia em uréia e peróxido de hidrogênio (PH). Acredita-se que o processo de clareamento ocorra, pelo menos em parte, devido ao baixo peso molecular do PH, que permite que este se difunda através do esmalte e dentina, liberando espécies reativas de oxigênio, que são íons instáveis, que ao reagirem com outras substâncias livres ou fracamente ligadas, conseguem novamente a estabilidade molecular. Esse fenômeno oxidante possivelmente explica o mecanismo complexo do clareamento dental.

Com o objetivo de acelerar e aumentar a eficácia clareadora, novas posologias tem sido propostas. O emprego de baixas concentrações de PH (3-12%) para uso caseiro tem sido indicado para reduzir o tempo diário de uso da moldeira e consequentemente causar menor desconforto para o paciente, enquanto produtos mais concentrados, como os à base PH a 35%, objetivam atender aos pacientes que não toleram o uso da moldeira ou anseiam resultados rápidos. No entanto, os trabalhos que avaliam a eficácia e segurança dos tratamentos realizados com produtos à base de peróxido de hidrogênio para uso caseiro são escassos. Este

fato é preocupante, pois os géis à base de peróxido de hidrogênio proporcionam uma difusão mais intensa que os tradicionais produtos à base de peróxido de carbamida a 10%, sendo maiores os riscos da penetração lesiva do peróxido no tecido pulpar.

Vale lembrar que inicialmente, a técnica do clareamento caseiro preconizava a aplicação do clareador por oito horas ao dia (noturno), durante duas a seis semanas. Porém, foi demonstrado que a ação do agente clareador decresce com o passar do tempo e após 2 horas da aplicação, a efetividade do gel diminui cerca de 50%. Este fato, associado ao desconforto proporcionado pelo uso prolongado da moldeira, motivaram a adoção de posologias mais brandas, sem a exposição desnecessária do órgão dental ao produto clareador.

Além disso, sabe-se que quanto maior a concentração e o tempo de exposição do tecido dental ao produto clareador, maior será a liberação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, os efeitos nos tecidos duros e na polpa. Neste contexto, encontram-se na literatura desde afirmações sobre o efeito inerte que o clareamento exerce sobre a polpa, até pesquisas que relacionam a realização dos procedimentos clareadores com a ocorrência de necrose em incisivos humanos. Acredita-se que esses possíveis danos são causados por componentes tóxicos liberados pelo produto clareador, que se difundem através do esmalte e dentina. É relatado ainda que o PH e os produtos derivados de sua degradação, como os íons hidroxila (OH^-), radicais superóxidos e hidroperoxila podem causar estresse oxidativo e efeitos citopatológicos como mutação, inativação enzimática, fragmentação e degradação proteica.

Neste contexto, mesmo com poucos estudos na literatura avaliando a necessidade e a segurança biológica do emprego de peróxidos altamente concentrados, estes produtos vem sendo aplicados e reaplicados várias vezes em uma mesma sessão clínica, com o intuito de aumentar a velocidade da alteração cromática. Sabe-se que apesar do efeito clareador estar relacionado à difusão dos peróxidos através dos tecidos dentais, acredita-se que a intensidade

desta difusão pode não estar relacionada às constantes reaplicações do gel, uma vez que têm sido obtidos bons resultados clínicos com a técnica de aplicação única.

Com isso, a alta concentração do produto e as constantes trocas preconizadas pelos fabricantes causam grande preocupação, uma vez que potencialmente causariam maiores danos à polpa. Desta forma, torna-se interessante conhecer a menor exposição possível capaz de minimizar os efeitos colaterais mantendo a mesma eficácia clareadora.

Sendo assim, são necessários estudos a fim de se conhecer quais posologias possibilitam obter efetividade clareadora sem que ocorra aumento da penetração transamelodentinária do PH e, consequente danos às células pulpares.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi comparar o efeito clareador, a difusão de PH e a citotoxicidade de três protocolos de clareamento dental de consultório (capítulo 1), comparando a tradicional posologia baseada em 3 aplicações de produto à base de PH 35%, com a aplicação única do mesmo produto e com um produto de menor concentração de peróxido, à base de PH 20%. No capítulo 2 as mesmas variáveis foram estudadas em tratamentos clareadores caseiros realizados com PH6% e PC10%, aplicados por diferentes tempos sobre o substrato dental

Capítulo 1

2- Capítulo 1

Alteração de cor, difusão de peróxido de hidrogênio e citotoxicidade causados por protocolos de clareamento dental de consultório

Clareamento dental de consultório: efetividade, difusão de H₂O₂ e citotoxicidade

Relevância Clínica: Os protocolos de clareamento dental que utilizam altas concentrações de peróxido de hidrogênio devem ser evitados, visto que são agressivos às células odontoblastóides

RESUMO

No presente estudo, a eficácia clareadora, citotoxicidade e difusão de peróxido de hidrogênio (PH) proporcionada por diferentes protocolos de clareamento de consultório foram avaliadas. Discos de esmalte/dentina bovinos foram submetidos a 3 sessões de clareamento com PH 35% (3x 15 min) , PH 35% (1x 45 min) ou 20% (1x 45 min). No grupo controle, nenhum tratamento foi realizado. Antes do clareamento, os discos foram adaptados a câmaras pulpares artificiais posicionadas em compartimentos contendo 1 ml de tampão acetato ou meio de cultura, de forma que a superfície de dentina permanecesse em contato direto com estas substâncias. Imediatamente após o clareamento, o peróxido de hidrogênio difundido foi estabilizado pelo tampão acetato e quantificado, enquanto que o meio de cultura foi aplicado por 1h em células MDPC-23, para análise do metabolismo (teste do MTT) e morfologia (MEV) celulares avaliadas. A alteração de cor dos espécimes (ΔE) foi analisada por espectrofotometria de reflexão. Os valores de ΔE e os dados da quantificação de peróxido foram submetidos ao teste ANOVA complementados pelo teste de Fisher ($\alpha=5\%$). Os dados do metabolismo celular foram submetidos ao teste ANOVA complementados pelo teste de

Tukey ($\alpha=5\%$). Ao final do tratamento, todos os protocolos proporcionaram a mesma efetividade. A difusão de PH foi significativamente superior nos grupos com PH 35% em relação ao PH 20%; somente na primeira sessão clareadora, a reaplicação do PH35% acarretou em aumento da difusão, no entanto, o decréscimo no metabolismo celular foi similar para todos os os géis estudados. Concluiu-se que apesar da maior difusão de peróxido nos grupos tratados com PH35%, os protocolos avaliados apresentaram a mesma efetividade clareadora e foram igualmente citotóxicos.

Palavras chave: Clareamento, Peróxido de Hidrogênio, Citotoxicidade, penetração trans-amelodentinária

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Por ser um tratamento eficaz e não invasivo¹, o clareamento dental é atualmente um dos procedimentos estéticos mais procurados pelos pacientes nas clínicas odontológicas. No entanto, o desafio atual dos tratamentos clareadores relaciona-se com o equacionamento de uma técnica que proporcione bons resultados estéticos, agrida minimamente os tecidos dentais e promova alto índice de satisfação do paciente, que deseja um tratamento acessível, rápido e que produza poucos efeitos colaterais.

Acredita-se que o processo de clareamento ocorra devido ao baixo peso molecular do peróxido de hidrogênio, que se difunde através do esmalte e dentina², liberando espécies reativas de oxigênio, reagem com outras substâncias livres ou fracamente ligadas e conseguem novamente a estabilidade molecular. Esse fenômeno oxidante possivelmente explica o mecanismo complexo do clareamento dental². No entanto, após atingir o tecido dentinário o PH alcança rapidamente o complexo dentino-pulpar³⁻⁶, resultando desde respostas inflamatórias moderadas à ocorrência de necrose em incisivos humanos^{3,5,7}. Estes danos teciduais possivelmente são resultantes do contato das células do tecido pulpar com o

PH e as EROs resultantes da sua decomposição³. Assim, acredita-se que a intensidade destes efeitos adversos esteja intimamente relacionada com a quantidade de EROs que entra em contato com as células pulpares e, desta forma, quanto maior a concentração e o tempo de exposição do tecido dentário ao produto clareador, maiores serão os danos produzidos^{3,7-11}.

Neste contexto, mesmo com poucos estudos na literatura avaliando a necessidade e a segurança biológica do emprego de peróxidos altamente concentrados, estes produtos vem sendo aplicados e reaplicados várias vezes em uma mesma sessão clínica, com o intuito de aumentar a velocidade da alteração cromática. Sabe-se que apesar do efeito clareador estar relacionado à difusão dos peróxidos através dos tecidos dentais, acredita-se que esta difusão pode não estar relacionada às constantes reaplicações do gel, uma vez que têm sido obtidos bons resultados clínicos com a técnica de aplicação única^{12,13}.

As contínuas trocas têm sido justificadas pela intensa degradação do peróxido após sua aplicação em moldeiras na técnica caseira^{14,15}. No entanto, quando nos referimos aos produtos utilizados na técnica “in-office”, estudos recentes mostram que a taxa de decomposição é relativamente pequena^{16,17}, e este fato talvez possa sustentar a adoção de uma nova posologia, baseada na aplicação única do produto clareador.

Sendo assim, levando em consideração que altas concentrações de peróxido são potencialmente agressivas às células pulpares, torna-se interessante e justificável estudar posologias pautadas na adoção de protocolos mais brandos, objetivando com isso encontrar alternativas seguras para o tratamento clareador.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi comparar o efeito clareador, a difusão de PH e a citotoxicidade de três protocolos de clareamento dental de consultório, comparando-se a tradicional posologia baseada em 3 aplicações de produto à base de PH 35%, com a aplicação única do mesmo produto e com um produto de menor concentração de peróxido, à base de PH 20%.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos espécimes: Foram utilizados incisivos bovinos permanentes obtidos de novilhos com idade entre 24 e 30 meses. Dentes com manchas, desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e trincas no esmalte não foram selecionados.

Posteriormente, foram retirados do terço médio da face vestibular de incisivos bovinos discos de esmalte e dentina com 5,2 mm de diâmetro. A superfície dentinária foi reduzida com lixas de óxido de alumínio de granulação 600 (T469-SF- Norton, Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), até que todo o disco apresentasse a espessura de 3,5 mm, sendo aproximadamente 1,3 mm ($\pm 0,2$ mm) de esmalte, e 2,2 mm ($\pm 0,2$ mm) de dentina. A superfície dentinária dos discos foi tratada com 0,5 M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pH 7,4, pelo tempo de 30 s, seguido de lavagem com água deionizada, para remoção da *smear layer*¹⁸.

Preparo da Câmara Pulpar Artificial: As Câmaras Pulpaes Artificiais (CPAs)^{10,11,19} foram confeccionadas em aço inox, possuindo 2 compartimentos. No topo do compartimento superior há uma abertura de 8mm de diâmetro, enquanto que a sua porção inferior apresenta redução do diâmetro para 6mm, permitindo o posicionamento adequado do disco de esmalte/dentina. Assim, os espécimes foram adaptados no compartimento superior entre dois anéis de silicone, que mantiveram os discos fixados. Um vedamento adicional foi realizado entre o disco e a parede lateral da CPA, utilizando cera 7. O compartimento inferior apresenta perfurações laterais para permitir a circulação das soluções que permanecem em contato com a superfície de dentina do disco (solução tampão de acetato empregado na quantificação do peróxido ou meio de cultura para avaliação da citotoxicidade).

