



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



Beatriz Voss Martins

**Influência da associação entre biomateriais poliméricos e LED violeta sobre
a eficácia estética, cinética de degradação e citotoxicidade de géis
clareadores**

Araraquara

2022



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



Beatriz Voss Martins

**Influência da associação entre biomateriais poliméricos e LED violeta sobre
a eficácia estética, cinética de degradação e citotoxicidade de géis
clareadores**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia; Área de Reabilitação Oral.

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2022

M386i Martins, Beatriz Voss
Influência da associação entre biomateriais poliméricos e LED
violeta sobre a eficácia estética, cinética de degradação e
citotoxicidade de géis clareadores / Beatriz Voss Martins. --
Araraquara, 2022
89 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

1. Clareamento dental. 2. Toxicidade. 3. Odontoblastos. 4. Técnica
de cultura de células. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Beatriz Voss Martins

Influência da associação entre biomateriais poliméricos e LED violeta sobre a eficácia estética, cinética de degradação e citotoxicidade de géis clareadores

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – Área de Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Gelson Luis Adabo

3º Examinador: Débora Alves Nunes Leite Lima

Araraquara, 1 de abril de 2022.

DADOS CURRICULARES

Beatriz Voss Martins

NASCIMENTO	30/03/1998 – Sapucaia do Sul – Rio Grande do Sul
FILIAÇÃO	Isaac Amador Martins Kelly Christina Voss Martins
2015-2019	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Pará – UFPA
2021	Estágio Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2020-2022	Pós-graduação em Odontologia – Área de Reabilitação Oral pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais, **Isaac Amador Martins e Kelly Christina Voss Martins**, aqueles que representam meu alicerce na terra e são os maiores responsáveis por esta conquista.

AGREDECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente à **Deus**, por me fazer sentir Sua presença em cada etapa da minha vida, me trazendo paz e força diante das dificuldades e esperanças para o futuro. Soli Deo Gloria!

À minha família, meus pais **Isaac** e **Kelly**, por acreditarem em mim mais que eu mesma, por me darem o incentivo e investirem e apoiarem todos os meus sonhos. Aos meus irmãos **Brenda** e **Gabriel**, por compartilharem a felicidade nas nossas vitórias, pela torcida e parceria de sempre. Ao **Rayann**, por toda ajuda e incentivo durante esses dois anos. Amo muito vocês!

Ao meu orientador, **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por acreditar em mim, pela oportunidade de ser sua orientada e abrir as portas do Laboratório de Patologia Experimental de Biomateriais (LPEB). Sua orientação foi muito importante para meu crescimento pessoal e profissional por sempre nos estimular a buscar a excelência. Serei sempre grata por ter feito parte do seu grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. **Josimeri Hebling**, pelo seu apoio e carinho de sempre, pelas contribuições no trabalho e pelas palavras de incentivo a cada etapa a ser executada.

Aos amigos de laboratório, **Igor, Carol, Uxua, Malu, Taísa, Laís, Isa, Vitória, Lídia e Rafa**, por todo aprendizado e suporte no decorrer destes 2 anos, cada trabalho ali executado tem um pouco do esforço de cada um, dessa forma, meu muito obrigada!

Ao grupo de clareamento, **Rafael** pelos ensinamentos das metodologias e pelo apoio estatístico crucial. **Marlon**, meu parceiro de pesquisa, obrigada por segurar minha mão nesses 2 anos, sei que fomos o equilíbrio um do outro para desenvolvermos estes trabalhos. Tenho muito orgulho disso.

Aos amigos de percurso, **Fernanda Ali, Amanda Ferro, Hamile Viotto, Nathália Fusco** e **Beatriz Ribas**, sou muito grata por ter tido a oportunidade de conhecer pessoas tão especiais. Obrigada por todos os momentos, desabafos e consolos, espero mantê-los em minha vida daqui para frente! Torço pelo sucesso de vocês!

Aos amigos que estavam distantes, mas sempre se fizeram presentes, **Larissa, Carol, Pamela, Ana, Aline, Thaianna, Geovanni, Paula e Darling**, amizade verdadeira não é fácil de se encontrar, que bom que tenho vocês!

AGRADECIMENTOS GERAIS

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara** (FOAr-UNESP), representada pelo Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, que através de todos seus funcionários e professores, possibilitaram a conclusão desta etapa em minha vida.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** da FOAr-UNESP) do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo seu coordenador Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, local de realização da presente pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, representado pelo coordenador Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri e pela Vice-coordenadora Dra. Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili e a todos os funcionários e professores que contribuíram para minha formação nesta etapa da pós-graduação.

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/08950-1) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Observar os detalhes da realidade para deduzir deles aquilo que não vemos diretamente, mas cujos indícios podemos seguir. Conscientes de que podemos sempre nos enganar e, portanto, dispostos a cada instante a mudar de ideia se aparecer um novo indício, mas sabendo também que, se formos competentes, compreenderemos corretamente, e descobriremos. A ciência é isso.”

Carlo Rovelli*

* Rovelli C. Sete breves lições de física. São Paulo: Objetiva; 2015.

Martins BV. Influência da associação entre biomateriais poliméricos e LED violeta sobre a eficácia estética, cinética de degradação e citotoxicidade de géis clareadores [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A catálise do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente nos géis clareadores pode favorecer o resultado estético e reduzir a citotoxicidade causada pelo clareamento dental de consultório. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da aplicação em esmalte, de um scaffold nanofibrilar (SN) e um primer polimérico contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica (PPC), sobre a eficácia estética, cinética de degradação e citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H_2O_2 , irradiados ou não com LED violeta (LED). Para isso, os seguintes grupos foram estabelecidos: **G1**- Nenhum tratamento (controle negativo); **G2**- SN+PPC; **G3**- LED; **G4**- SN+PPC+LED; **G5**- 35% $H_2O_{2comercial}$ (controle positivo); **G6**- SN+PPC+35% $H_2O_{2comercial}$; **G7**- SN+PPC+35% $H_2O_{2comercial}$ +LED; **G8**- 35% H_2O_2 ; **G9**- SN+PPC+35% H_2O_2 ; **G10**- SN+PPC+35% H_2O_2 +LED; **G11**- 20% H_2O_2 ; **G12**- SN+PPC+20% H_2O_2 ; **G13**- SN+PPC+20% H_2O_2 +LED; **G14**- 10% H_2O_2 ; **G15**- SN+PPC+10% H_2O_2 ; **G16**- SN+PPC+10% H_2O_2 +LED. Discos de esmalte/dentina (n=8) foram manchados e então submetidos ou não a aplicação dos protocolos de clareamento por 45 min. Para determinar a eficácia estética, os discos foram analisados em espectrofotômetro de reflexão-UV (sistema CIE $L^*a^*b^*$, ΔE_{00} e ΔWI). A geração de radicais hidroxila ($OH^\bullet$) a partir da decomposição do H_2O_2 também foi determinada (sonda fluorescente HORAC). Para avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária, os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram realizados sobre discos de esmalte/dentina adaptados em câmaras pulparem artificiais. Os extratos (meio de cultura + componentes dos géis que se difundiram pelos discos) foram recolhidos e imediatamente aplicados sobre células odontoblastóides MDPC-23, as quais foram analisadas quanto a viabilidade (alamarBlue), estresse oxidativo (sonda carboxy- H_2DCFDA) e morfologia (microscopia eletrônica de varredura, MEV). A quantidade de H_2O_2 presente nos extratos também foi determinada (violeta leucocristal/peroxidase). Os dados coletados foram submetidos aos testes Three-Way ANOVA e Tukey ($p<0,05$), sendo a Análise de Variância para medidas repetidas usada para avaliar a geração de $OH^\bullet$. Aumento nos valores de ΔE_{00} e ΔWI , bem como da geração de $OH^\bullet$ ocorreu nos grupos G6, G7, G9, G10, G12, G13, G15 e G16 em comparação a G1 e G2 ($p<0,05$). G16 (SN+PPC+10% H_2O_2 +LED) apresentou eficácia estética semelhante ao clareamento de consultório (G5; $p>0,05$). A citotoxicidade foi reduzida em todos os grupos onde SN+PPC foram aplicados sobre o esmalte antes do gel clareador (G6, G9, G12 e G15). Porém, os menores valores de citotoxicidade ocorreram nos grupos onde foi usado SN+PPC+LED (G7, G10, G13 e G16), nos quais também foi observado o menor estresse oxidativo celular em comparação aos grupos que receberam apenas o gel clareador ($p<0,05$). Assim, foi possível concluir que a fotocatálise do gel clareador com 10% de H_2O_2 , aplicado sobre esmalte previamente recoberto com SN e tratado com PPC, aumenta a eficácia estética e reduz a citotoxicidade em comparação ao clareamento convencional de consultório.

Palavras-Chave: Clareamento dental. Toxicidade. Odontoblastos. Técnicas de cultura de células.

Martins BV. Influence of the association between polymeric biomaterials and violet LED on the aesthetic effectiveness, degradation kinetics and cytotoxicity of bleaching gels [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The catalysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) present in bleaching gels may improve the aesthetic result and reduce the cytotoxicity caused by in-office dental bleaching. Thus, the aim of the present study was to assess the influence of covering the enamel with a nanofibril scaffold (NS) and a polymeric primer containing 10 mg/mL of hemic peroxidase (PPC) on the aesthetic efficacy, degradation kinetics and trans-amelodentinal cytotoxicity of bleaching gels with 10%, 20% and 35% H_2O_2 , irradiated or not with violet LED (LED). Using commercial or laboratory-made bleaching gels, which were associated or not to SN, PPC and violet LED, the following groups were established: **G1**- No treatment (negative control); **G2**- SN+PPC; **G3**- LED; **G4**- SN+PPC+LED; **G5**- 35% $H_2O_{2commercial}$ (positive control); **G6**- SN+PPC+35% $H_2O_{2commercial}$; **G7**- SN+PPC+35% $H_2O_{2commercial}$ +LED; **G8**- 35% H_2O_2 ; **G9**- SN+PPC+35% H_2O_2 ; **G10**- SN+PPC+35% H_2O_2 +LED; **G11**- 20% H_2O_2 ; **G12**- SN+PPC+20% H_2O_2 ; **G13**- SN+PPC+20% H_2O_2 +LED; **G14**- 10% H_2O_2 ; **G15**- SN+PPC+10% H_2O_2 ; **G16**-SN+PPC+ 10% H_2O_2 +LED. Enamel/dentin discs (n=8) were stained and then submitted or not to the experimental bleaching protocols for 45 min. To determine the esthetic efficacy, the discs were analyzed under a UV-reflection spectrophotometer (CIE $L^*a^*b^*$, ΔE_{00} and ΔWI system). To evaluate the amount of hydroxyl radicals ($OH^\bullet$) generated by H_2O_2 degradation, a fluorescent probe (HORAC) was used. The in vitro model of artificial pulp chamber was used to assess the trans-amelodentinal cytotoxic effects caused by the treatments to the odontoblast-like MDPC-23 cells. For this purpose, the extracts (culture medium + gel components that diffused through the discs) were collected and immediately applied to the cultured cells, which were assessed concerning their viability (alarmarBlue), oxidative stress (carboxy- H_2DCFDA probe) and morphology (scanning electron microscopy, SEM). The amount of H_2O_2 present in the extracts was also determined (leuko-crystal violet/peroxidase). Data were submitted to the Three-Way ANOVA test complemented by Tukey post-test ($p<0.05$). Analysis of variance for repeated measures was used to analyze the $OH^\bullet$ generation. Significant increase in ΔE_{00} and ΔWI values, as well as in $OH^\bullet$ generation occurred in groups G6, G7, G9, G10, G12, G13, G15 and G16 in comparison with G1 and G2 ($p<0.05$). G16 group (SN+PPC+10% H_2O_2 +LED) presented similar aesthetic efficacy to conventional in-office dental bleaching protocol (G5) ($p>0.05$). Reduced trans-amelodentinal cytotoxicity was observed in all groups in which SN+PPC were used to cover the enamel before the bleaching gel application (G6, G9, G12 and G15). However, the lowest cytotoxicity occurred in G7, G10, G13 and G16, in which SN, PPC, and LED were used to perform the bleaching therapies. Cells of these groups exhibited lower oxidative stress when compared with groups in which bleaching gels were applied directly on enamel ($p<0.05$). Thus, it was possible to conclude that the approach of photocatalyzing a bleaching gel with 10% H_2O_2 , applied on enamel previously covered with SN and PPC, increases the degradation kinetics of H_2O_2 , that, in turn, improves the aesthetic efficacy and reduces the cytotoxicity in comparison with the conventional in-office dental bleaching therapy.

Keywords: Tooth Bleaching. Toxicity. Odontoblasts. Cell Culture Techniques.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
4 MATERIAL E MÉTODO	23
4. 1 Estudo 1.....	23
4.1.1 Formulação dos géis clareadores experimentais	23
4.1.2 Formulação do scaffold nanofibrilar (SN)	23
4.1.3 Formulação do primer polimérico catalisador (PPC)	24
4.1.4 Obtenção dos discos de esmalte e dentina	25
4.1.5 Padronização da cor inicial dos discos	26
4.1.6 Avaliação da eficácia estética	27
4.1.7 Avaliação da geração de OH[•] nos géis clareadores	30
4.2 Estudo 2	31
4.2.1 Cultura de células odontoblastóides MDPC-23	31
4.2.2 Obtenção dos espécimes	31
4.2.3 Procedimento experimental	31
4.2.4 Quantificação de free-H₂O₂ presente nos extratos	33
4.2.5 Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária (viabilidade celular - alamarBlue)	34
4.2.6 Análise do estresse oxidativo	34
4.2.7 Avaliação da morfologia celular (MEV)	35
4.3 Análise Estatística	35

5 RESULTADOS	36
5.1 Eficácia Estética	36
5.2 Cinética de Degradação do Gel Clareador	38
5.3 Difusão Trans-amelodentinária de H₂O₂	39
5.4 Citotoxicidade Trans-amelodentinária	41
5.5 Estresse Oxidativo	42
5.6 Morfologia Celular (MEV)	43
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A	65
ANEXO A.....	88

1 INTRODUÇÃO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa derivada do oxigênio (ERO) capaz de penetrar o esmalte e dentina, onde consegue oxidar componentes orgânicos coloridos locais, os quais determinam a cor do elemento dental¹. Dentre as diversas espécies reativas do oxigênio (EROs) conhecidas, o H_2O_2 é aquele que apresenta o menor potencial de oxidação ($E^0=+1,8\text{V}$), sendo essa propriedade definida pela tendência de uma espécie química em doar elétrons, levando à oxidação com sequente fragmentação de moléculas orgânicas longas². Assim, para que a alteração cromática dos dentes seja efetiva e ocorra em um curto período de tempo, géis com elevada concentração de H_2O_2 têm sido tradicionalmente empregados no clareamento dental de consultório³⁻⁷. No entanto, o baixo potencial de oxidação do H_2O_2 faz com que a grande quantidade desta molécula não interagida com os cromóforos (free- H_2O_2), a qual permanece nos tecidos duros do dente, consiga alcançar o espaço pulpar^{8,9} em concentrações elevadas o suficiente para ocasionar danos celulares irreversíveis¹⁰⁻¹⁴.

Tem sido demonstrado que os efeitos biológicos negativos do clareamento dental são diretamente proporcionais à concentração de free- H_2O_2 capaz de se difundir pela estrutura dental e interagir com as células pulpares^{10,11}. A partir de diversos estudos prévios, foi demonstrado que o excesso de free- H_2O_2 na câmara pulpar pode causar estresse oxidativo nas células locais com consequente ruptura de membranas, aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios, bem como intensa morte celular por necrose^{15,18}. Tem sido relatado que esses efeitos adversos, observados em pesquisas in vitro e in vivo, supostamente são responsáveis pela sensibilidade dentária pós-clareamento, sintoma comumente relatado pelos pacientes submetidos à terapia de consultório^{19,20,21}.

Nos últimos anos, foi estabelecido que a toxicidade celular e a efetividade estética da técnica de clareamento de consultório estão diretamente relacionadas com a concentração de H_2O_2 presente no gel clareador e do tempo de aplicação do produto sobre o esmalte^{11,12,18,23}. Porém, o emprego de estratégias para diminuir a concentração de H_2O_2 ou o tempo de aplicação a fim de prevenir os efeitos adversos do clareamento profissional, faz com que muitas sessões clínicas sejam realizadas, o que limitaria o emprego deste protocolo na prática clínica atual^{11,22}. Assim, considerando esses dados e o fato de que as técnicas de clareamento de consultório usados atualmente podem causar sensibilidade e danos pulpares irreversíveis^{19,17,20}. Diversos pesquisadores têm

investigado o comportamento cinético do H_2O_2 , com o intuito de propor estratégias que possam: 1) reduzir o tempo para alcançar efetividade estética, e 2) prevenir, ou pelo menos reduzir, a citotoxicidade causada por este tipo de terapia^{24,14,25}.

Catalisadores enzimáticos têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica, química e no campo da engenharia tecidual para o desenvolvimento de biomateriais^{26,27}. Isso ocorre porque as cascatas enzimáticas mimetizam os processos que ocorrem na natureza²⁸. Dentre os diversos catalisadores químicos estudados, a enzima peroxidase hêmica (HRP) tem se destacado na Odontologia Estética por aumentar significativamente a eficácia estética e reduzir o efeito tóxico de géis clareadores usados em consultório, representando, assim, uma boa opção para acelerar a reação de oxidação do H_2O_2 ²⁵. Além da utilização de agentes catalisadores para otimizar o clareamento dental, diversos polímeros também têm sido usados no desenvolvimento de biomateriais com potencial para atuar como coadjuvantes nos processos de catálise, como o hidroxipropil metilcelulose (HPMC). Já foi demonstrado que o HPMC, um polímero semi-sintético derivado da celulose, é biodegradável, biocompatível, atóxico e por conseguir formar um gel hidrófilo, tem sido amplamente empregado na indústria farmacêutica para liberação controlada de fármacos^{29,30}. A policaprolactona (PCL), um polímero orgânico amplamente utilizado na engenharia tecidual³¹, além de ser biodegradável e atóxico^{32,33,34} permite ser eletrofiada, o que faz com seja amplamente empregada para produzir scaffolds de nanofibras^{35,33}. Apesar dos bioprodutos compostos por nanofibras possuírem alta porosidade, o reduzido diâmetro dos poros pode impedir a passagem de microrganismos, bactérias, vírus, e até mesmo partículas tóxicas, porém mantendo uma permeabilidade interessante de acordo com a função a ser exercida e local onde será aplicado³⁶.

Outra opção introduzida na Odontologia Estética para favorecer a alteração cromática dos dentes, é a fotocatálise do H_2O_2 presente nos géis clareadores. Essa fototerapia pode causar degradação homolítica do H_2O_2 liberado do gel clareador, gerando dois mols de radical hidroxila ($HO\cdot$)³⁷. A partir desse conhecimento e com objetivo de acelerar o resultado estético da terapia profissional, bem como minimizar o excesso de free- H_2O_2 e seus consequentes efeitos citotóxicos para células pulpares, foi proposto a fotocatálise do H_2O_2 com LED violeta (λ 405 – 410 nm). De acordo com os pesquisadores, o LED violeta pode produzir alterações cromáticas nos dentes quando usado ou não em associação com géis clareadores³⁸⁻⁴².

Diante dos dados apresentados, este estudo teve como objetivo principal avaliar

a eficácia estética, cinética de decomposição do H_2O_2 e citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H_2O_2 , quando aplicados sobre esmalte previamente recoberto com um scaffold nanofibrilar (SN) e tratado com um primer polimérico catalisador (PPC), seguido ou não de fotocatalise com LED Violeta.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a influência da aplicação, em esmalte, de um scaffold nanofibrilar (SN) seguido de um primer polimérico enriquecido com a enzima peroxidase hêmica (PPC), sobre a eficácia estética, cinética de degradação do H_2O_2 e o possível efeito tóxico trans-amelodentinário causado pelo clareamento dental de consultório, realizado com géis contendo 10%, 20% e 35% de H_2O_2 , submetidos ou não à fotocatalise com LED violeta.

2.1 Objetivos Específicos

Analisar, através do sistema de avaliação CIEL*a*b (espectrofotometria de reflexão UV – CIEDE 2000 (ΔE_{00}), os índices de clareamento (ΔWI), perceptibilidade e aceitabilidade [50%:50%]), de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H_2O_2 , aplicados por 45 min sobre discos de esmalte/dentina recobertos com SN+PPC, e então submetidos ou não à fotocatalise com LED violeta. Também foi determinada a cinética de decomposição do H_2O_2 presente nos géis clareadores por meio da quantificação de radicais $OH^\bullet$ formados;

Avaliar a quantidade de free- H_2O_2 capaz de se difundir através de discos de esmalte/dentina recobertos ou não com SN+PPC e tratados por 45 min com géis clareadores contendo 10%, 20% e 35% de H_2O_2 , os quais foram submetidos ou não à fotocatalise com LED violeta. Também foi determinado se a quantidade de free- H_2O_2 difundido pelos discos foi capaz de causar toxicidade trans-amelodentinária sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A coloração do elemento dental é determinada por fenômenos intrínsecos e extrínsecos. Os fenômenos ópticos responsáveis pela visualização mais amarelada do dente ocorre de forma intrínseca por fatores fisiológicos ligados principalmente à dentina, tecido mais espesso do dente. A dentina tubular, depositada continuamente nos dentes vitais, também pode incorporar pigmentos de origem pulpar, o que é percebido devido a característica delgada e translúcida do esmalte⁴³. A pigmentação extrínseca tem origem na dieta e hábitos pessoais do indivíduo, o que permite que moléculas coloridas consigam se aderir superficialmente no esmalte ou até mesmo, dependendo de seu tamanho, atingir a dentina subjacente^{44,45}. O escurecimento dos dentes, apesar de natural, representa uma das principais queixas de muitos pacientes com relação a questão estética do sorriso⁴⁶. O aumento da preocupação quanto ao escurecimento dos dentes impulsionou a Odontologia Estética contemporânea a desenvolver procedimentos capazes de solucionar essa questão. O clareamento dental surgiu como uma terapia estética rápida e eficaz, a qual pode ser considerada como conservadora quando comparada a instalação de lentes e facetas de resina ou porcelana⁴⁷.

Dentre as diversas técnicas clareadoras desenvolvidas, duas são amplamente utilizadas pelos cirurgiões-dentistas e diferenciam-se pela forma de uso, concentração do agente clareador e tempo de aplicação. No clareamento caseiro, onde são empregadas moldeiras pré-fabricadas ou feitas a partir de moldes das arcadas dentárias dos pacientes, géis de peróxido de carbamida ou de hidrogênio nas concentrações de 10-16% ou 4-10%, respectivamente, são usados⁴⁸⁻⁵⁰. A aplicação do gel na moldeira é realizada pelo próprio paciente após receber orientação profissional, sendo que o tempo de uso pode variar de 30 minutos a 8 horas por dia durante 2 a 4 semanas^{48,49}. Diante da dificuldade para alcançar resultados estéticos desejados e de forma rápida, o clareamento caseiro, o qual requer longo período de tratamento e efetivo comprometimento do paciente, tem perdido espaço para uma estratégia mais rápida e inteiramente dependente da atuação do cirurgião-dentista^{51,47}. Por outro lado, o clareamento dental de consultório causa alteração cromática no elemento dental logo após a realização de uma única sessão de aplicação direta do gel clareador por 45 minutos sobre o esmalte^{47,3}. Nesta estratégia de clareamento profissional, géis com elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que variam entre 35% e 40%, são usados^{52,47}. A aplicação do gel clareador sobre o esmalte dentário é realizada após proteção da mucosa gengival adjacente com uma barreira polimérica⁴⁷. Entretanto,

apesar desta ser a modalidade de terapia estética mais utilizada na atualidade, uma elevada porcentagem dos pacientes (80-100%) submetidos ao clareamento dental de consultório relatam algum tipo de sensibilidade dentária pós-tratamento^{3,53,54,5,7}.

