MARJORIE DE OLIVEIRA GALLINARI

ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DOS GÉIS CLAREADORES INCORPORADOS COM NANO TUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ASSOCIANDO OU NÃO COM LED VIOLETA. ESTUDO IN VITRO E IN VIVO

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), Araçatuba.

Supervisor(a): Prof. Ass. André Luiz Fraga Briso

CNPq - 152143/2022-0

Araçatuba

2024

RELATÓRIO TÉCNICO FINAL
PROGRAMA DE PÓS-DOUTORADO NA UNESP 91/2017
NÚMERO DO PROJETO: 3771

VIGÊNCIA: 01/08/2022 ATÉ 31/07/2024

ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DOS GÉIS CLAREADORES INCORPORADOS COM NANO TUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ASSOCIANDO OU NÃO COM LED VIOLETA. ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

STUDY ON THE EFFECT OF BLEACHING GELS WITH TITANIUM DIOXIDE NANOTUBES IN COMBINATION WITH OR WITHOUT VIOLET LED. IN VITRO AND IN VIVO STUDY

Marjorie de Oliveira Gallinari
Bolsista

André Luiz Fraga Briso
Supervisor

RESUMO DO PROJETO PROPOSTO

Resumo: As pesquisas sobre as terapias clareadoras têm ganhado grande espaço, diversificando técnicas com intuito de amenizar os danos que este tratamento pode causar no tecido pulpar. Neste contexto, o uso do LED violeta sem o uso de géis clareadores tem obtido resultados positivos, porém sem a conhecida eficácia das técnicas tradicionais. Além disso, o uso de catalisadores, como os nanotubos de dióxido de titânio (TiO2-nts) tem proporcionado maior eficácia clareadora por acelerar a reação de oxidação dos procedimentos clareadores. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da incorporação de TiO2-nts na composição de géis clareadores contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) (35%, 17,5% e 9%), associando ou não com a irradiação com o LED violeta, no efeito clareador no substrato dentário e na resposta inflamatória do tecido pulpar e estresse oxidativo. Para tanto, discos de esmalte/dentina bovinos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos (n=10): GI-placebo (controle negativo); GII-PH 35% (controle positivo); GIII-PH 17,5%; GIV-PH 17,5%-nts; GV-PH 17,5%+vio; GVI-PH 17,5%-nts+vio; GVII-PH 9%; GVIII-PH 9%-nts; GIX-PH 9%+vio; GX-PH 9%-nts+vio. Foram avaliados a alteração de cor (T1-após 1ª sessão, T2-2ª sessão, T3-3ª sessão e T4-14 dias após finalização do tratamento), difusão do peróxido de hidrogênio, degradação do peróxido e análise do pH (T1-inicial, T2-15 minutos, T3-30 minutos e T3-45 minutos após ativação do gel) (fase 1). Em seguida, foram selecionadas as 4 terapias mais efetivas do estudo, e então foi realizada a análise in vivo da resposta inflamatória e celular específica ao estresse oxidativo após o tratamento clareador em molares de ratos, por meio da análise histopatológica e imuno-histoquímica (fase 2). Os momentos de eutanásia dos animais foram: imediatamente após e 24 horas após o tratamento clareador. Os resultados foram submetidos a testes estatísticos específicos. Analisando o pH observou que os grupos que receberam na composição os nanotubos de TiO2 apresentaram pH mais próximo do neutro além da maior estabilidade, enquanto que o gel PH35% apresentou pH próximo ao nível crítico da cavidade bucal. Em relação à degradação do PH foi possível observar que incorporação dos nanotubos nos géis clareadores (PH9-N e PH17,5-N) mantiveram os géis mais estáveis durante toda a aplicação do gel clareador. Analisando a eficácia

clareadora observou-se que os grupos PH9-N-V, PH9-V e PH17,5-V se assemelharam ao grupo PH35% na segunda sessão clareadora e em relação à difusão do PH, o grupo PH9-N apresentou a menor taxa de difusão trans-amelodentinária de H2O2, diferenciando-se de todos os demais grupos que receberam gel clareador. Na fase 2 foi possível observar que o grupo recebeu apenas os nanotubos na composição (PH17,5-nts) apresentou um infiltrado inflamatório mais brando do que os demais grupos analisados no tempo imediatamente após o tratamento clareador, além de promover menor imunomarcação para os marcados de TNF-a e oxido nítrico sintse. A partir dos dados analisados, a incorporação de nanotubos de TiO2 na composição de agentes clareadores com concentrações menores tem mostrado ser uma técnica promissora por se apresentar ser uma técnica altamente eficaz com menores danos aos tecidos pulpares.

Palavras-Chave: Clareamento Dentário, Luz Violeta, Dióxido de Titânio

Este projeto foi dividido em duas fases principais, descritas a seguir:

FASE 1 – Incorporação do TiO_2-nts aos géis clareadores e caracterização:

- As análises de alteração de cor, penetração trans-amelodentinária, degradação do peróxido e valores do pH foram finalizados e está em fase de edição para publicação do artigo.

FASE 2 – Análise *in vivo* dos géis clareadores com TiO_2-nts incorporados:

- Análise histológica com a coloração de Hematoxilina e Eosina foram finalizados
- A análise de imunohistoquímica para os marcadores de TNF-a e oxido nitroso já estão prontos.

DESCRIÇÃO DAS METODOLOGIAS DESENVOLVIDAS

2.1. FASE 1: INCORPORAÇÃO DO TiO2-NTS AOS GÉIS CLAREADORES E CARACTERIZAÇÃO

2.1.1. OBTENÇÃO DOS TIO2-NTS E INCORPORAÇÃO NO GEL CLAREADOR

Os TiO_2-nts foram formados a partir de uma única folha laminada (10 nm de diâmetro e 200 nm de comprimento) e foram produzidos em estruturas espirais; eles foram sintetizados pelo método alcalino. (37) Os TiO_2-nts foram preparados pela mistura de 12 g da fase TiO_2 anatase, pureza de 99%, com 200 mL de NaOH 10 M. Esta mistura foi mantida a 120 ° C durante 24 h em um recipiente de Teflon aberto, colocado em um banho de glicerina e aquecido com um aquecedor de manto. As sínteses foramm realizadas à pressão ambiente, onde apenas os reagentes precursores foram submetidos ao tratamento alcalino. Após o tratamento, a mistura foi lavada repetidamente com ácido clorídrico 0,1 M e água deionizada para remover os íons de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7. (37)

2.1.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados incisivos bovinos obtidos a partir de animais com idade entre 24 e 36 meses. Após a extração e obtenção dos dentes, os mesmos foram limpos mecanicamente através de curetas periodontais e em seguida foram submetidos à profilaxia com auxílio de pedra pomes e água. Para evitar a proliferação bacteriana os dentes limpos foram armazenados em solução salina fisiológica contendo timol a 0,1% e mantidos em refrigerador em temperatura aproximada a 4°C até o início da fase experimental.