Procedimento clareador: Os tratamentos foram realizados conforme a descrição dos grupos experimentais: GRUPO 1- Grupo controle, não recebeu tratamento clareador; GRUPO 2- os espécimes receberam tratamento com o produto à base de PH 35% (Whiteness HP

Maxx- FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Este produto apresenta-se comercialmente em dois frascos, um contendo o peróxido e o outro o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas na proporção de 3:1. O produto foi manipulado segundo as instruções do fabricante e, em seguida, foram aplicados 0,04 ml da mistura sobre cada espécime, permanecendo em contato com o esmalte por 15 min. Posteriormente, o gel foi aspirado da superfície do esmalte e o produto foi reaplicado mais 2 vezes, totalizando 45 min. de exposição ao material clareador, conforme indica o fabricante; GRUPO 3- os espécimes receberam tratamento com o mesmo produto descrito anteriormente, no entanto foi realizada somente uma aplicação, permanecendo por 45 minutos sobre o esmalte; GRUPO 4- os espécimes receberam tratamento com o produto à base de PH 20% (Whiteness HP Blue - FGM Produtos Odontológicos). Após a manipulação, realizada segundo as instruções do fabricante, foram aplicados 0,04 ml do produto sobre a superfície dental, permanecendo 45 min sobre este tecido, conforme indica o fabricante.

Foram realizadas três sessões de clareamento, com intervalos de uma semana, sendo que, neste período, foi aplicada sobre o esmalte dental saliva artificial, enquanto que a dentina permaneceu em contato com água destilada.

Avaliação da Eficácia Clareadora: Os espécimes (n=15) foram submetidos à mensuração de cor em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), que utiliza o modelo de cores CIE L*a*b*, estabelecido pela *Comission Internationale de l'Eclairage – CIE* (Comissão Internacional sobre Iluminação). Para tanto, foi confeccionada uma matriz de silicone preta contendo um orifício central que possibilitou o posicionamento padronizado do espécime durante as leituras. Foram realizadas três leituras de cada espécime, e a média entre elas foi calculada. As análises foram realizadas antes do início do tratamento, 24 horas após cada sessão clareadora e sete dias após o término do tratamento. O sistema CIE L*a*b* calcula a distância de cor entre dois pontos através da

fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. Após o cálculo do ΔE , os valores foram tabulados de acordo com o grupo e tempo de análise e submetidos ao teste ANOVA complementados pelo teste de Fisher ($\alpha=5\%$).

Quantificação da difusão de PH: Para quantificação da difusão de PH (n=15), os discos de esmalte/dentina posicionados nas CPAs, foram colocados em placas acrílicas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) contendo 1ml de solução tampão de acetato a 2 M (pH 4,5). A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução que estabilizou o PH difundido. Imediatamente após o clareamento, 20 μ l da solução tampão foram transferidos para tubos de ensaio contendo 100 μ l de corante violeta leuco cristal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,5 mg/ml; 50 μ l de peroxidase extraída de rábano silvestre (Sigma Chemical Co.) a 1mg/mL, e 2,750 ml de água destilada. Este método baseia-se na reação do PH com o corante violeta leucocristal, catalizado pela enzima peroxidase²⁰. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de peróxido, tornando possível avaliar a quantidade de peróxido difundida. A densidade ótica da solução azul resultante foi mensurada em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão) em comprimento de onda de 596 nm. Uma curva de calibração, com valores de absorbância de soluções de PH de concentrações conhecidas, foi utilizada para converter os valores da densidade ótica obtidos em valores equivalentes a μ g de peróxido por ml de solução tampão acetato. A quantificação de PH foi realizada a cada sessão de clareamento. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA complementado pelo teste de Fisher ($\alpha=5\%$).

Citotoxicidade trans-amelodentinária: Inicialmente, células MDPC-23²¹ foram semeadas (30.000 células/cm²) em placas de 24 compartimentos (Costar Corp.) em meio de cultura DMEM completo (100 IU/ml penicilina; 100 mg/ml estreptomicina; 2 mmol/L glutamina; GIBCO, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino

(SFB; GIBCO). As placas permaneceram em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 h (Isotemp; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Os dispositivos disco/CPA foram esterilizados por óxido de etileno, sendo então posicionados em placas de 24 compartimentos contendo 1 ml de DMEM sem SFB. O clareamento foi realizado na superfície de esmalte, de acordo com os seguintes grupos experimentais descritos anteriormente, por 1, 2 ou 3 sessões. O meio de cultura em contato com a dentina foi substituído a cada sessão. Imediatamente após a realização da última sessão de clareamento, uma alíquota de 500 µl do meio de cultura contendo os componentes da difusão trans-amelodentinária dos géis clareadores (extrato) foi aplicada sobre células MDPC-23 previamente cultivadas, permanecendo em contato por 1 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o metabolismo celular foi avaliado pelo teste de MTT, e a morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Teste do MTT: A análise da viabilidade celular (n=11) foi realizada pelo teste do MTT²¹, através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), que representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Após o período de incubação das células com os extratos, os mesmos foram substituídos pela solução de MTT (5 mg/ml; Sigma Chemical Co.) e as células incubadas por 4 h, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os cristais de formazan formados nas células viáveis foram diluídos com solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl) e a absorbância mensurada em Leitor de Elisa (570 nm; Tp-reader). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV): Lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (n=2), previamente esterilizadas, foram posicionadas no fundo dos compartimentos imediatamente antes do cultivo das células. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permaneceram aderidas às lamínulas foram fixadas por 1 h em glutaraldeído tamponado a 2,5%. Posteriormente à fixação inicial, as células foram submetidas aos procedimentos de

pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%; desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) e secagem química em 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane, 98% (HMDS, ACROS Organics, New Jersey, NY, USA). As lamínulas foram fixadas em *stubs*, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tokio, Japão) para estudo da morfologia celular.

RESULTADOS

Todos os protocolos avaliados promoveram alteração significativa do ΔE quando comparados ao grupo controle. As alterações foram contínuas a partir da primeira sessão clareadora e apresentaram recidiva parcial após 1 semana do término do clareamento (Tabela 1). Observou-se que após a última sessão, o grupo que utilizou o PH20% apresentou menor alteração de cor que o grupo PH35% (3x15), mas nos demais tempos, inclusive aos 28 dias todos os tratamentos apresentaram desempenho semelhante.

Quando analisada a penetração trans-amelodentinária, observou-se todos os protocolos provocaram difusão significativa de PH através da estrutura dental, sendo que o grupo PH20% causou a menor penetração em todas as sessões. Os grupos PH35% com 1 aplicação de 45 minutos e 3 aplicações de 15 minutos diferiram entre si apenas na primeira sessão, quando o protocolo com as reaplicações provocou maior difusão maior (Tabela 2).

Associado a esses resultados, observou-se redução significativa da viabilidade celular em todos os grupos clareados, quando comparados ao controle negativo. Não foram observadas diferenças entre as sessões, bem como quando os protocolos clareadores foram comparados entre si (Tabela 3).

A Figura 1 mostra imagens representativas dos efeitos de cada protocolo clareador sobre as células MDPC-23. No grupo controle foi observado um grande número de células

aderidas ao substrato de vidro. Estas células exibiram amplo citoplasma recobrindo praticamente todo substrato. Por outro lado, quando os géis clareadores foram aplicados sobre os discos de esmalte/dentina, foram observadas alterações significativas na morfologia celular, independente do protocolo clareador utilizado. Extensas áreas do substrato de vidro ficaram expostas, indicando que as células que estavam aderidas morreram e se deslocaram do local, enquanto que as poucas células que permaneceram aderidas apresentaram profundas alterações na morfologia.

DISCUSSÃO

A técnica clareadora *in-office* é realizada pelo cirurgião dentista no consultório odontológico empregando altas concentrações de peróxidos sobre a superfície de esmalte. Normalmente, as sessões clínicas destinadas para este procedimento duram até 50 minutos, sendo que a grande maioria dos fabricantes recomenda a reaplicação frequente do produto durante a mesma sessão clínica.

No presente estudo, todas as técnicas clareadoras proporcionaram alterações cromáticas semelhantes, mostrando serem igualmente efetivas. A eficácia semelhante usando protocolos com PH 35% com e sem trocas do produto, também foi relatada em outros estudos^{12,13} e, neste contexto, Marson e colaboradores em 2008¹⁶, avaliando a taxa de decomposição do produto Whiteness HP Maxx, observou que não há degradação significativa do produto após 45 minutos de contato com a superfície dental, sugerindo que a substituição do produto é desnecessária. No entanto, outros fatores devem ser considerados na manutenção do produto sobre a superfície dental. É importante que durante a permanência do produto sobre o esmalte o pH mantenha-se em níveis seguros, evitando alterações significativas na superfície deste tecido^{16,23}. Trentino e colaboradores²⁴, avaliaram o pH do produto Whiteness HP Maxx à base de peróxido de hidrogênio a 35% (com e sem reaplicação) e Whiteness HP

Blue à base de peróxido de hidrogênio a 20% (aplicação única) e evidenciaram que a manutenção dos produtos por um tempo prolongado não compromete a segurança do procedimento, uma vez que o pH permanece acima do valor crítico para o esmalte dental.

Outros estudos também demonstraram que produtos com diferentes concentrações do componente ativo apresentam a mesma efetividade clareadora ao término do tratamento, tanto pela técnica caseira²⁵⁻²⁷, como na técnica de consultório²⁶⁻²⁸. Matis e col. (2007)²⁸ compararam 8 produtos a base de PH em diferentes concentrações (15% a 35%), aplicados por diferentes períodos na superfície dental. Com base em seus resultados, os autores sugeriram que na técnica de consultório o efeito clareador é mais influenciado pelo tempo de contato do produto com o tecido dental do que pela sua concentração. Os mesmos autores também relataram 51% de recidiva de cor após uma semana e 65% após seis semanas do término do tratamento²⁸. Esta grande recidiva cromática provavelmente se deve ao momento da leitura, realizado imediatamente após o término do clareamento. Este fato, associado ao uso de fontes de luz e ao alto poder osmótico dos produtos, possivelmente aumentaram a desidratação dental. Para minimizar este fato, no presente estudo, a leitura de cor foi realizada 24h após cada sessão de clareamento, evitando o registro de um “falso efeito clareador”, causado pela desidratação pós-clareamento²⁹. Apesar de a análise ter sido realizada 24h pós-tratamento, ainda foi observado retorno da cor após uma semana, o que provavelmente se deve ao fato da completa reidratação ocorrer por até duas semanas pós-clareamento³⁰.

Quanto à difusão de PH, observou-se que o grupo PH35% com 3 aplicações de 15 minutos proporcionou maior penetração do que o PH35% com 1 aplicação de 45 minutos apenas na primeira sessão. Apesar de a análise estatística revelar esta diferença pontual, uma análise global de nossos dados nos faz concordar com os obtidos por Kwon e colaboradores (2012)¹⁷ que verificaram uma penetração constante de peróxido de hidrogênio durante 1 hora

de aplicação, sugerindo a possibilidade de manutenção do produto sobre o esmalte dental por um período superior a 15 minutos.

O grupo clareado com PH20% causou menor difusão que os dois protocolos de clareamento dental utilizando PH35%. Este comportamento pode ser explicado pelos diferentes coeficientes de difusão de cada produto, que é dependente da quantidade de peróxido disponível, da espessura a ser penetrada e do tempo de aplicação. Sendo assim, a difusão de peróxido para a câmara pulpar tende a ser proporcional à concentração do agente clareador utilizado⁴. Porém, esta diferença no total de PH que se difundiu pelos discos não interferiu de forma significativa na citotoxicidade *in vitro*. Em parte, esta discrepância dos resultados pode ser atribuída ao fato do teste empregado detectar apenas a difusão do PH. No entanto, sabe-se que o PH se degrada em outras EROs, as quais podem também ter se difundido e causado efeitos tóxicos para as células MDPC-23. Observações semelhantes foram encontradas por Sacono e colaboradores (2010)¹⁰, que também não observaram diferença significativa na citotoxicidade trans-amelodentinária sobre células MDPC-23 para géis clareadores a base de PH 38% e 20%. Estes resultados nos leva a acreditar que todos os protocolos, no modelo experimental utilizado, são igualmente tóxicos para células MDPC-23.