Ubal dini et al.¹ (2013) demonstraram que o clareamento dental ocorre devido a oxidação causada pelo H_2O_2 nos pigmentos orgânicos coloridos presentes no esmalte e dentina. Esses pigmentos, também chamados de cromóforos, são caracterizados como moléculas com estrutura cíclica formada por duplas ligações de carbono⁴⁵. Ao entrar em contato com os cromóforos, o H_2O_2 quebra as duplas ligações de carbono dessas moléculas coloridas, o que favorece a passagem de luz pelos tecidos duros do dente^{44,55}. Contudo, o baixo potencial de oxidação do H_2O_2 faz com que os géis usados no clareamento dental de consultório tenham que conter elevadas concentrações desta ERO, o que proporciona bons resultados estéticos em curtos períodos de tempo²⁻⁷. Porém, a grande concentração de H_2O_2 no gel clareador faz com que parte destas moléculas tóxicas não reagidas com os cromóforos permaneçam livres (free- H_2O_2) no esmalte e dentina^{8,9}. Desde que a dentina é um tecido tubular, já foi demonstrado que elevadas quantidades de free- H_2O_2 conseguem se difundir rapidamente por essa estrutura dentária permeável para causar lesão de variadas intensidades nas células da polpa^{8,9}. Diversos estudos mostraram que logo após aplicar o gel clareador de consultório sobre o esmalte dentário, o H_2O_2 consegue se difundir pelo espaço interprismático desse tecido altamente mineralizado, atravessar toda espessura de dentina subjacente e alcançar o espaço pulpar em apenas 15 minutos^{56-59,8,1,60,9}. Muitos estudos laboratoriais recentes demonstraram que a concentração de H_2O_2 nos géis clareadores está diretamente relacionada com a quantidade de free- H_2O_2 que se difunde pelo esmalte/dentina e com o volume de radicais hidroxila (OH^*) formado^{10,14,61}. Além disso, estudos in vitro e in vivo também demonstraram que elevadas concentrações de free- H_2O_2 causam estresse oxidativo associado a grave lesão em membranas de células pulpares, bem como liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido agredido^{18, 12,62}. Já foi demonstrado que a associação de todos esses efeitos adversos causados pelo clareamento dental de consultório usado atualmente, tem resultado em áreas de necrose pulpar, sendo que os danos teciduais observados microscopicamente podem ser os responsáveis pela sensibilidade dentária pós-tratamento^{17,20}. É importante ressaltar que diversos estudos clínicos conduzidos na última década demonstraram que o clareamento dental de consultório realizado com géis contendo altas concentrações de H_2O_2 aumenta o risco de sensibilidade dentária^{6,63,64}.

O tempo de aplicação do material sobre a superfície do esmalte dentário, assim

como a própria espessura do dente a ser clareado, são fatores que influenciam a difusão trans-amelodentinária do free- H_2O_2 ^{10,22}. De Oliveira Duque e colaboradores²² (2017), demonstraram em estudo in vitro, no qual simularam a espessura de pré-molares e incisivos inferiores em discos de esmalte/dentina e observaram maior difusão de H_2O_2 nos discos que representavam os incisivos, após a aplicação do gel clareador.

A partir do conhecimento dos mecanismos e fatores que resultam nos efeitos biológicos adversos do clareamento dental de consultório, vários pesquisadores propuseram reduzir a concentração do H_2O_2 nos géis clareadores, bem como o tempo de aplicação dos produtos sobre o esmalte. Contudo, os resultados obtidos com a realização desses estudos demonstraram que ambas as estratégias prejudicaram significativamente a eficácia estética da terapia profissional, o que tornou essas opções clinicamente inviáveis^{10,22,23,65}. Diante disso, pesquisadores iniciaram buscas por novas estratégias que pudessem prevenir, ou pelo menos reduzir, a citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento dental de consultório, bem como acelerar e favorecer a eficácia estética do tratamento ^{24,14,25}. Assim, estudos passaram a ser executados considerando os conhecimentos da cinética de decomposição do H_2O_2 , sendo que para isso foram investigados os efeitos da fototerapia e do uso de agentes catalisadores químicos/enzimáticos sobre os efeitos estéticos e biológicos dos géis clareadores ^{39,25,14,61,66,67}.

Quanto a aplicação da fototerapia no clareamento dental, esta estratégia tem sido bastante usada para otimizar a decomposição do H_2O_2 e gerar duas moléculas de $\text{OH}^\bullet$ ^{37,68,40,42}. Diversos pesquisadores têm usado diferentes fontes luminosas, como diodos emissores de luz (LED), laser, luz halógena e outras para acelerar e aumentar a eficácia do tratamento clareador^{69,70}. Esta associação se baseia na absorbância da energia pelo gel clareador, o que resulta na produção de calor, acelerando a oxidação do H_2O_2 e consequentemente aumentando a geração de outras espécies reativas do oxigênio (EROs) com potencial catalisador superior ao do H_2O_2 ^{68,39}. Contudo, esse mecanismo pode potencializar a difusão de EROs pelo esmalte e dentina, aumentando os riscos de efeitos tóxicos sobre as células pulpares⁷¹. Atualmente tem sido proposto o uso do LED violeta, fonte de luz com comprimento de onda na faixa de 405-410 nm, o qual tem sido demonstrado ser capaz de clarear os dentes associado ou não ao uso de géis clareadores^{39,72}. A emissão da faixa do LED corresponde com o máximo de absorção das moléculas pigmentadas, o que resulta em efeito clareador por fotólise⁴¹. Recentemente, De Oliveira Gallinari et al.³⁹ (2019) observaram alterações cromáticas nos tecidos dentários quando foi empregado o LED violeta, independente do uso de um

gel clareador sobre o esmalte. Porém, os autores também relataram que a associação do LED com um gel contendo apenas 17,5% de H₂O₂ melhorou o resultado estético final. Apesar dos interessantes e promissores resultados obtidos com o LED violeta, Maran et al.⁷⁴(2019) observaram que por ser uma alternativa recente, estudos sobre a real eficácia estética do LED e seus possíveis efeitos colaterais precisam ser realizados.

A busca por minimizar os efeitos adversos ocasionados pela terapia clareadora, impulsionou diversas pesquisas sobre o comportamento cinético do H₂O₂. Com isso, o uso de catalisadores enzimáticos surgiu como uma alternativa a fim de acelerar a reação oxidativa dessa molécula, aumentar a liberação de radicais OH^{*} e outros subprodutos com maior atividade oxidativa, reduzindo a quantidade de free-H₂O₂ capaz de causar toxicidade e ainda otimizando o resultado estético^{75,76,77,60,24}. Dentre os diversos catalisadores químicos estudados, a enzima peroxidase hêmica (HRP) derivada da raiz da *Armoracia rusticana*, tem se destacado na Odontologia por promover aumento significativo da eficácia estética e redução do efeito tóxico de géis clareadores de consultório²⁵. Recentemente, Ortecho-Zuta et al.¹⁴ (2019) demonstraram que a adição de 10 mg/mL de HRP num gel clareador com 35% de H₂O₂ reduziu significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária do produto. Neste estudo, a presença da HRP no gel fez com que a viabilidade celular fosse cerca de 34% maior quando comparada ao gel sem adição desta enzima. Além disso, os autores observaram aumento de aproximadamente 24% na eficácia estética após a 1ª sessão de clareamento com o gel contendo HRP. Apesar do efeito positivo sobre a eficácia estética e redução na toxicidade celular, foi possível observar que as células pulpares ainda se apresentaram sensíveis ao estresse oxidativo mediado pelo free-H₂O₂ que se difundiu pelo esmalte e dentina.

Além da utilização de ativadores enzimáticos, estudos têm lançado mão do emprego de diferentes polímeros comumente empregados na indústria farmacêutica, como coadjuvantes no carreamento e liberação do catalisador enzimático. A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero biodegradável e biocompatível capaz de formar um gel hidrófilo, interessante para liberação controlada de agentes ativos^{30,78}. Num estudo recente de Ortecho-Zuta⁶¹ (2021), um primer polimérico catalisador (PPC) foi preparado com HPMC, ao qual foi incorporado 10mg/mL da enzima HRP. Os autores relataram que o uso deste primer experimental antes da aplicação do gel, favoreceu a alteração cromática e reduziu a citotoxicidade do clareamento de consultório. Outro polímero interessante para a área de desenvolvimento de biomateriais é a policaprolactona (PCL), um polímero orgânico de baixo custo, biodegradável e atóxico^{32,34,79}, o qual é capaz de produzir uma malha microscópica de nanofibras

(scaffold) quando submetido ao processo de eletrofiação^{35,33} (Rabionet et al., 2017; Dabouian et al., 2018). Assim, o revestimento do esmalte com um scaffold poroso poderia reduzir a toxicidade trans-amelodentinária do gel clareador, pois este biomaterial teria a capacidade de limitar, fisicamente, a passagem de partículas tóxicas através dele^{36,61}. É importante ressaltar ainda, que devido ao fato das EROs interagirem com estruturas orgânicas^{1,80}, é possível que o H_2O_2 liberado do gel clareador possa interagir com a parte orgânica do scaffold de PCL, favorecendo a degradação desta molécula. No mesmo estudo de Ortecho-Zuta⁶¹ (2021), foi demonstrado que o uso de um scaffold nanofibrilar à base de PCL associado ao PPC no procedimento clareador de consultório, resultou em maior eficácia estética e menor citotoxicidade. Assim, é possível estabelecer a hipótese de que o revestimento do esmalte com um scaffold nanofibrilar e um primer catalisador, antes da aplicação de géis clareadores, os quais seriam submetidos à fotocatalise com LED violeta, poderia intensificar a decomposição do H_2O_2 . Desta forma, outros EROs com maior potencial oxidativo e menor tempo de vida (quando comparados ao H_2O_2) seriam gerados. Consequentemente, além de acelerar o clareamento dental, essa estratégia poderia limitar a difusão trans-amelodentinária de free- H_2O_2 , prevenindo, ou pelo menos diminuindo significativamente, a citotoxicidade desta modalidade de terapia estética profissional. Dentro deste contexto, é possível sugerir que mesmo géis clareadores com concentrações de H_2O_2 menores do que àquelas usadas em consultório, poderiam resultar em protocolos mais citocompatíveis e que promovam excelente eficácia estética.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo 1

Análise da eficácia estética de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H_2O_2 aplicados por 45 minutos sobre discos de esmalte/dentina recobertos com SN+PPC e submetidos ou não à fotocatálise com LED violeta, bem como avaliação da cinética de decomposição do H_2O_2 .

4.1.1 Formulação dos géis clareadores experimentais

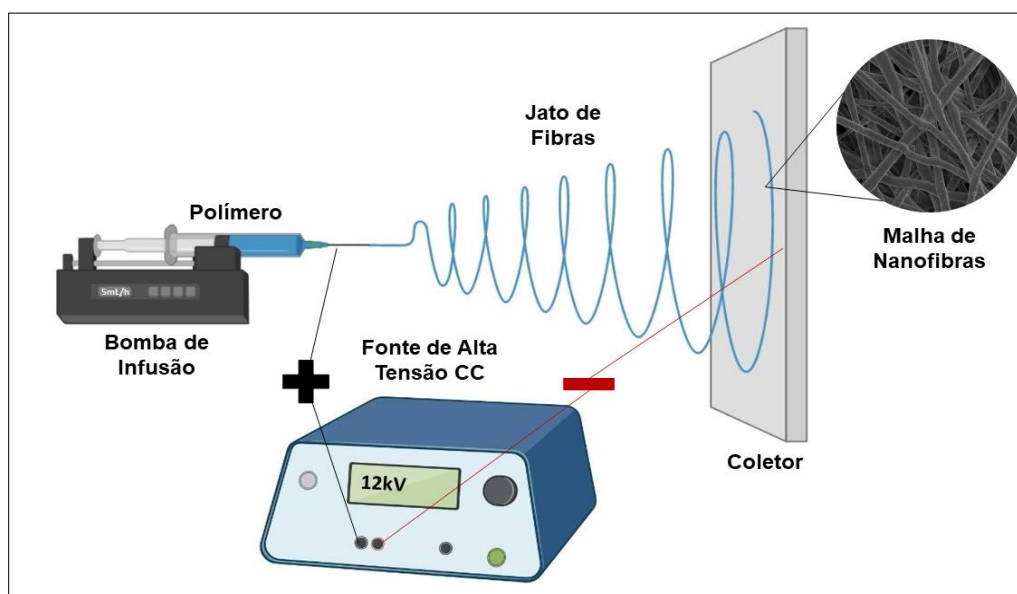
Os géis foram preparados à base do espessante carbopol (ácido poliacrílico Mv ~ 3.000,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), obtido a partir de uma solução a 1% v/m diluído em água ultra-pura ($\text{H}_2\text{O}_{\text{UP}}$; Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), e pH basificado em 8,0. A solução foi mantida em agitação magnética durante 8 horas em temperatura ambiente (30°C) e então estocada *overnight* sob refrigeração (4°C). Para a obtenção da fase líquida das menores concentrações (10% e 20% de H_2O_2), foi realizada a diluição a partir de uma solução de estoque de 35% de H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio 35% P.A, Neon, Suzano, SP, Brasil) em $\text{H}_2\text{O}_{\text{UP}}$, imediatamente antes das análises. A proporção de 1:3 foi utilizada para realizar a mistura das soluções (espessante e fase líquida).

4.1.2 Formulação do Scaffold nanofibrilar (SN)

O SN, preparado à base de PCL (Sigma-Aldrich), foi desenvolvido para atuar como uma fita protetora, para revestir a superfície do esmalte antes da aplicação do gel clareador. Assim, uma solução de 12,5% de PCL foi preparada com clorofórmio/dimetilformamida (80:20) (Labsynth Produtos para laboratório, São Paulo, SP, Brasil) sob agitação magnética constante *overnight*. A solução obtida foi então transferida para uma seringa de 5 mL (Descarpak, São Paulo, SP, Brasil) com agulha de aço inoxidável de calibre de 18 gauge (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), a qual foi conectada em equipamento de injeção automática (KDScientific, Holliston, MA, EUA) sob a velocidade de 1 mL/h. A voltagem da fonte de alta tensão foi de 12 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor de 15 cm. As nanofibras obtidas são do tipo randômicas, sendo que para isso foi utilizado um coletor plano de alumínio, disposto perpendicularmente à seringa (Figura 1). Antes de serem aplicadas sobre o

esmalte, as nanofibras foram submetidas a um protocolo de lavagem com álcool 50% (10 minutos – 1x), álcool 70% (20 minutos – 3x), solução salina tampão fosfato (PBS; VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) (10 minutos – 3x). Em seguida, as nanofibras foram mantidas durante 12 horas imersas em PBS e após este período, a solução foi aspirada e as nanofibras mantidas em estufa à 37° C por mais 48 horas para secagem (Ortecho-Zuta et al., 2021). Para facilitar a aplicação sobre o esmalte dos discos de esmalte/dentina, as nanofibras foram recortadas em formato circular (6 mm de diâmetro) com auxílio de um punch dermatológico (Koplast, Barra do Rio, Jaraguá do Sul, SC, Brasil).

Figura 1 - Imagem ilustrativa do sistema de eletrofiação do polímero para obtenção do scaffold nanofibrilar (SN)



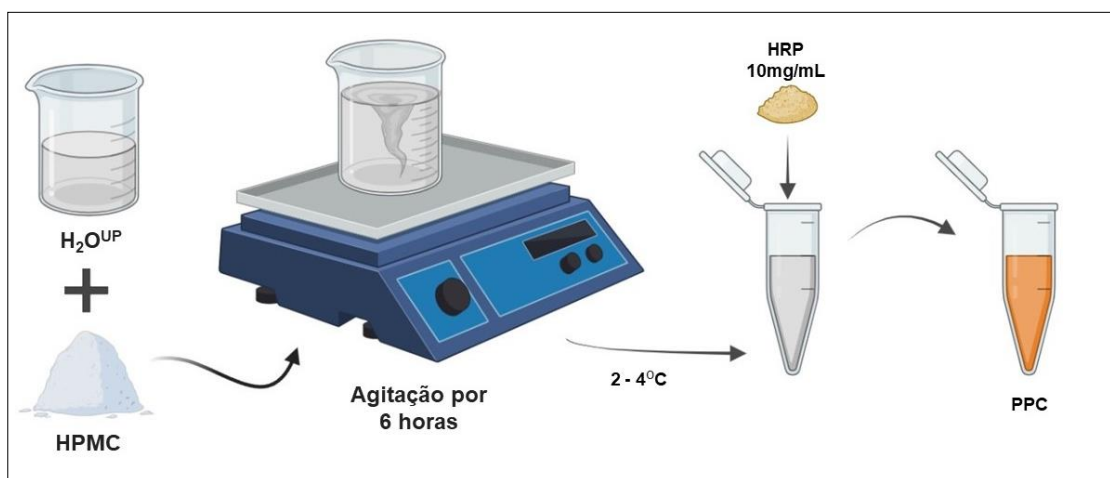
Fonte: Elaboração própria.

4.1.3 Formulação do primer polimérico catalisador (PPC)

O PPC (Figura 2) foi preparado para resistir ao escoamento, sendo capaz de formar uma película sobre o esmalte (Ortecho-Zuta et al., 2019). Para isso, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC, Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, EUA) foi usado como polímero base. O HPMC (1 g) na viscosidade de 100 mPa.s. foi diluído em H₂O_{UP} (10 mL) para obter uma solução a 10%. A solução foi mantida em agitação magnética em temperatura ambiente por 6 horas, o qual foi posteriormente armazenado na geladeira por 24 horas. A HRP (Sigma-Aldrich) foi incorporada (10 mg/mL) ao PPC como agente

catalisador e então acondicionado em tubos de 1,5 mL (Corning, Oneonta, NY, EUA). Imediatamente após o gel clareador nas concentrações 10%, 20% ou 35% de H_2O_2 ser manipulado, este foi aplicado sobre o PPC (1:1; v/v). A temperatura gerada pela catálise do H_2O_2 , bem como o pH do produto foram avaliados imediatamente após o contato do gel clareador com o PPC, e a cada 5 minutos durante um período total de 15 minutos por meio de um microeletrodo de bancada (HI-2221 Calibration Check pH/Bench Meter; Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, AD, Reino Unido).

Figura 2 - Esquema ilustrativo da preparação do Primer Polimérico Catalisador (PPC)

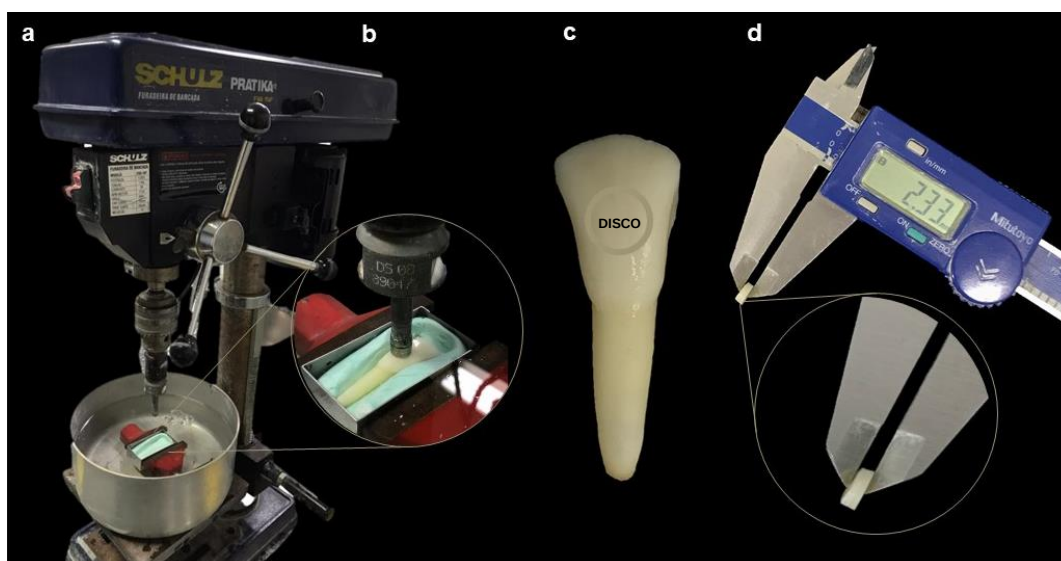


Fonte: Elaboração própria.

4.1.4 Obtenção dos discos de esmalte e dentina

Foram obtidos 128 discos de esmalte e dentina do terço médio da superfície vestibular de incisivos bovinos previamente descontaminados e armazenados em solução de Timol 2,5%, a aquisição dos discos foi realizada por meio de uma broca diamantada trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schül tz, Joinville, SC, Brasil), obtendo-se discos com diâmetro padronizado em 5,6 mm (Figura 3). A superfície dentinária foi regularizada por meio de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda, Jundiaí, SP, Brasil) com movimentos giratórios manuais para cada granulação até atingir espessura padronizada de 2,3 mm de esmalte/dentina, a qual foi determinada por meio do uso de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil) (De Oliveira Duque et al., 2017).

Figura 3 - Imagens ilustrativas do processo de obtenção dos discos de esmalte/dentina bovinos



- a) Furadeira de bancada; b) Vista aproximada da broca diamantada trefina com diâmetro de 5,6mm localizada no terço médio da superfície vestibular incisivo bovino; c) Posição do corte na face vestibular do incisivo bovino; d) Paquímetro digital utilizado para medir a espessura dos discos.

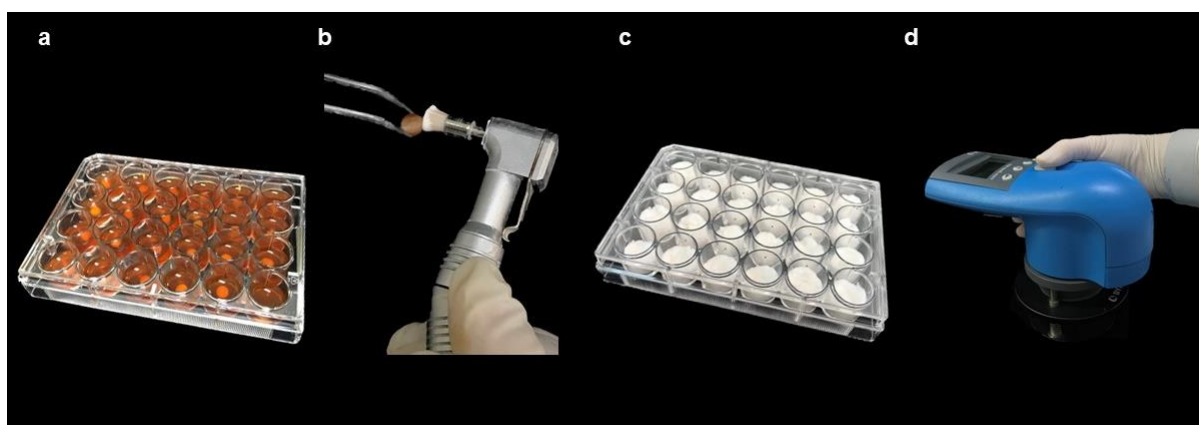
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.5 Padronização da cor inicial dos discos

A padronização da coloração dos discos, foi realizada a partir de uma leitura colorimétrica inicial (baseline), seguida de um protocolo de manchamento pré-estabelecido na literatura (De Oliveira Duque et al., 2017). Para isso, a superfície dentinária dos discos foi tratada com EDTA 0,5m por 30 segundos para eliminação da smear layer. Em seguida, cada disco foi posicionado em um compartimento de uma placa esterilizada de 24 compartimentos, onde foi adicionado 1mL da solução de 3,2 g de chá-preto preparada por infusão em 100 mL de água fervente por 5 minutos, e então, as placas foram armazenadas durante 24 horas em estufa à 37°C. (Leão Jr S. A., Fazenda Rio Grande, PR, Brasil). Após este período, foi realizada uma profilaxia com solução de pedra-pomes (AAF do Brasil, Londrina, PR, Brasil) e água na superfície do esmalte dos discos. Em sequência, 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionada em cada compartimento da placa para remoção de pigmentos que não foram totalmente absorvidos pela dentina. Após 24 horas em estufa à 37°C, foi posicionado algodão embebido em solução do tipo saliva (fosfato de potássio monobásico 3,9%; cloreto de cálcio 3,6%; cloreto de sódio 2%; cloreto de potássio 2%; cloreto de magnésio 3,7%; phenochem 0,2%; gel de natrosol 10%; água destilada qsp) em cada compartimento

individual da placa contendo um disco, permanecendo em contato durante 72 horas em estufa a 37° C para padronizar e manter a hidratação dos discos. Por fim, cada disco foi posicionado em um suporte padronizado e então realizada a leitura com um espectrofotômetro de reflexão UV (Espectrofotômetro de Reflexão ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha) para a obtenção do valor de ΔE , de acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$. As leituras foram realizadas, em horário padronizado, por um único pesquisador, o qual utilizava vestimenta padrão na cor branca. Todas as análises foram conduzidas no mesmo local de uma bancada previamente recoberta com uma placa branca. Discos com valores de L^* , a^* e b^* similares em um intervalo de $\Delta E=3$ (Paravina et al., 2019), foram selecionados e distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais (Figura 4).