Em seguida, foram obtidos discos de esmalte/dentina com 5,7mm de diâmetro a partir do terço médio da face vestibular de cada dente com auxílio de uma furadeira de bancada (modelo FGC-16, Ferrari, São Paulo, SP, Brasil) com uma ponta diamantada para corte de vidro acoplada (8 mm em diâmetro, Dinser Diamond Tools Ltda, Sacomã, SP, Brasil), sob constante irrigação. Inicialmente, todos os discos foram submetidos à regularização da superfície dentinária por

meio de movimentos giratórios manuais sobre lixas de óxido de alumínio de granulação 400 e 600 (T469-SF-Noton, Saint-Gobam Abrasives Ltda, Jundiai, SP, Brasil), até que apresentassem a espessura de 3,7 mm (1,3 mm de esmalte e 2,4 mm de dentina +0,2mm), medidos em paquímetro digital (modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda, SP, Brasil). Para remoção da smear layer, foi aplicada solução de EDTA 0.5M, pH 7,2 por 30 segundos30, seguido de lavagem com água deionizada.

Após a obtenção dos discos, os mesmos foram submetidos a uma leitura inicial prévia do valor de L*, utilizando o aparelho espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), que utiliza o sistema de cores CIEL*a*b*. Para realização da leitura foram confeccionados suportes de silicone preto com o diâmetro (5,7mm) e espessura (3,5mm) para que os discos de esmalte/dentina possam se encaixar perfeitamente no suporte, padronizando a posição do espécime e fazendo com que o feixe de luz atinja sempre o mesmo local. Obtidos os valores das coordenadas, foi calculada a média de toda a amostragem, sendo selecionados blocos dentais que apresentarem valores de L* mais próximos do valor médio, respeitando a tolerância de 5%. Em seguida, as amostras foram divididas para cada um dos experimentos.

2.1.3. CONCENTRAÇÕES DOS GÉIS CLAREADORES E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foi utilizado o gel clareador à base de peróxido de hidrogênio (PH) a 35% (Whiteness HP Maxx - FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil), como grupo controle positivo. Este produto se apresenta comercialmente em dois frascos, um contendo o peróxido de hidrogênio e o outro, o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas na proporção de 3:1, de acordo com as instruções do fabricante.

A segunda concentração do gel clareador, foi obtido através da diluição do gel clareador a 35%, imediatamente antes do procedimento clareador. Para realizar esta diluição foi adicionado 3 gotas de água destilada no gel obtido a partir das recomendações do fabricante (3:1), obtendo assim um gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 17,5%. (22)

Para o gel de menor concentração, foi realizado a diluição do gel clareador a 35%. Para isso, seguiu os mesmos passos para diluição e obtenção do gel a 17,5%, porém neste momento foi feito a mistura de 6 gotas de água destilada, 3 gotas de peróxido de hidrogênio e 3 gotas de agente espessante, obtendo assim um gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 9% aproximadamente. Após a homogeneização da solução, a mesma foi coletada com a micropipeta para líquidos viscosos e foi aplicado 0,4mL da solução na superfície do esmalte, permanecendo no local por 45 minutos.

Para obtenção do gel placebo, foi solicitado à empresa para fornecimentos dos géis sem o princípio ativo (peróxido de hidrogênio) com intenção de obter um gel com a mesma consistência e coloração do gel clareador, sendo manuseado e aplicado da mesma maneira como foi explicado para os géis clareadores.

Para fabricação dos géis contendo os TiO_2-nts na composição, os TiO_2-nts foram pesados em uma balança de precisão (BEL Engineering, Monza, Milão, Itália) e adicionados manualmente aos agentes clareadores, a uma concentração de 1%. (34, 35) Os TiO_2-nts foram incorporados aos agentes clareadores por 1 minuto. Em seguida, o conteúdo foi aspirado por uma micropipeta para líquidos viscosos (Microman M100E, Gilson, Middleton, WI, EUA), e foi aplicado 0,04 ml na superfície do esmalte por 45 min. O TiO_2 foi incorporado ao gel clareador de forma manual, por meio de espatulação, imediatamente antes de cada aplicação.

Para a irradiação, a ponteira acrílica do LED foi ativada por 12 minutos a uma distância de 1,5cm seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante.

Os blocos dentais foram aleatoriamente divididos em 09 grupos experimentais, de acordo com o protocolo de clareamento a ser realizado, conforme apresentado no Quadro 1 e descrito a seguir.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais segundo a terapia clareadora adotada.

Grupos	Luz	Gel	Protocolo
G1	--	Gel placebo (controle negativo)	1 aplicação de 45 minutos do gel placebo
G2	--	PH 35% (controle positivo)	1 aplicação de 45 minutos do gel clareador

G3	SEM LUZ	PH 17,5%	12 minutos de irradiação e 1 aplicação de 45 minutos do clareador
G4		PH 17,5% + TiO2-nts	
G5	LED VIOLETA (400-405mn)	PH 17,5%	
G6		PH 17,5% + TiO2-nts	
G7	SEM LUZ	PH 9%	
G8		PH 9% + TiO2-nts	
G9	LED VIOLETA (400-405mn)	PH 9%	
G10		PH 9% + TiO2-nts	

2.1.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS GÉIS CLAREADORES

a) Análise de pH: Os valores de pH foram obtidos em triplicata para cada gel clareador, de acordo com os respectivos períodos de medição. Será realizada a mensuração dos valores de pH inicialmente (após a mistura do gel clareador), 15, 30 e 45 minutos após a ativação do gel clareador em contato com a coroa dentária por meio de papel indicador de pH (Whatman® indicator papers, Sigma-Aldrich, MO, USA).

b) Análise da liberação e degradação de PH por permaganatometria: a medição da degradação de PH antes, durante e após o procedimento clareador foi adotado o método titulométrico, baseado permanganometria da solução analisada. (38, 39)

Inicialmente foi feita a titulação de uma solução de peróxido de hidrogênio de 200 volumes. Para isso, deverá ser feita a padronização da solução de KMnO4 utilizando um padrão primário à base de oxalato de sódio, pelo fato de o permanganato de potássio não ser um reagente primário padrão e ser instável. Em seguida, a solução de permanganato foi gotejada em um recipiente contendo 25mL do padrão de oxalato de sódio e 20 mL de ácido sulfúrico. Somente após a solução do oxalato de sódio (transparente)

apresentar uma coloração roxa constante é que a reação foi finalizada. Após verificar o gasto de solução de permanganato gasto, foi então calculado o fator de correção, que será utilizado para calcular a concentração de peróxido dos géis posteriormente. O fator de correção foi calculado pela seguinte fórmula: $Fc = \frac{25}{V}$, sendo que Fc é o fator de correção da solução de permanganato de potássio; e V é o volume gasto de permanganato de potássio. Após a verificação do volume de solução de permanganato de potássio, iniciou a titulação para análise da concentração de peróxido presente nos diferentes géis clareadores.

Para isso, os géis clareadores foram manipulados e em uma balança analítica foi pesado 0,02g de cada gel. Em seguida essa quantia foi diluída em 20mL de água deionizada em agitador magnético a 3500 RPM por 30 segundos. Após a diluição, a mistura foi dispensada em um Becker de 50mL contendo 15mL de ácido sulfúrico. Em seguida iniciou o processo de titulação através do gotejamento da solução de permanganato de sódio (coloração roxa) sobre a solução inicial até o momento em que a reação atingia o seu pico (solução de peroxido de hidrogênio e ácido sulfúrico na coloração rósea irreversível). Então, a concentração do peróxido foi calculada a partir da seguinte fórmula: $C = \frac{V\ x\ 1{,}701\ x\ Fc\ x\ 100}{m}$, sendo que C é a concentração do PH, V é o volume de permanganato de sódio 0,1N gasto na reação em mL, Fc é o fator de correlação da solução de KMnO4 0,1N, e m é a massa da amostragem em mg. Por fim a degradação do peróxido foi calculada comparando a concentração final e com a inicial.

c) <u>Análise da alteração cromática superficial</u>

- *Pigmentação das amostras*: Após a seleção dos espécimes, os mesmos foram armazenados em eppendorfs contendo 1ml de infusão de chá preto à temperatura ambiente. A infusão foi feita empregando 1,6g de chá preto (Chá Matte Leão, Curitiba, PR, Brasil) para cada 100 ml de água destilada.(40) O processo de pigmentação foi monitorado durante 6 dias, sendo realizado a troca da solução diariamente. Os tubos contendo a solução e os espécimes foram mantidos em temperatura ambiente durante todo o processo.