O decréscimo médio na viabilidade celular observada no presente estudo foi de 35,49% para o tratamento com 3 aplicações de 15 min do PH 35%, 37,10% para o grupo que recebeu aplicação única do PH35% e em torno de 30% para uma aplicação de 45 min do PH 20%. O efeito agressivo dos peróxidos em altas concentrações já foi destacado por vários pesquisadores. Coldebella e colaboradores (2009)¹¹ e Trindade e colaboradores (2009)³ observaram decréscimo de 62,09% e 92,03% e no metabolismo de células MDPC-23 após 1 e 3 aplicações de 15 min do PH 35%, respectivamente. De forma semelhante, Sacono e colaboradores (2010)¹⁰ encontraram redução de 97,18% no metabolismo das mesmas células após 3 aplicações de 10 min do PH 38%, bem como de 96,29% após uma aplicação de 45 min

do PH 20%. No entanto, nestes trabalhos o tempo de contato das células com o extrato contendo peróxido foi de 24 h, enquanto que no presente estudo foi de 1h. Em estudo recente, Soares e col. (2012)¹⁹ observaram redução em torno de 40,4% do metabolismo das células MDPC-23 após 1 h de contato do extrato obtido a partir de 3 aplicações de um gel com 35% PH sobre a superfície de discos de esmalte/dentina adaptados a CPAs. Assim, acredita-se que o PH permanece ativo por longos períodos no meio de cultura, sendo que quanto maior o tempo de contato com as células, maiores os efeitos tóxicos celulares *in vitro*.

Nas imagens de MEV dos grupos clareados foram observados efeitos deletérios nas células MDPC-23, tais como alterações na morfologia e morte celular, caracterizada pela exposição do substrato de vidro e restos celulares nas lâminas. Este fenômeno pode ser atribuído à ação do próprio peróxido, bem como de radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), e outras EROs resultantes da degradação do gel clareador². A presença de altas concentrações dessas substâncias em contato com as células causa estresse oxidativo³¹, podendo resultar em diminuição na proliferação celular³², peroxidação lipídica e fragmentação de proteínas, com consequente lesão da membrana celular⁸, gerando morte celular por necrose ou apoptose³³.

Sendo assim, a técnica de aplicação única traria vantagens como redução no tempo de atendimento clínico e nos custos do tratamento, uma vez que uma quantidade menor de material seria empregado por paciente. Além disso, minimizaríamos a probabilidade de acidentes em decorrência do possível contato do gel com os tecidos moles adjacentes. Porém, todas as técnicas avaliadas, apesar de efetivas, foram citotóxicas para as células odontoblastóides, apontando para a necessidade de se repensar na técnica in-office utilizada atualmente.

Contudo, os resultados do presente estudo devem analisados com ponderação por se tratar de um estudo *in vitro*. Dentre as limitações do presente estudo estão o uso de dentes bovinos e o fato de que os dados da difusão do peróxido e citotoxicidade são referentes

apenas à última aplicação do produto, não sendo possível avaliar o efeito cumulativo das sessões, o que talvez deixasse o procedimento clareador ainda mais agressivo. Além disso, fatores como pressão intra-pulpar, presença de prolongamentos citoplasmáticos nos túbulos dentinários^{34,35}, além da presença de enzimas antioxidantes e mecanismos de defesa da polpa³⁶ poderiam diminuir a difusão do peróxido, bem como atenuar a intensidade da agressão.

Mesmo que existam mecanismos fisiológicos que dificultam a difusão de peróxido para a câmara pulpar, Costa e colaboradores⁷, em estudo *in vivo* observaram intensa reação inflamatória associada a áreas de necrose de coagulação no tecido pulpar coronário de incisivos inferiores humanos submetidos ao PH 38% aplicado por 30 min, técnica similar à avaliada na presente investigação. No estudo realizado por Sato e colaboradores (2013)³⁷, pré-molares de pacientes jovens submetidos a 45 min de tratamento com PH 35% apresentaram indução de estresse oxidativo no tecido pulpar, associado à intensa atividade de metaloproteinases e Catepsina B, proteases intimamente relacionadas com a degradação da matriz extracelular. Assim, de acordo com os resultados do presente estudo e dos resultados de estudos laboratoriais e clínicos presentes na literatura, as técnicas avaliadas apresentam riscos de danos ao tecido pulpar, especialmente quando direcionada para dentes com pequena espessura de esmalte e dentina.

Conclusão

Concluiu-se que os protocolos estudados causaram a mesma alteração cromática, redução do metabolismo celular, além de morte e alteração da morfologia de células MDPC-23, evidenciando a necessidade de se estabelecer protocolos mais seguros para essa técnica clareadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML & Briso AL (2012). Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **32(3)** 303-309.
- 2) Kawamoto K & Tsujimoto Y (2004) Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching *Journal of Endodontics* **30(1)** 45-50.
- 3) Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J & Costa CA (2009). Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications *International Endodontics Journal* **42(6)** 516-524.
- 4) Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN & Menezes MM (2007). Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique *Journal of Endodontics* **33(9)** 1074-1077.
- 5) Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA & Mjör IA (2004). Pulp reaction to vital bleaching *Operative Dentistry* **29 (4)** 363-368.
- 6) Briso A, Lima A, Gonçalves R, Gallinari M & Santos PD (2013). Transenamel and Transdentinal Penetration of Hydrogen Peroxide Applied to Cracked or Microabrasioned Enamel. *Operative Dentistry* Online Early
- 7) Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT & Hebling J (2010). Human pulp responses to in-office tooth bleaching *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **109 (4)** 59-64.
- 8) Martindale JL & Holbrook NJ (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival *Journal of Cellular Physiology* **192 (1)** 1-15.

- 9) de Almeida LC, Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH & Briso AL (2012). Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources *Acta Odontologica Latinoamericana* **25(1)** 3-8.
- 10) Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ, Hebling J & Costa CAS (2010). Efeito Citotóxico de Agentes Clareadores a Base de Peróxido de Hidrogênio a 20% e 38% sobre Células Odontoblastóides *Revista Odontologica Bras Central* **18(48)** 15-21.
- 11) Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J & Costa CA (2009). Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells *Brazilian Dental Journal* **20(4)** 267-74.
- 12) Marson FC, Sensi LG, Strassler H, Miraziz L, Riehl H & Reis R (2008). In-office bleaching gel application times: clinical evaluation *Journal of Dental Research (Special Issue)* Abstract #1028.
- 13) Marson FC, Sensi LG & Reis R (2008). Novo conceito na clareação dentária pela técnica no consultório *Revista Dental Press de Estética* **5(3)** 55-66.
- 14) Rolla, JN. Avaliação clínica de diferentes tempos de aplicação de um gel clareador na técnica de clareamento dental em consultório. Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
- 15) Al-Qunaian TA, Matis BA & Cochran MA (2003). In vivo kinetics of bleaching gel with three-percent hydrogen peroxide within the first hour *Operative Dentistry* **28(3)** 236-241.
- 16) Matis BA, Gaião U, Blackman D, Schultz FA & Eckert GJ (1999). In vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. *Journal of the American Dental Association* **130(2)** 227-235.

- 17) Kwon SR, Oyoyo U & Li Y. Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: An in vitro study. *Journal of Dentistry* 2012; In press.
- 18) Jacques P & Hebling J (2005). Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system *Dental Materials* **21(2)** 103-109.
- 19) Soares DG, Ribeiro APD, Vargas FS, Hebling J & Costa CAS (2012). Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clinical Oral Investigation* **6** Online Early
- 20) Mottola HA, Simpson BE & Gorin G (1970). Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Analytical Chemistry* **42(3)** 410-411.
- 21) Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH & Butler WT (1998). Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae *Connect Tissue Research* **37(3-4)** 233-249.
- 22) Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *Journal of Immunology Methods* **65(1-2)** 55-63.
- 23) Price RB, Sedarous M & Hiltz GSJ (2000). The pH of tooth-whitening products. *Canadian Dental Association* **66(8)** 421-6.
- 24) Trentino, AC. Estudo in vitro da variação do pH de agentes clareadores e seu efeito sobre o desgaste e rugosidade superficial do esmalte bovino após escovação simulada. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.

- 25) Krause F, Jepsen S & Braun A (2008). Subjective intensities of pain and contentment with treatment outcomes during tray bleaching of vital teeth employing different carbamide peroxide concentrations *Quintessence International* **39(3)** 203-209.
- 26) Dietschi D, Rossier S & Krejci I (2006). In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products *Quintessence International* **37(7)** 515-526.
- 27) Matis BA, Cochran MA, Franco M, Al-Ammar W, Eckert GJ & Stropes M (2007). Eight in-office tooth whitening systems evaluated in vivo: a pilot study. *Operative Dentistry* **32 (4)** 322-327.
- 28) Basting R, Amaral F, França F & Flório F (2012). Clinical Comparative Study of the Effectiveness of and Tooth Sensitivity to 10% and 20% Carbamide Peroxide Home-use and 35% and 38% Hydrogen Peroxide In-office Bleaching Materials Containing Desensitizing Agents *Operative Dentistry* **37(5)** 464-473.
- 29) Jones AH, Diaz-Arnold AM, Vargas MA & Cobb DS (1999). Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques *Journal of Esthetic Dentistry* **11(2)** 87-94.
- 30) Haywood VB (1996). Achieving, maintaining and recovering successful tooth bleaching *Journal of Esthetic Dentistry* **8(1)** 31-38.
- 31) Halliwell B & Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* **142(2)** 231-255.
- 32) Cekarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM & Keller JN (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773(2)** 93-104.

- 33) Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N & Niki E (2006). Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Research* **40(6)** 619-630.
- 34) Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, Osorio R, Tay FR & Prati C (2007). Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dental Materials* **23(6)** 705-713.
- 35) Vongsavan N & Matthews B (1991). The permeability of cat dentine in vivo and in vitro. *Archives of Oral Biology* **36(9)** 641-646.
- 36) Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A & Caputi S (2003). Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *European Journal of Oral Science* **111(5)** 454-456.
- 37) Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, Carrilho MR, Nascimento FD & Tersariol IL (2013) Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *Journal of Dental Research* **92(2)** 187-192.

Autores:

Letícia Cunha Amaral Gonzaga de Almeida*, Diana Gabriela Soares**, Marjorie Oliveira

Galinari***, Carlos Alberto de Souza Costa****, Paulo Henrique dos Santos*****

André Luiz Fraga Briso*****

*DDS, MS – Post-graduate student, Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

**DDS, MS – Araraquara School of Dentistry, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara, SP Brazil.

***Graduate student- Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

**** DDS, MS, PhD – Full Professor -Araraquara School of Dentistry,UNESP- Univ. Estadual Paulista, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP Brazil.

***** DDS, MS, PhD – Assistant Professor - Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araçatuba School of Dentistry, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Brazil.

***** DDS, MS, PhD– Associate Professor, Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

Endereço de correspondência:

Carlos Alberto de Souza Costa

Departamento de Fisiologia e Patologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Rua Humaitá, 1680, Centro Cep: 14801-903 - Araraquara, SP

Telephone: 55-16-3301-6477 Fax: 55-16-3301-6488

e-mail: casouzac@foar.unesp.br

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processos #2010/10378-2-Bolsa de Doutorado e #2010/17637-3- Auxílio Regular) e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp- Fundunesp pelo suporte financeiro.

Tabela 1-Média (desvio padrão) dos valores de Delta E e decisão estatística tomada para os grupos de receberam clareamento de consultório.

	Controle			PH 35% 3X15min.		PH 35% 1x45min		PH 20% 50min	
7 dias	1,47 (0,72)	B a		4,64 (0,93)	A d	4,18 (0,84)	A d	4,27 (0,93)	A d
14 dias	1,80 (0,29)	B a		6,45 (1,14)	A c	6,15 (1,04)	A c	5,84 (1,02)	A c
21 dias	1,52 (0,31)	C a		7,61 (0,98)	A a	7,37 (0,91)	AB a	6,88 (1,07)	B a
28 dias	1,18 (0,48)	B a		7,29 (0,97)	A b	7,01 (0,92)	A b	6,54 (1,12)	A b

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas, diferem entre si ($p<0,05$)

Tabela 2- Média (desvio padrão) da quantidade de peróxido (em µg/ml) que penetrou através dos espécimes dos grupos que receberam clareamento de consultório.