Figura 4 - Imagens ilustrativas do protocolo de manchamento dos discos de esmalte/dentina



a) Discos submersos em 1mL da solução de chá preto em placa de 24 compartimentos; b) Profilaxia da superfície do esmalte com pedra-pomes; c) Organização dos discos em placas de 24 compartimentos de maneira que a superfície de dentina permanecesse em contato com algodão embebido em água e a superfície de esmalte ficasse em contato com uma solução tipo saliva; d) Análise de cor realizada em espectrofotômetro.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.6 Avaliação da eficácia estética

Os grupos estabelecidos para a realização deste estudo (n=8), bem como os protocolos experimentais definidos para cada um deles, estão dispostos na Figura 5.

Figura 5 - Distribuição dos grupos experimentais e controles de acordo com o tratamento e tempo de aplicação.

GRUPOS	TRATAMENTOS	TEMPO
G1	Sem tratamento (Controle Negativo)	45 min
G2	SN* + PPC**	45 min
G3	LED	20 min
G4	SN + PPC + LED	45 min
G5	35% H_2O_2 Comercial (Controle Positivo)	45 min
G6	SN+PPC+35% H_2O_2 Comercial	45 min
G7	SN+PPC+35% H_2O_2 Comercial+LED	45 min
G8	35% H_2O_2	45 min
G9	SN+PPC+35% H_2O_2	45 min
G10	SN+PPC+35% H_2O_2 +LED	45 min
G11	20% H_2O_2	45 min
G12	SN+PPC+20% H_2O_2	45 min
G13	SN+PPC+20% H_2O_2 +LED	45 min
G14	10% H_2O_2	45 min
G15	SN+PPC+10% H_2O_2	45 min
G16	SN+PPC+10% H_2O_2 +LED	45 min

*SN: Scaffold Nanofibrilar

** PPC: Primer Polimérico Catalisador

No grupo controle negativo, nenhum tratamento foi realizado, permitindo a manutenção da cor do esmalte pós-manchamento. O controle positivo representa o grupo que recebeu a aplicação de um gel comercial contendo 35% de H_2O_2 (Whiteness HP, FGM, Joinville, SC, Brasil) sob a superfície do esmalte em 1 sessão de 45 minutos, semelhante ao que ocorre na prática clínica. Nos grupos experimentais, foram aplicados géis com diferentes concentrações de H_2O_2 sobre o esmalte revestido ou não com o conjunto SN+PPC e então irradiado ou não com o LED por 20 minutos.

Os grupos experimentais receberam géis com 10% ou 20% de H_2O_2 preparados em laboratório, bem como géis com 35% de H_2O_2 comercial ou preparado em laboratório. Previamente à aplicação do gel, os discos pertencentes aos grupos que receberam os biomateriais poliméricos (SN+PPC) foram inicialmente recobertos com o SN, o qual foi posicionado sobre o esmalte com uma pinça e então mantido no local com auxílio de um produto fotopolimerizável (TopDam, FGM, Joinville, SC, Brasil). Imediatamente após, 10 μ L do PPC foi aplicado e cuidadosamente espalhado sobre o

SN com auxílio de uma micropipeta para materiais viscosos (Microman M50, Gilson Inc). Finalmente, os géis clareadores foram preparados, sendo que 20 µL foi coletado e aplicado com micropipeta para materiais viscosos sobre os biomateriais poliméricos. Para os grupos onde o LED violeta foi utilizado (Bright Max Whitening, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), a irradiação foi aplicada por 20 minutos sem intervalo, seguindo os padrões de C (Ciclo)= 1, A (Ativação)= 20, P (Pausa)= 0 (De Oliveira Gallinari et al., 2019) durante a sessão clareadora. Os discos de esmalte/dentina foram posicionados em uma matriz de silicone branco, de forma que apenas a superfície de esmalte permaneceu exposta. Em seguida, o Espectrofotômetro foi posicionado sobre o espécime de forma padronizada e os valores de L*a*b* obtidos, antes (*baseline*) e 72 horas após o clareamento, período necessário para evitar que a desidratação do esmalte dental viesse interferir na análise de cor. Para avaliar a alteração de cor, foi utilizada a equação do CIEDE 2000 (ΔE_{00}) descrita por Paravina et al. (2015), pois este método permite maior acurácia por adicionar cinco correções para resolver o problema da uniformidade percentual encontrada na equação CIELAB. O índice de clareamento (ΔWI), conforme descrito por Pérez et al. (2016), determinado a partir dos valores obtidos no espectrofotômetro de acordo com as seguintes equações:

$$\begin{aligned}
 1) \quad & \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H} \\
 2) \quad & WI = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^* \\
 3) \quad & \Delta WI = WI - WI_{baseline}
 \end{aligned}$$

A seguir, os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , ΔE_{00} e ΔWI) obtidos para os grupos controles e experimentais foram analisados estatisticamente através do teste de ANOVA a 3 fatores e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores dos limiares de perceptibilidade (PT) e aceitabilidade (AT) foram adotados como 50:50%, ΔE_{00} foram 0,8 (PT) e 2,7 (AT) e ΔWI foram 0,72 (PT) e 2,60 (AT) (Paravina et. al, 2019).

4.1.7 Avaliação da geração de OH[•] nos géis clareadores

Para determinar o potencial dos biopolímeros e do LED em aumentar a taxa de decomposição do H₂O₂ e gerar o radical OH[•], a quantificação desta última molécula nos géis clareadores foi analisada (n=8), tal como previamente descrito por Ortecho-Zuta et al. (2019). Para isso, uma amostra circular do SN (6 mm de diâmetro), 10 µL de PPC e 20 µL do gel clareador (10%, 20% ou 35% H₂O₂) foram colocados em compartimentos de uma placa esterilizada de 96 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil). Os biopolímeros expostos aos géis clareadores foram incubados em temperatura ambiente pelos períodos de 0, 5, 10 e 15 min em contato com 140 µL da sonda fluorescente do kit OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity Activity Assay (HORAC, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA). Nos grupos onde o LED violeta foi usado, a irradiação foi aplicada sobre o gel pelo tempo de 20 minutos. As alíquotas presentes em cada compartimento foram transferidas para uma nova placa de 96 compartimentos e a fluorescência foi monitorada a 480 nm de excitação e 530 nm de emissão (Synergy H1, Biotek). No grupo CN, foi usado água ultra-pura (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) em substituição ao H₂O₂ presente na reação, sendo os valores normalizados pelo grupo CN. Na presença de HO[•], ocorre redução na emissão de fluorescência pela sonda HORAC. Desta forma, a emissão de fluorescência da sonda sem presença de amostra foi empregada para calcular a produção de HO[•], sendo os resultados calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Produção de OH}^{\bullet} = \frac{\text{Emissão de fluorescência no grupo controle negativo (100\%)}}{\text{Emissão de fluorescência no grupo experimental.}}$$

4.2 Estudo 2

Avaliação da quantidade de free-H₂O₂ capaz de se difundir através de discos de esmalte/dentina recobertos ou não com SN+PPC e tratados por 45 minutos com géis clareadores contendo 10%, 20% e 35% de H₂O₂ e então submetidos ou não à fotocatalise com LED violeta e determinação dos possíveis efeitos tóxicos da quantidade difundida de free-H₂O₂ sobre células odontoblastóides MDPC-23.

4.2.1 Cultura de células odontoblastóides MDPC-23

As células utilizadas neste estudo estavam estocadas em nitrogênio líquido dentro do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp. As células MDPC-23 foram descongeladas e então cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO. Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) em uma atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Passagens foram realizadas até se obter o número de células suficiente para executar todos os protocolos biológicos estabelecidos no estudo.

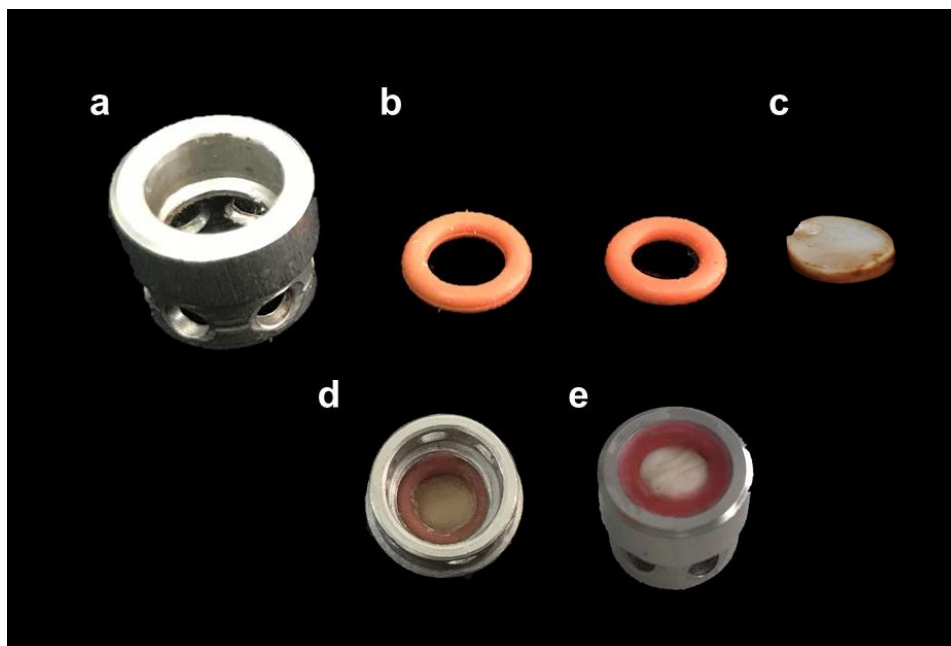
4.2.2 Obtenção dos espécimes

Um total de 128 discos de esmalte/dentina bovinos, distribuídos em 16 grupos (n=8), foram obtidos tal como descrito em detalhe no Estudo 1. Estes discos, os quais tiveram espessura padronizada de tal forma a simular incisivos inferiores humanos (2,3mm), foram submetidos ao protocolo de manchamento, também descrito anteriormente.

4.2.3 Procedimento experimental

Os discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) e mantidos em posição com dois anéis de silicone. Para prevenir extravasamentos do produto para o espaço pulpar da CPA, o que certamente poderia interferir nos resultados da pesquisa, o gap entre a borda do disco e a parede lateral da CPA foi selada com cera utilidade (Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 6) (Oliveira Duque et al., 2017).

Figura 6 - Representação esquemática da montagem do disco na CPA



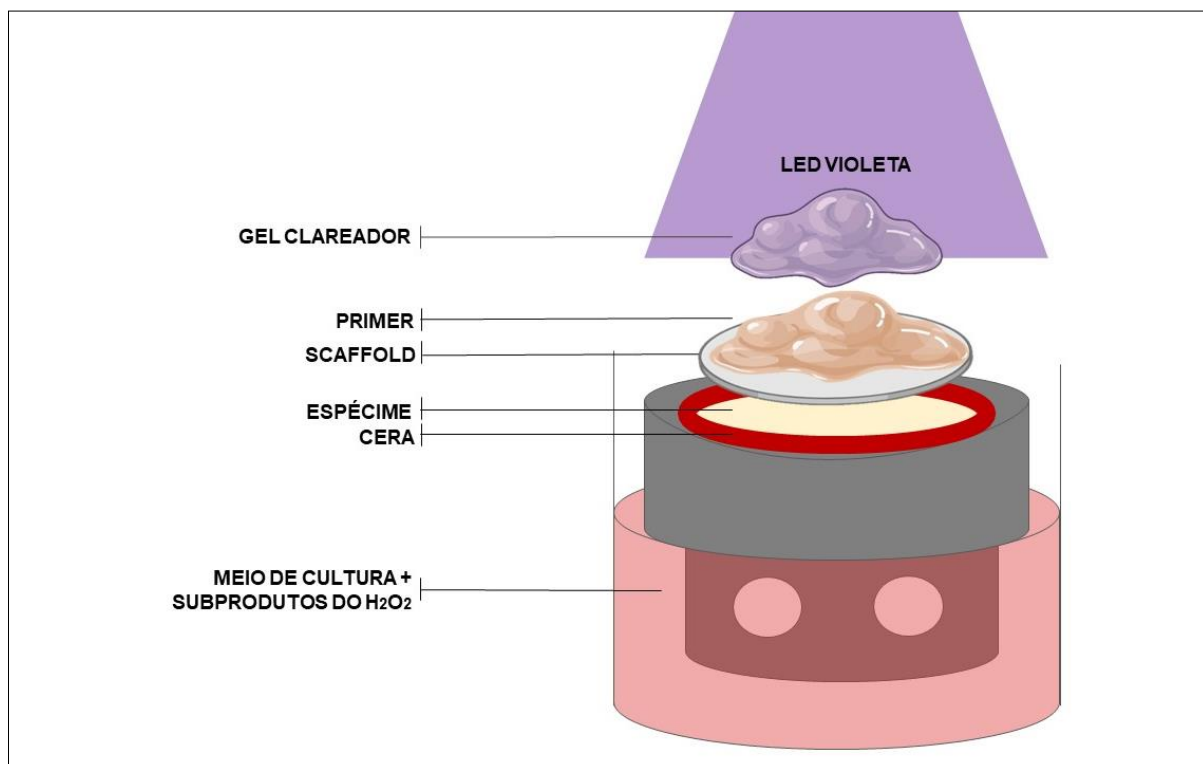
a) CPA construída em aço inoxidável; b) Anéis de silicone usados para manter o disco em posição na CPA; c) Característica do disco após ter passado pelo protocolo de manchamento com chá-preto; d) Visão inferior (compartimento pulpar) da CPA após posicionamento do disco de dentina e dos anéis de silicone; e) Visão superior (compartimento coronário) da CPA, onde o disco de dentina está posicionado e sua borda selada com cera.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As CPAs montadas com os discos foram esterilizadas em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil), e cada conjunto foi então posicionado individualmente em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp.). Em cada compartimento foi aplicado 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino, o qual permaneceu em contato com a dentina (voltada para baixo), sendo que o esmalte (voltado para cima) se manteve exposto para receber os tratamentos (Figura 7).

Os protocolos de clareamento avaliados nesta etapa do projeto foram os mesmos realizados no Estudo 1. Nesta etapa, imediatamente após executar os procedimentos sobre o esmalte, os extratos (DMEM + componentes dos géis clareadores que se difundiram pelos discos de esmalte/dentina) foram coletados e então aplicados por 1 hora sobre células MDPC-23 previamente cultivadas em placas esterilizadas de 24 e 96 compartimentos.

Figura 7 - Imagem ilustrativa representando todos os componentes do procedimento experimental.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.4 Quantificação de free-H₂O₂ presente nos extratos

Alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo (n=8) foram transferidas para tubos plásticos (Tubos de ensaio 5 mL, KASVI Imp.) contendo 900 µL de solução tampão acetato (2 mol/L, pH 4,5), permitindo a estabilização do H₂O₂. Em seguida, 500 µL desta solução foram transferidos para novos tubos plásticos (Tubos de ensaio 5 mL, KASVI Imp.) contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich). Os tubos foram então agitados e foi adicionado 50 µL de solução a 1 mg/mL da enzima horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). A absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Synergy H1) com comprimento de onda de 596 nm. Foi utilizado uma curva padrão de quantidades conhecidas de H₂O₂ para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em µg de H₂O₂ por mL de extrato (Duque CCO et al., 2014).

4.2.5 Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária (viabilidade celular - alamarBlue)

A análise da viabilidade celular (n=8) foi realizada pelo teste de alamarBlue. Para isso, alíquotas de 100 µL de cada extrato foram aplicadas sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas (10.000 cells/well) em compartimentos de placas esterilizadas de 96 compartimentos (Kasvi Imp.). Após incubar as células por 1 hora em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas ao fundo dos compartimentos foram incubadas em contato uma solução composta por 90 µL de DMEM e 10 µL da solução Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). As placas foram colocadas em incubadora por 4 horas a 37°C e 5% CO₂, possibilitando a penetração do corante através da membrana citoplasmática das células previamente expostas aos extratos. Após este período, a solução foi coletada e transferida para uma placa de 96 compartimentos (KASVI Imp.), sendo a fluorescência mensurada a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) (Leite et al., 2018). O valor médio de fluorescência do grupo CN (G1) no período de 4 horas foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo este o parâmetro usado como base para determinar os valores de viabilidade das células nos demais grupos experimentais (Leite et al., 2018).

4.2.6 Análise do estresse oxidativo

O estresse oxidativo celular foi avaliado por meio da estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células (n=8) imediatamente após o clareamento. Para isto, células MDPC-23 previamente cultivadas em compartimentos de placas esterilizadas de 96 compartimentos foram expostas por 30 minutos à sonda carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen) na concentração de 10 µg/mL. Esta sonda é permeável à membrana celular e fluoresce quando em contato com EROs. Na sequência, alíquotas de 100 µL dos extratos (n=8) de cada grupo foram aplicadas sobre essas células por 1 hora e a intensidade de fluorescência delas foi avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1) após o período de exposição ao extrato. Os dados foram normalizados pelo grupo controle negativo, obtendo-se assim a proporção de aumento na intensidade de fluorescência para cada grupo desta etapa do projeto (Ortecho-Zuta et al., 2019).

4.2.7 Avaliação da morfologia celular (MEV)

Para esta análise, as células foram semeadas (60.000 cells/well) sobre lamínulas de vidro previamente lavadas com solução de etanol a 70% e posicionadas no fundo de placas de 24 compartimentos (n=4) e os mesmos procedimentos clareadores descritos anteriormente foram realizados. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por 60 minutos em 1 mL de glutaraldeído 2,5% diluído em PBS (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Posteriormente, as lamínulas de vidro com as células foram lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem) e pós-fixadas com 200 µL de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich) a 1% por 60 minutos. Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens com 1 mL de PBS por 5 minutos cada. Após os procedimentos de fixação, as células foram desidratadas por meio de trocas seriadas (30 minutos cada) de 1mL das soluções de etanol à 30%, 50% e 70%, 95% (2x) e 100% (2x). Em seguida, foram realizadas três lavagens (20 minutos cada) das células com 200 mL de 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich). Por fim, as lamínulas com as células aderidas sobre elas foram posicionadas sobre stubs metálicos, fixadas com fita adesiva de carbono (3M Company, Saint Paul, Minnesota, EUA) e mantidas em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil) durante 72 horas. Então, foi realizada a metalização com ouro (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil), o que permitiu a análise das células em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 6610; JEOL Ltda, Akishima, Tokio, Japão) (Ortecho-Zuta et al., 2019).

4.3 Análise Estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e ao teste de Levene para avaliação da homoscedasticidade. Para os ensaios de eficácia estética, viabilidade celular, estresse oxidativo e difusão de H₂O₂ foi realizada análise de variâncias a três critérios (Three-Way ANOVA), onde a interação entre as variáveis foi avaliada (p<0,05). Para o teste de cinética de degradação foi realizado análise de variância para medidas repetidas. Todas as análises estatísticas realizadas empregaram um nível de significância de 5% (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY).

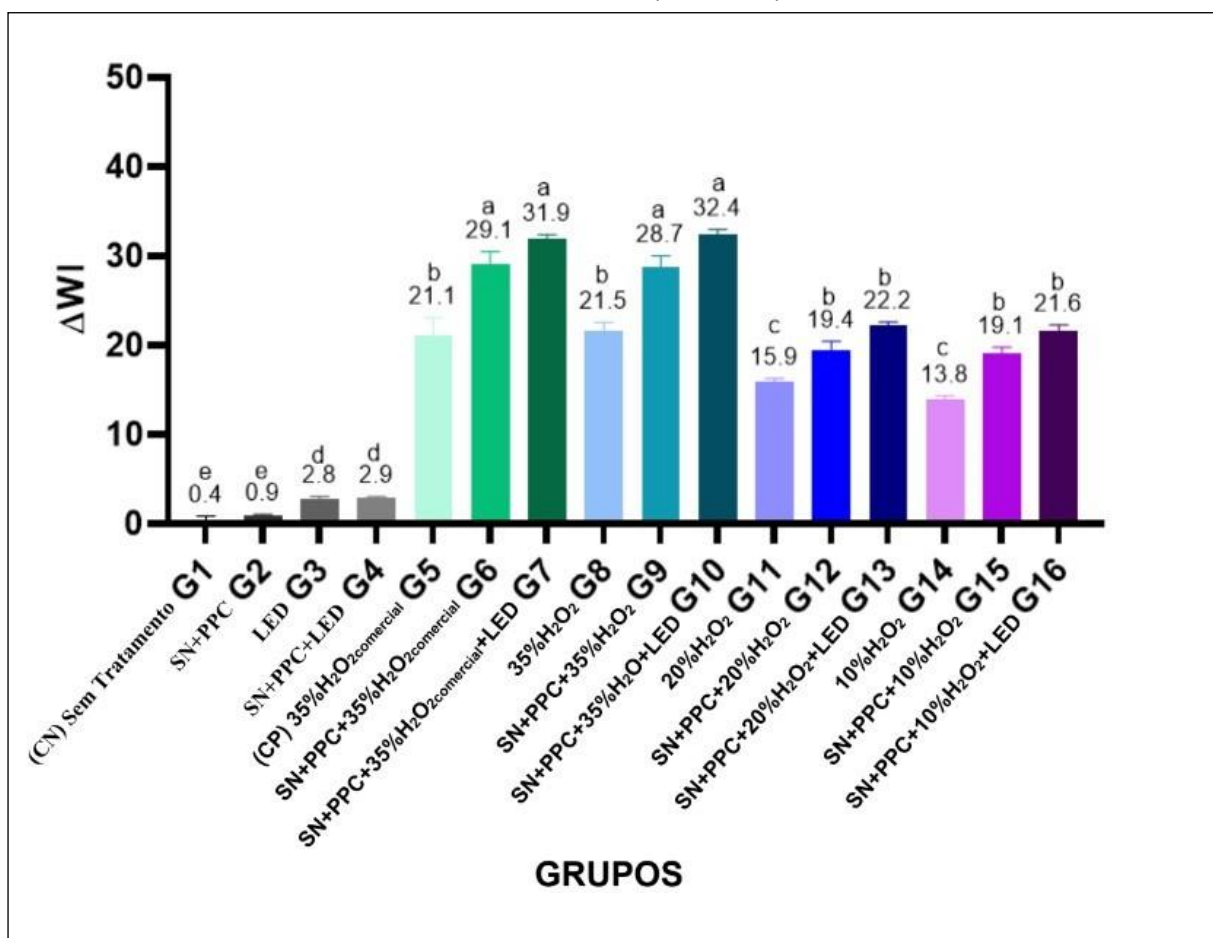
5 RESULTADOS

De acordo com a análise de variância a três critérios, foi observada a significância para todas as variáveis analisadas isoladamente (concentração de H_2O_2 , presença dos biomateriais e aplicação da fotocatalise; $p < 0,05$). Além disso, houve significância quando os três fatores estavam associados, demonstrando interação entre eles ($p < 0,05$). Sendo assim, a análise estatística seguiu apenas utilizando os valores de interação, uma vez que estes fatores não podem ser separados. Após a análise de ANOVA a três critérios, foi realizado o pós-teste complementar de Tukey.

5.1 Eficácia Estética

A partir dos resultados demonstrados na Figura 8, maiores valores de ΔWI foram encontrados em todos os grupos clareados em comparação aos grupos G1 (controle negativo) e G2 (SN+PPC; $p < 0,05$). A fotoativação dos géis clareadores aplicados sobre os dois biomateriais usados em conjunto (G7, G10, G13, G16), não causou diferença significativa nos valores de ΔWI , independente da concentração de H_2O_2 , quando comparados aos seus respectivos grupos (G6, G9, G12, G15), onde o LED violeta não foi usado ($p < 0,05$). Entretanto, os grupos que receberam aplicação apenas dos biomateriais (G6, G9, G12, G15) e aqueles que receberam os biomateriais e a fotoativação (G7, G10, G16, G16), apresentaram maiores valores de ΔWI em relação àqueles que receberam apenas o gel clareador (G5, G8, G11 e G14) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo G3 (LED) e G4 (SN+PPC+LED; $p > 0,05$). Esses dois grupos foram estatisticamente diferentes dos grupos G1 e G2, onde nenhum tratamento ou apenas SN+PPC foi usado, respectivamente ($p < 0,05$).