Concluído o tratamento pigmentante, foi realizada a segunda seleção das amostras, de forma semelhante à descrita anteriormente. Nesta oportunidade, permaneceu no estudo 90 blocos dentais pigmentados (n=10). As seleções acima descritas objetivaram padronizar a cor inicial, bem como a intensidade de pigmentação dos blocos dentários.a capacidade clareadora dos espécimes.

- *Mensuração da alteração de cor superficial:* Os espécimes foram submetidos à mensuração de suas cores em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), a cada sessão de consultório, bem como após o término do tratamento. As leituras foram realizadas na superfície vestibular dos espécimes, e comparadas à leitura inicial, através do comprimento de onda versus reflexão. Os tempos de análise dessa parte do estudo foram: T0- leitura inicial; T1- após a primeira sessão clareadora; T2- após a segunda sessão clareadora; T3- após a terceira sessão de clareamento. Objetivando analisar a estabilização cromática, os espécimes ainda serão analisados em T4- quatorze dias após o término do tratamento. Os valores do parâmetro do CIELab foram anotados e posteriormente o whitenessindex (WID), diferenças whiteness index (ΔWID), mudança de cor (ΔE) e CIEDE2000 (ΔE00) foram determinados de acordo com as seguintes equações:

$WID = (0.511 \times L^*) - (2.324 \times a^*) - (1.100 \times b^*)$

$\Delta WID = WID_{final} - WID_{baseline}$

$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$

$\Delta E00 = [(\Delta L'/KLSL)^2 + (\Delta C'/KCSC)^2 + (\Delta H'/K\ HSH)^2 + RT^*(\Delta C'/KCSC)^*(\Delta H'/K\ HSH)]^{1/2}$

d) <u>Análise da permeação trans-amelodentinária do PH:</u>

- *Preparo da CPA*: Os discos destinados para esta análise foram adaptados a um dispositivo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-Unesp. Cada CPA

apresenta 2 compartimentos: o da porção superior, apresenta uma abertura de 8 mm de diâmetro, e outra abaixo com 6 mm de abertura, permitindo o posicionamento e travamento adequado do espécime; a porção inferior apresenta perfurações laterais que permitem a circulação da solução utilizada para quantificar o peróxido penetrado no espécime. Os espécimes foram posicionados nas CPAs entre dois anéis de silicone com diâmetro interno de 4,47 mm e espessura de 1,78 mm (Rodimar Rolamentos Ltda, Araraquara, SP, Brasil). Em seguida foi realizado vedamento adicional com cera rosa fundida nº 7 (Wilson®,Polidental, Cotia, SP, Brasil). Com as câmaras pulpares artificiais montadas, os tratamentos clareadores foram realizados, conforme a descrição realizada no item 3.1.4, para cada grupo experimental.

- *Quantificação da penetração trans-amelodentinária de PH:* Para quantificar o PH que penetra através dos discos de esmalte e dentina, 1 ml de solução tampão de acetato foram despejados em casulos (placas de cultura celular) que também receberão as CPAs. A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução e o peróxido de hidrogênio difundido através da estrutura dental fez parte da mesma. Após o clareamento foi então adicionada a solução de corante violeta leucocristal e a solução contendo enzima peroxidase.(41) A coloração dessa mistura varia sua intensidade de acordo com a quantidade de peróxido. Assim, como a absorbância é proporcional à concentração do peróxido, foi possível avaliar indiretamente a quantidade de peróxido que difundiu da superfície dental para a solução contida na CPA. A leitura da solução foi realizada com o Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), 30 minutos após cada sessão clareadora.

e) *Quantificação das EROs*: Para quantificação do total de radicais livres produzido, foram depositadas alíquotas de 0.2ul de gel clareador preparado em placas flat black e adicionados 0.25 uL de sonda carboxy-H2DCFDA (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) na concentração de 50 uM, sendo a emissão de fluorescência avaliada com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm (Synergy H1, Biotek) imediatamente, após 15, 30 e 45 minutos, sendo realizado o blank em todos os grupos de análise (n=5).

2.2. FASE 2: ANÁLISE *IN VIVO* DOS GÉIS CLAREADORES COM TiO2-NTS INCORPORADOS

O objetivo desta fase experimental foi avaliar o efeito da incorporação dos TiO2-nts em géis clareadores associando ou não com a irriadiação da luz violeta na resposta inflamatória e celular específica ao estresse oxidativo após o tratamento clareador. A hipótese nula a ser testada é que o emprego do LED Violeta e a incorporação dos TiO2-nts nos géis clareadores não interferiria na resposta inflamatória e na capacidade de resposta celular específica ao estresse oxidativo após o tratamento clareador. O projeto foi submetido ao comitê de ética do uso de animal local recebendo sua aprovação (Processo FOA nº 821-2023)

2.2.1. Delineamento experimental

Os fatores estudados foram: 1- Tratamento clareador em 4 níveis (G1: técnica 1 selecionada com luz, G2: técnica 2 selecionada com luz, G3: técnica 1 selecionada sem luz e G4: técnica 2 selecionada sem luz); 2- Tempo de avaliação em 2 níveis (T0: imediatamente após o término do tratamento clareador, T1: 24 horas após o término do tratamento clareador). Serão consideradas 2 variáveis de resposta: resposta inflamatória pulpar e resposta celular ao estresse oxidativo

2.2.2. Animais

Foram utilizados 72 ratos machos (Rattus albinus, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24ºC e com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), permanecendo em gaiolas coletivas, sendo 4 ratos por gaiola. Os animais serão alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água à vontade.

2.2.3. Distribuição dos lotes experimentais

Nesta fase, foram analisadas as 4 técnicas que apresentarem os melhores resultados na fase 1 do estudo. Os animais foram distribuídos em 2 lotes experimentais (com luz e sem luz) de acordo com as técnicas clareadoras selecionadas e subdivididos em 4 grupos de forma randomizada.

2.2.4. Protocolo sedativo e anestesia

Antes dos procedimentos clareadores, os animais receberam, via intramuscular, uma associação do sedativo Cloridrato de Xilazina (Syntec do Brasil LTDA, Cotia, São Paulo, Brazi) na dosagem de 10 mg/kg e Cloridrato de Quetamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil), na dosagem 80 mg/Kg, para causar efeito anestésico.