	Controle			PH 35% 3X15min.		PH 35% 45min.		PH 20% 45min.	
7º dia	0,32 (0,136)	D a		6,22 (027)	A b	5,58 (0,51)	B c	4,70 (0,20)	B ab
14º dia	0,30 (0, 114)	C a		6,16 (0,16)	A b	6,04 (0,17)	A b	5,19 (0,15)	B a
21º dia	0,39 (0,114)	C a		6,40 (0,14)	A a	6,34 (0,17)	A a	4,69 (0,16)	B b

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas, diferem entre si ($p<0,05$)

Tabela 3 - Média das porcentagens do metabolismo celular para os grupos de clareamento de consultório e controle.

Grupos	Média
controle	100,00A
PH 35% 3x15 min. 1 sessão	63,33 B
PH 35% 3x15 min. 2 sessões	68,24 B
PH 35% 3x15 min. 3 sessões	61,96 B
PH 35% 1x45 min. 1 sessão	62,89 B
PH 35% 1x45 min. 2 sessões	61,73 B
PH 35% 1x45 min. 3 sessões	64,08 B
8- PH 20% 50 min. 1 sessão	68,63 B
9- PH 20% 50 min 2 sessões	73,52 B
10- PH 20% 50 min 3 sessões	67,85 B

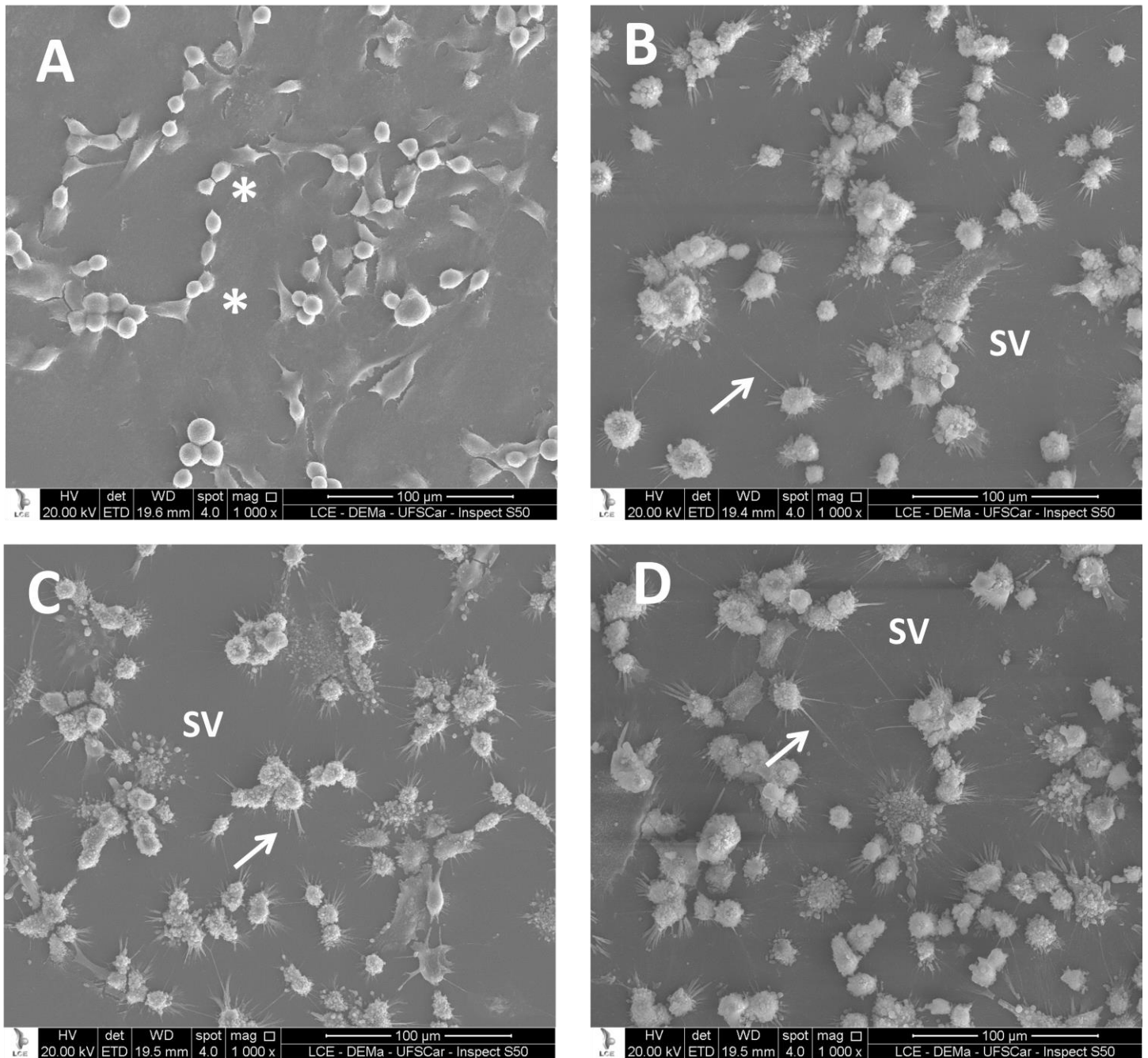


Figura 1- MEV 1000x. Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais:

A- Grupo controle: As células MDPC-23 exibem amplo citoplasma recobrimdo a lamínula de vidro sobre a qual foram cultivadas. Também pode-se observar proliferação celular (mitoses) (*). **B- PH 35% 3x15 minutos:** Muitas células que estavam aderidas ao substrato morreram e

se deslocaram da lamínula de vidro (SV). As poucas células que permaneceram sobre o substrato, exibem notável contração do citoplasma. Esta reação celular fez com que passassem a exibir morfologia arredondada, sendo que alguns finos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana parecem mantê-las aderidas à lamínula de vidro (→). **C- PH 35% 1x45 minutos:** De forma semelhante ao observado na imagem B, observa-se diminuição do número de células aderidas ao vidro, as quais exibem forma mais arredondada. Extensas áreas da lamínula de vidro estão expostas. **D- PH 20%:** Apesar de um maior número de células MDPC-23 ter permanecido sobre o substrato de vidro, quando comparado às imagens dos grupos PH35%, estas células também apresentaram importantes alterações morfológicas (→).

Capítulo 2

3- Capítulo 2

Clareamento caseiro: alteração de cor, difusão do peróxido de hidrogênio e citotoxicidade

Autores: Leticia Cunha Amaral Gonzaga de Almeida*; Diana Gabriela Soares**; Fernanda Almeida Azevedo***; Carlos Alberto de Souza Costa****; Elaine Cristina Voltolini Pontes*****; Paulo Henrique dos Santos*****; André Luiz Fraga Briso*****

*DDS, MS – Post-graduate student, Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

**DDS, MS – Post-graduate student, Araraquara School of Dentistry, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP, Brazil.

***Graduate student- Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

**** DDS, MS, PhD- Full Professor -Araraquara School of Dentistry,UNESP- Univ. Estadual Paulista, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP, Brazil.

***** Graduate student- Araraquara School of Dentistry,UNESP- Univ. Estadual Paulista, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP Brazil.

***** DDS, MS, PhD- Assistant Professor, Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araçatuba, SP, Brazil.

***** DDS, MS, PhD- Associate Professor, Araçatuba School of Dentistry, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil.

Endereço de correspondência:

Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso
Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Departamento de Odontologia Restauradora
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça CEP 16105-050, Araçatuba - SP – Brasil
Telephone: 55-18-36363348 Fax: 55-18-36363349
e-mail: alfbriso@foa.unesp.br

Disclosure Statement: Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Clareamento caseiro: alteração de cor, difusão do peróxido de hidrogênio e citotoxicidade.

RESUMO

Este estudo avaliou a alteração de cor, a citotoxicidade e a difusão do H_2O_2 ocorridos em diferentes protocolos clareadores caseiros: peróxido de carbamida (PC) 10% por 3 horas ou 1,5 horas; peróxido de hidrogênio (PH) 6% por 1,5 horas ou 45min. Para a quantificação da penetração do peróxido, discos de dentes bovinos foram posicionados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) contendo solução tampão de acetato, que foi coletada para avaliação em espectrofotômetro. Para análise da citotoxicidade, os espécimes foram adaptados nas CPAs contendo meio de cultura, que posteriormente foi aplicado sobre células odontoblastóides MDPC-23 por 1 hora. O metabolismo celular foi avaliado pelo teste MTT e a alteração de cor foi analisada pelo sistema CIE $L^*a^*b^*$. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e teste de Fisher ($\alpha=5$). O tratamento com PC10% por 3 horas foi o mais efetivo, enquanto que o tratamento com PH6% por 45 minutos possibilitou a menor alteração cromática. Com relação à difusão, observou-se que os grupos PC10% por 1,5 horas e PH6% por 45 minutos causaram a menor penetração trans-amelodentinária do peróxido, enquanto que o tratamento com o PH6% por 1,5 horas possibilitou a maior difusão. Nenhum tratamento alterou o metabolismo celular. Concluiu-se que: na terapia clareadora caseira, a redução do tempo de exposição aos peróxidos pode comprometer o resultado clareador; o PH6% por 1,5 horas proporcionou a maior difusão PH, embora o tratamento com PC10% por 3hs tenha sido o mais efetivo; nenhum protocolo causou citotoxicidade às células MDPC-23.

Significância Clínica: O tratamento clareador com PC10% e PH6% utilizado segundo as orientações do fabricante é eficaz e não citotóxico para células odontoblastóides, no entanto, a redução do tempo de exposição aos peróxidos prejudica sua efetividade.

INTRODUÇÃO

O clareamento com peróxidos tem sido utilizado há mais de cem anos ¹, contudo foi após a publicação da técnica caseira² que a sua popularidade aumentou, tornando-se hoje um dos procedimentos mais requisitados no consultório odontológico. A proposta original de Haywood e Heymann² era baseada no uso noturno de moldeiras de acetato, contendo o gel à base de peróxido de carbamida a 10%. Esta técnica, quando bem indicada e supervisionada pelo cirurgião-dentista, proporciona um ganho estético altamente satisfatório na maioria dos pacientes^{3,4} e continua sendo apontada como o padrão ouro para a comparação com outras terapias⁵.

Inicialmente, a aplicação do clareador era realizada por oito horas ao dia (noturno)^{2,6}, no entanto, foi constatado que a eficácia do gel diminui cerca de 50% após 2 horas de sua aplicação⁷. Este fato, associado ao desconforto proporcionado pelo uso da moldeira⁷, tem motivado a redução do tempo de seu emprego, evitando a exposição desnecessária do órgão dental ao produto clareador^{7,8}.

Nesta tendência de redução do tempo de utilização da moldeira, também tem sido proposto o emprego de produtos contendo baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (3-12%). No entanto, apesar de ser comum estudos de clareadores a base de peróxido de hidrogênio altamente concentrados ^{4,5,9,10}, os trabalhos que avaliam a eficácia e segurança dos tratamentos realizados com produtos à base de peróxido de hidrogênio para uso caseiro são escassos.

Este fato é preocupante, pois os géis à base de peróxido de hidrogênio proporcionam uma difusão mais intensa que os tradicionais produtos à base de peróxido de carbamida a 10%⁶, sendo maiores os riscos da penetração lesiva do peróxido no tecido pulpar ¹¹, além da ocorrência de sensibilidade dental ^{6,12}, que é o efeito colateral mais relatado pelos pacientes¹³.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a alteração de cor , difusão e citotoxicidade de tratamentos clareadores caseiros realizados com PH6% e PC10%, aplicados por diferentes tempos sobre o substrato dental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos Espécimes: Discos de esmalte e dentina com 5,2mm de diâmetro foram obtidos do terço médio da face vestibular de incisivos bovinos previamente selecionados. A superfície dentinária foi desgastada em lixas de óxido de alumínio de granulação 600 (T469-SF- Norton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), até que todo o disco apresentasse a espessura de 3,5mm, sendo aproximadamente 1,3mm ($\pm 0,2$ mm) de esmalte e 2,2mm de dentina. Para remoção da *smear layer* foi aplicada a solução de 0,5M EDTA, pH 7,4, na superfície dentinária pelo tempo de 30 segundos¹⁴, seguida de enxague com água deionizada.