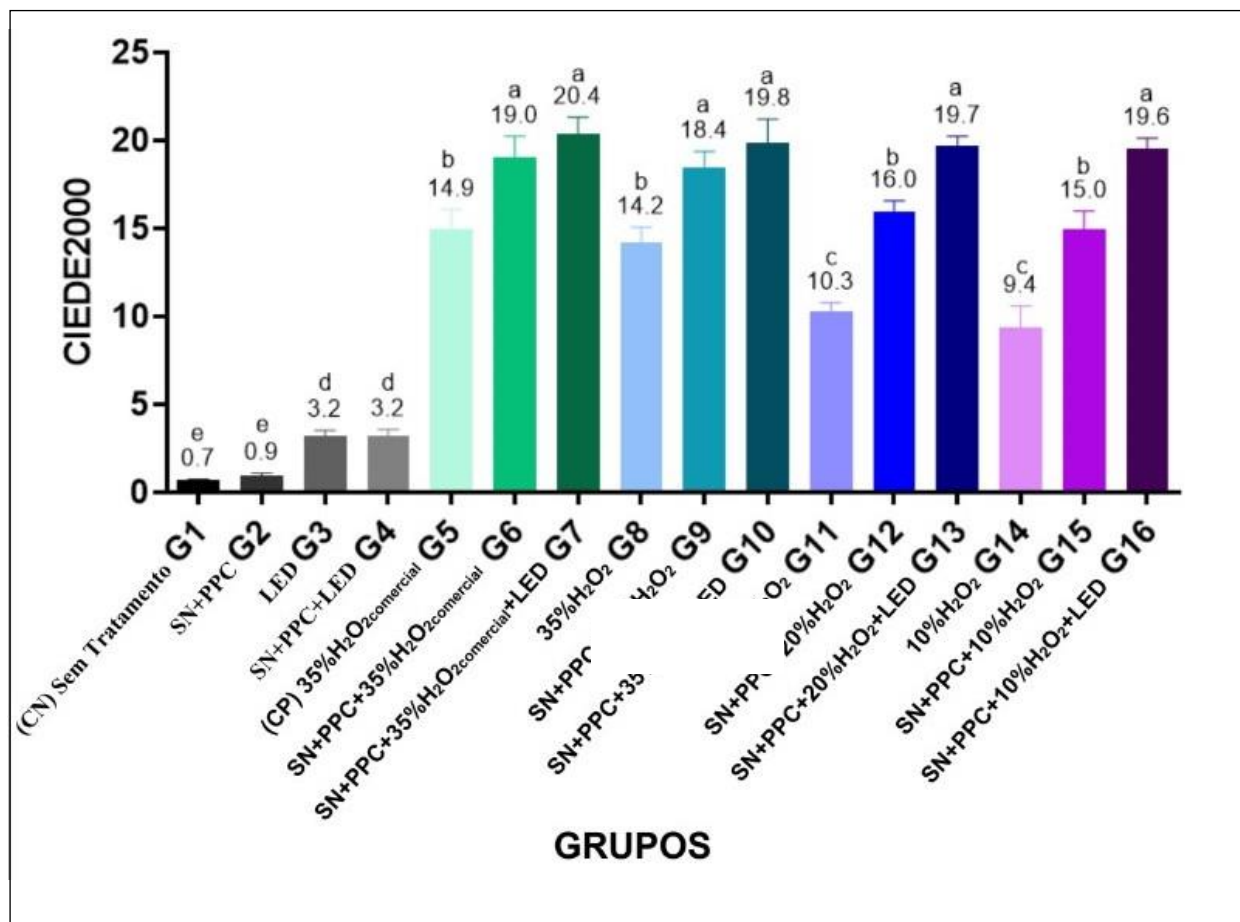
Figura 8 - Gráfico de barras dos valores médios (números) de ΔWI e desvio padrão



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Quanto aos valores de ΔE_{00} (Figura 9), a aplicação dos géis clareadores com 35% de H_2O_2 comercial (G6) e H_2O_2 experimental (G9) sobre o esmalte previamente revestido com os biomateriais, não diferiram estatisticamente dos grupos G7 e G10, onde os mesmos géis foram submetidos a fotoativação com LED violeta ($p > 0,05$). Por outro lado, géis com concentrações de 20% de H_2O_2 (G13) e 10% de H_2O_2 (G16), os quais foram aplicados sobre os biomateriais e então submetidos a irradiação com LED violeta, apresentaram valores de ΔE_{00} estatisticamente superiores aos grupos G12 e G15, onde os géis não foram fotocatalisados ($p < 0,05$). G13 e G16 também apresentaram valores de ΔE_{00} superiores ao procedimento tradicional de consultório (G5) ($p < 0,05$). Esse resultado demonstrou que géis clareadores com baixas concentrações de H_2O_2 causam significativa alteração cromática nos tecidos dentários quando os produtos são submetidos à catálise enzimática, associada à fotocatalise com LED violeta.

Figura 9 - Gráfico de barras dos valores médios (números) de ΔE_{00} e desvio-padrão

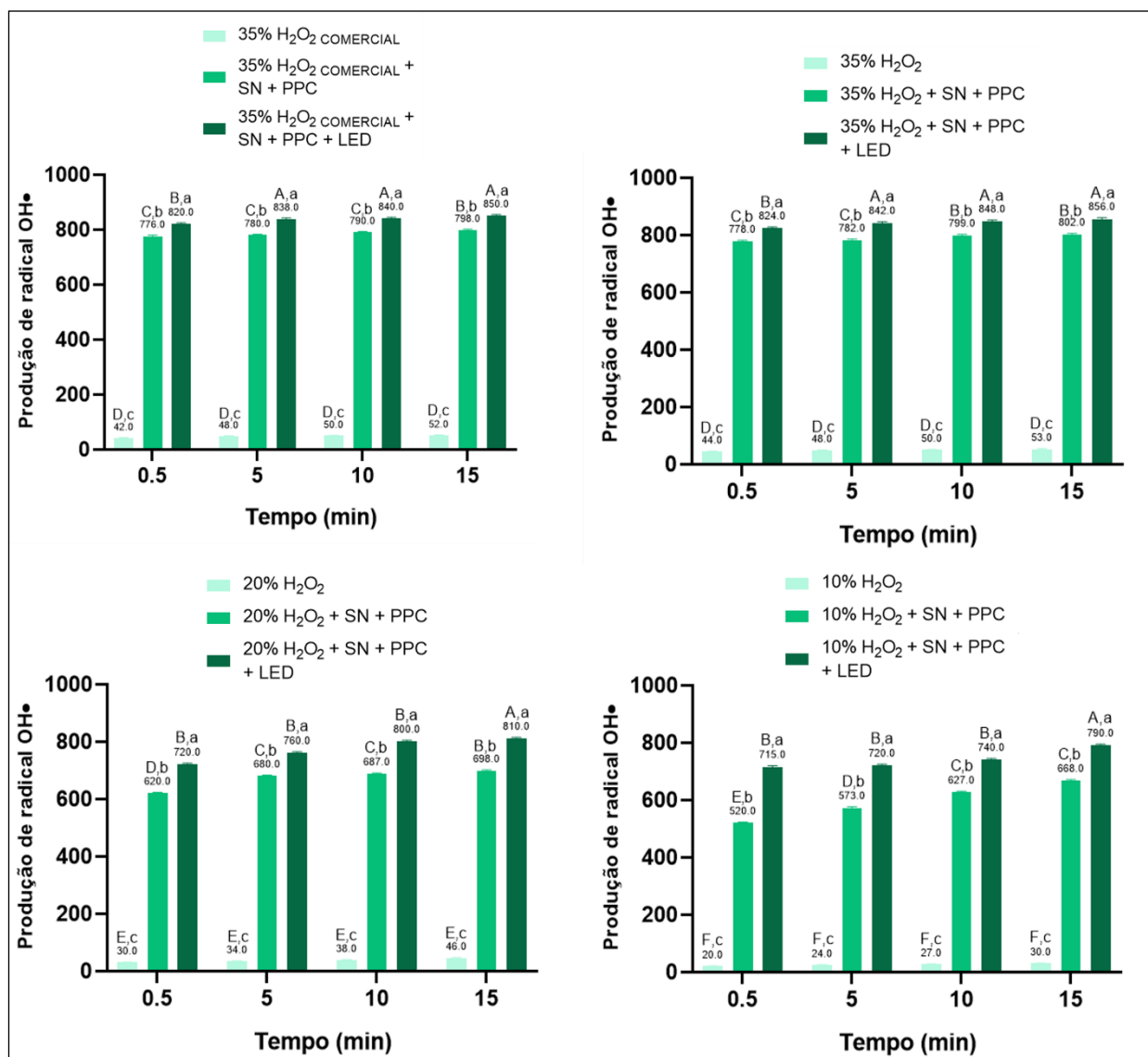
Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria

5.2 Cinética de Degradação do Gel Clareador

Os resultados da produção de radicais $\text{OH}^{\bullet}$ estão representados na Figura 10. Os grupos G7, G10, G13 e G16, onde os géis clareadores foram aplicados sobre os biomateriais (SN+PPC) e então irradiados com LED violeta, resultaram em maior produção de radicais $\text{OH}^{\bullet}$ em comparação aos grupos G6, G9, G12 e G15, nos quais não foi realizada a fotocatálise ($p < 0,05$). Foi possível observar ainda, que a irradiação dos géis aplicados sobre os biomateriais também causou maior produção de $\text{OH}^{\bullet}$ quando comparado àqueles grupos que receberam apenas o gel clareador (G5, G8, G11 e G14), independente da concentração de H_2O_2 presente no produto ($p < 0,05$).

Figura 10 - Cinética de liberação de $\text{OH}^{\bullet}$ ao longo do período de 15 minutos para os produtos contendo as diferentes concentrações de H_2O_2 (10, 20 e 35%), na presença ou ausência de SN+PPC e LED



Números representam valores médios de fluorescência da sonda HORAC em relação ao controle negativo em cada período de análise. As letras maiúsculas demonstram diferença significativa entre os tempos e letras minúsculas demonstram diferença entre os grupos em cada tempo. (ANOVA a três critérios para medidas repetidas; teste de Tukey; $p < 0,05$).

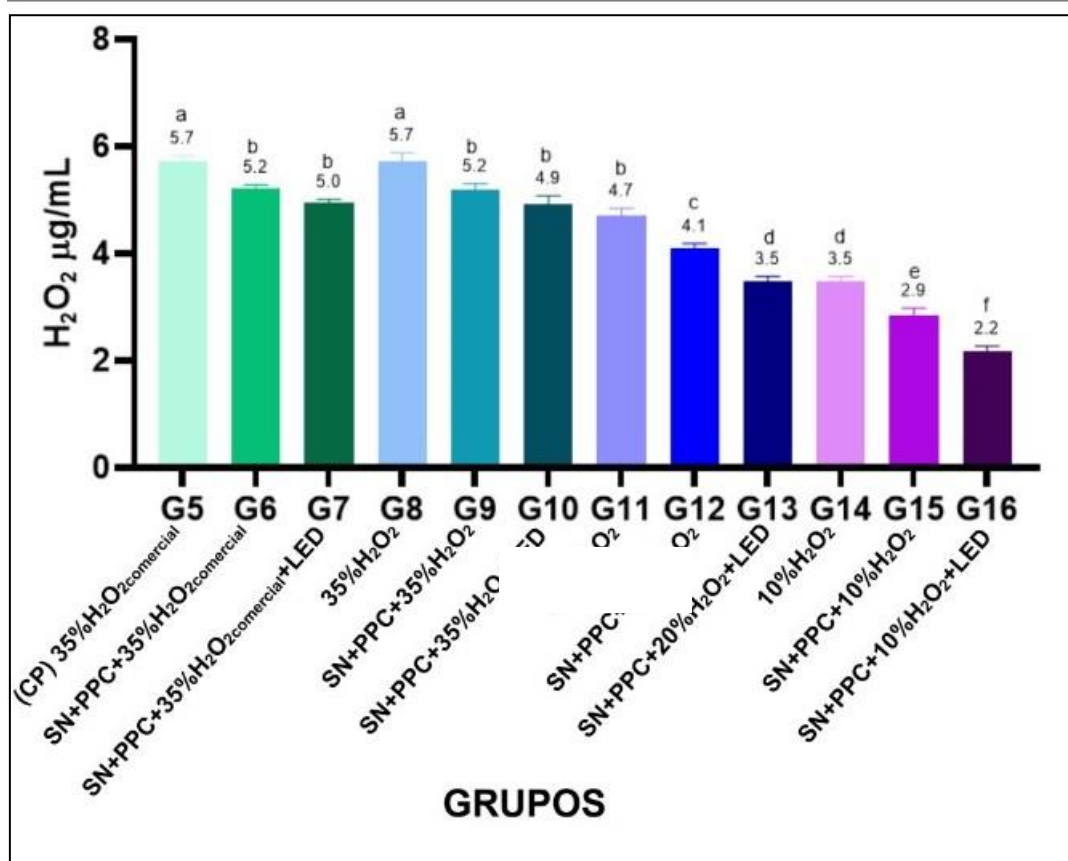
Fonte: Elaboração própria

5.3 Difusão Trans-amelodentinária de H_2O_2

Os maiores valores de difusão de H_2O_2 foram encontrados nos grupos G5 e G8, onde géis clareadores com 35% de H_2O_2 foram aplicados diretamente sobre o esmalte ($p < 0,05$). Não foi observado diferença estatística quando esses mesmos géis foram usados sobre esmalte previamente revestido com SN e PPC (G6 e G9) e então fotoativados (G7 e G10) com LED violeta ($p > 0,05$). Esses grupos G6, G7, G9 e G10

também não diferiram estatisticamente do grupo G11, onde um gel clareador com 20% de H_2O_2 foi aplicado diretamente sobre o esmalte ($p>0,05$). Em contrapartida, G12 (SN+PPC+20% H_2O_2) e G13 (SN+PPC+20% H_2O_2 +LED) apresentaram diferentes valores de difusão de H_2O_2 , sendo que a menor difusão ocorreu no grupo onde o gel foi foto-catalisado com LED violeta ($p<0,05$). Foi interessante observar que G13 não diferiu estatisticamente de G14, no qual um gel com 10% de H_2O_2 foi aplicado diretamente sobre o esmalte ($p>0,05$). O grupo G15 (SN+PPC+10% H_2O_2) apresentou maior difusão de H_2O_2 em comparação a G16 (SN+PPC+10% H_2O_2 +LED), sendo que as células desse último grupo exibiram o menor estresse oxidativo celular ($p<0,05$) (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico de barras referente aos valores médios (numéricos) e desvio padrão da difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 liberado dos géis clareadores



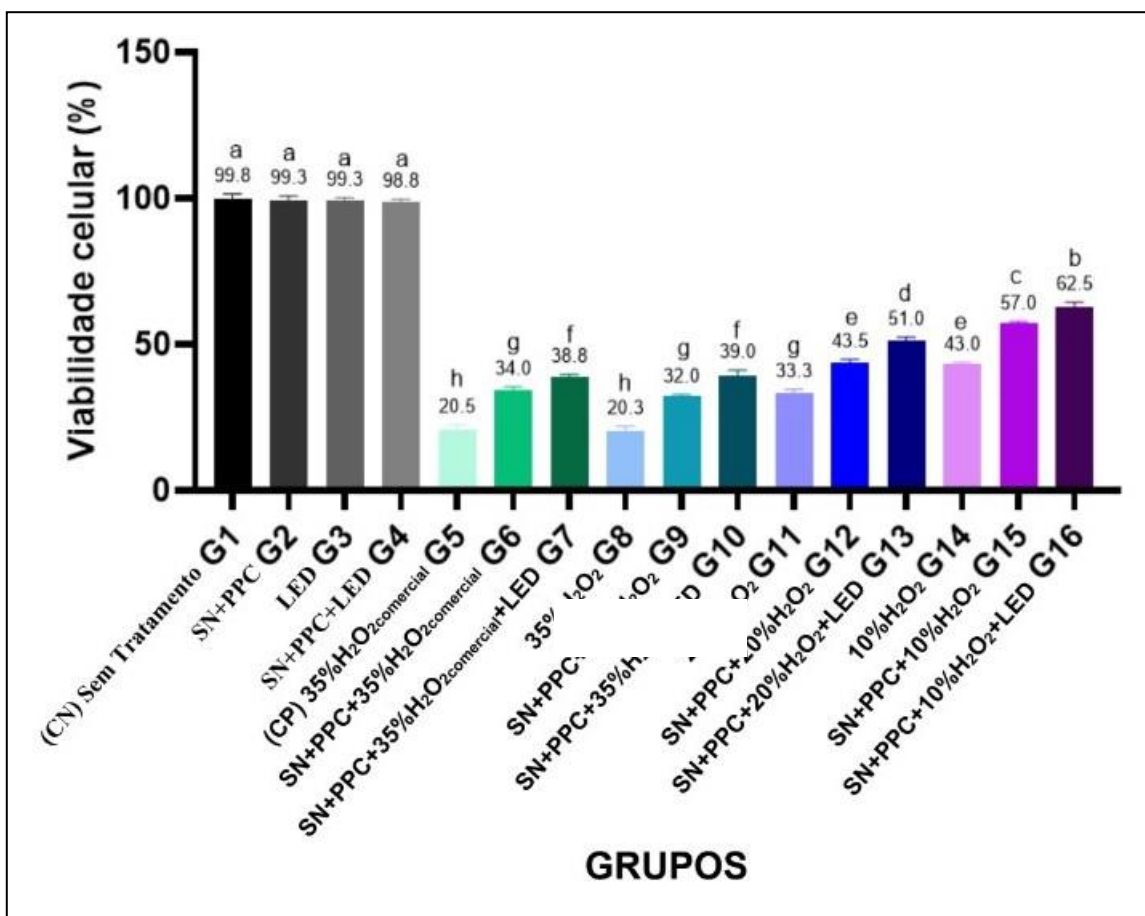
Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a três critérios; teste de Tukey; $p<0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Citotoxicidade Trans-amelodentinária

De acordo com os resultados de citotoxicidade trans-amelodentinária (Figura 12), observou-se diminuição da viabilidade celular em todos os grupos onde foi aplicado gel clareador, independente da concentração de H_2O_2 em comparação ao controle negativo (G1; $p < 0,05$). Por outro lado, os grupos G2 (SN+PPC), G3 (LED) e G4 (SN+PPC+LED), não diferiram estatisticamente de G1 ($p > 0,05$), indicando, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009, a citocompatibilidade dos biomateriais e da luz violeta usada no estudo. Os menores valores de viabilidade celular foram encontrados nos grupos onde géis clareadores com 35% de H_2O_2 (G5 e G8) foram aplicados diretamente sobre o esmalte ($p < 0,05$), seguido dos grupos onde esses géis foram aplicados sobre os biomateriais poliméricos (G6 e G9) e do grupo G11, no qual o gel com 20% de H_2O_2 foi usado diretamente sobre o esmalte. Em G16 (SN+PPC+10% H_2O_2 +LED), as células exibiam a maior taxa de viabilidade, a qual foi estatisticamente diferente de todos os demais grupos clareados ($p < 0,05$). Células MDPC-23 pertencentes ao grupo G12 (SN+PPC+20% H_2O_2) apresentaram viabilidade estatisticamente semelhante a G14, onde o gel clareador com 10% de H_2O_2 foi aplicado diretamente sobre o esmalte ($p > 0,05$).

Figura 12 - Gráfico de barras referente aos valores médios (números) e desvio padrão da viabilidade das células MDPC-23 em relação aos grupos estabelecidos



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

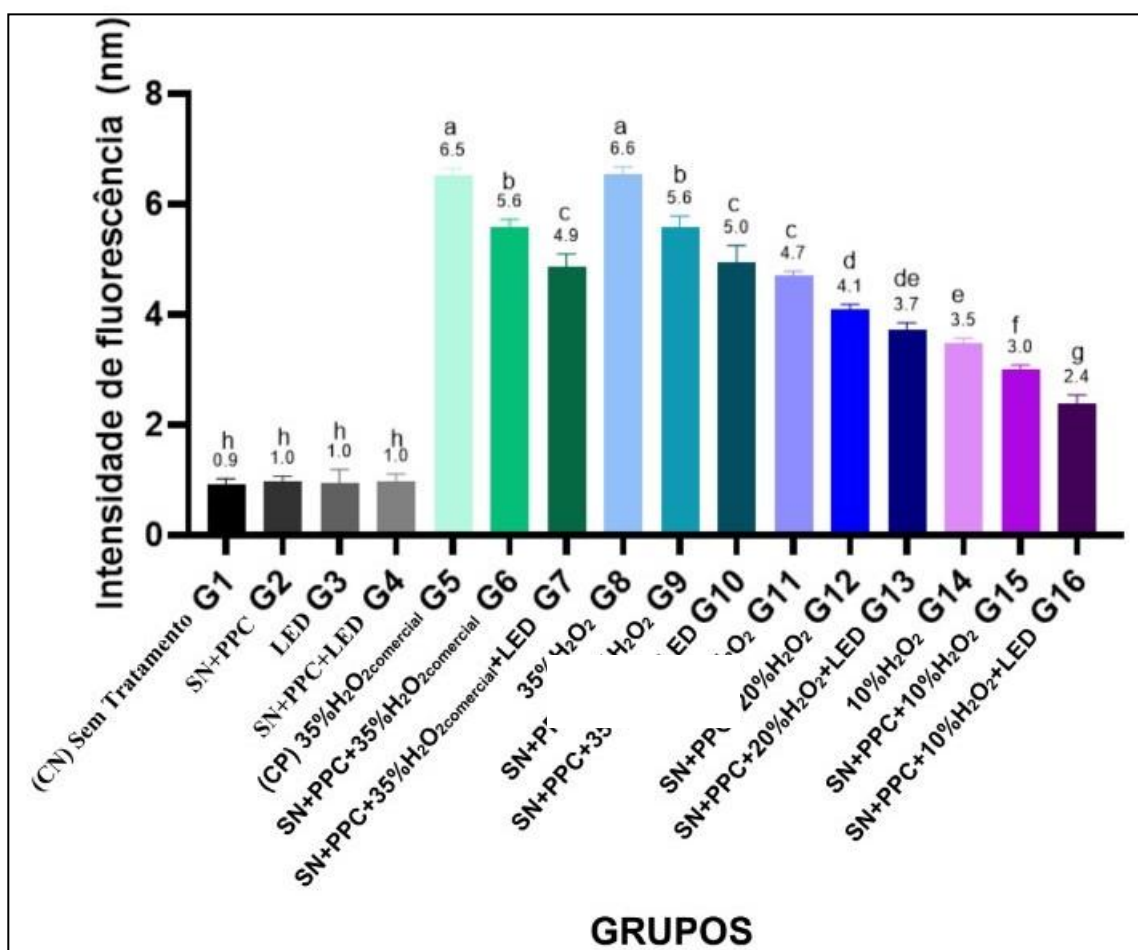
Fonte: Elaboração própria

5.5 Estresse Oxidativo

Tal como demonstrado na Figura 13, aumento do estresse oxidativo celular ocorreu em todos os grupos que receberam gel clareador em comparação a G1 (controle negativo), G2 (SN+PPC), G3 (LED) e G4 (SN+PPC+LED). Os maiores valores de estresse oxidativo foram observados nos grupos G5 e G8, nos quais géis clareadores com 35% de H₂O₂ foram aplicados diretamente sobre o esmalte ($p < 0,05$). Queda no estresse oxidativo celular ocorreu quando esses mesmos géis clareadores foram aplicados sobre esmalte previamente revestido com SN e PPC (G6 e G9), sendo essa redução ainda mais significativa quando os produtos foram irradiados com LED violeta (G7 e G10) ($p < 0,05$). Porém, G7 e G10 não diferiram estatisticamente do grupo G11, onde um gel clareador com 20% de H₂O₂ foi aplicado diretamente sobre esmalte ($p > 0,05$). A menor taxa de estresse oxidativo celular foi observado no grupo G16

(SN+PPC+10% H_2O_2 +LED) em comparação a todos os demais grupos clareados ($p < 0,05$). Os grupos G12 (SN+PPC+20% H_2O_2) e G13 (SN+PPC+20% H_2O_2 +LED) não diferiram entre si, sendo que apenas G13 foi semelhante a G14, onde um gel com 10% de H_2O_2 foi aplicado diretamente sobre o esmalte ($p > 0,05$).