2.2.5. Protocolo clareador

Após realizada a analgesia dos animais, os mesmos receberam a aplicação de uma resina polimerizável (Top Dam - FGM Produtos Odontológicos Ltda., Santa Catarina, Brasil) ao redor dos molares superiores direitos e esquerdos, com intuito de proteger as estruturas circundantes. A barreira gengival foi fotoativada por 20 segundos. Posteriormente, foi aplicado 4 µL de gel clareador selecionado com auxílio de uma pipeta própria para líquidos viscosos (Microman E M100E, Gilson, Inc, Middleton, Wisconsin, USA), permanecendo em contato com o esmalte por 20 minutos. Para realizar a irradiação com a luz violeta, a hemiarcada que não recebeu a irradiação permaneceu com artefato preto que impeça a ação fotocatalítica nos elementos dentais. A irradiação com o led violeta foi realizada por 6 minutos seguidos na hemiarcada destinada à irradiação.

O tempo de tratamento clareador que foi empregado nesta pesquisa foi determinados por testes piloto, que apontaram que esta posologia não gerarou necrose e dissolução pulpar no tratamento clareador imediatamente após o tratamento clareador.

2.2.6. Eutanásia e obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados imediatamente após o clareamento e 24 horas após o término dos tratamentos clareadores. Inicialmente, os animais foram anestesiados como mencionado anteriormente. Em seguida, as hemimaxilas foram separadas, dissecadas e fixadas em solução de formalina tamponada a 4% por 24 horas. Os espécimes foram descalcificados em solução de ácido etilenodiaminotetracético a 10% (pH = 7) por aproximadamente 3 meses e depois desidratados, clarificados e embebidos em parafina. (16)

2.2.7. Processamento histológico

As maxilas foram mantidas na mesma solução fixadora durante 8 horas, sendo em seguida lavadas em água corrente por 12 h e depois imersas em solução desmineralizadora constituída por solução de EDTA a 10% (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Figura 1).

Posteriormente, as maxilas foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em série gradativa de álcool etílico, diafanizadas em xilol e impregnadas e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes histológicos de molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Foi realizada a microtomia em micrótomo de deslizamento (Leica Microsystems - RM 2045 Wetzlar, Germany), resultando em cortes seriados com 6 µm de espessura, os quais foram coletados em lâminas silanizadas. As lâminas histológicas foram submetidas à coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina, para análise histopatológica, ou ao processamento imunoistoquímico

2.2.8. Técnica histológica

Os cortes destinados à coloração com H.E. foram imersos em solução de hematoxilina por 7 minutos, após desparafinização e reidratação. Em seguida, os cortes foram lavados com água corrente por 1 minuto, mergulhados em álcool-ácido por 2 segundos e lavados novamente em água corrente por 5 minutos. Após a coloração com hematoxilina, os cortes foram imersos em solução de eosina por 4 minutos e em seguida será realizada a desidratação em álcool com concentração crescente (95º - 95º - 100º - 100º). Ao final, foram realizados dois banhos em xilol.

2.2.9. Análises histopatológica

As preparações histológicas serão observadas em microscópio óptico (DM 4000 B, Leica®, Germany). Serão utilizados 4 cortes histológicos equidistantes da polpa dentária do primeiro molar superior. Uma análise semiquantitativa da inflamação será realizada. Os escores atribuídos em cada terço da câmara pulpar (oclusal, médio e cervical) serão: 1 – Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; 2 – Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo); 3 – Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo); 4 – Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo); 5 – Necrose

2.2.10. Técnica imuno-histoquímica

Os cortes histológicos destinados ao processamento imunoistoquímico foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker*® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunoistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 1% de soro albumina bovino por 12 horas para o bloqueio dos sítios inespecíficos. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com anticorpo anti-óxido nítrico sintase e tnf-α. O anticorpo primário foi diluído em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX foi realizada a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contra corados com hematoxilina de Harris. Como controle

negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários

2.2.11. Análises imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi definida avaliando-se a presença de coloração acastanhada no citoplasma das células e na matriz extracelular, em cada terço da câmara pulpar e serão analisadas o número de células por mm 2

2.2.12. Análise estatística

Para realizar os testes estatísticos foi utilizado o software SigmaPlot 14.0. A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas e os mesmos foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn para comparações individuais. Para todos os testes foi adotado o nível de 5% de significância

RESULTADOS OBTIDOS

1. ANÁLISES IN VITRO

1.1. Variação do pH

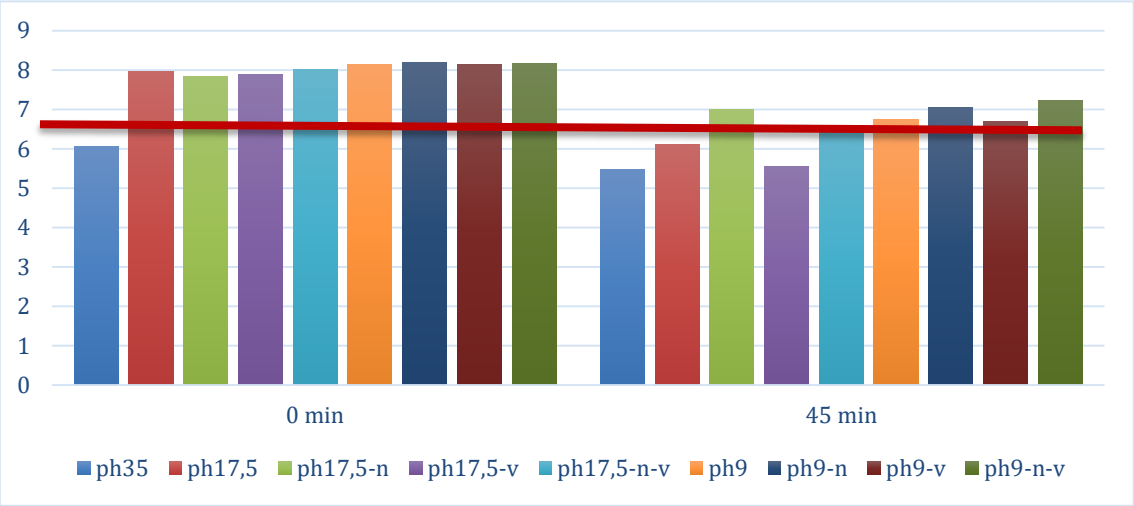
Quanto à variação do pH, analisando imediatamente após a manipulação apenas o gel PH 35% apresentou dados abaixo do Neutro (6.06) e os demais grupos apresentaram valores mais alcalinos (variando de 7,97 a 8,18). Ao final do tratamento apenas os grupos PH17,5-N, PH 9-N e PH 9-N-V apresentaram pH neutro (7,00, 7,05 e 7,23 respectivamente). Os resultados mostraram maior estabilidade dos valores de pH para os géis PH9-N e PH17,5-N ao longo dos tempos de análise. Já o grupo PH35 e PH17.5-V apresentaram maior acidificação, praticamente igualando-se ao ponto crítico do pH em que a saliva deixa de proteger a estrutura mineral do esmalte (5,5), conforme descrito na tabela 1 e gráfico 1**.**

Tabela 1 – Valores de pH de cada gel clareador durante a ativação do gel sob a superfície de esmalte dentário.

	0 min	15 min	30 min	45 min
PH 35	6,06	5,68	5,52	5,47*
PH 17,5	7,97	7,00	6,46	6,10
PH 17,5-N	7,84	7,50	7,20	7,00
PH 17,5-V	7,90	6,15	6,05	5,54*
PH 17,5-N-V	8,02	7,21	7,00	6,60
PH 9	8,15	7,28	6,88	6,74
PH 9-N	8,18	7,93	7,30	7,05
PH 9-V	8,14	7,18	6,75	6,70
PH 9-N-V	8,17	8,02	7,45	7,23

* Ponto crítico do pH em que a saliva deixa de proteger a estrutura mineral do esmalte.