Preparo da Câmara Pulpar Artificial: As Câmaras Pulpare Artificiais (CPAs)¹⁵ foram confeccionadas em aço inox, possuindo 2 compartimentos. No topo do compartimento superior há uma abertura de 8mm de diâmetro, enquanto que em sua porção inferior há redução do diâmetro para 6mm, permitindo o posicionamento adequado do disco de esmalte/dentina. Assim, os espécimes foram adaptados no compartimento superior entre dois anéis de silicone, que mantiveram os discos fixados. Um vedamento adicional foi realizado entre o disco e a parede lateral da CPA, utilizando cera 7. O compartimento inferior apresenta perfurações que permitem a circulação das soluções que mantém contato com a superfície de dentina do disco (solução tampão de acetato empregado na quantificação do peróxido ou meio de cultura para avaliação da citotoxicidade).

Procedimento Clareador: Os discos dentais foram adaptados em CPAs e o conjunto foi posicionado em placas acrílicas de 24 compartimentos, contendo solução tampão de acetato ou meio de cultura, que permaneceu em contato direto com a superfície dentinária. O esmalte

permaneceu voltado para cima e recebeu tratamentos distintos, de acordo com os grupos experimentais: GRUPO 1- considerado grupo controle, não recebeu tratamento clareador; GRUPO 2- Foi aplicado 0,04ml do produto Whiteness Perfect (FGM Produtos Odontológicos), à base de PC a 10%, por 3 horas diárias, tempo mínimo recomendado pelo fabricante; GRUPO 3- Recebeu o mesmo tratamento do Grupo 2, no entanto houve redução pela metade do tempo de exposição ao produto, que permaneceu sobre o esmalte por 1,5 horas diárias; GRUPO 4- Foi aplicado 0,04 ml do produto Whiteness Class (FGM Produtos Odontológicos), que contém PH a 6%, por 1,5 horas diárias, tempo recomendado pelo fabricante; GRUPO 5- Foi realizado o mesmo tratamento descrito no Grupo 4, no entanto o produto permaneceu em contato com o esmalte por metade do tempo descrito no grupo anterior, 45 minutos diários.

Todos os protocolos foram repetidos por 21 dias e durante o período em que as amostras não estavam sendo clareadas, permaneceram em contato com saliva artificial.

Mensuração da Cor: Os espécimes (n=15) foram submetidos à mensuração de cor em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), que utiliza o modelo de cores CIE L*a*b*, estabelecido pela *Comission Internationale de l'Eclairage – CIE* (Comissão Internacional sobre Iluminação). Para tanto, foram confeccionadas matrizes individualizadas de silicone preto, que possibilitaram padronizar o posicionamento do espécime durante as leituras. Foram realizadas três leituras de cada espécime e a média entre elas foi calculada. As leituras foram realizadas antes do início do tratamento, 24 horas após cada semana de clareamento e 7 dias após o término do tratamento.

O sistema CIE L*a*b* calcula a distância de cor entre dois pontos através da fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. O cálculo do ΔE teve como parâmetro a leitura realizada antes do início dos tratamentos e os valores foram tabulados de acordo com o grupo e tempo

de análise. Após o cálculo do ΔE , os valores foram tabulados e submetidos aos testes ANOVA e Fisher ($\alpha=5\%$).

Penetração Trans-amelodentinária de H_2O_2 : Para quantificação do H_2O_2 que penetrou através dos discos de esmalte/dentina, foi colocado 1ml de solução tampão de acetato a 2M (pH4,5) em casulos que receberam as CPAs. A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução que estabiliza o peróxido de hidrogênio difundido através da estrutura dental. Após o clareamento, 100 μ l dessa solução, já contendo o peróxido difundido, foi colhida e depositada em um tubo de ensaio com 100 μ l de corante violeta leucocristal (Sigma Chemical Co) a 0,5 mg/ml; 50 μ l de peroxidase extraída de rábano silvestre (Sigma Chemical Co) a 1mg/ml, e 2,750 ml de água destilada. Este método¹⁶ baseia-se na reação do peróxido de hidrogênio com a violeta leucocristal, catalizado pela enzima peroxidase. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de peróxido, tornando possível avaliar indiretamente a quantidade de peróxido difundida.

A densidade óptica da solução resultante foi mensurada em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão) em comprimento de onda de 596nm. Uma curva de calibração, com valores de absorbância de soluções de H_2O_2 de concentrações conhecidas, foi utilizada para converter os valores da densidade óptica obtidos em valores equivalentes a μ g/ml de peróxido. Os dados foram tabulados e submetidos aos testes ANOVA e teste de Fisher ($\alpha=5\%$).

A quantificação do PH foi realizada após cada semana de clareamento, sendo que a solução coletada para avaliação continha o peróxido referente a apenas ao último dia de clareamento.

Citotoxicidade Trans-amelodentinária: Células MDPC-23¹⁷ foram semeadas (30.000 células/cm²) em placas de 24 compartimentos (Costar Corp.) em meio de cultura DMEM completo (100 IU/ml penicilina; 100 mg/ml estreptomicina; 2 mmol/l glutamina; GIBCO,

Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO). As placas permaneceram em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, durante 48 h (Isotemp; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Os dispositivos disco/CPA foram esterilizados por oxido de etileno, sendo então posicionados em placas de 24 compartimentos contendo 1 ml de DMEM sem SFB. O produto clareador foi depositado na superfície de esmalte, como descrito anteriormente, por 7,14 ou 21 dias. O meio de cultura em contato com a dentina foi substituído a cada semana. Imediatamente após a realização da última aplicação do gel, uma alíquota de 500 µl do meio de cultura contendo os componentes da difusão trans-amelodentinária dos géis clareadores (extrato) foi aplicada sobre células MDPC-23 previamente cultivadas, permanecendo em contato por 1 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o metabolismo celular foi avaliado pelo teste de MTT, e a morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Avaliação do Metabolismo Celular (Teste de MTT): A análise da viabilidade celular (n=10) foi realizada pelo teste do MTT¹⁸, através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), que representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Após o período de incubação das células com os extratos, os mesmos foram substituídos pela solução de MTT (5 mg/ml; Sigma Chemical Co.) e as células foram incubadas por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os cristais de formazan formados nas células viáveis foram diluídos com solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl) e a absorbância mensurada em Leitor de Elisa (570 nm; Tp-reader). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

RESULTADOS

De uma forma geral, os géis promoveram alteração gradativa e contínua da cor desde a primeira semana de tratamento. A análise realizada aos 28 dias, ou seja, 07 dias após o término do tratamento, mostrou que o grupo tratado com PC10% por 3 horas proporcionou as

as maiores alterações de ΔE e não apresentou recidiva da cor. Por outro lado, foi observado que o clareamento com PH 6% por 45 minutos apresentou a menor variação cromática em todos os períodos e que o tratamento com PC 10% e com o PH6% por 1,5 horas apresentaram desempenhos semelhantes durante todo o tratamento (Tabela 1).

Com relação à difusão do PH, todos os grupos clareados diferiram do grupo controle. O protocolo utilizando PC 10% por 3 horas apresentou valores de difusão menores que do grupo PH 6%. Os grupos PC10% por 1,5 horas e PH6% por 45 minutos foram semelhantes entre si e causaram a menor penetração de peróxido de hidrogênio em todos os períodos analisados. Também foi verificado que o tratamento com o PH6% por 1,5 horas apresentou os valores mais elevados de penetração em todos os períodos avaliados (Tabela 2).

Apesar dos resultados do ΔE e da penetração trans-amelodentinária indicarem comportamentos distintos entre as terapias analisadas, o metabolismo celular não foi afetado por nenhum tratamento, permanecendo semelhante ao grupo controle ($p>0,05$) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O clareamento bem sucedido além de requerer a eficácia clareadora, não deve provocar danos ao tecido pulpar¹⁴. Neste contexto, as técnicas caseiras tem se destacado por possibilitarem a alteração cromática, com o mínimo de efeitos colaterais^{3,4,8,10,13}.

No presente estudo, foram avaliados protocolos alternativos da técnica caseira buscando otimizar os resultados, sem comprometer a segurança do procedimento. Observou-se o tratamento com PC10% por 3hs pode ser considerado o mais efetivo, pois produziu a maior alteração cromática e menor recidiva de cor após o término do tratamento.

Vale destacar que inicialmente, a técnica do clareamento caseiro consistia de oito horas diárias de uso da moldeira (noturno), durante até seis semanas¹⁹. No entanto, tem sido demonstrado que após 2h de aplicação do produto clareador, apenas 50% do princípio ativo

mantém-se disponível⁷ e que a maior parte dos tratamentos pode ser concluída em até 3 semanas¹⁰. Além disso, o uso prolongado da moldeira causa desconforto para o paciente, que por este motivo, muitas vezes opta pela técnica de consultório. Outro fato importante é que a desidratação que acontece durante o tratamento clareador é exacerbada quando adota-se tempos prolongados de uso da moldeira, contribuindo para o desenvolvimento da sensibilidade²⁰. Sabe-se que produtos clareadores mais concentrados causam maior sensibilidade^{8,13,21}, assim como um maior tempo de aplicação^{8,22}, o que nos motivou a estudar protocolos com tempo menor de utilização da moldeira.

No presente estudo, o tempo utilizado pela técnica de clareamento com PC10% seguiu as orientações do fabricante, que preconiza pelo menos 3 horas de uso diário da moldeira. A alternativa de redução do tempo de tratamento com o peróxido de carbamida (PC por 1,5h) inicialmente proporcionou resultados semelhantes à terapia padrão (PC10%), no entanto a efetividade foi menor nas análises realizadas aos 21 e aos 28 dias, quando foi observada significativa recidiva cromática. Apesar disso, a diferença no ΔE foi próximo à 1, o que pode ser clinicamente pouco relevante²³.

Neste contexto, Cardoso e colaboradores, 2010⁸ avaliaram a efetividade e a sensibilidade associada ao clareamento com PC10% em diferentes tempos. Na oportunidade foi observado que 8 horas de clareamento durante 16 dias produziu o mesmo efeito clareador que o obtido com 1 hora de tratamento por 18 dias. Também foi reportado que os pacientes que usaram o produto por 8 horas relataram sensibilidade com maior frequência e intensidade, sugerindo que a redução do tempo de uso da moldeira poderia ser vantajosa.

Outra posologia que seguiu as orientações de uso do fabricante foi o tratamento com PH6% por 1,5 horas. Durante as duas primeiras semanas de tratamento, a alteração cromática aconteceu de forma semelhante à ocorrida com o tratamento com PC10%. No entanto, este protocolo foi menos efetivo na avaliação realizada após 21 dias de clareamento, propiciando

significativa recidiva cromática após o término do tratamento. Também foi verificado que para este produto, a redução do tempo de aplicação para 45 minutos comprometeu significativamente o resultado clareador em todos os momentos de análise, representando o pior tratamento clareador estudado.

Comparando o desempenho dos grupos PC10% e o PH6% com o mesmo tempo de aplicação (1,5 horas), observou-se que apesar do peróxido estar disponível em maior quantidade e de forma imediata no produto utilizado no grupo PH6%, as duas formas de tratamento foram igualmente eficazes. Estas observações se juntam a outras encontradas na literatura, que mostram a mesma efetividade de produtos de diferentes concentrações, pela técnica caseira com peróxido de carbamida^{21, 24,25} ou na técnica de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% e 38%²⁴⁻²⁶. Hanning e colaboradores, 2007²⁰, também avaliaram produtos clareadores à base de PC10% e PH6% e encontraram eficácia semelhante. Estes resultados tornam questionável a necessidade de aumentar a concentração do agente clareador com o objetivo de melhorar o resultado final do tratamento, já que a maior concentração nem sempre leva a um melhor resultado.