Figura 13 - Gráfico de barras representativo dos valores médios (números) e desvio padrão da intensidade de fluorescência da sonda carboxy-H2DCFDA (estresse oxidativo)



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

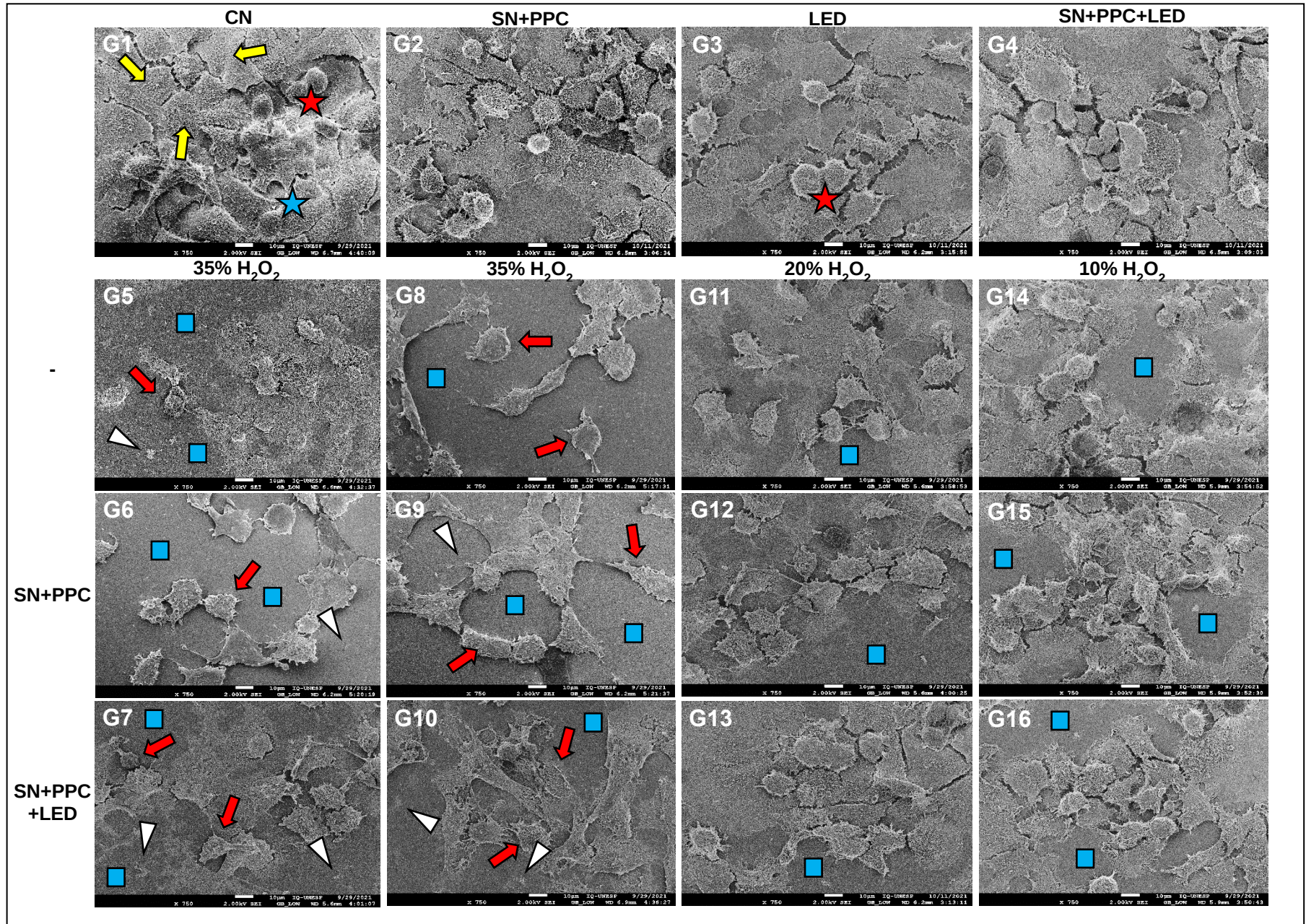
Fonte: Elaboração própria

5.6 Morfologia Celular (MEV)

A análise das imagens obtidas em MEV, as quais são representativas de todos os grupos experimentais e controle deste estudo, permitiu determinar se houve ou não alterações na morfologia e no número de células que permaneceram aderidas ao substrato após serem expostas aos extratos (Figura 14). De maneira geral, redução no número e alteração na morfologia celular foi observado em todos os grupos clareados em comparação ao grupo controle negativo (G1). Nos grupos G2 (SN+PPC), G3 (LED)

e G4 (SN+PPC+LED), onde nenhum protocolo clareador foi realizado, as células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibiam amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos originados de sua membrana, semelhante ao observado no grupo G1 (Figura 14/G1). Essas células ocupavam praticamente todo substrato, demonstrando que os biomateriais poliméricos (SN e PPC) e o LED violeta não causam toxicidade celular quando aplicados sobre o esmalte (Figura 14/G2; G3; e G4). Entretanto, nos grupos G5 e G8, onde géis com 35% de H_2O_2 foram aplicados diretamente sobre o esmalte, ocorreu notável redução no número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro (Figura 14/G5; G8). Essas células se apresentavam morfológicamente arredondadas e com menor quantidade de prolongamentos citoplasmáticos. Quando géis clareadores com 20% de H_2O_2 (G11; Figura 14; G11) e 10% de H_2O_2 (G14; Figura 14/G14) foram aplicados diretamente sobre o esmalte, a redução no número de células e as alterações morfológicas foram menos graves em comparação aos géis com 35% de H_2O_2 . Nos grupos G6 e G9, onde géis com 35% de H_2O_2 foram aplicados sobre esmalte previamente recoberto com SN+PPC, apesar das células apresentarem maior viabilidade em comparação a G5 e G8, foi possível observar que para ambos os grupos houve importante redução no número e alteração na morfologia das células que permaneceram aderidas ao substrato (Figura 14/G6; G9). Em G12 e G15, onde géis clareadores com 20% de H_2O_2 e 10% de H_2O_2 foram aplicados sobre esmalte revestido com SN+PPC, respectivamente, uma quantidade elevada de células MDPC-23, as quais exibiam discretas alterações morfológicas, se manteve aderida ao substrato de vidro (Figura 14/G12; G15). Porém, G15 apresentou os melhores resultados em comparação a G12. Importante redução numérica e alteração na morfologia celular foi observado nos grupos G7 (Figura14/G7) e G10 (Figura14/G10), onde géis clareadores com 35% de H_2O_2 foram aplicados sobre esmalte previamente recoberto com SN+PPC, e então irradiados com LED violeta. Isso demonstra que a associação de diferentes estratégias de catálise não é capaz de prevenir a citotoxicidade de géis clareadores com concentrações elevadas de H_2O_2 , tal como 35%. Tanto no grupo G13 (SN+PPC+20% H_2O_2 +LED) quanto no grupo G16 (SN+PPC+10% H_2O_2 +LED), uma elevada quantidade de células MDPC-23, as quais não exibiam graves alterações morfológicas, permaneceu aderida ao substrato de vidro (Figura 14/G13; G16). Este resultado positivo foi mais evidente em G16, onde um gel com 10% de H_2O_2 foi submetido às estratégias de catálise química e fotocatálise.

Figura 14 - Eletrofotomicrografias representativas dos grupos controles e experimentais (MEV, magnificação original x750)



G1, G2, G3 e G4: Grande quantidade de células MDPC-23 (setas amarelas) são observadas recobrando, quase que completamente, o substrato. As estrelas vermelha e azul representam células em fase inicial e final de mitose, respectivamente. Note, em todas as imagens que as células exibem amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos, os quais parece mantê-las aderida ao substrato. **G5, G6, G7, G8, G9 e G10:** Notável redução no número de células, as quais apresentam morfologia alterada (setas vermelhas), pode ser observado. Note a ampla área do substrato de vidro exposta (quadrado azul), sobre a qual restos de células mortas se mantêm aderidos (cabeças de seta). **G11, G12, G13 e G14:** Apesar da redução no número de células aderidas ao substrato, nestes grupos as células exibem morfologia semelhante àsquelas observadas no grupo controle (G1). Note que as área de substrato exposto (quadrado azul) azuis são menores do que observado nos grupos onde géis com 35% de H₂O₂ foram usados, independente do emprego de SN+PPC e/ou LED violeta (G5, G6, G7, G8, G9 e G10).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

A busca por protocolos clareadores de consultório biocompatíveis com o complexo dentina-polpa é justificada pelos intensos efeitos tóxicos que este tipo de terapia estética pode causar ao elemento dental^{10,11,14}, os quais parecem estar associados a dor pós-tratamento, frequentemente relatada pelos pacientes^{19,20,21}. Já foi demonstrado que o uso de géis clareadores com elevadas concentrações de H₂O₂ traz riscos para as células da polpa dental, visto que essa molécula de baixo peso molecular, a qual é uma espécie química altamente tóxica, tem potencial para se difundir rapidamente pelo esmalte e dentina, alcançando a câmara pulpar^{8,9}. Assim, diversos pesquisadores têm relatado que os efeitos biológicos adversos causados pelo clareamento dental de consultório, estão diretamente relacionados com a quantidade de H₂O₂ não reagido com os cromóforos do dente (free-H₂O₂), os quais conseguem entrar em contato com as células da polpa^{12,13,8,9}. Dentro desse contexto, vários estudos demonstraram que quanto maior a concentração de H₂O₂ no gel clareador e seu tempo de aplicação sobre o esmalte, mais intensos são os danos celulares indiretos causados pelo tratamento^{12,13,24}. No presente estudo, o efeito citotóxico trans-amelodentinário de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H₂O₂, foi avaliado, porém padronizado em 45 minutos o tempo de aplicação dos produtos sobre o esmalte. O período de 45 minutos de uso dos produtos foi estabelecido com objetivo de simular uma sessão de clareamento dental convencional realizado em consultório^{47,3}. Para executar esse estudo, foram utilizadas câmaras pulpares artificiais (CPAs), as quais têm sido amplamente empregadas para analisar a propriedade biológica indireta de diferentes materiais dentários aplicados sobre esmalte ou dentina^{85,10,11,24}. Em cada CPA, foi adaptado um disco de esmalte/dentina bovino com espessura de 2,3 mm. Este protocolo foi usado com objetivo de simular a técnica clareadora realizada em incisivos inferiores²², os quais correspondem aos dentes mais suscetíveis aos efeitos adversos deste tratamento^{17,20,86}. É importante ressaltar que dentes bovinos têm sido comumente utilizados em pesquisas laboratoriais devido à semelhança morfológica, estrutural e química aos dentes humanos^{87,88}.

De maneira geral, os resultados de toxicidade obtidos na presente pesquisa corroboram com os dados de investigações prévias, pois a redução na

concentração de H_2O_2 no gel clareador diminuiu a intensidade dos danos e o estresse oxidativo observados nas células pulpares (Figuras 12 e 13). Esses dados foram diretamente relacionados com a quantidade de H_2O_2 que alcançou o compartimento coronário da câmara pulpar artificial (Figura 11). Porém, quando os géis clareadores foram aplicados sobre o esmalte previamente revestido com o SN associado ao PPC, os efeitos tóxicos foram minimizados. A redução da citotoxicidade foi ainda maior quando os géis aplicados sobre esses biomateriais poliméricos foram submetidos à fotocatalise com LED violeta. Essas estratégias de catalisar, por diferentes vias, o H_2O_2 liberado dos géis clareadores, tornando o procedimento mais compatível com as células pulpares, foi menos efetivo para os produtos que continham 35% de H_2O_2 na sua composição. Esse dado indica que concentrações muito elevadas de H_2O_2 nos géis clareadores, tal como 35% ou mais, parecem não ser adequados para uso neste tipo de tratamento estético profissional, sinalizando para a possibilidade de se trabalhar com géis menos concentrados submetidos à diferentes estratégias de catálise.

Carey et al.⁸⁰ (2014) relataram que a atividade oxidativa do H_2O_2 usado de forma isolada, tal como encontrado no gel clareador de consultório, ocorre dentro de uma simples equação, onde um mol de H_2O_2 gera uma molécula de H_2O e $\text{OH}^\bullet$. Durante o processo de clareamento, apenas parte do H_2O_2 aplicado sobre a superfície do esmalte é capaz de reagir com os componentes orgânicos do dente, liberando moléculas de $\text{OH}^\bullet$ e outras espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs). Essas novas EROs geradas pela decomposição do H_2O_2 são importantes para favorecer o resultado estético da terapia, visto que possuem elevado potencial de oxidação e curto tempo de meia-vida^{89,90,8}. Dessa forma, quanto maior a decomposição do H_2O_2 , maior quantidade de $\text{OH}^\bullet$ é liberada, sendo essa molécula capaz de quebrar rapidamente as ligações de carbono dos pigmentos, acelerando a alteração cromática dos tecidos dentários e ao mesmo diminuindo a quantidade de free- H_2O_2 com potencial para chegar à polpa. Consequentemente, o uso de substâncias com propriedade de catalisar a reação de oxidação do H_2O_2 liberado dos géis clareadores pode ser uma estratégia interessante a ser empregada no clareamento dental de consultório. Baseados nesses dados, diversos pesquisadores utilizaram os conhecimentos previamente estabelecidos para desenvolver uma sequência de pesquisas, onde foi possível

demonstrar o interessante papel da catálise química e da fotocatalise do H_2O_2 na diminuição da quantidade de free- H_2O_2 em géis clareadores utilizados em consultório^{14,39,91,61}. Dentro de uma sequência lógica de evolução científica neste campo da Odontologia Estética, o presente estudo laboratorial buscou, com a proposta de otimizar a eficácia estética e diminuir os efeitos citotóxicos da terapia clareadora convencional de consultório, associar dois biomateriais poliméricos (SN e PPC) à géis clareadores com diferentes concentrações de H_2O_2 , os quais foram submetidos ou não a fotocatalise com o LED violeta.

De acordo com os resultados de cinética de degradação do H_2O_2 , aumento na produção de $\text{OH}^\bullet$ ocorreu nos grupos que receberam o conjunto SN+PPC, sendo os valores ainda maiores nos grupos onde os géis clareadores também receberam fotocatalise com LED. Em estudo laboratorial prévio, Ortecho-Zuta et al.¹⁴ (2019) demonstraram a ocorrência de aumento significativo na produção de $\text{OH}^\bullet$ quando a enzima peroxidase hêmica (HRP) foi adicionada num gel clareador com 35% de H_2O_2 , imediatamente antes da aplicação do produto sobre o esmalte dentário. Em contato com H_2O_2 , a HRP é capaz de reduzir a energia cinética necessária para que as moléculas iniciem a reação, aumentando a taxa de decomposição do H_2O_2 , o que gera maior liberação de EROs⁶¹. O resultado do aumento na produção de $\text{OH}^\bullet$ estaria relacionado a maior eficácia estética observada no presente estudo, bem como em outros estudos onde a enzima HRP foi incorporada ao protocolo de clareamento dental de consultório^{77,76,14}.

O mecanismo de ação de fontes luminosas comumente utilizadas nas técnicas de clareamento de consultório ocorre especialmente por meio do aquecimento gerado pela luz, o que favorece a decomposição do H_2O_2 para gerar EROs mais potentes³⁷. Contudo, a eficácia e segurança das fontes de luz têm sido amplamente debatidas^{92,8,93,42}. Entre as diversas fontes de luz estudadas, o LED violeta tem ganhado destaque por ser segura e apresentar comprimento de onda entre 405-410nm, valor que representa o pico de absorção dos cromóforos presentes nos tecidos dentários⁴¹. Sendo assim, a alteração cromática dos dentes causada pelo LED violeta ocorreria por fotólise, independente do uso de um gel clareador contendo H_2O_2 na terapia^{38,39}. Esse efeito do LED violeta foi confirmado no presente estudo, onde foi possível observar ação clareadora decorrente do uso isolado desta fonte de luz (G3 e G4).

Contudo, a eficácia estética gerada pela fotólise resultante do uso isolado do LED violeta (G3) foi cerca de 69% menor do que àquela observada quando o gel com 10% de H_2O_2 (G14) foi aplicado por 45 minutos sobre o esmalte. O gel clareador com 35% de H_2O_2 aplicado sobre esmalte revestido com SN+PPC e irradiado com LED violeta (G7 e G10), resultou em eficácia estética cerca de 83% maior do que o uso isolado do LED violeta. Gallinari et al.³⁹ (2019) avaliaram o uso do LED violeta isolado ou associado a um gel de 17,5% de H_2O_2 . Os autores relataram que apesar do LED violeta ser capaz de promover alteração cromática nos discos de esmalte/dentina, os melhores resultados foram obtidos quando essa fonte de luz foi utilizada em associação com o gel clareador. Assim, é possível estabelecer que o LED violeta é um importante coadjuvante no clareamento dental onde géis são aplicados sobre o esmalte. Considerando os interessantes resultados da presente pesquisa, pode-se inferir ainda, que o LED violeta tem papel fundamental na fotocatalise do H_2O_2 liberado do gel clareador, sendo que esta estratégia, por conseguir aumentar a geração de OH^* , favorece a alteração cromática dos tecidos dentários e parece reduzir a citotoxicidade da terapia estética. Porém, o possível efeito do LED violeta como fotoestimulador da ação catalítica da enzima HRP contida no primer polimérico ainda necessita ser avaliado em futuros estudos.

Na presente investigação laboratorial, o primer polimérico contendo HRP foi aplicado após o recobrimento da superfície do esmalte com um scaffold nanofibrilar à base de PLC. Este procedimento foi realizado com objetivo de estabelecer uma barreira semi-permeável, com capacidade para limitar a passagem de elevada concentração de H_2O_2 até os tecidos dentários subjacentes. Além da barreira física, a enzima HRP presente no primer teria a função de catalisar parte do H_2O_2 liberado do gel clareador, sendo que o componente orgânico do próprio PPC e também do SN poderia interagir e assim participar da degradação desta molécula tóxica. Assim, a ação conjunta do SN e do PPC poderia favorecer a geração de OH^* , reduzindo a quantidade de free- H_2O_2 capaz de alcançar as células pulpares, bem como acelerando a alteração cromática do tecido dentário. No presente estudo, o uso conjunto de SN+PPC aumentou a eficácia estética e reduziu a citotoxicidade trans-amelodentinária causada pelos géis clareadores contendo diferentes concentrações de H_2O_2 . Numa pesquisa recente, Ortecho-Zuta et al.⁶¹ (2021) avaliaram os efeitos tóxicos

de um gel clareador com 35% de H_2O_2 quando aplicado sobre esmalte revestido apenas com um primer contendo HRP ou quando esse bioproduto foi associado com um SN. Os autores observaram que os menores valores de estresse oxidativo celular ocorreram apenas quando os biomateriais poliméricos foram utilizados em conjunto. Este resultado demonstra que a ação catalisadora do PPC é complementada pela barreira física formada pelo SN e pela degradação complementar do H_2O_2 causada por seu componente orgânico. No presente estudo, além do uso associado de SN e PPC, a fotocatálise complementar realizada com LED violeta determinou os maiores valores de viabilidade das células MDPC-23, as quais exibiam os menores valores de estresse oxidativo (Figura 11), bem como morfologia semelhante àquela observada no grupo controle (Figura 14). Diante desses dados científicos, é possível sugerir que quanto mais intensa a degradação do H_2O_2 liberado dos géis clareadores de consultório e consequentemente maior a geração de $\text{OH}^{\bullet}$, menor os efeitos tóxicos e mais significativa a alteração cromática causada pelo clareamento dental profissional.

No presente estudo, a avaliação da eficácia estética foi determinada após 72 horas de concluídos os procedimentos clareadores, visto que além da prolongada reação de oxidação do H_2O_2 , a desidratação e desmineralização do dente atuam alterando a coloração do elemento dental logo após o procedimento⁵. Os valores de índice de clareamento (ΔWI) obtidos nesse estudo demonstraram que o uso dos biomateriais associados a fotocatálise (G7, G10, G13, G16) não determinou resultados estatisticamente diferentes daqueles grupos onde apenas SN e PPC foram usados (G6, G9, G12, G15), independente da concentração de H_2O_2 nos géis. Contudo, os valores de ΔE_{00} obtidos na presente pesquisa demonstraram que as maiores alterações colorimétricas ocorreram nos grupos onde géis com 20% (G13) e 10% (G16) de H_2O_2 foram aplicados sobre os biomateriais e então submetidos à fotocatálise com LED violeta em comparação aos grupos G12 e G15, nos quais apenas SN e PPC foram usados. Esses resultados indicam que a ação catalisadora do LED violeta é aumentada quando essa fonte de luz é aplicada sobre géis clareadores com baixas concentrações de H_2O_2 . Foi possível determinar, ainda, que o grupo G16, onde o gel clareador com 10% de H_2O_2 foi aplicado sobre esmalte revestido com SN+PPC, e então irradiado com LED violeta, apresentou valor de ΔE_{00} cerca de

24% maior do que aquele alcançado com o clareamento convencional de consultório (G5). Esses interessantes dados científicos indicam a possibilidade de se conseguir resultados estéticos excelentes, empregando diferentes estratégias para catalisar H_2O_2 liberado de géis clareadores contendo baixa concentração desta EROs. Uma abordagem interessante para um próximo estudo seria a associação das estratégias catalisadoras avaliadas nesta investigação sobre a redução do tempo empregado em uma sessão clínica, o que poderia reduzir os custos desta modalidade de tratamento estético, tornando-a acessível para um maior número de pessoas. Todavia, outros estudos são necessários para avaliar especificamente este tópico dentro da Odontologia Estética.

De maneira geral, foi observado no presente estudo que o menor valor de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 ocorreu no grupo onde o gel menos concentrado (10%) foi aplicado sobre esmalte previamente revestido com SN+PPC e então irradiado com LED violeta (G16). Nesse grupo específico, a concentração de H_2O_2 difundido foi cerca de 61% menor do que no grupo G5, o qual representa o clareamento dental convencional realizado em consultório. Nos grupos G6, G9, G12 e G15, onde os géis clareadores foram usados em associação com SN+PPC, a viabilidade celular foi cerca de 66%, 66%, 31% e 33% maior do que nos grupos G5, G8, G11 e G14, respectivamente, onde os mesmos géis foram aplicados diretamente sobre o esmalte. Nos grupos G7, G10, G13 e G16, onde os géis receberam catálise complementar por meio do uso do LED violeta, os valores de viabilidade foram de aproximadamente 89%, 89%, 53% e 45% maior do que nos grupos G5, G8, G11 e G14, respectivamente. Foi observado que a intensidade do estresse oxidativo celular está indiretamente relacionada com os dados de viabilidade celular. Nos grupos G7, G10, G13 e G16, as células MDPC-23 apresentaram valores de estresse oxidativo cerca de 25%, 25%, 21% e 31% menores em comparação aos grupos G5, G8, G11 e G14, respectivamente. O estresse oxidativo celular foi 63% menor no grupo G16 em comparação ao grupo controle G5. Estes resultados expressivos reforçam o papel positivo da catálise do H_2O_2 , sendo essa estratégia promissora para se estabelecer terapias inovadoras mais rápidas e biocompatíveis de clareamento dental de consultório.