Gráfico 1 – Dados da variação de pH dos géis clareadores analisados.



1.2. Degradação do peróxido de hidrogênio

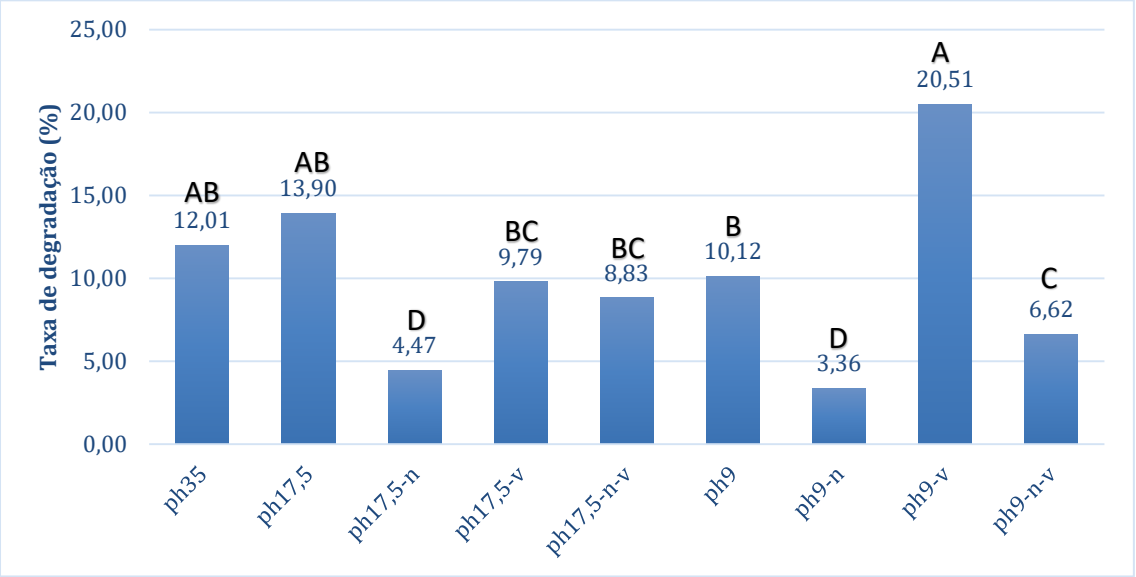
Avaliando os dados obtidos da degradação de peróxido (Tabela 2), foi possível observar que a incorporação dos nanotubos nos géis clareadores (PH9-N e PH17,5-N) mantiveram os géis mais estáveis durante toda a aplicação do gel clareador (linhas vermelhas). Além disso, o uso da luz violeta isolada provocou maior diminuição na concentração dos géis clareadores (linhas verdes), porém quando a luz irradiou os géis com nanotubos foi possível observar um equilíbrio na taxa de degradação (linhas amarelas) assemelhando numericamente com a degradação dos géis sem nanotubos e sem sofrer irradiação da luz violeta (linhas cinzas) (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem (%) dos géis clareadores obtidos a parti da titulação de peróxido de hidrogênio durante o período de ativação do gel clareador

	0 min	15 min	30 min	45 min
PH 35	34,98	33,5	31,9	30,78
PH 17,5	16,62	15,95	15,50	14,31
PH 17,5-N	17,24	16,95	16,92	16,47
PH 17,5-V	16,95	15,95	15,62	15,29
PH 17,5-N-V	17,45	16,71	16,31	15,91
PH 9	10,38	10,12	9,89	9,33
PH 9-N	10,71	10,69	10,58	10,35
PH 9-V	10,92	9,61	9,37	8,68
PH 9-N-V	10,27	10,05	9,68	9,59

No gráfico 2 podemos realizar a comparação visual da taxa de degradação de todos os géis clareadores analisados e observa-se que o grupo PH9.V apresentou a maior taxa de degradação em relação aos demais grupos, ultrapassando os 20% de degradação da concentração inicial. Os grupos que receberam na composição os nanotubos, sem receber a irradiação da luz violeta (PH9-N e PH17,5-N) apresentaram as menores taxas de degradação, os únicos que não ultrapassaram 5% de degradação da concentração inicial, mostrando-se ser os géis mais estáveis deste estudo.

Gráfico 2 – Dados da taxa de degradação (%) dos géis clareadores analisados ao longo do período de ativação sob a superfície do esmalte dentário



*Letras diferentes apontam diferença estatística entre os diferentes tratamentos clareadores. (p<0.05)

1.3. Análise da alteração de cor

Na tabela 3 podemos observar os valores de delta E dos espécimes submetidos aos diferentes tratamentos clareadores. Analisando os tratamentos ao longo do tempo, todos obtiveram os tratamentos promoveram alteração de cor obtendo o ápice do clareamento na terceira sessão de clareamento e somente o grupo que recebeu PH17,5 houve um retorno da cor após 14 dias de finalização do tratamento. O grupo controle continuo constante durante todo o experimento o que comprova a estabilização da pigmentação realizada.

Em relação aos diferentes tratamentos o grupo que recebeu PH35%

apresentou os maiores valores, porém se assemelhou aos grupos PH9-N-V, PH9-V e PH17,5-V. Na terceira sessão de clareamento os grupos PH9-V e PH9-N-V apresentaram semelhança com os grupos que receberam PH 17,5%.

Tabela 3 – Média (desvio padrão) dos valores referentes ao Delta E dos diferentes tratamentos clareadores

	T1		T2		T3		T4	
CONTROLE	1,39 (-0,59)	A d	1,87 (082)	A c	1,54 (0,89)	A e	1,70 (0,87)	A d
PH 35	8,51 (2,59)	C a	12,5 (3,75)	B a	14,28 (3,38)	A a	14,65 (3,38)	A a
PH 17,5	6,36 (1,62)	C a	9,93 (2,76)	B ab	11,31 (2,34)	A c	10,88 (2,28)	AB b
PH 17,5-N	7,1 (2,23)	C a	9,35 (2,43)	B b	11,53 (1,99)	A c	11,31 (1,89)	A bc
PH 17,5-V	8,57 (2,02)	C a	11,67 (1,93)	B ab	13,84 (2,50)	A abc	13,49 (2,49)	A ab
PH 17,5-N-V	8,92 (2,70)	C a	12,69 (3,46)	B a	14,64 (3,62)	A a	13,18 (3,57)	A ab
PH 9	5,34 (1,810	C c	6,97 (1,69)	B b	9,18 (1,84)	A d	8,55 (1,90)	A c
PH 9-N	5,27 (1,03)	C c	7,88 (1,65)	B b	10,41 (2,02)	A d	9,44 (2,01)	A c
PH 9-V	6,53 (2,87)	C a	9,73 (3,87)	B ab	12,14 (4,02)	A bcd	11,25 (4,02)	A b
PH 9-N-V	6,25 (1,52)	C b	9,63 (2,26)	B ab	11,90 (2,73)	A bcd	10,95 (2,90)	A b

*Letras maiúsculas apontam diferença estatística entre os tempos, letras minúsculas apontam diferença estatística entre os tratamentos clareadores.

Na tabela 4 é possível observar as diferenças do índice de clareamento. Nesta análise todos os grupos obtiveram êxito no tratamento clareador, porém os grupos PH9, PH9-V, PH9-N, PH9-N-V e PH17,5-N-V tiveram um retorno da cor, assemelhando-se com a cor obtida na segunda sessão clareadora.