Quando em análise a penetração trans-amelodentinária de peróxido de hidrogênio, observou-se que o tratamento com o PH 6% por 1,5 horas possibilitou os mais elevados valores de penetração, seguido do PC10% por 3 horas. Os grupos PC10% por 1,5 horas e PH 6% por 45 minutos foram semelhantes entre si e causaram a menor penetração. Os produtos a base de peróxido de hidrogênio, por ser o composto ativo, proporcionam uma difusão mais rápida através da estrutura dental, enquanto que os produtos à base de peróxido de carbamida ainda devem dissociar-se para liberar apenas 3,3% de peróxido de hidrogênio¹². Para que toda esta reação ocorra, necessita-se de um tempo maior de contato do produto com o tecido dental. Cooper e colaboradores em 1992¹² mostraram que em concentrações equivalentes de

peróxido, o de carbamida causa menor penetração para a câmara pulpar que o peróxido de hidrogênio.

Para a avaliação da citotoxicidade, com o intuito de aproximar a metodologia das condições *in vivo*, foram utilizadas além das CPAs, células MDPC-23. Estas células, foram estabelecidas por Hanks e colaboradores em 1998¹⁷, e desde então tem sido bastante relatadas na literatura^{14,15,27}. Estas células odontoblastóides de linhagem imortalizada, isoladas da papila dentária de molar de camundongos (Mouse Dental Papillae Cells), apresentam características morfológicas e funcionais semelhantes às de células odontoblásticas, mas com pouca habilidade de induzir a formação de dentina²⁸. Estas são as células mais apropriadas para se avaliar *in vitro*, os efeitos adversos de materiais dentários, uma vez que os odontoblastos são as primeiras células pulpares a serem afetadas pelos produtos difundidos através do tecido dental²⁹.

A diferença observada entre os grupos na penetração do peróxido de hidrogênio não se refletiu na citotoxicidade do tratamento, uma vez que todos os grupos apresentaram taxa de metabolismo celular semelhante ao controle.

Um estudo com metodologia semelhante, avaliou 2 géis clareadores à base de peróxido de carbamida a 10% e a 16%, aplicados por 8 horas diárias. Os autores também não observaram redução do metabolismo celular quando foi utilizado o gel contendo PC10%, no entanto, houve redução nos grupos tratados com o produto a 16%¹⁵. Vale destacar que o peróxido de carbamida a 16% produz aproximadamente 5,3% de peróxido de hidrogênio, concentração inferior à do produto utilizado nesta pesquisa e que não causou danos no metabolismo celular. Possivelmente este fato deve estar associado ao tempo reduzido de exposição aos agentes agressores, lembrando que o PH a 6% foi aplicado no esmalte por 1,5 horas ou 45 minutos, enquanto que na referida pesquisa o PC a 16% permaneceu por 8 horas diárias sobre o tecido dental.

No entanto, vale destacar, que o extrato final obtido e aplicado sobre as células, refere-se a apenas uma única aplicação do produto na superfície dental. Desta maneira, apesar do efeito do clareador representar a totalidade da alteração cromática proporcionada pelo tratamento, os efeitos citotóxicos observados foram produzidos por um único dia de tratamento. Este fato pode ter amenizado os efeitos celulares, entretanto, em uma situação *in vivo*, fatores como pressão intra-pulpar, presença de prolongamentos citoplasmáticos nos túbulos dentinários^{30,31}, além da presença de enzimas antioxidantes e mecanismos de defesa da polpa^{32,33} também poderiam diminuir a difusão do peróxido, bem como atenuarem a intensidade da agressão.

Estudos *in vivo* realizados em pré-molares humanos após a aplicação de PC10% também mostram que esta opção de tratamento não produz injúrias pulpares graves^{34,35}, sendo as reações teciduais, quando presentes, reversíveis após o término do tratamento³⁵.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo pode-se concluir que: (1) a redução do tempo de exposição ao clareador prejudica a efetividade clareadora dos tratamentos realizados com PC10% e PH6%; (2) todos os protocolos foram efetivos para clarear dentes, no entanto o PH6% por 45 min causou a menor alteração de cor; (3) a alteração de cor ocorre de forma gradativa e contínua até a terceira semana de tratamento; (4) o grupo que utilizou PH6% por 1,5 horas proporcionou a maior penetração trans-amelodentinária de peróxido de hidrogênio; (5) os protocolos utilizados não causam redução do metabolismo das células de linhagem odontoblástica.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processos #2010/10378-2- Bolsa de Doutorado e #2010/17637-3- Auxílio Regular) e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp- Fundunesp pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prinz, H. Recent improvements in tooth bleaching: a clinical syllabus. *The Dental Cosmos* 1924; 66:558-560.
2. Haywood, V. B; Heymann, H. O. Nightguard vital bleaching. *Quint Int* 1989; 20:173-176.
3. Auschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent* 2005; 30:156-63.
4. Briso ALF, Fonseca MSM, de Almeida LCAG, Mauro SJ, dos Santos PH. Color Alteration in Teeth Subjected to Different Bleaching Techniques. *Laser Physics* 2010; 20: 2066–2069.
5. Buchalla, W; Attin, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser – a systematic review. *Dent Mater* 2007; 23:586-596.
6. Haywood VB Bleaching of vital teeth: Current concepts and research. *Quint Int* 1997 28:424-425.
7. Matis BA, Gaiao U, Blackman D, Schultz FA, Eckert GJ. In vivo degradation of Bleaching gel used in whitening teeth. *J Am Dent Assoc* 1999; 130(2): 227-235.
8. Cardoso PC, Reis A, Loguercio A, Vieira LC, Baratieri LN. Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. *J Am Dent Assoc* 2010; 141(10):1213-1220.
9. Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to the in-office tooth bleaching treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:59-64.

10. Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML, Briso AL. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent* ; 2012; 32(3):303-309.
11. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamideperoxide bleaching agents. *J Endod* 1992; 8(7):315-317.
12. de Almeida LC, 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.
13. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater.* 2005; 21: 103-109.
14. 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* 2012, In Press.
15. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J* 2011; 44(2):116-125.
16. Mottola HA.; Simpson BE.; Gorin, G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal Chem* 1970; 42(3):410-411.
17. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998; 37:233-249.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.

19. Leonard RH Jr, Haywood VB, Phillips C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. *Quint Int* 1997;28:527-534.
20. Hannig C, Lindner D, Attin T. Efficacy and tolerability of two home bleaching systems having different peroxide delivery. *Clin Oral Investig* 2007;11(4):321-329.
21. Krause F, Jepsen S, Braun A. Subjective intensities of pain and contentment with treatment outcomes during tray bleaching of vital teeth employing different carbamide peroxide concentrations. *Quint Int* 2008;39(3):203-9.
22. Marson FC, Sensi LG, Araújo FO, Junior Monteiro S, Araújo E. Avaliação clínica do clareamento dental pela técnica caseira. *R Dental Press Estet* 2005; 2:84-90.
23. Stober T, Gilde H, Lenz P. Color stability of highly filled composite resin materials for facings. *Dent Mater* 2001;17(1):87-94.
24. Dietschi D, Rossier S, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. *Quint Int* 2006; 37:515-526.
25. Basting R, Amaral F, França F, Flório F. Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents. *Oper Dent* 2012; 37(5):464-473.
26. Matis BA, Cochran MA, Franco M, Al-Ammar W, Eckert GJ, Stropes M. Eight in-office tooth whitening systems evaluated in vivo: a pilot study. *Oper Dent* 2007; 32(4):322-7
27. Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J* 2009; 42(6) 516-524.

28. Rodriguez AP, Tsujigiwa H, Gunduz M, Cengiz B, Nagai N, Tamamura R, Borkosky SS, Takagi T, Inoue M, Nagatsuka H. Influence of the microenvironment on gene and protein expression of odontogenic-like and osteogenic-like cells. *Biocell* 2009; 33(1):39-47.
29. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(1):13-27.
30. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Prati C. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2007; 23(6):705-713.
31. Vongsavan N, Matthews B. The permeability of cat dentine in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol* 1991; 36 (9):641-646.
32. Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod* 1992; 18(11):527-534.
33. Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci* 2003;111(5):454-456.
34. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent* 2004;29: 363-368.
35. Fugaro OJ, Fugaro JO, Matis B, Gregory RL, Cochran MA, Mjör I. The dental pulp: inflammatory markers and vital bleaching. *Am J Dent* 2005;18(4):229-232.

Tabela 1- Média (desvio padrão) dos valores de Delta E, e decisão estatística tomadas para os diferentes protocolos de clareamento caseiro.

	Controle	PC 10%- 3hs	PC 10% 1,5 hs	PH 6% 1,5 hs	PH 6% 45 min.
7 dias	1,47 (0,71) C ab	3,86 (1,01) A c	3,76 (0,54) A d	3,55 (0,30) Ad	2,84 (0,55) Bd
14 dias	1,80 (0,29) C a	5,32 (1,04) A b	4,93 (0,61) A c	4,85 (0,74) A c	3,64 (0,50) Bc
21 dias	1,52 (0,31) D ab	6,97 (0,90) A a	6,31 (0,74) B a	6,10 (0,57) B a	4,52 (0,54) Ca
28 dias	1,18 (0,47) D b	6,75 (0,90) A a	5,70 (0,86) B b	5,46 (0,76) B b	3,99 (0,60) Cb

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas ou minúsculas nas colunas, diferem entre si (p<0,05)

Tabela 2- Média (desvio padrão) da quantidade de peróxido (em µg/ml) que penetrou através dos espécimes nos diferentes protocolos de clareamento caseiro.

	Controle	PC 10% 3hs	PC 10% 1,5 hs	PH 6% 1,5 hs	PH 6% 45 min.
7 dias	0,12 (0,06) D a	0,40 (0,07) B b	0,26 (0,07) C b	0,46 (0,09) A b	0,26 (0,06) C b
14 dias	0,09 (0, 04) D a	0,46(0,28) B a	0,31 (0,05) C a	0,52(0,07) A a	0,32 (0,05) C a
21 dias	0,13(0,03) C a	0,39(0,18) A b	0,26 (0,05) B b	0,42(0,09) A b	0,29 (0,05) B ab

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas, diferem entre si (p<0,05)

Tabela 3: Média dos valores em porcentagem do metabolismo celular para os grupos de clareamento caseiro e controle.

Grupos	Média
Controle	100,00
PC10% 3hs 7dias	96,29
PC10% 3hs 14dias	104,19
PC10% 3hs 21dias	93,52
PC10% 1,5 hs7 dias	99,26
PC10% 1,5 hs 14 dias	102,04
PC10% 1,5hs 21 dias	92,81
PH 6% 1,5 hs 7dias	98,63
PH 6% 1,5 hs 14dias	97,66
PH 6% 1,5 hs 21dias	91,26
PH 6% 45min 7dias	92,67
PH 6% 45min 14dias	98,13
PH 6% 45min 21dias	95,35

Anexos

ANEXO A – Norma da revista selecionada para a publicação do artigo 1

Operative Dentistry

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Dear Authors,

We are so grateful to each of you for continuing to provide *Operative Dentistry* with such outstanding manuscripts to consider. We have seen a steady increase each year in the number of manuscripts that are sent to us for publication consideration. For example, in 2012 we received 505 manuscripts—a 238% increase over 2002 and a 742% increase over 1992, 80 were printed for a 15% acceptance rate. Because of the costs of maintaining a manuscript submission system that can deal with this kind of traffic, our costs are increasing as fast as our submission rate. Unfortunately, it has come time that we need to pass a small portion of these costs on to you, our submitting authors. *Operative Dentistry* is charged by our submission vendor 25.00USD per manuscript that goes through our system, whether it is accepted for publication or not. Beginning with the first submission of 2013, that cost will now be charged to our authors to submit a manuscript into our system; it is a one time cost per manuscript, meaning that even if you are asked to submit several revisions of your paper, only the original submission will be charged. This 25.00USD fee will be required for a manuscript to be considered in any way. Please understand that this fee is charged to us by our vendor, and will be non-refundable. Paying the submission fee will have no bearing on whether or not your manuscript will be accepted either for review, or for publication. We thank you for understanding the necessity of this step. Should you have any questions about this new policy, please contact our offices at editor@jopdent.org.