Apesar dos animadores dados científicos obtidos com a execução do presente estudo, suas limitações também necessitam ser abordadas. Recentemente, Kury et al.⁹⁴ (2022) demonstraram que pigmentos coloridos de distintas origens, os quais são formados a partir do emprego da associação de diferentes protocolos de manchamento in vitro dos tecidos dentários, apresentam variados níveis de sensibilidade à fotólise causada pelo LED violeta. Os autores relataram que os pigmentos gerados pelo chá-preto são pouco sensíveis a ação do LED violeta. Esse fato poderia explicar, pelo menos em parte, a limitada contribuição da técnica de fotocatalise usada nesse estudo laboratorial sobre o resultado estético alcançado. Consequentemente, a estratégia de irradiação com LED violeta avaliada nessa pesquisa talvez tenha participado mais efetivamente da catálise do H_2O_2 liberado dos géis clareadores do que diretamente da fotólise dos pigmentos de chá-preto artificialmente criados pelo protocolo de manchamento previamente descrito por de Oliveira Duque et al. (2017). Assim, é imprescindível que novas estratégias de clareamento dental sejam avaliadas sobre tecidos dentários manchados com pigmentos de diferentes origens, tal como sugerido por Kury et al.⁹⁴ (2022). Outra limitação deste estudo se refere ao fato de que as análises de citotoxicidade e eficácia estética foram realizadas com base em apenas uma sessão de terapia clareadora, onde géis são aplicados pelo período máximo de 45 minutos. Na prática clínica, é comum a realização de mais sessões de clareamento dental para que resultados estéticos satisfatórios sejam alcançados. Apenas com o intuito de complementar o presente estudo, dados adicionais de eficácia estética também foram obtidos após duas e três sessões de clareamento, com intervalos de 72 horas entre cada uma delas. De maneira geral, foi possível observar que a aplicação repetida do LED violeta sobre o esmalte previamente recoberto com os biomateriais poliméricos favoreceu significativamente a alteração cromática dos discos de esmalte/dentina manchados. Porém, os testes de citotoxicidade nessas duas sessões adicionais de clareamento não foram executados, visto que a instabilidade da molécula de H_2O_2 não permite estocar, com segurança, extratos obtidos em cada sessão. Isso porque a contínua degradação do H_2O_2 nos extratos certamente limitaria os efeitos citotóxicos ao longo do tempo, o que forneceria um resultado falso de citocompatibilidade das estratégias em estudo. Essa é uma importante limitação técnica da metodologia laboratorial de análise indireta de géis clareadores e das

diferentes modalidades de clareamento dental amplamente empregados na atualidade.

De Souza Costa et al.^{86,95} (2014; 2020) relataram que dados científicos alcançados com pesquisas laboratoriais, especialmente de citotoxicidade, permitem comparar grupos, bem como desvendar alguns possíveis mecanismos de ação isolados de componentes de materiais em contato com células. Porém, para concluir este tópico relacionado com as limitações do presente estudo, esses mesmos autores também descreveram que resultados obtidos de pesquisas *in vitro* não podem ser extrapoladas diretamente para situações clínicas. Isso se deve ao fato de que a polpa de dentes vitais apresenta organização estrutural, células tronco mesenquimais e um sistema imunológico atuante, os quais conferem, em conjunto, um notável potencial de reparo e regeneração para este tecido conjuntivo especializado quando submetido a diferentes níveis de agressão⁹⁶⁻⁹⁹. Sabe-se ainda, que a presença de colágeno e prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos dentro dos túbulos da dentina, bem como a pressão de exsudação de fluído dentinário contendo imunoglobulinas e outras proteínas de baixo peso molecular, podem dificultar a difusão transdentinária de componentes liberados de materiais dentários⁹⁸⁻¹⁰². Esses fatores, e outros relacionados com o mecanismo intrínseco de defesa do complexo dentina-polpa contra agentes tóxicos, parecem indicar que os danos celulares diretos e indiretos observados *in vitro* são mais intensos do que àqueles ocorridos *in vivo*^{85,95}. Consequentemente, resultados de pesquisas *in vitro* devem ser cuidadosamente interpretados, sendo que o uso deles para indicar ou não a aplicação clínica de determinados materiais e técnicas, deve ser prudentemente analisado. Dentro deste contexto, futuros estudos clínicos são necessários para confirmar ou não os excelentes e promissores dados científicos obtidos com a execução do presente estudo laboratorial.

7 CONCLUSÃO

A fotocatalise com LED violeta, bem como a catálise química/enzimática do H_2O_2 presente em géis clareadores, favorece o resultado estético e reduz a difusão trans-amelodentinária desta molécula reativa, aumentando a geração de $\text{OH}^\bullet$ e reduzindo a citotoxicidade indireta do clareamento dental realizado numa sessão de 45 minutos.

O revestimento do esmalte com um scaffold nanofibrilar de PCL e um primer polimérico de HPMC contendo 10mg/mL de HRP, seguido da aplicação de um gel clareador com 10% de H_2O_2 , o qual é submetido à irradiação com LED violeta, otimiza o resultado estético e reduz a citotoxicidade comumente causada pelo clareamento convencional de consultório.

REFERÊNCIAS*

1. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013; 92(7):661-5.
2. Suty H, De Traversay C, Cost M. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol*. 2004;49:227-33.
3. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent*. 2011; 36: 12-7.
4. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2012; 40: 644-53.
5. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2012;25:199-204.
6. Reis A, Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. *Oper Dent*. 2013;38:386-93.
7. De Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. In-office bleaching with a two- and seven-day intervals between clinical sessions: A randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent*. 2015; 43:424-9.
8. Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod*. 2007; 33:1074-7.
9. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, Briso ALF. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent*. 2015; 40: 72-9.
10. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent*. 2014; 42:185-98.
11. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig*. 2015;19:1013-

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia Lda F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J. Dent.* 2014;42(3) 351-358.
13. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol.* 2015;60:1428-36.
14. Ortecho-Zuta U, De Oliveira Duque CC, Leite ML, Bordini E, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity. *Oper Dent.* 2019; 44(4): 414-23.
15. Bitter NC. A scanning electron microscope study of the long-term effect of bleaching agents on the enamel surface in vivo. *Gen Den.* 1998; 46(1): 84-8.
16. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(2): 93-104.
17. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 59-64.
18. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, & de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig.* 2013;17(8):1901-1909.
19. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74(5): 835-40.
20. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.
21. Rezende M, Loguercio AD, Kossatz S, Reis A. Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: a multi regression and logistic analysis. *J Dent.* 2016; 45 :1-6.
22. De Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, De Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(8): 2509-20.
23. Acuña ED, Parreiras SO, Favoreto MW, Cruz GP, Gomes A, Borges CPF et al. Loguercio AD, Reis A. In-office bleaching with a commercial 40% hydrogen peroxide gel modified to have different pHs: color change, surface morphology, and penetration of hydrogen peroxide into the pulp chamber. *J Esthet Restor Dent.* 2019; 34(2): 1-6.
24. De Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of

- a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(6): 1631-7.
25. Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Ortecho-Zuta U, Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:e20180453.
 26. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249-59.
 27. Lancaster L, Bulutoglu B, Banta S, Wheeldon I. Enzyme colocalization in protein-based hydrogels. *Methods Enzymol*. 2019;617:265-85.
 28. Sperl JM, Sieber V. Multi-enzyme cascade reactions – status and recent advances. *ACS Catal*. 2018;8:2385–96.
 29. Lee BJ, Ryu SG, Cui JH. Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999;25(4):493- 501.
 30. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T. Influence of water-soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release*. 2002; 81(1-2): 165-72.
 31. Kenar H, Ozdogan CY, Dumlu C, Doger E, Kose GT, Hasirci V. Microfibrous scaffolds from poly (l-lactide-co- ϵ -caprolactone) blended with xeno-free collagen/hyaluronic acid for improvement of vascularization in tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019; 97: 31-44.
 32. Dash TK, Konkimalla VB. Poly(E-caprolactone) based formulation for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release*. 2012; 158:15-33.
 33. Dabouian A, Bakhshi H, Irani S, Pezeshki-Modaress M. β -Carotene: a natural osteogen to fabricate osteoinductive electrospun scaffolds. *RSC Adv*. 2018; 18: 9941-5.
 34. Atyabi SM, Sharifi F, Irani S, Zandi M, Mivehchi H, Nagheh Z. Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold atmospheric plasma. *Cell Biochem Biophys*. 2016; 74(2):181-90.
 35. Rabionet M, Yeste M, Puig T, Ciurana J. Electrospinning PCL scaffolds manufacture for three-dimensional breast cancer cell culture. *Polymers*. 2017;9:328.
 36. Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2002; 3(6): 1233-9.
 37. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, et al. Light

- augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(2):167-75.
38. Lago ADN, Ferreira WDR, Furtado GS. Dental bleaching with the use of violet light only: reality or future? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 17: 124-26.
 39. Gallinari MO, Cintra LTA, Souza MBA, Barboza ACS, Esteves LMB, Fagundes TC, Briso ALF. Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: A case series with split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27:59–65.
 40. Gallinari MO, Cintra LTA, Barboza ACS, da Silva LMAV, de Alcantara S, dos Santos PH, Fagundes TC, Briso, ALF. Evaluation of the color change and tooth sensitivity in treatments that associate violet LED with carbamide peroxide 10%: A randomized clinical trial of a split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30:101679.
 41. M. Kury, E.E. Wada, D.P. Silva, C.P.M. Tabchoury, M. Giannini, V. Cavalli, Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial, *J Appl Oral Sci.* (2020) 28:e20190720, <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0720>.
 42. Daltro TWS, Almeida SAG, Dias MF, Lins-Filho PC, Silva CHV, Guimarães RP. The influence of violet LED light on tooth bleaching protocols: In vitro study of bleaching effectiveness. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32: 102052.
 43. Sulieman, M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent. Update.* 2005;32,463–464, 466–468, 471.
 44. Kury M, Resende BA, Silva DP, Wada EE, Antonialli FM, Giannini M, Cavalli V. Clinical Application of Violet LED In-office Bleaching with or without Traditional Systems: Case Series. *Oral Health and Dental Studies.* 2019; 2(1): 1.
 45. Kwon SR, Wertz PW, Li Y, Chan DC. Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin: confocal laser microscopy observation. *Int J Cosmet Sci.* 2012; 34(1): 97-101.
 46. Alqahtani MQ. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dent J.* 2014; 26(2): 33-46.
 47. Maghaireh GA, Alzraikat H, Taha NA. Satisfaction with dental appearance and attitude toward improving dental esthetics among patients attending a dental teaching center. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17:16–21.
 48. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, De Souza Costa CA. Tooth whitening: complications from the use of peroxides. Switzerland: Springer. 2016; 45-79.

49. Carlos NR, Bridi EC, Amaral F, França F, Turssi CP, Basting RT. Efficacy of Home-use Bleaching Agents Delivered in Customized or Prefilled Disposable Trays: A Randomized Clinical Trial. *Oper Dent*. 2017; 42(1): 30-40.
50. Aka B, Celik EU. Evaluation of the efficacy and color stability of two different at-home bleaching systems on teeth of different shades: a randomized controlled clinical trial. *J Esthet Restor Dent*. 2017; 29(5): 325-38.
51. Chemin K, Rezende M, Costa MC, Salgado A, de Geus JL, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Evaluation of At-home Bleaching Times on Effectiveness and Sensitivity with 10% Hydrogen Peroxide: A Randomized Controlled Double-blind Clinical Trial. *Oper Dent*. 2021; 46(4): 385-394.
52. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: at-home or in-office? *Compend Contin Educ Dent*. 1998;19(8): 831-8.
53. Moghadam FV, Majidinia S, Chasteen J, Ghavamnasiri M. The degree of color change, rebound effect and sensitivity of bleached teeth associated with at-home and power bleaching techniques: a randomized clinical trial. *Eur J Dent*. 2013;7(4):405–411.
54. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent*. 2011; 36(3): 251-7.
55. De Almeida LC, De Souza Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso ALF. 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.
56. Li Y. Stain removal and whitening by baking soda dentifrice: A review of literature. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(11S):S20-S26.
57. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod*. 1992; 18(7): 315-7
58. Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tuncbilek M, Ertan R Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod*. 2000; 26(2): 92–4.
59. Gökay O, Müjdecı A, Algn E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod*. 2004; 30(12): 887–9.
60. Gökay O, Müjdecı A, Algn E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005; 38(8): 516–20.
61. Torres CR, Souza CS, Borges AB, Huhtala MF, Caneppele TM. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues *in vitro*. *Scientific World Journal*. 2013;193241.
62. Ortecho-Zuta U, De Oliveira Duque CC, Ribeiro RAO, Leite ML, Soares DG, Hebling J, Briso ALF, de Souza Costa CA. Polymeric biomaterials maintained

the esthetic efficacy and reduced the citotoxicity of in-office dental bleaching. *J Esthet Restor Dent.* 2021;1-11.

63. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC. The number of bleaching sessions influences pulp issue damage in rat teeth. *J Endod.* 2013; 39(12): 1576-80.
64. Moncada G, Sepúlveda D, Elphick D, Contente M, Estay J, Bahamondes V, et al. Effects of light activation, agent concentration and tooth thickness on dental sensitivity after bleaching. *Oper Dent.* 2013;38(5):467-76.
65. Pontes M, Gomes J, Lemos C, Leão RS, Moraes S, Vasconcelos B, Pellizzer EP. Effect of Bleaching Gel Concentration on Tooth Color and Sensitivity: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oper Dent.* 2020;45(3):265-275.
66. Estay J, Angel P, Bersezio C, Tonetto M, Jorguera G, Peña M, Fernández E. The change of teeth color, whiteness variations and its psychosocial and self-perception effects when using low vs. High concentration bleaching gels: a one-year follow up. *BMC Oral Health.* 2020; 20;255.
67. Barboza ACS, Dos Santos PH, do Vale LR, De Oliveira Gallinari M, Assmann A, Vidal CMP, Fagundes TC, Briso ALF. Dental bleaching with violet LED: Effects on dentin color change, resin-dentin bond strength, hybrid layer nanohardness and dentinal collagen biostability. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;33:102141.
68. De Souza BR, Lago ADN, Ferreira LS, Mayer-Santos E, de Freitas PM, Morimoto S, Ramalho KM. In-office bleaching protocols using violet LED: A split mouth case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 36:102497.
69. Kwon SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent.* 2015; 27(5): 240-57.
70. Klaric E, Rakic M, Marcius M, Ristic M, Sever I, Tarle Z. Optical effects of experimental light-activated bleaching procedures. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(3): 160-7.
71. Santos AECGD, Bussadori SK, Pinto MM, Pantano Junior DA, Brugnera AJr, Zanin FAA, Rodrigues MFSD, Motta LJ, Horliana ACRT. Evaluation of in-office tooth whitening treatment with violet LED: protocol for a randomized controlled clinical trial. *BMJ Open.* 2018;8(9):e021414.
72. Sobral MFP, Cassoni A, Tenis CA, Steagall W, Brugnera Junior A, Bagnato VS, Botta SB. Longitudinal, Randomized, and Parallel Clinical Trial Comparing a Violet Light-Emitting Diodes System and In-Office Dental Bleaching: 6-Month Follow-Up. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2021 Jun;39(6):403-410.
73. Goncalves RS, Costa CA, Soares DG, dos Santos PH, Cintra LT, Briso ALF. Effect of different light sources and enamel preconditioning on color change, H₂O₂ penetration, and cytotoxicity in bleached teeth. *Oper Dent.* 2016; 41(1): 83-92.

74. Gallinari MO, Fagundes TC, da Silva LM, de Almeida Souza MB, Barboza A, Briso ALF. A New Approach for Dental Bleaching Using Violet Light with or without the Use of Whitening Gel: Study of Bleaching Effectiveness. *Oper Dent*. 2019; 44(5): 521-529.
75. Maran BM, Ziegelmann PK, Burey A, de Paris Matos T, Loguercio AD, Reis A. Different light-activation systems associated with dental bleaching: a systematic review and a network meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(4):1499-1512.
76. Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of Chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy - *in vitro* study. *J Dent*. 2010;38(10):838-46.
77. Travassos AC, Torres CR, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010;35:8.
78. Gopinath S, James V, Vidhya S, Karthikeyan K, Kavitha S, Mahalaxmi S. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1): 45-9.
79. Mamani PL, Ruiz-Caro R, Veiga MD. Matrix tablets: the effect of hydroxypropyl methylcellulose/anhydrous dibasic calcium phosphateratio on the release rate of a water-soluble drug through the gastrointestinal tract I. in vitro tests. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2012;13(4):1073-1083.
80. Santoro M, Sarita RS, Walker JL, Mikos AG. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107:206-212.
81. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pr*. 2014;14:70-6.
82. Paravina RD, Pérez MM, Ghinea R. Acceptability and perceptibility thresholds in dentistry: A comprehensive review of clinical and research applications. *J Esthet Restor Dent*. 2019;31(2):103-112.
83. Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ, Bona AD, Iguel C, Linninger M et al. Color difference thresholds in dentistry. *J Esthet Restor Dent*. 2015;27Suppl 1:S1-9.
84. Pérez Mdel M, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD et al. Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dent Mater*. 2016;32(3):461-7.
85. Leite MLAS, de Souza Costa CA, Duarte RM, Andrade AKM, Soares DG. Bond strength and cytotoxicity of a universal adhesive according to the hybridization strategies to dentin. *Braz Dent J*. 2018;29(1):68-75.

86. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
87. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B.* 2014;(4):178-85.
88. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod.* 2001;27(1):23-30.
89. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):768-75.
90. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent.* 1993; 69(1): 46-8.
91. Bveris A. Biochemistry of radicals: from electron to tissues. *Medicine.* 1998; 58(4): 350-6.
92. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2008; 34(12): 1462-5.
93. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(3): 458-64.
94. Kury, M., Rueggeberg, F.A., Soto-Montero, J.R. et al. Characterization and effectiveness of a violet LED light for in-office whitening. *Clin Oral Invest.* 2022.
95. De Souza Costa CA. Biological Aspects of Dental Materials. *J Adhes Dent.* 2020; 22(5): 540-544.
96. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25): 13625-30.
97. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58(2): 137-47.
98. De Souza Costa CA, Figueiredo JAP, Hebling J, Estrela C. Pulpal biology. In: Estrela C, editor. *Endodontics Science.* Brasil: Artes Medicas. 2009; 1-22.

99. Fuks AB, Hebling J, de Souza Costa CA. The primary pulp: developmental and biomedical background. In: Fuks A, Peretz B, editors. Pediatric endodontics: current concepts in pulp therapy for primary and young permanent teeth. Switzerland: Springer;2016; 7-22.
100. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3:711-35.
101. Da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, De Souza Costa CA, Soares DG. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(7): 1559-66.
102. D'Alpino PHP, Moura GEDD, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD, Tersariol ILDS. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dent Mater*. 2017; 33(12): 1402-1415.
103. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent*. 2011;36(6): 590-6.

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Tooth bleaching; Cytotoxicity; Odontoblasts.
Corresponding Author:	Carlos Alberto de Souza Costa BRAZIL
First Author:	Beatriz Voss Martins
Order of Authors:	Beatriz Voss Martins Marlon Ferreira Dias Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro Maria Luísa Leite Josimeri Hebling Carlos Alberto de Souza Costa
Abstract:	Objective: To assess the influence of coating the enamel with a nanofiber scaffold (NS) and a polymeric catalyst primer (PCP) on the esthetic efficacy (EE), degradation kinetics (DK) of hydrogen peroxide (H₂O₂), and trans-amelodentinal cytotoxicity (TC) of bleaching gels subjected or not to violet-LED irradiation. Methodology: The following groups were established (n=8): G1- No treatment (negative control); G2- NS+PCP; G3- LED; G4- NS+PCP+LED; G5- 35% H₂O₂ (positive control); G6- NS+PCP+35% H₂O₂ +LED; G7- 20% H₂O₂ ; G8- NS+PCP+20% H₂O₂ +LED; G9- 10% H₂O₂ ; G10- NS+PCP+10% H₂O₂ +LED. For EE analysis, enamel/dentin discs were stained (e/dd/s) and exposed for 45 minutes to the bleaching protocols. To assess TC, the e/dd/s were adapted to artificial pulp chambers, and the extracts (culture medium + components diffused through the e/dd/s) were collected and applied to MDPC-23 cells, which had their viability (CV), oxidative stress (OxS), and morphology (SEM) evaluated. The amount of H₂O₂ diffused and the production of hydroxyl radicals (OH•) were also determined (two-Way ANOVA/Tukey/paired Student t-test; p<0.05). Results: G6 presented the highest EE compared to the other groups (p<0.05), and G10 resulted in a similar EE to conventional in-office bleaching (G5; p>0.05). The lowest diffusion values of H₂O₂, TC, and OxS were found in G10 compared to the exposed bleached groups (p<0.05). Conclusion: Coating the enamel with NS and PCP, followed by the application of 10%, 20%, or 35% H₂O₂ bleaching gels irradiated with violet LED, stimulates H₂O₂ degradation, increasing the esthetic efficacy and reducing the trans-amelodentinal toxicity of the treatment.
Suggested Reviewers:	Vanessa Cavalli, Dr vcavalli@yahoo.com André Luiz Fraga Briso andre.briso@unesp.br Jorge Perdigão perdi001@umn.edu

Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet

LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts

Beatriz Voss Martins^a, Marlon Ferreira Dias^a, Rafael Antônio de Oliveira Ribeiro^a, Maria Luísa de Alencar e Silva Leite^a, Josimeri Hebling^b, Carlos Alberto de Souza Costa^c

^aDepartment of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, Brazil

^bDepartment of Morphology, Genetics, Orthodontics and Pediatric Dentistry, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pathology, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, Brazil

Corresponding Author: Carlos Alberto de Souza Costa, Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, 14801-903, Brazil. Phone: + 55 (16) 3301-6477
- Email address: cas.costa@unesp.br

ABSTRACT

Objective: To assess the influence of coating the enamel with a nanofiber scaffold (NS) and a polymeric catalyst primer (PCP) on the esthetic efficacy (EE), degradation kinetics (DK) of hydrogen peroxide (H_2O_2), and trans-amelodentinal cytotoxicity (TC) of bleaching gels subjected or not to violet-LED irradiation. **Methodology:** The following groups were established (n=8): G1- No treatment (negative control); G2- NS+PCP; G3- LED; G4- NS+PCP+LED; G5- 35% H_2O_2 (positive control); G6- NS+PCP+35% H_2O_2 +LED; G7- 20% H_2O_2 ; G8- NS+PCP+20% H_2O_2 +LED; G9- 10% H_2O_2 ; G10- NS+PCP+10% H_2O_2 +LED. For EE analysis, enamel/dentin discs were stained (e/dd/s) and exposed for 45 minutes to the bleaching protocols. To assess TC, the e/dd/s were adapted to artificial pulp chambers, and the extracts (culture medium + components diffused through the e/dd/s) were collected and applied to MDPC-23 cells, which had their viability (CV), oxidative stress (OxS), and morphology (SEM) evaluated. The amount of H_2O_2 diffused and the production of hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$) were also determined (two-Way ANOVA/Tukey/paired Student t-test; $p < 0.05$). **Results:** G6 presented the highest EE compared to the other groups ($p < 0.05$), and G10 resulted in a similar EE to conventional in-office bleaching (G5; $p > 0.05$). The lowest diffusion values of H_2O_2 , TC, and OxS were found in G10 compared to the exposed bleached groups ($p < 0.05$). **Conclusion:** Coating the enamel with NS and PCP, followed by the application of 10%, 20%, or 35% H_2O_2 bleaching gels irradiated with violet LED, stimulates H_2O_2 degradation, increasing the esthetic efficacy and reducing the trans-amelodentinal toxicity of the treatment.

Keywords: Tooth bleaching; Cytotoxicity; Odontoblasts.

HIGHLIGHTS

- Higher production of $\text{OH}^\bullet$ improves the esthetic outcome of the tooth bleaching.
- Violet LED causes a discrete chromatic change in dental tissues.
- Catalysis applied to a bleaching gel with 10% H_2O_2 optimizes the esthetic efficacy.

1. INTRODUCTION

Conventional in-office tooth bleaching (CIOTB), which is considered a non-invasive procedure that causes a rapid chromatic change in hard dental tissues, has been extensively used in contemporary Esthetic Dentistry [1]. However, most patients subjected to this professional therapy report some type of tooth sensitivity [2,3,4]. Such adverse effect has been related to the intense trans-amelodentinal diffusion of unreacted (H_2O_2 -free) hydrogen peroxide (H_2O_2) that cause irreversible damage to pulp cells [5,6,7,8]. This takes place because of the high concentration of this low-oxidation-potential reactive molecule in bleaching gels, which main objective is to break the double links of colored pigments (chromophores), favoring the chromatic change of dental tissues [9,10,11,12].