Realizando uma análise comparativa entre os grupos, foi possível observar que no final do tratamento clareador (T3) o índice de clareamento dos grupos PH9-V e PH9-N-V foram semelhantes ao tratamento do grupo controle positivo (PH35). O mesmo aconteceu para todos os grupos que receberam PH17,5. Quando analisou 14 dias após a finalização dos tratamentos, todos os grupos com PH9 tiveram um retorno do índice de clareamento, mantendo semelhança significativa com os grupos que receberam PH17,5%.

Tabela 4 – Média (desvio padrão) dos valores referentes ao Delta WId dos diferentes tratamentos clareadores

	T1		T2		T3		T4	
CONTROLE	-1,06 (2,00)	A d	-0,21 (2,22)	A c	-0,29 (1,88)	A c	-1,62 (1,87)	A e
PH 35	10,87 (2,82)	C ab	16,06 (4,44)	B a	17,96 (5,20)	A a	18,80 (5,17)	A a
PH 17,5	8,38 (2,78)	C a	12,58 (4,14)	B a	15,04 (3,96)	A ab	14,73 (3,79)	A abcd
PH17,5-N	9,34 (3,88)	C a	13,26 (5,38)	B a	15,90 (3,81)	A ab	16,22 (3,47)	A abc
PH17,5-V	12,05 (2,88)	C a	16,38 (2,77)	B a	18,48 (3,73)	A a	18,54 (3,87)	A ab
PH17,5-N-V	10,02 (2,44)	C a	14,88 (2,31)	B ab	17,71 (3,31)	A a	15,76 (3,36)	B abc
PH 9	7,09 (2,09)	C b	8,74 (2,63)	B b	12,01 (2,19)	A b	10,91 (2,08)	B d
PH9-N	6,70 (2,29)	C b	9,07 (2,58)	B b	11,29 (3,73)	A b	9,48 (3,73)	B d
PH9-V	8,81 (3,94)	C a	12,58 (6,47)	B a	15,86 (6,78)	A a	14,06 (6,78)	B bcd
PH9-N-V	8,86 (3,47)	C c	10,93 (4,15)	B b	14,28 (4,54))	A a	12,48 (4,54)	B cd

*Letras maiúsculas apontam diferença estatística entre os tempos, letras minúsculas apontam diferença estatística entre os tratamentos clareadores.

Em relação aos dados do CIEDE 2000, foi possível observar que todos os tratamentos tiveram uma evolução gradual do tratamento clareador, porém os grupos PH17,5-N-V e todos os grupos com PH9 retornaram a cor, se assemelhando à T2 (Tabela 5).

Em relação à análise comparativa entre os grupos, pode-se observar que os grupos PH9-V e PH9-N-V foram semelhantes ao grupo controle positivo (PH35), bem como os grupos PH17,5-V e PH17,5-N-V na terceira sessão clareadora.

Tabela 5 – Média (desvio padrão) dos valores referentes ao CIEDE2000 dos diferentes tratamentos clareadores

	T1		T2		T3		T4	
CONTROLE	1,22 (0,43)	A d	1,66 (0,82)	A d	1,36 (0,76)	A e	1,60 (0,73	A e
PH 35	7,78 (2,79)	C ab	11,26	B a	12,07(3,43)	A a	12,83 (3,44)	A a
PH 17,5	5,6 (1,61)	B a	8,73	A abc	9,71 (2,28)	A b	9,35 (2,24)	A abcd
PH17,5-N	6,06 (2,41)	C a	8,16 (2,44)	B bc	9,58 (2,30)	A c	9,64 (1,93)	A abc
PH17,5-V	7,55 (2,20)	C ab	10,16 (2,07)	B ab	11,74 (2,38)	A abc	11,47 (2,39)	A abc
PH17,5-N-V	8,00 (2,78)	C a	11,17 (3,40)	B ab	12,69 (3,49)	A ab	11,71 (3,33)	B abc
PH 9	4,87 (1,94)	C b	6,34 (1,87)	B c	8,02 (1,89)	A d	7,47 (1,96)	B d
PH9-N	4,99 (1,16)	C b	7,32 (1,73)	B b	9,31 (1,99)	A c	9,48 (1,97)	B d
PH9-V	5,91 (2,91)	C a	8,72 (3,15)	B a	10,45 (3,34)	A abcd	9,72 (3,35)	B bcd
PH9-N-V	5,69 (1,42)	C c	8,53 (2,17)	B a	10,33 (2,53)	A abcd	9,52 (2,59)	B cd

*Letras maiúsculas apontam diferença estatística entre os tempos, letras minúsculas apontam diferença estatística entre os tratamentos clareadores.

1.4. Difusão do peróxido de hidrogênio

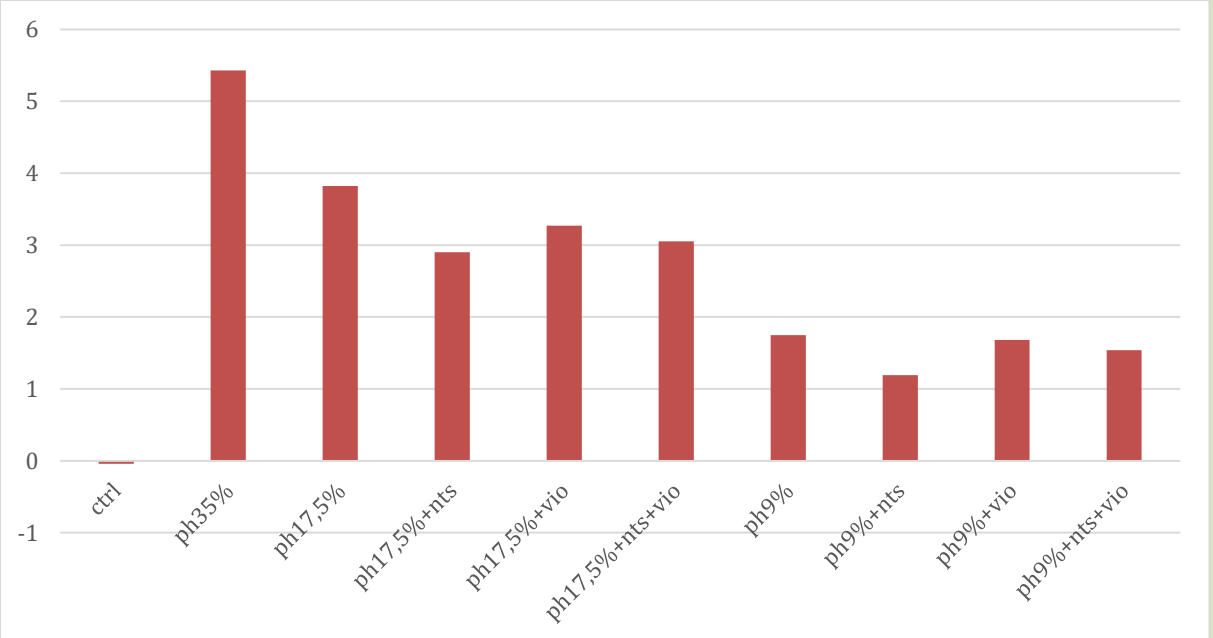
A difusão de peróxido de hidrogênio foi proporcional à concentração do gel utilizado, ou seja, o PH35 teve a maior difusão de PH, seguido dos grupos com PH17,5 e por fim os grupos PH9. O grupo PH9-N apresentou a menor taxa de difusão trans-amelodentinária de H2O2, diferenciando-se de todos os demais grupos que receberam gel clareador (Tabela 6).