Sincerely,

Operative Dentistry Office Staff

All submitted manuscripts will be subject to the possibility of e-publication only. We now have the option of assigning 3-5 articles to each issue that will be published exclusively at our online journal www.jopdentonline.org. These e-pub articles will be paginated with an "e" prefix and will carry a fully citable DOI number. If you are not interested in the possibility of having your paper published only electronically, please do not submit your manuscript to us. Your authorization to allow us to e-publish will help us to publish manuscripts even faster than we have in the past. Our goal is to have a manuscript through the review process (submission to acceptance) in 2 months and from acceptance to publication within 2 months. Please feel free to send any questions about this policy to editor@jopdent.org.

Operative Dentistry requires electronic submission of all manuscripts. All submissions must be sent to Operative Dentistry using the [Allen Track upload site](#). Your manuscript will only be considered officially submitted after it has been approved through our initial quality control check, and any problems have been fixed. You will have 6 days from when you start the process to submit and approve the manuscript. After the 6 day limit, if you have not finished the submission, your submission will be removed from the server. You are still able to submit the manuscript, but you must start from the beginning. Be prepared to submit the following manuscript files in your upload:

- A Laboratory or Clinical Research Manuscript file must include:
 - a title
 - a running (short) title
 - a clinical relevance statement
 - a concise summary (abstract)
 - introduction, methods & materials, results, discussion and conclusion
 - references (see Below)
 - The manuscript **MUST NOT** include any:
 - identifying information such as:
 - Authors
 - Acknowledgements
 - Correspondence information
 - Figures
 - Graphs
 - Tables
- An acknowledgement, disclaimer and/or recognition of support (if applicable) must in a separate file and uploaded as supplemental material.
- All figures, illustrations, graphs and tables must also be provided as individual files. These should be high resolution images, which are used by the editor in the actual typesetting of your manuscript. Please refer to the instructions below for acceptable formats.
- All other manuscript types use this template, with the appropriate changes as listed below.

Complete the online form which includes complete author information and select the files you would like to send to Operative Dentistry. Manuscripts that do not meet our formatting and data requirements listed below will be sent back to the corresponding author for correction.

GENERAL INFORMATION

- All materials submitted for publication must be submitted exclusively to Operative Dentistry.
- The editor reserves the right to make literary corrections.
- Currently, color will be provided at no cost to the author if the editor deems it essential to the manuscript. However, we reserve the right to convert to gray scale if color does not contribute significantly to the quality and/or information content of the paper.
- The author(s) retain(s) the right to formally withdraw the paper from consideration and/or publication if they disagree with editorial decisions.
- International authors whose native language is not English must have their work reviewed by a native English speaker prior to submission.

- Spelling must conform to the American Heritage Dictionary of the English Language, and SI units for scientific measurement are preferred.
- While we do not currently have limitations on the length of manuscripts, we expect papers to be concise; Authors are also encouraged to be selective in their use of figures and tables, using only those that contribute significantly to the understanding of the research.
- Acknowledgement of receipt is sent automatically. If you do not receive such an acknowledgement, please contact us at editor@jopdent.org rather than resending your paper.
- **IMPORTANT:** Please add our e-mail address to your address book on your server to prevent transmission problems from spam and other filters. Also make sure that your server will accept larger file sizes. This is particularly important since we send page-proofs for review and correction as .pdf files.

REQUIREMENTS

• FOR ALL MANUSCRIPTS

1. **CORRESPONDING AUTHOR** must provide a WORKING / VALID e-mail address which will be used for all communication with the journal.

NOTE: Corresponding authors **MUST** update their profile if their e-mail or postal address changes. If we cannot contact authors within seven days, their manuscript will be removed from our publication queue.

2. **AUTHOR INFORMATION** must include:
 - full name of all authors
 - complete mailing address **for each author**
 - degrees (e.g. DDS, DMD, PhD)
 - affiliation (e.g. Department of Dental Materials, School of Dentistry, University of Michigan)
3. **MENTION OF COMMERCIAL PRODUCTS/EQUIPMENT** must include:
 - full name of product
 - full name of manufacturer
 - city, state and/or country of manufacturer

4. **MANUSCRIPTS AND TABLES** must be provided as Word files. Please limit size of tables to no more than one US letter sized page. (8 ½" x 11")

5. **ILLUSTRATIONS, GRAPHS AND FIGURES**

Photographs submitted to Operative dentistry must be unretouched.

They may be cropped, annotated and/or aggregated with other photos, but each photo must remain unretouched.

Illustrations, graphs and figures must be provided as TIFF or JPEG files with the following parameters:

- line art (and tables that are submitted as a graphic) must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 600 dpi and a maximum resolution of 1200

dpi. This means the shortest side should be no smaller than 3000 pixels.

- gray scale/black & white figures must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means the shortest side should be no smaller than 1500 pixels.
- color figures must be sized with the short edge being no shorter than 3.5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means that the shortest side should be no smaller than 1050 pixels.
- color photographs must be sized with the short edge being no shorter than 3.5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means that the shortest side should be no smaller than 1050 pixels.

• OTHER MANUSCRIPT TYPES

1. CLINICAL TECHNIQUE/CASE STUDY MANUSCRIPTS must include:

- a running (short) title
- purpose
- description of technique
- list of materials used
- potential problems
- summary of advantages and disadvantages
- references (see below)

2. LITERATURE AND BOOK REVIEW MANUSCRIPTS must include:

- a running (short) title
- a clinical relevance statement based on the conclusions of the review
- conclusions based on the literature review...without this, the review is just an exercise
- references (see below)

• FOR REFERENCES

REFERENCES must be numbered (superscripted numbers) consecutively as they appear in the text and, where applicable, they should appear after punctuation.

The reference list should be arranged in numeric sequence at the end of the manuscript and should include:

1. Author(s) last name(s) and initial (ALL AUTHORS must be listed) followed by the date of publication in parentheses.
2. Full article title.
3. Full journal name in italics (no abbreviations), volume and issue numbers and first and last page numbers complete (i.e. 163-168 NOT attenuated 163-68).
4. Abstracts should be avoided when possible but, if used, must include the above plus the abstract number and page number.

5. Book chapters must include chapter title, book title in italics, editors' names (if appropriate), name of publisher and publishing address.
6. Websites may be used as references, but must include the date (day, month and year) accessed for the information.
7. Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner with "In press" following the journal name.
8. **DO NOT** include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
9. References that contain Crossref.org's DOIs (Digital Object Identifiers) should always be displayed at the end of the reference as permanent URLs. the prefix <http://dx.doi.org/> can be appended to the listed DOI to create this URL.
IE <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1995.0238>

EXAMPLES OF REFERENCE STYLE

- Journal article: two authors
Evans DB & Neme AM (1999) Shear bond strength of composite resin and amalgam adhesive systems to dentin *American Journal of Dentistry* **12(1)** 19-25.
- Journal article: multiple authors
Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH & Robinson SJ (1997) Current concepts on adhesion to dentin *Critical Review of Oral and Biological Medicine* **8(3)** 306-335.
- Journal article: special issue/supplement
Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P & Vanherle G (2001) Adhesives and cements to promote preservation dentistry *Operative Dentistry* (**Supplement 6**) 119-144.
- Abstract:
Yoshida Y, Van Meerbeek B, Okazaki M, Shintani H & Suzuki K (2003) Comparative study on adhesive performance of functional monomers *Journal of Dental Research* **82(Special Issue B)** Abstract #0051 p B-19.
- Corporate publication:
ISO-Standards (1997) ISO 4287 Geometrical Product Specifications Surface texture: Profile method – Terms, definitions and surface texture parameters *Geneve: International Organization for Standardization* **1st edition** 1-25.
- Book: single author
Mount GJ (1990) *An Atlas of Glass-ionomer Cements* Martin Duntz Ltd, London.
- Book: two authors
Nakabayashi N & Pashley DH (1998) *Hybridization of Dental Hard Tissues* Quintessence Publishing, Tokyo.
- Book: chapter
Hilton TJ (1996) Direct posterior composite restorations In: Schwartz RS, Summitt

JB, Robbins JW (eds) *Fundamentals of Operative Dentistry* Quintessence, Chicago 207-228.

- Website: single author
Carlson L (2003) Web site evolution; Retrieved online July 23, 2003 from:
<http://www.d.umn.edu/~lcarlson/cms/evolution.html>
 - Website: corporate publication
National Association of Social Workers (2000) NASW Practice research survey 2000. NASW Practice Research Network, 1. 3. Retrieved online September 8, 2003 from:
<http://www.socialworkers.org/naswprn/default>
 - Website: Online Early/Pre-published/Epub ahead of print/p>p*
- Smith, JR, Brown, AB. 15 Year follow-up on At-home Tray Bleaching, A Case Study. Journal of Oral Traditions. Prepublished Sep 20, 2010. doi: 10.1177/01234-67891-3456
- *these references must have some form of permanent reference such as a doi in order to be used in this form - otherwise, please reference as listed under "Website: single Author"
- Journal Article with DOI: SA Feierabend, J Matt & B Klaiber (2011) A Comparison of Conventional and New Rubber Dam Systems in Dental Practice. **Operative Dentistry** 36(3) 243-250, <http://dx.doi.org/10.2341/09-283-C>

ANEXO B – Norma da revista selecionada para a publicação do artigo 2

Information for Authors

The AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY is published six times a year in February, April, June, August, October and December by *Mosher & Linder, Inc.*

The **AJD** invites submission of research manuscripts and reviews related to the clinical practice of dentistry. Manuscripts are considered for publication with the understanding that they have not been published elsewhere in any form or any language, are submitted solely to the **AJD**, and if accepted for publication in the **AJD**, they will not be published elsewhere in the same form or in any other language, without the consent of the Editor. Manuscripts are reviewed by at least two referees.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor, Managing Editor, Editorial Board members or publisher of the **AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY**.

All correspondence from the Editorial Office will be made with the designated Corresponding Author unless otherwise specified in a letter by the authors.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS. Papers should be written in proper American English, double spaced, with liberal margins, and **only submitted by E-mail to the Editor**, with the text and tables in Microsoft Word files and illustrations in JPEG image format.

Papers reporting results of original research should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), and References.

CLINICAL RESEARCH PAPERS. Need to follow the CONSORT Statement (Needleman I, *et al. Am J Dent* 2008;21: 7-12).

DISCLOSURE STATEMENT. The *American Journal of Dentistry* is instituting a policy to disclose conflicts of interest, as well as sponsorship of studies published in the Journal. Please provide information regarding any conflict of interest relationships of all authors, or state that each author has no conflict.

Examples of common financial relationships include: employment, consultancies, stock ownership, honoraria, and paid expert testimony. You can read more about other potential conflict of interests and the general policy at: <http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/supplements.html> and <http://www.icmje.org/#conflicts>

COPYRIGHT RELEASE. The following statement, signed by all authors, should accompany all manuscripts: "All manuscript's copyright ownership is transferred from the author(s) of the article (title of article), to the American Journal of Dentistry in the event the work is published. The manuscript has not been published in any form or any language and is only submitted to the American Journal of Dentistry".

TITLE PAGE should include the title of the manuscript, all authors' full names and degrees, affiliations to institution or private practice, designation and address of corresponding author, telephone and fax numbers and e-mail address.

Disclosure statement

ABSTRACT PAGE should follow the title page and only contain: the title of the manuscript, the abstract and the clinical significance sections. On the abstract page, the name(s) of the author(s) should not appear. The abstract should have the following sections: Purpose, Methods, and Results.