Several studies showed that cell toxicity and tooth bleaching effectiveness depend directly on the H_2O_2 concentration in gels and its application time on the tooth enamel [5,6,13,14]. However, reducing the H_2O_2 concentration in gels and/or its application time on teeth ends up requiring various bleaching sessions, limiting the use of this strategy in the current clinical practice [7,13]. Thus, the search for faster and biocompatible bleaching protocols has driven researchers to the study of the kinetic behavior of H_2O_2 [15,16,17]. Proposing to catalyze H_2O_2 and increase the production of molecules of higher oxidation potential, catalyzing agents stood out because this strategy favored esthetic efficacy and decreased the cytotoxicity caused by CIOTB [17,16]. In this context, the heme peroxidase (HPR) enzyme, originated from the root of *Amoracia Rusticana*, which has a high potential for catalyzing H_2O_2 , started to be incorporated and tested successfully for professional bleaching protocols [17,18].

Several polymers, such as hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), may be used to develop biomaterials with the potential to carry catalyzing agents [19]. The HPMC is a biodegradable, biocompatible, and non-toxic semi-synthetic polymer. Since HPMC can form a hydrophilic gel, it has been extensively used in the pharmaceutical industry, particularly for the controlled release of drugs [20,21]. The polycaprolactone (PCL) is biodegradable and non-toxic biopolymer [22,23,24] that has been extensively used to produce electrospun scaffolds [24]. Jin et al. (2002) [25] reported that the reduced pore diameter of electrospun scaffolds prepared with PLC may limit the passage of microorganisms and toxic particles, and the desired permeability of this biopolymer may be achieved so it will perform specific functions in the application site.

The photocatalysis of H_2O_2 has been extensively studied in Dentistry [26]. Although it is known that light increases the temperature of the bleaching gel, favoring H_2O_2 degradation to produce two mols of the hydroxyl radical [27], the efficacy and safety of photocatalysis remains controversial [28,26]. Among the different light sources used in Dentistry, the violet LED associated or not with the use of a bleaching gel seems to have the highest potential to produce color changes in dental tissues [29,30,31,32].

Considering the limited current knowledge on the safety and efficacy of using violet LED for tooth bleaching, as well as the role of catalyzing biopolymers in this esthetic therapy, this *in vitro* study aimed to assess the effect of associating a nanofiber scaffold (NS) and a polymeric catalyst primer (PCP) on the esthetic efficacy, degradation kinetics, and cytotoxicity of bleaching gels, irradiated or not with a violet LED. The null hypothesis was that using violet LED to irradiate bleaching gels applied to the enamel previously coated with biopolymers (NS+PCP) does not interfere with the chromatic change and cytotoxicity commonly caused by CIOTB.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Formulation of experimental bleaching gels: Gels with 10%, 20%, and 35% H_2O_2 were prepared from a stock solution of 35% H_2O_2 (35% hydrogen peroxide P.A, Neon, Suzano, SP, Brazil). Carbopol (polyacrylic acid $M_v \sim 3,000,000$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) prepared from a 1% (v/m) solution was used as a thickener [16].

2.2. Formulation of the nanofiber scaffold (NS; $n=8$): A 12.5% polycaprolactone (PCL; Sigma-Aldrich) solution was prepared with chloroform/dimethylformamide (80:20) (Labsynth Produtos para Laboratório, São Paulo, SP, Brazil) under constant overnight magnetic agitation [18]. The solution obtained was transferred to a 5-mL syringe (Descarpak, São Paulo, SP, Brazil) with an 18-gauge stainless steel needle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, USA), which was connected to automatic injection equipment (KDScientific, Holliston, MA, USA), at a speed of 1 mL/h. The high voltage source value was 12 kV and a 15-cm distance was maintained between the tip of the needle and the flat collector. The nanofiber scaffold adhered to the collector was carefully removed and the round samples with 6 mm of diameter were obtained using a sterilized skin punch (Koplast, Barra do Rio, Jaraguá do Sul, SC, Brazil) [18].

2.3. Formulation of the polymeric catalyst primer (PCP; n=8): A flow-resistant PCP capable of forming a homogeneous pellicle on the enamel was prepared (Ortecho-Zuta et al., 2021). Hence, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC; Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, USA) was used as a base polymer. The HPMC powder (1 g) with a viscosity of 100 mPa.s. was diluted in H₂O_{UP} (10 mL) to obtain a solution at a concentration of 10%. The gel was prepared under magnetic agitation at room temperature for 6 hours and later stored in a refrigerator for 24 hours. The heme peroxidase enzyme (HPR; Sigma-Aldrich) was incorporated (10 mg/mL) into the HPMC solution as a catalyzing agent, originating the PCP. Immediately after manipulating the 10%, 20%, or 35% H₂O₂ bleaching gel, it was applied to the PCP (1:1; v/v) that was conditioned in 1.5-mL tubes (Corning, Oneonta, NY, USA) [18].

2.4 Achievement and standardization of enamel and dentin discs (n=8): Eighty standardized enamel/dentin discs (5.6 mm of diameter) were obtained from whole bovine incisors with a trephine diamond bur (Dinser brocas diamantadas Ltda., São Paulo, SP, Brazil) attached to a bench drill (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brazil). The dentin surface was corrected by wearing with 400- and 600-granulation sandpapers (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda, Jundiaí, SP, Brazil), making manual rotary movements for each granulation until obtaining a standardized thickness of 2.3 mm of enamel/dentin, simulating the thickness of lower incisors [13,16,18]

2.5 Esthetic efficacy assessment (n=8): Enamel/dentin discs were subjected to laboratory staining with black tea, as previously described in detail [33], and distributed into groups (Figure 1). In G6, G8, and G10, the enamel surface of the discs was coated with NS, to which 10 µL of PCP was applied. After being manipulated and applied (1 session of 45 minutes) to the biopolymers, the bleaching gels were irradiated for 20 minutes with a violet LED (MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) [30]. After placing the discs in a white silicone matrix, the esthetic efficacy was analyzed with a UV-reflective spectrophotometer (Reflection Spectrophotometer ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Germany). The values of L*a*b* obtained before (*baseline*) and 72 hours after concluding the bleaching procedures were used to assess color changes (CIEDE 2000, ΔE_{00} - Paravina et al., 2015)[34]. The whitening index (ΔWI ; Pérez et al., 2016)[35] was determined according to the following equations:

- 1) $\sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}$
- 2) $WI = 0.511L^* - 2.3424a^* - 1.100b^*$
- 3) $\Delta WI = WI - WI_{\text{baseline}}$

Next, the color parameters (L^* , a^* , b^* , ΔE_{00} , and ΔWI) obtained for all groups were statistically analyzed as described below. The values of perceptibility threshold (PT) and acceptability threshold (AT) were used as 50:50%, ΔE_{00} values were 0.8 (PT) and 2.7 (AT), and ΔWI values were 0.72 (PT) and 2.60 (AT) (Paravina et al., 2019)[34].

2.6 Assessment of $OH^\bullet$ production in the bleaching gels ($n=8$): To determine the potential of biopolymers and LED to increase the rate of H_2O_2 decomposition and produced the $OH^\bullet$ radical, the quantification of the latter molecule in the bleaching gels was analyzed as previously described by Ortecho-Zuta et al. (2019)[16]. Hence, a round NS sample (6 mm of diameter), 10 μL of PCP, and 20 μL of bleaching gel (10%, 20%, or 35% H_2O_2) were placed in the compartments of a 96-well sterilized plate (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brazil). The biopolymers exposed to bleaching gels were incubated at room temperature for 0, 5, 10, and 15 minutes in contact with 140 μL of the fluorescent probe of the OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity Activity kit (HORAC, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). The G6, G8, and G10 were irradiated for 20 minutes with a violet LED and incubated for 15 minutes with the fluorescent probe of the OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (HORAC) Activity Assay kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Considering the probe is oxidized by the $OH^\bullet$ radical, the presence of this molecule reduces fluorescence, and this effect can be monitored at 480 nm excitation and 530 nm emission (Synergy H1). The production of $OH^\bullet$ was calculated with the following equation: $OH^\bullet$ production = fluorescence emission in the negative control group (100%) - fluorescence emission in the experimental group [16,18].

2.7 MDPC-23 cell culture: Immortalized odontoblastic cells were cultivated in sterilized plates of 75 cm^2 (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brazil) with Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO. Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO); 100 IU/mL and 100 g/mL, respectively, of penicillin and streptomycin;

and 2 mmol/L of glutamine (GIBCO), in a wet atmosphere at 37°C, 5% CO₂, and 95% air. The cells were passed until obtaining an adequate number for the experiment.

2.8 Experimental procedure: Enamel/dentin discs were adapted to artificial pulp chambers (APCs), and the disc/APC sets were sterilized in ethylene oxide (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brazil). Then, each set was individually placed in compartments of 24-well sterilized acrylic plates (KASVI Imp.) containing 1 mL of DMEM (de Oliveira Duque et al., 2017)[13]. Immediately after performing the bleaching procedure on the enamel (Figure 2), the extracts (DMEM + bleaching gel components diffused by the enamel and dentin) were collected and stored in aliquots of 100 µL in cryogenic tubes for later use in cytotoxicity tests [16,18].

2.9 Quantification of H₂O₂ in the extracts (n=8): Aliquots of 100 µL of the extracts obtained from each group were transferred to 5-mL plastic tubes (KASVI Imp.) containing 900 µL of acetate buffer solution (2 mol; pH 4.5), which allows stabilizing H₂O₂. Then, 500 µL of this solution was transferred to new 5-mL plastic tubes (KASVI Imp.) containing water and a leucocrystal violet dye (0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich). The tubes were agitated in a vortex and 50 µL of a solution of 1 mg/mL of horseradish peroxidase enzyme (Sigma-Aldrich) was added. The absorbance of solutions was measured in a spectrophotometer (Synergy H1) at a 596-nm wavelength. The standard curve of the known amounts of H₂O₂ was used for converting the optical density values obtained in the samples into µg of H₂O₂ per mL of extract [15,13,16,18].

2.10 Cell viability assessment (Alamar Blue assay; n=8): Aliquots of 100 µL of each extract were applied to the MDPC-23 cells previously cultivated (10,000 cells) in compartments of 96-well sterilized acrylic plates (KASVI Imp.). One hour after incubation, the extracts were aspirated and the cells that remained adhered to the bottom of the compartments were incubated for 4 hours in contact with a solution composed of 90 µL of DMEM and 10 µL of Alamar Blue solution (Life Technologies; Grand Island, NY, USA). Then, the solution was collected and transferred to a 96-well plate (KASVI Imp.), and absorbance was measured at 570 nm in a spectrophotometer (Synergy H1, Biotek, Winooski, USA) [36,16,18].

2.11 Cell oxidative stress analysis (n=8): Cell oxidative stress was assessed with an estimate of reactive oxygen species (ROS) production by the cells, immediately after

bleaching. Hence, MDPC-23 cells previously cultivated in compartments of 96-well sterilized plates were exposed for 30 minutes to the carboxy-H2DCFDA probe (Invitrogen, San Francisco, CA, USA) with a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. This probe is permeable to the cell membrane and emits fluorescence when in contact with ROS. Next, the aliquots of 100 μL of the extracts from each group were applied to the cells for 1 hour, and fluorescence intensity was assessed at 592 nm excitation and 517 nm emission (Synergy H1) after the time of exposure to the extracts. The data were normalized by the negative control group as previously described by Ortecho-Zuta et al. (2019) and Ortecho-Zuta et al. (2021)[16,18].

2.12 Cell morphology assessment (n=4): For this analysis, the MDPC-23 cells were cultivated on glass coverslips placed in the bottom of 24-well plates, and the same bleaching procedures previously described were performed. After incubating the cells in contact with the extracts, these were aspirated and the MDPC-23 cells that remained adhered to the glass coverslips were fixed and processed for later microscopic analysis (Ortecho-Zuta et al., 2021)[18]. After an assembly in metallic stubs, the coverslips with the cells were subjected to gold metallization (Sistevac, Rolândia, PR, Brazil). Finally, the morphology of MDPC-23 cells was assessed in a scanning electron microscope (SEM, JEOL JSM 6610; JEOL Ltda, Akishima, Tokyo, Japan) to produce photomicrographs representing each group [16,18].

2.13. Statistical analysis: The data collected were subjected to the Shapiro-Wilk test to assess normality and the Levene test to assess homoscedasticity. For the tests of esthetic efficacy, cell viability, oxidative stress, and H_2O_2 diffusion, a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was performed. For the degradation kinetics test, paired Student t-test was performed. All statistical analyses used a 5% significance level (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY, USA).

3. RESULTS

3.1 Esthetic efficacy

Higher ΔWI and ΔE_{00} values (Figure 3) were found in all groups compared to the control group (G1) ($p < 0.05$). The groups that received the biopolymers and LED application, regardless of H_2O_2 concentration (G6, G8, and G10), showed a significant increase of ΔWI in comparison with those groups that received only the bleaching gels

(G5, G7, and G9) ($p < 0.05$). G3 (LED) was statistically similar to G4 (NS+PCP+LED) ($p > 0.05$). However, G3 and G4 presented higher ΔWI and ΔE_{00} values than G1 and G2, in which no treatment (negative control) or only biopolymers were used, respectively ($p < 0.05$).

The biopolymers and violet LED used in association with bleaching gels containing 35% (G6), 20% (G8), and 10% (G10) H_2O_2 resulted in higher ΔE_{00} values than their equivalents G5, G7, and G9, in which these bleaching gels were applied directly to the enamel ($p < 0.05$).

3.2 Degradation kinetics of the bleaching gel

Figure 4 shows data of $OH^\bullet$ production. G6 (NS+PCP+35% H_2O_2 +LED), G8 (NS+PCP+20% H_2O_2 +LED), and G10 (NS+PCP+10% H_2O_2 +LED), presented higher production of $OH^\bullet$ radicals than their equivalents G5 (35% H_2O_2), G7 (20% H_2O_2), and G9 (10% H_2O_2), in which the gels were applied directly to the enamel ($p < 0.05$).

3.3 Trans-amelodentinal H_2O_2 diffusion

G5 (positive control - conventional in-office bleaching) showed the highest H_2O_2 diffusion compared to G6, G7, G8, G9, and G10, in which different bleaching strategies were assessed ($p < 0.05$) (Figure 5). G6 was statistically similar to G7 ($p > 0.05$). However, G7 presented higher H_2O_2 diffusion than G8, in which the same bleaching gel was applied to the enamel coated with biopolymers and irradiated with violet LED ($p < 0.05$). The H_2O_2 diffusion was also similar between G8 and G9 ($p > 0.05$). G10 had the lowest trans-amelodentinal H_2O_2 diffusion compared to the other groups that used different bleaching strategies ($p < 0.05$).

3.4 Trans-amelodentinal cytotoxicity

Figure 6 shows a significant reduction of cell viability in all the groups with bleaching gel application, regardless of H_2O_2 concentration and the use of biopolymers or not, compared to G1 (negative control), G2 (NS+PCP), G3 (LED), and G4 (NS+PCP+LED) ($p < 0.05$). Among the bleached groups, the highest MDPC-23 cell viability was found in G10 ($p < 0.05$). The G6 and G8 were statistically similar ($p > 0.05$). When compared to the other groups, the lowest cell viability was found in G5 (positive control), which represented the conventional in-office tooth bleaching ($p < 0.05$).

3.5 Cell oxidative stress

There was a significant increase in oxidative stress in all groups that used bleaching gels associated or not with biopolymers and violet LED, in comparison with G1 (negative control), G2 (NS+PCP), G3 (LED), and G4 (NS+PCP+LED) ($p<0.05$) (Figure 7). The higher cell oxidative stress value was found when the 35% H_2O_2 bleaching gel was applied directly to the enamel (positive control - G5). However, coating the enamel with biopolymers before applying the same bleaching gel, which was also irradiated with a violet LED (G6), significantly reduced oxidative stress ($p<0.05$). The result obtained in G6 was similar to G7 ($p>0.05$). Among the bleached groups, the lowest oxidative stress was found in G10 (NS+PCP+10% H_2O_2 +LED) ($p<0.05$).

3.6 Cell morphology

The SEM images obtained (Figure 8) allowed determining that the morphology and number of cells adhered to the glass substrate were similar among the groups in which bleaching gels were not applied to the enamel (G1 to G4). In these groups, the cells exhibited a large membrane with several thin cytoplasmic extensions. However, there were morphological changes and a reduced number of cells in all bleached groups (G5 to G10) compared to non-bleached ones (G1 to G4). The application of bleaching gels with 35% (G6), 20% (G8), and 10% (G10) H_2O_2 to the enamel previously coated with biopolymers and irradiated with violet LED caused a lower reduction in the number of cells than G5, G7, and G9, respectively, in which the same gels were used directly to the enamel.

4. DISCUSSION

Using H_2O_2 catalyzing agents seems an interesting strategy to be incorporated into conventional in-office tooth bleaching (CIOTB), considering that H_2O_2 decomposition produces high-oxidation-potential molecules, increasing esthetic efficacy and decreasing the amount of H_2O_2 -free capable of reaching the pulp [16-18,37]. In the present study, bleaching gels at concentrations of 10%, 20%, and 35% of H_2O_2 were applied for 45 minutes to the enamel previously coated with biopolymers (NS and PCP) and then irradiated with violet LED. This experimental strategy, incorporated into the bleaching procedure to catalyze the H_2O_2 released from the gels, increased the production of hydroxyl radicals ($OH^\bullet$), which optimized the esthetic efficacy of the therapy. The strategy to catalyze H_2O_2 by associating different techniques (enzymatic catalysis and

photocatalysis) also decreased the trans-amelodentinal H_2O_2 -free diffusion, which resulted in lower cell oxidative stress and made the therapy more cytocompatible. Based on these promising results, the null hypothesis of the present study was rejected.

The positive effect of employing enzymatic catalyzers on the increased H_2O_2 decomposition in bleaching gels has been recently assessed [16-18]. Significant increase in $\text{OH}^\bullet$ production and consequently in esthetic efficacy was shown when adding the heme peroxidase (HPR) enzyme to a 35% H_2O_2 bleaching gel [16]. The HPR in contact with H_2O_2 reduced the kinetic energy required for these molecules to start reacting. Thus, the rate of H_2O_2 decomposition enhances, resulting in the formation of many free radicals capable of interacting and degrading chromophores in the dental structure [16,38,39]. Despite the excellent esthetic results obtained, Ortecho-Zuta et al. [16] showed that the strategy used in their study still maintained a high level of cell oxidative stress. Consequently, it was relevant to suggest that adding other methods of H_2O_2 catalysis could result in a strategy capable of eliminating or at least decreasing the cytotoxicity of CIOTB and perhaps optimizing the esthetic efficacy of this professional therapy. In this context, different pathways to catalyze the H_2O_2 released from bleaching gels started to be investigated to make CIOTB safer for clinical use [40,18].

The PCL was employed in this study to build a semi-permeable polymeric barrier (NS) capable of limiting the immediate trans-amelodentinal diffusion of a high amount of H_2O_2 -free and favor $\text{OH}^\bullet$ production by the interaction of H_2O_2 with its components. Ortecho-Zuta et al. [18] observed that coating the enamel with NS followed by the application of a polymeric primer containing HPR reduced significantly the indirect cytotoxicity of a 35% H_2O_2 bleaching gel. This strategy also allowed obtaining superior esthetic results to those achieved with CIOTB. The authors reported that applying the 35% H_2O_2 bleaching gel for only 15 minutes to the enamel previously coated with NS and PCP resulted in a chromatic change of dental tissues similar to CIOTB, and the cytotoxic effects were statistically inferior to those caused by the professional esthetic therapy. Considering the excellent results obtained by Ortecho-Zuta et al. [18], the present study also used the strategy of associating NS and PCP. However, other H_2O_2 concentrations in the gels, such as 20% and 10% were tested, and the products were subjected to complementary photocatalysis performed with a violet LED. Regarding esthetic efficacy, perhaps the reduction of H_2O_2 concentration in the bleaching gel could be compensated by the use of a violet LED, considering this strategy could prevent or at least minimize the trans-amelodentinal cytotoxic effects of the treatment.

Overall, there were greater color changes (ΔE_{00}) and whitening indexes (ΔWI) in all groups that had the enamel coated with biopolymers and gels irradiated with violet LED (G6, G8, and G10) compared to the corresponding groups in which the gels were applied directly to the enamel (G5, G7, and G9). The greatest color change occurred in G6 (NS+PCP+35% H_2O_2 +LED). However, in G10 (NS+PCP+10% H_2O_2 +LED), the ΔE_{00} value obtained was 24% higher than that of the control group (G5), which represents CIOTB. In the present study, violet LED applied to enamel without bleaching gels (G3 and G4) caused color changes in the enamel/dentin discs. However, the rate was 66% and 84% lower than G9 (10% H_2O_2), and G6 (SN+PCP+35% H_2O_2 +LED), respectively. Gallinari et al. [30] assessed the use of violet LED associated or not with a 17.5% H_2O_2 bleaching gel. The authors showed that, although LED can cause chromatic changes in enamel and dentin, there were improved esthetic results when the bleaching gel was applied to the enamel and then photocatalyzed. These results, as well as the ones obtained in the present study, determined that, regardless of H_2O_2 concentration in the bleaching gel, the photocatalysis of this molecule is an important step to favor the esthetic outcome.

The present study showed a higher $OH^\bullet$ production in G6, G8, and G10, which used biopolymers to coat the enamel and a violet LED to irradiate the bleaching gels, compared to their equivalents G5, G7, and G9. Thus, associating the catalysis strategies used in this study limited the trans-amelodentinal H_2O_2 -free diffusion, and the highest amount of this molecule was found in the extracts of the control group G5. Conversely, there was a significant reduction in the amount of H_2O_2 when this same bleaching gel was applied to the enamel coated with biopolymers and irradiated with violet LED (G6). Despite these interesting data obtained in G6, the amount of H_2O_2 in the extracts of this group was higher than in G8 and G10. These results, as well as those reported in previous studies performed *in vitro* [17,18,33] and *in vivo* [41-43], confirm that high H_2O_2 concentrations (35% or higher) in bleaching gels commonly used in CIOTB are not adequate and safe. In this study, among all the bleached groups, G10 presented the lowest amount of H_2O_2 in the extracts, and its mean value was 60% lower than G5 (control).

The present laboratory investigation used enamel/dentin discs with 2.3 mm of thickness to simulate the most challenging clinical condition when performing CIOTB [16,18,33]. This is because the vital lower incisors, which present 2.3 mm of mean enamel/dentin thickness, are more susceptible to pulp cytotoxic effects caused by professional bleaching [41]. Moreover, discs obtained from bovine teeth have been commonly used for *in vitro* studies due to their similar morphology to human teeth

[44,45]. In the present study, the enamel/dentin discs were adapted to artificial pulp chambers (APCs), considering that this methodology has been extensively used to assess bleaching gels and innovative tooth bleaching strategies [17,33,16,18]. In the methodology, the culture medium that remains in contact with the dentinal surface of the disc receives the H_2O_2 -free diffused by the enamel and dentin, then called as extract. Thus, the extracts obtained from each group are applied to cultured MDPC-23 odontoblast-like cells, which present odontoblast phenotypes [46,47]. Although MDPC-23 cells are more resistant against the toxic components released from dental materials than primary cultures obtained in pulp tissues [15], odontoblasts are organized in monolayers to coat the dentin of vital teeth [48]. Therefore, due to their specific pulp location, odontoblasts are the first cells of this specialized connective tissue to contact the bleaching gel components diffused through enamel/dentin discs [49,48]. The present investigation, as well as several recent studies [17,33,16,18], showed that the strategy of catalyzing H_2O_2 reduces the cytotoxic effect of bleaching gels, regardless of the concentration of this reactive molecule in their composition. G6, G8, and G10, in which 35%, 20%, and 10% H_2O_2 bleaching gels were applied to the enamel coated with biopolymers and irradiated with violet LED, showed a significant reduction in the cytotoxicity index compared to G5, G7, and G9, respectively, in which the gels applied directly to the enamel were not subjected to photocatalysis. The MDPC-23 cell viability in G10 (10% H_2O_2 +NS+PCP+LED) was 3x higher than the control group G5, which represented CIOTB. The cell viability results found in the present study agree with the levels of cell oxidative stress obtained for each group. G6, G8, and G10 showed a reduction of approximately 24%, 21%, and 31% in cell oxidative stress, respectively, compared to their equivalent groups G5, G7, and G9. The MDPC-23 cells in G10 presented oxidative stress of about 64% lower than the control group (G5). These scientific data support the important role of the strategy of combining the use of biopolymers and the irradiation of bleaching gels with violet LED in H_2O_2 catalysis, with a consequent reduction in the cytotoxicity of the therapies tested.