Tabela 6 – Média (desvio padrão) da quantidade de PH (ug/mL) detectado dos géis clareadores após a difusão através de discos de esmalte/dentina de 3,5mm de espessura.

CONTROLE	PH 35	PH 17,5	PH17,5-N	PH17,5-V	PH17,5-N-V	PH 9	PH9-N	PH9-V	PH9-N-V
-0,04	5,43	3,82	2,9	3,27	3,05	1,75	1,19	1,68	1,54
(0,10)	(0,3)	(0,5)	(0,4)	(0,4)	(0,2)	(0,2)	(0,1)	(0,3)	(0,2)
F	A	B	C	C	C	D	E	D	D

*Letras maiúsculas diferentes apontam diferença estatística entre os grupos.

Gráfico 4 – Gráfico representativo das médias da difusão de H2O2 através das estruturas de esmalte/dentina com espessura de 3,5mm



1.5. *Quantificação das EROS*:

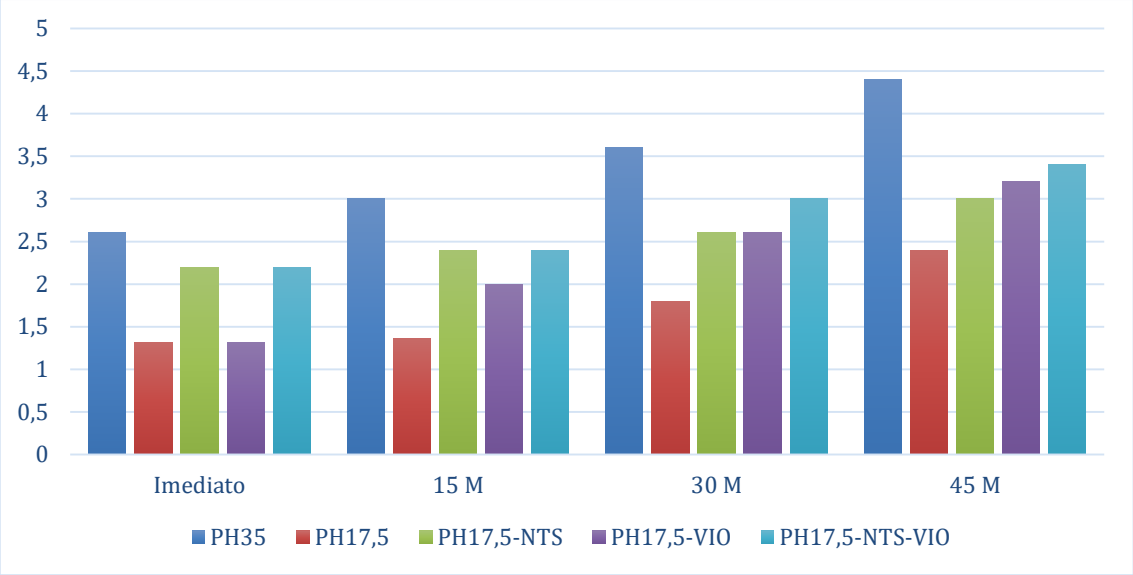
Analisando os géis separadamente, observar-se que em relação aos géis com PH17,5% (Tabela 7 e gráfico 5) que nos tempos iniciais (imediato e 15 minutos), os grupos que receberam a incorporação dos nanotubos apresentaram valores semelhantes ao grupo PH35, e no tempo de 45 minutos, o grupo PH17,5 apresentou a menor liberação de EROs. Em relação à análise dos tempos foi possível observar que todos os grupos aumentaram gradativamente a liberação de EROs, sendo que o tempo de 45 minutos apresentou os maiores valores, porém vale destacar que no tempo de 30 minutos, apenas os grupos com TiO2-NTS (PH17,5-NTS e Ph17,5-NTS-VIO) e o grupo PH35 apresentaram liberação semelhante ao tempo de 45 minutos e que apenas o grupo PH17,5-VIO apresentou diferença estatística entre todos os tempos analisados.

Tabela 7 – Médias (desvio padrão) dos valores referentes à detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs) dos géis clareadores PH17,5 e PH35 nos diferentes tempos analisados.

	Imediato	**15 M**	**30 M**	**45 M**
PH35	2,60 (0,55) Ab	3,00 (1,00) Aab	3,60 (0,89) Aa	4,40 (0,55) Aa
PH17,5	1,32 (0,63) Bb	1,36 (0,59) Cb	1,80 (0,84) Bb	2,40 (0,55) Ca
PH17,5-NTS	2,20 (0,45) Ac	2,40 (0,55) ABbc	2,60 (0,55) Bab	3,00 (0,00) Ba
PH17,5-VIO	1,32 (0,48) Bd	2,00 (0,31) BCc	2,60 (0,53) Bb	3,20 (0,94) Ba
PH17,5-NTS-VIO	2,20 (0,45) Ac	2,40 (0,55) Abc	3,00 (0,71) ABab	3,40 (0,89) Ba

*Letras maiúsculas comparam os géis clareadores em um determinado tempo (entre linhas) e as letras minúsculas comparam os tempos de um gel clareador (entre colunas) ($p<0.05$)

Gráfico 5 – Médias representativas da quantificação das EROs ao longo do tempo de ativação dos géis clareadores PH17,5 e PH35 nos diferentes tempos analisados.



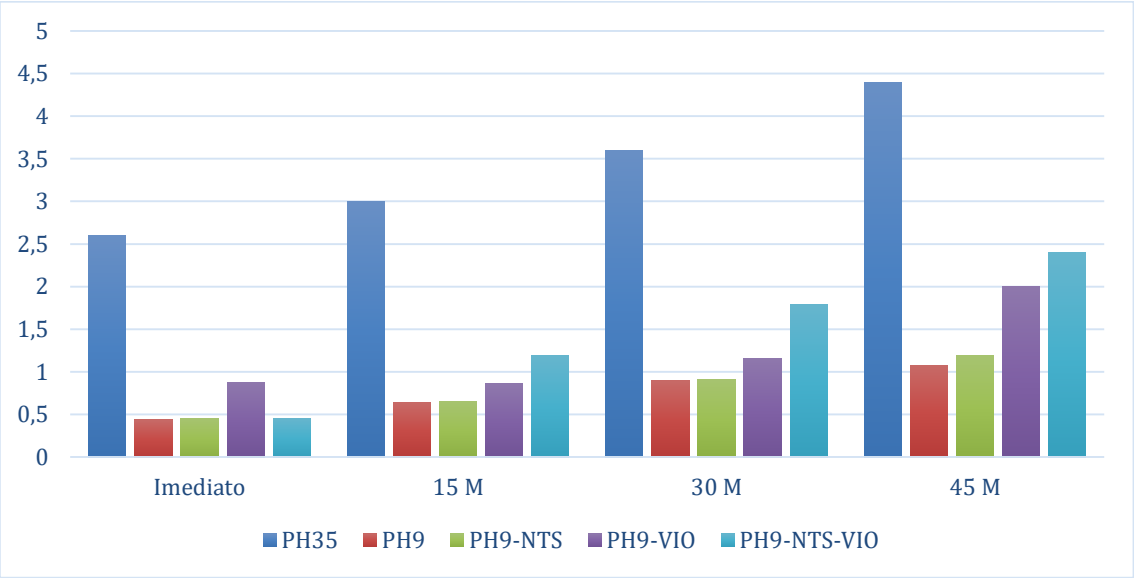
Em relação às análises dos grupos que receberam PH9% (Tabela 8 e gráfico 6), observa-se que no tempo imediato apenas o grupo PH35 apresentou diferença estatística com os demais grupos, apresentando os maiores valores de liberação. A partir dos 15 minutos de ativação, apenas o grupo PH9-NTS-VIO se assemelhou estatisticamente com o grupo PH35. Em relação aos tempos analisados, apenas o grupo PH9-NTS os tempos de 15, 30 e 45 minutos foram semelhantes entre si. Os demais grupos os maiores valores de liberação foram observados a partir dos 30 minutos de ativação do gel clareador. O grupo PH19-NTS-VIO foi o único grupo em que o tempo imediato foi diferente estatisticamente dos demais tempos analisados.