CLINICAL SIGNIFICANCE. As a separate sentence after the abstract, a short statement should highlight the clinical significance of the manuscript.

REFERENCES. All references and only those cited in the text should appear in the list of references. They should be numbered consecutively as they appear in the text of the paper. Reference formatting programs should not be used.

When a paper cited has three or more authors, it should appear in the text thus: Gwinnett *et al.*¹ In the Reference section, article references must include the names and initials of all the authors, the full title of the paper, the abbreviated title of the journal, year of publication, the volume number, and first and last page numbers, *e.g.*:

Journals:

1. Thornton JB, Retief DH, Bradley EA. Marginal leakage of two glass ionomer cements: Ketac-Fil and Ketac-Silver. *Am J Dent* 1988; 1: 35-38.

Abstracts:

2. Alpegiani M, Gagliani M, Re D. Operator influence using adhesive systems: One bottle vs. multi bottles. *J Dent Res* 1998;77: 942 (Abstr 2487).

Online abstracts:

3. Bayne SC, Wilder Jr AD, Perdigão J, Heymann HO, Swift EJ. 4-year wear and clinical performance of packable posterior composite. *J Dent Res* 2003;86 (Sp Is A): (Abstr 0036).

Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner in the text and in the list of references with the journal title, accompanied by "In press," *e.g.*:

3. Crim GA, Abbott LJ. Effect of curing time on marginal sealing by four dentin bonding agents. *Am J Dent*, In press.

Book and monograph references should include author, title, city, publisher, year of publication, and page numbers, *e.g.*:

4. Malone WFP, Koth DL. *Tylman's theory and practice of fixed prosthodontics*. St. Louis: Ishiyaku Euro-America, 1989; 110-123.

5. Ripa LW, Finn SB. The care of injuries to the anterior teeth of children. In: Finn SB. *Clinical pedodontics*. 4th ed, Philadelphia: WB Saunders, 1973; 125.

Personal communications should only appear in parentheses in the text and not in the list of references.

ILLUSTRATIONS. Illustrations should be numbered, provided with suitable legends, and kept to the minimum essential for proper presentation of the results. Color illustrations will be published at the authors' expense.

Contact the Managing Editor at (954) 888-9101 or amjdent@amjdent.com.

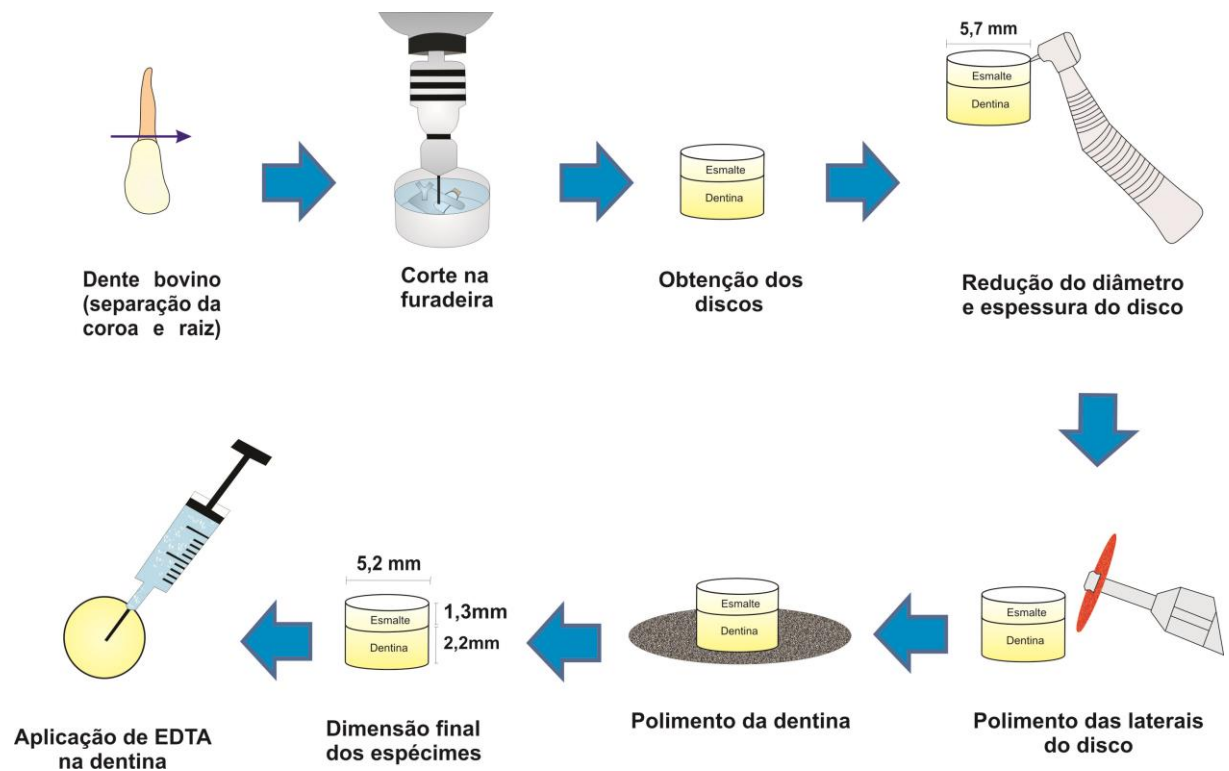
Legends are required for all illustrations and should be typed as a group on a separate page. For photomicrographs, legends must specify original magnification and stain (if used).

TABLES should be logically organized and should supplement the information provided in the text. Each table should be typed on a separate page with the number, title and footnotes. Tables should be kept to the minimum essential for proper presentation of the results.

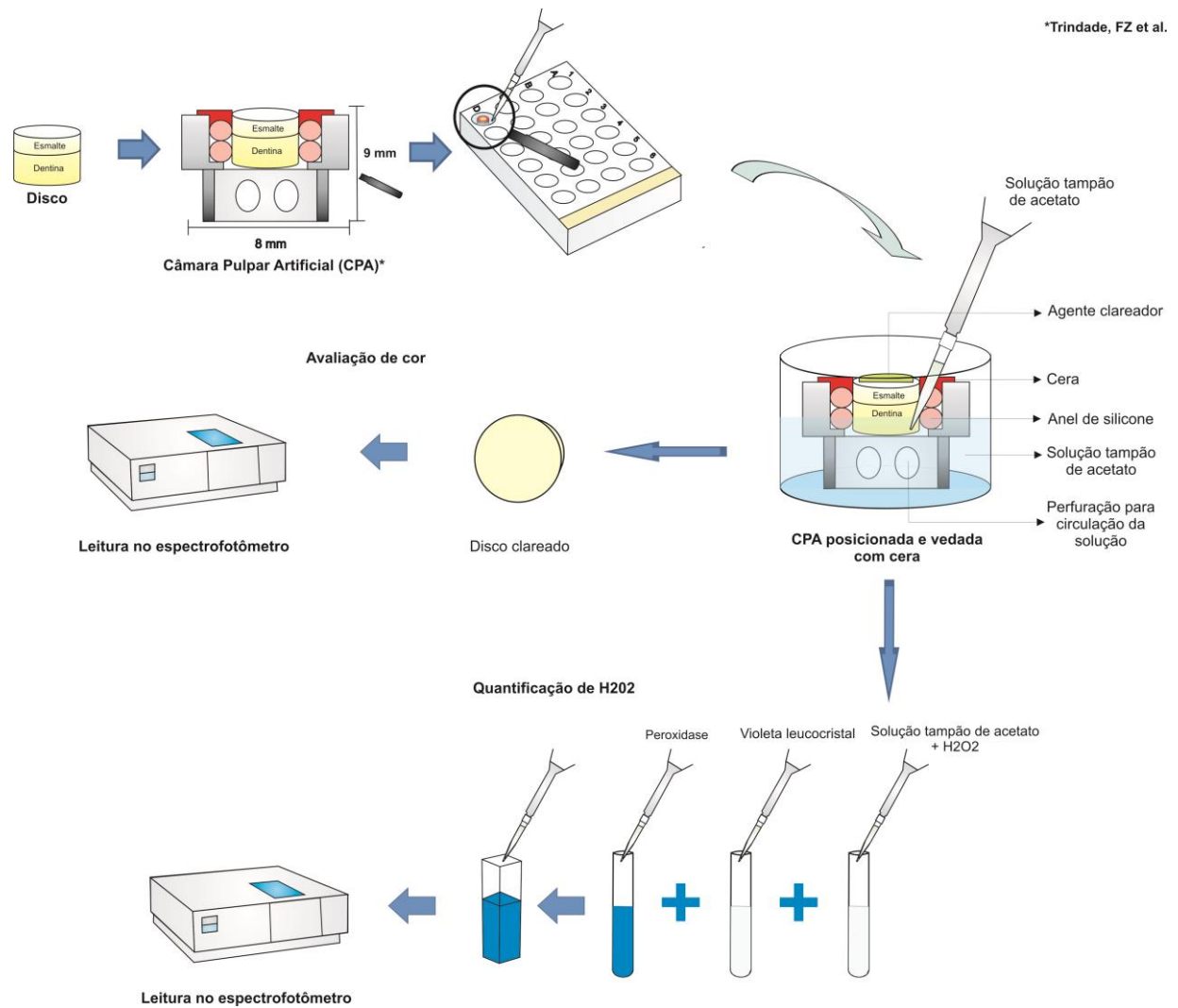
Permissions from author and publisher must be obtained for the direct use of previously published material including text, photographs, drawings, etc. The original permission should be then included with the manuscript.

REPRINTS. For reprints contact the Business Office at (954) 888-9101 or amjdent@amjdent.com.

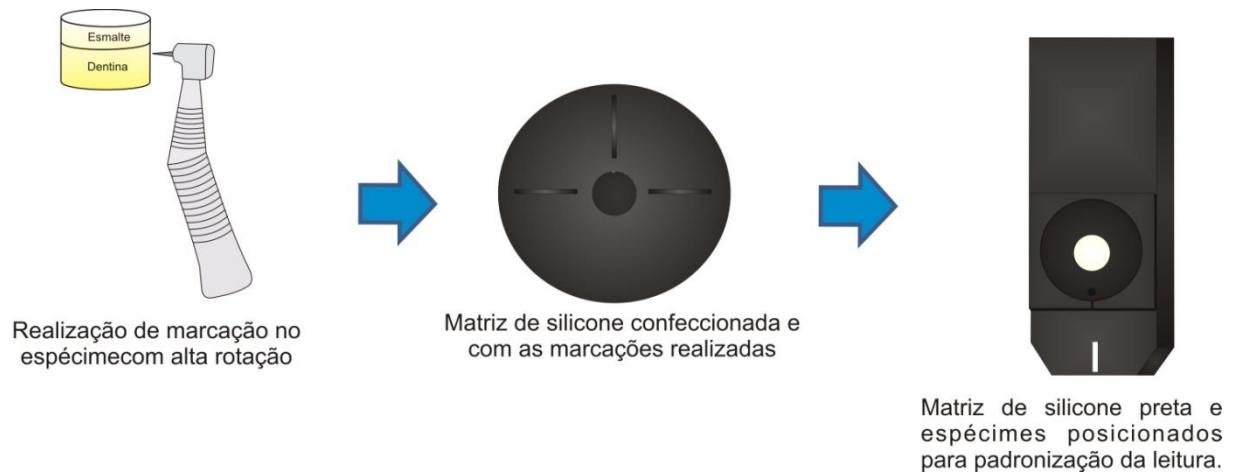
ADDRESS. All manuscripts should be sent to the Editor by e-mail only to: godoy@amjdent.com

ANEXO C– Esquemas Representativos das Etapas da Metodologia**Esquema 1- Obtenção dos espécimes**

*Trindade, FZ et al.



Esquema 2- Avaliação da alteração de cor e difusão de peróxido de hidrogênio



Esquema 3- Confeção de dispositivo para padronização da leitura de cor dos espécimes.