Despite all efforts to mimic *in vitro* conditions *in vivo*, the results obtained in the present laboratory study cannot be directly extrapolated to clinical situations. One of the reasons is that it was not possible to simulate, using the APC, the exudation pressure of the dentinal fluid, which may limit H_2O_2 diffusion through the dentinal tubules in a vital tooth, thus preventing or at least reducing the toxic effects of the therapy [49,48]. However, even after considering the limitations of this study, performing this *in vitro*

investigation allowed determining the interesting role of the association of different catalysis techniques and NS to reduce toxicity and optimize the chromatic change of dental tissues caused by professional tooth bleaching. The decreased H_2O_2 concentration in the bleaching gel also seems a possibility for further exploration, especially when the product is exposed to biopolymers and violet LED. Thus, more studies are still needed, considering that the interesting data obtained in this laboratory study deserves to be assessed *in vivo* to obtain faster and safer bleaching strategies for patients.

5. CONCLUSION

The methodology used in the present study allowed concluding that coating the enamel with a nanofiber scaffold (NS) and a polymeric catalyst primer (PCP), followed by the application of 10%, 20%, and 35% H_2O_2 bleaching gels for 45 minutes, which were irradiated for 20 minutes with a violet LED, stimulates H_2O_2 degradation, increases esthetic efficacy, and reduces the cytotoxicity of the treatment. Using a 10% H_2O_2 bleaching gel in this combined catalysis strategy optimized the esthetic result and restricted the cytotoxicity caused by conventional in-office tooth bleaching.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant 2020/08882-6), the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grants 302047/2019-0 and 408721/2018-9), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Finance Code 001).

REFERENCES

- [1] A.L.F. Briso, V. Rahal, M.O. Gallinari, D.G. Soares, C.A. de Souza Costa, Tooth whitening: complications from the use of peroxides, Switzerland: Springer. (2016) 45-79.
- [2] K. Markowitz, Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses*. 74(5) (2010) 835-40, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.11.044>.
- [3] D.A. Roderjan, R. Stanislawczuk, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, A. Reis, A.D. Loguercio, Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J*. 26 (2015) 242-8, <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302282>.

- [4] M. Rezende, A.D. Loguercio, S. Kossatz, A. Reis, Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: a multi regression and logistic analysis. *J Dent.* 45 (2016) 1-6, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.11.003>
- [5] D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 42 (2014) 185-98, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
- [6] D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig.* 19 (2015) 1013-20, <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1321-3>
- [7] D.D. Soares, F.G. Basso, E.C. Pontes, L.D.F. Garcia, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J. Dent.* 42 (2014) 351-358, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.09.001>
- [8] D.G. Soares, F.G. Basso, D.S. Scheffel, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol.* 60 (2015);60:1428-36, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.014>
- [9] H. Suty, C.D. Traversay, M. Cost, Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol.* 49 (2004) 227-33.
- [10] A. Reis, L.Y. Tay, D.R. Herrera, S. Kossatz, A.D. Loguercio, Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent.* 36 (2011) 590-6, <https://doi.org/10.2341/10-173-C>
- [11] L.B. He, M.Y. Shao, K. Tan, X. Xu, J.Y. Li, The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 40 (2012) 644-53, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.04.010>
- [12] L.Y. Tay, C. Kose, D.R. Herrera, A. Reis, A.D. Loguercio, Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent.* 25 (2012) 199-204.
- [13] C.C. de Oliveira Duque, D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 21 (2017) 2509-20, <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>
- [14] E.D. Acuña, S.O. Parreiras, M.W. Favoreto, G.P. Cruz, A. Gomes, C.P.F. Borges, A.D. Loguercio, A. Reis, In-office bleaching with a commercial 40% hydrogen peroxide gel modified to have different pHs: Color change, surface morphology, and penetration of hydrogen peroxide into the pulp chamber, *J. Esthet. Restor. Dent.* (2019) 1-6, <https://doi.org/10.1111/jerd.12453>.

- [15] C.C. de Oliveira Duque, D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 18 (2014) 1631-7, <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1147-4>.
- [16] U. Ortecho-Zuta, C.C. de Oliveira Duque, M.L. Leite, E. Bordini, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, D.G. Soares, Effects of Enzymatic Activation of Bleaching Gels on Hydrogen Peroxide Degradation Rates, Bleaching Effectiveness, and Cytotoxicity, *Oper. Dent.* 44 (2019) 414-423, <https://doi.org/10.2341/17-276-L>. U.
- [17] D.G. Soares, N. Marcomini, C.C.O. Duque, E.A.F. Bordini, U. Ortecho-Zuta, F. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, 2019. Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. *J. Appl. Oral. Sci.* 27, e20180453.
- [18] Ortecho-Zuta, C.C. de Oliveira Duque, R.A. de Oliveira Ribeiro, M.L. Leite, D.G. Soares, J. Hebling, A.L.F. Briso, C.A. de Souza Costa, Polymeric biomaterials maintained the esthetic efficacy and reduced the cytotoxicity of in-office dental bleaching, *J. Esthet. Restor. Dent.* 33 (2021) 1139-1149, <https://doi.org/10.1111/jerd.12805>.
- [19] P.L. Mamani, R. Ruiz-Caro, M.D. Veiga, Matrix tablets: the effect of hydroxypropyl methylcellulose/anhydrous dibasic calcium phosphateratio on the release rate of a water-soluble drug through the gastrointestinal tract I. in vitro tests, *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 13 (2012) 1073-1083
- [20] B.J. Lee, S.G. Ryu, J.H. Cui, Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin, *Drug Dev Ind Pharm.* 25(1999) 493- 501, <https://doi.org/10.1081/ddc-100102199>.
- [21] K. Sako, T. Sawada, H. Nakashima, S. Yokohama, T. Sonobe, Influence of water soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release, *J. Control. Release.* 81 (2002) 165-72, [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00067-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00067-6).
- [22] T.K. Dash, V.B Konkimalla, Poly(E-caprolactone) based formulation for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release.* 158 (2012) 15-33, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>.
- [23] S.M. Atyabi, F. Sharifi, S. Irani, M. Zandi, H. Mivehchi, Z. Nagheh, Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold atmospheric plasma, *Cell Biochem. Biophys.* 74 (2016) 181-90, <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0718-1>.
- [24] A. Dabouian, H. Bakhshi, S. Irani, M. Pezeshki-Modaress, β -Carotene: a natural osteogen to fabricate osteoinductive electrospun scaffolds, *RSC Adv.* 19 (2018) 9941-5.
- [25] H.J. Jin, S.V. Fridrikh, G.C. Rutledge, D.L. Kaplan, Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide), *Biomacromolecules.* 3 (2002) 1233-9.

- [26] M. Kury, E.E. Wada, D.P. Silva, C.P.M. Tabchoury, M. Giannini, V. Cavalli, Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial, *J Appl Oral Sci.* (2020) 28:e20190720, <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0720>.
- [27] M. Tavares, J. Stultz, M. Newman, V. Smith, R. Kent, E. Carpino, et al, Light augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc.* 134 (2003) 167-75, <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0130>.
- [28] A.N.S. Rastelli, H.B. Dias, E.T. Carrera, A.C.P. de Barros, D.D.L. Dos Santos, V.H. Panhóca, V.S. Bagnato, Violet LED with low concentration carbamide peroxide for dental bleaching: A case report, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* (2018) 270-272. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.021>
- [29] M.O. Gallinari, L.T.A. Cintra, M.B.A. Souza, A.C.S. Barboza, L.M.B. Esteves, T.C. Fagundes, A.L.F. Briso, Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: A case series with split-mouth design, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 27 (2019) 59–65, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.016>.
- [30] M.O. Gallinari, T.C. Fagundes, L.M. da Silva, M.B. de Almeida Souza, A. Barboza, A.L.F. Briso, A New Approach for Dental Bleaching Using Violet Light with or without the Use of Whitening Gel: Study of Bleaching Effectiveness, *Oper Dent.* 44 (2019) 521-529, <https://doi.org/10.2341/17-257-L>.
- [31] T.W. Silva Daltro, S.A. Gomes de Almeida, M.F. Dias, P.C. Lins-Filho, C.H.V. da Silva, R.P. Guimarães, The influence of violet LED light on tooth bleaching protocols: In vitro study of bleaching effectiveness, *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 32 (2020) 102052, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102052>.
- [32] M. Kury, F.A. Rueggeberg, J.R. Soto-Montero, et al, Characterization and effectiveness of a violet LED light for in-office whitening, *Clin Oral Invest.* (2022), <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04357-x>.
- [33] C.C. de Oliveira Duque, D.G. Soares, A. Briso, U. Ortecho-Zuta, R.A. de Oliveira Ribeiro, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Influence of Tooth Pigmentation on H₂O₂ Diffusion and Its Cytotoxicity After In-office Tooth Bleaching, *Oper. Dent.* 45 (2020) 632-642, <https://doi.org/10.2341/19-013-L>.
- [34] R.D. Paravina, M.M. Pérez, R. Ghinea, Acceptability and perceptibility thresholds in dentistry: A comprehensive review of clinical and research applications, *J Esthet Restor Dent.* 31 (2019) 103-112, <https://doi.org/10.1111/jerd.12465>.
- [35] M.M. Pérez, R. Ghinea, M.J. Rivas, A. Yebra, A.M. Ionescu, R.D. Paravina, et al, Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space, *Dent Mater.* 32 (2016) 461-7, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.008>.
- [36] M.L.A.S. Leite, C.A. de Souza Costa, R.M. Duarte, A.K.M. Andrade, D.G. Soares. Bond strength and cytotoxicity of a universal adhesive according to the hybridization strategies to dentin, *Braz Dent J.* 29 (2018) 68-75, <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801698>.

- [37] J.H. Chen, J.W. Xu, C.X. Shing, Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions, *J Prosthet Dent.* 69 (1993) 46-8, [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(93\)90239-k](https://doi.org/10.1016/0022-3913(93)90239-k).
- [38] S. Gopinath, V. James, S. Vidhya, K. Karthikeyan, S. Kavitha, S. Mahalaxmi, Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent.* 16 (2013) 45-9, <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0453>.
- [39] A.C. Travassos, C.R. Torres, A.B. Borges, D.C. Barcellos, In vitro assessment of chemical activation efficiency during in office dental bleaching, *Oper. Dent.* 35 (2010) 8, <https://doi.org/10.2341/09-256-L>.
- [40] M. Kury, B.A. Resende, D.P. Silva, E.E. Wada, F.M. Antonialli, M. Giannini, V. Cavalli, Clinical Application of Violet LED In-office Bleaching with or without Traditional Systems: Case Series, *Oral Health and Dental Studies.* 2 (2019) 1, <https://doi.org/10.31532/OralHealthDentStud.2.1.001>.
- [41] C.A. de Souza Costa, H. Riehl, J.F. Kina, N.T. Sacono, J. Hebling, Human pulp responses to in-office tooth bleaching, *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 109 (2010) 59-64, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>.
- [42] D.A. Roderjan, R. Stanislawczuk, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, A. Reis, A.D. Loguercio, Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings, *Braz. Dent. J.* 26 (2015) 242-8, <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302282>.
- [43] D.A. Roderjan, R. Stanislawczuk, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, D.D. Soares, A. Reis, et al, Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors, *J Mater Sci Eng B.* (2014) 178-85.
- [44] G. Schmalz, K.A. Hiller, L.J. Nunez, J. Stoll, K. Weis, Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions, *J Endod.* 27 (2001) 23-30, <https://doi.org/10.1097/00004770-200101000-00007>.
- [45] J.D.D. Teruel, A. Alcolea, A. Hernández, A.J. Ruiz. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth, *Arch Oral Biol.* 60 (2015) 768-75, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>.
- [46] C.T. Hanks, D. Fang, Z. Sun, C.A. Edwards, W.T. Butler, Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line, *Eur J Oral Sci.* 106 (1998) 60-6, <https://doi.org/>
- [47] P.A. Baldión, M.L. Velandia-Romero, J.E. Castellanos, Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation, *Int J Cell Biol.* 2018 (2018) 6853189, <https://doi.org/>
- [48] C.A. de Souza Costa, Biological aspects of dental material, *J. Adhes. Dent.* 22 (2020) 540-4, <https://doi.org/10.3290/j.jad.a45409>.

[49] C.A. de Souza Costa, J. Hebling, D.L. Scheffel, D.G. Soares, F.G. Basso, A.P. Ribeiro, Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques, Dent. Mater. 30 (2014) 769-84, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.010>.

Table

Table 1. Distribution of groups according to the treatments.

GROUPS	TREATMENTS	TIME
G1	No treatment (negative control)	45 min
G2	NS*+PCP**	45 min
G3	LED	20 min
G4	NS+PCP+LED	45 min
G5	35% H_2O_2 (positive control)	45 min
G6	SN+PCP+35% H_2O_2 +LED	45 min
G7	20% H_2O_2	45 min
G8	NS+PCP+20% H_2O_2 +LED	45 min
G9	10% H_2O_2	45 min
G10	NS+PCP+10% H_2O_2 +LED	45 min

*NS: Nanofiber Scaffold.

** PCP: Polymeric Catalyst Primer.

Figures

Figure 1. Illustrative image of the experimental procedure.

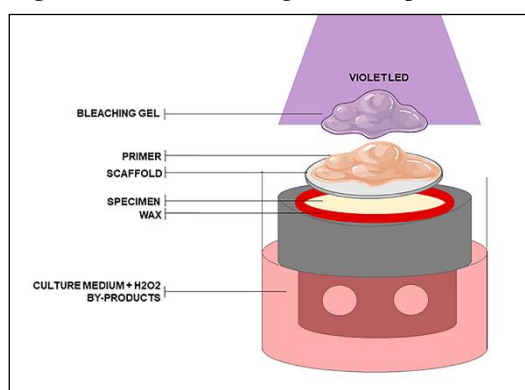
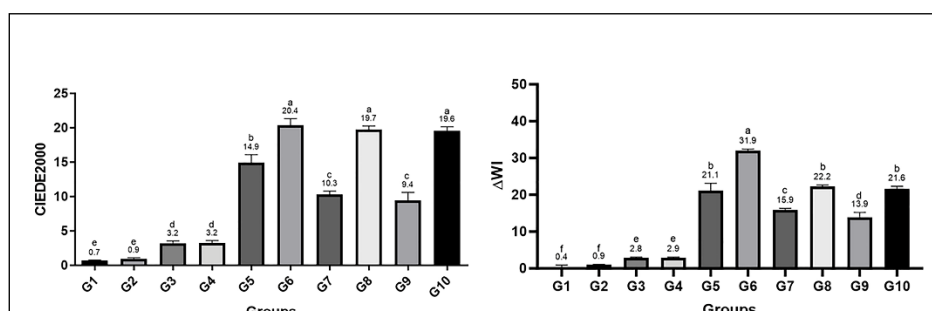


Figure 2. Bar graph of the mean (numerical) and standard deviation values of ΔWI and ΔE_{00} .



Different letters show statistically significant differences ($p < 0.05$).

Figure 3. Hydroxyl radical release kinetics in 15 minutes for the different H_2O_2 concentrations in the presence or absence of NS+PCP and LED.

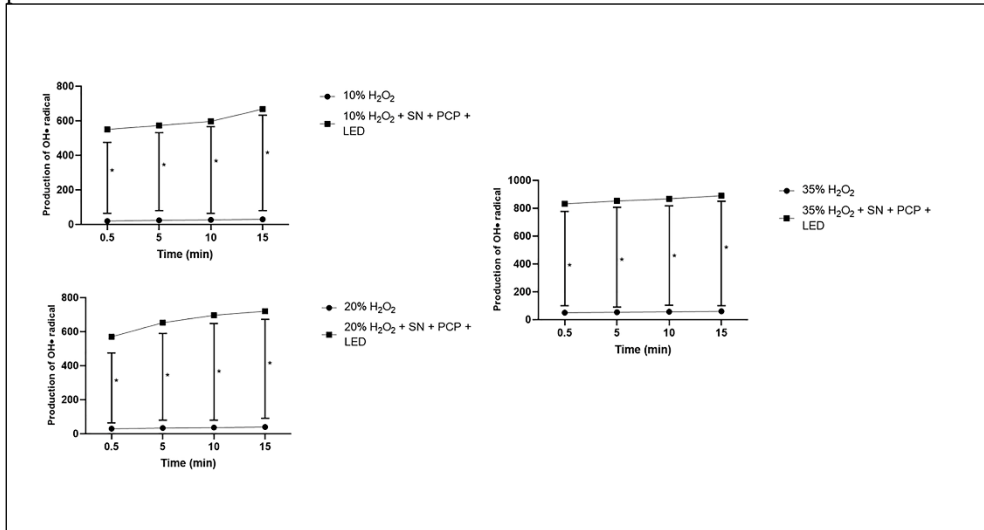
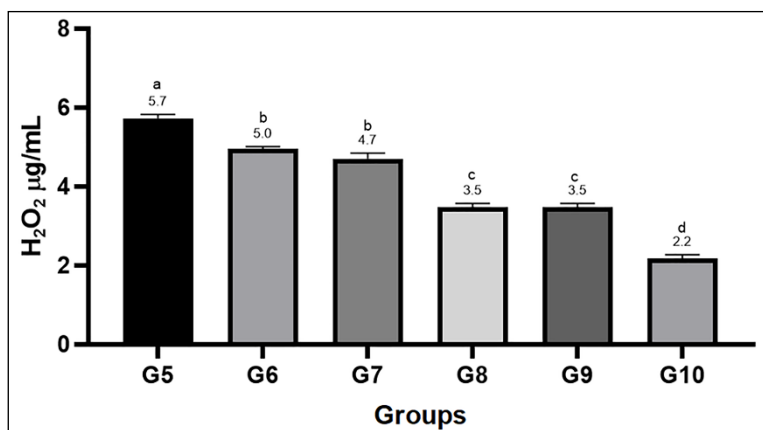
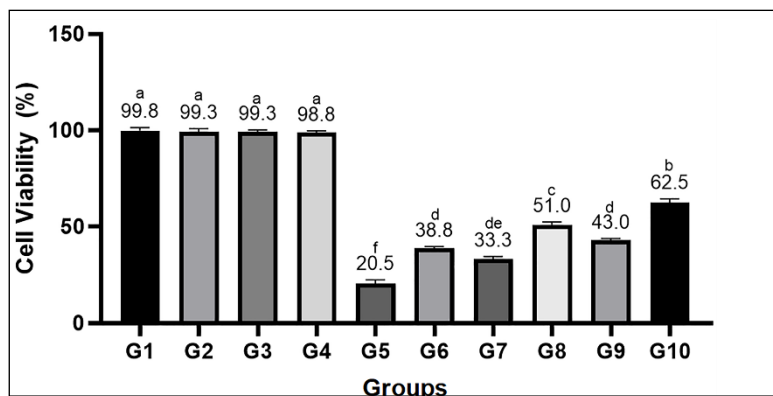


Figure 4. Bar graph of the mean (numerical) and standard deviation values of the H_2O_2 diffusion of bleaching gels.



Different letters show statistically significant differences among the groups (two-way ANOVA; Tukey's test; $p < 0.05$).

Figure 5. Bar graph of the mean (numerical) and standard deviation values of cell viability.



Different letters show statistically significant differences among the groups (two-way ANOVA; Tukey's test; $p < 0.05$).

Figure 6. Bar graph of the mean (numerical) and standard deviation values of fluorescence intensity of the carboxy-H2DCFDA probe (oxidative stress).

Different letters show statistically significant differences among the groups (two-way ANOVA; Tukey's test; $p < 0.05$).

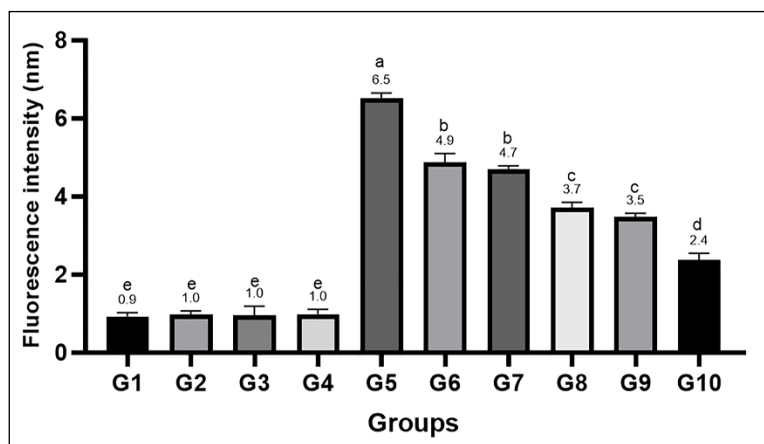
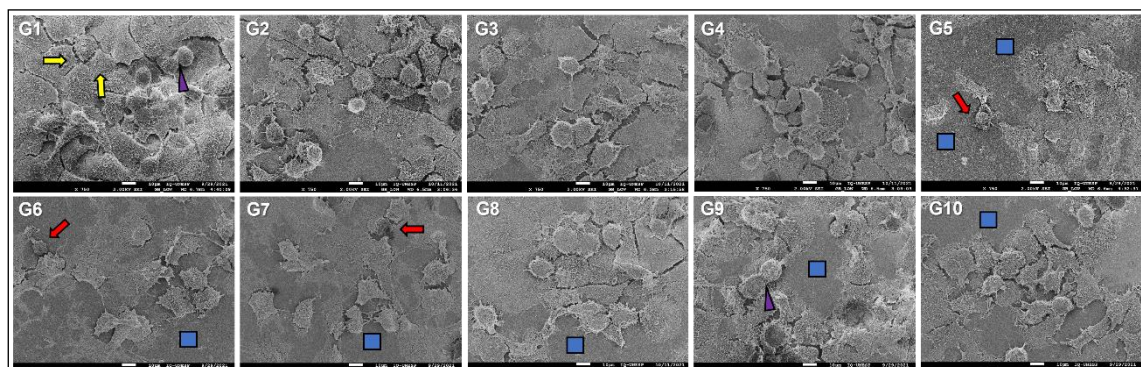


Figure 7. Scanning electron microscopy.



G1 (negative control; NC), G2, G3, and G4: There is a high number of cells (yellow arrows) almost completely coating the substrate. The purple arrowheads represent cells at the beginning of mitosis. All images showed that cells display an extensive cytoplasm and several cytoplasmic extensions, which seem to maintain them adhered to the substrate. **G5, G6, and G7:** Significant reduction in the number of cells, with changed morphology (red arrows), and exposed coverslip surface (blue square). **G8, G9, and G10:** Despite the reduction in the number of cells adhered to the substrate, the cells of these groups show similar morphology to those of the control group (G1). Moreover, the exposed substrate areas (blue square) are smaller than those of G5, G6, and G7.

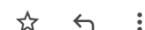
Confirming handling editor for submission to Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

Externa

Caixa de entrada x

**Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** <em@editorialmanager.com>

10:35 (há 1 hora)



para mim ▼

This is an automated message.

Manuscript Number: PDPDT-D-22-00171

Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts

Dear Professor de Souza Costa,

The above referenced manuscript will be handled by Editor-in-Chief Ron Allison.

To track the status of your manuscript, please log into Editorial Manager at <https://www.editorialmanager.com/pdpdt/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU_PDPDT#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pdpdt/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

ANEXO A - COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FOAR-UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Declaração

De acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), RESOLUÇÃO NORMATIVA N 30, DE 2 DE FEVEREIRO DE 2016, que baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA, seção VI -RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES, item 6.1.10, quando o material não for oriundo de uma atividade de ensino ou de pesquisa científica, por exemplo, cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo, a responsabilidade para atender a necessidade de obtenção e manutenção da documentação que evidencie a origem do material de forma inequívoca é do responsável pela atividade, compartilhada por sua equipe, nunca da CEUA institucional. Assim sendo, de acordo com a legislação vigente no Brasil, os projetos de pesquisa que venham a utilizar dentes, ossos e/ou outras partes de bovinos oriundos de abate do animal como rotina da atividade de frigoríficos, não necessitam de análise e avaliação pela CEUA Institucional.

Araraquara, 18 de janeiro de 2022.


Prof. Dra. CARINA APARECIDA FABRICIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

**Autorizo a reprodução deste trabalho a publicação pelo prazo 2 anos
após a data de defesa)**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de Novembro de 2022.

Beatriz Voss Martins