Tabela 8 – Médias (desvio padrão) dos valores referentes à detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs) dos géis clareadores com PH9 e PH35 nos diferentes tempos analisados.

	Imediato	**15 M**	**30 M**	**45 M**
PH35	2,60 (0,55) Ab	3,00 (1,00) Ab	3,60 (0,89) Aa	4,40 (0,55) Aa
PH9	0,44 (0,09) Cb	0,64 (0,21) Bb	0,90 (0,07) Cab	1,08 (0,52) Ca
PH9-NTS	0,46 (0,05) Cb	0,65 (0,27) Bab	0,91 (0,04) Ca	1,19 (1,06) Ca
PH9-VIO	0,88 (0,11) Bc	0,86 (0,34) Bc	1,16 (0,26) Cb	2,00 (0,77) Ba
PH9-NTS-VIO	0,46 (0,05) Cd	1,19 (0,45) Bc	1,79 (0,45) Bb	2,40 (0,55) Ba

*Letras maiúsculas comparam os géis clareadores em um determinado tempo (entre linhas) e as letras minúsculas comparam os tempos de um gel clareador (entre colunas) ($p<0.05$)

Gráfico 6 – Médias representativas da quantificação das EROs ao longo do tempo de ativação dos géis clareadores com PH9 e PH35 nos diferentes tempos analisados.



2. ANÁLISES IN VIVO

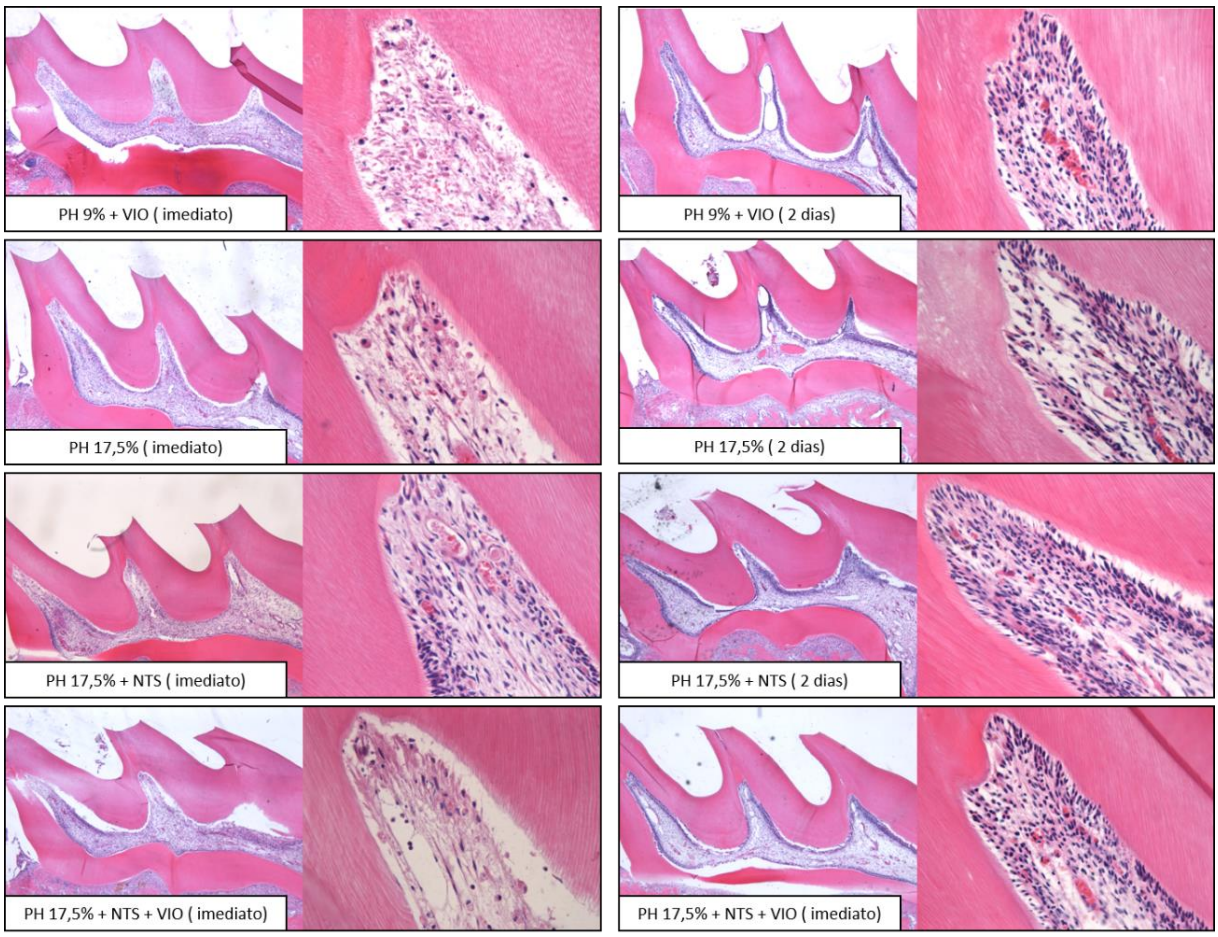
2.1. *Análise histológica:*

Analisando as imagens da figura 2 e os dados apresentados na tabela 7 podemos observar que o grupo que recebeu PH 17,5-N apresentou um infiltrado inflamatório mais brando do que os demais grupos analisados no tempo imediatamente após o tratamento clareador. Neste mesmo tempo, os grupos PH9-V, PH175-N-V e PH17,5 apresentaram regiões de necrose no corno pulpar. Analisando após 48 horas do tratamento clareador, os grupos Ph17,5-N e PH17,5-N-V apresentaram grande proliferação celular e uma melhor organização tecidual em relação aos demais grupos. O grupo PH9-V, apesar de observar uma organização tecidual favorável, foi possível observar a presença de grande quantidade de células inflamatórias e vasos sanguíneos presentes na região. Já o grupo PH17,5 foi o grupo que apresentou maior dano tecidual, com maior desorganização tecidual e presença de células inflamatórias.

Tabela 7 – Scores e medianas atribuídos no terço coronário da cavidade pulpar do primeiro molar superior dos ratos

	0h	Mediana	48h	Mediana
	3		2	
	3		2	
PH 9-V	3	3 Aa	2	2 Ab
	4		3	
	3		2	
	3		2	
	3		2	
ph17,5	2	3 Aa	1	2 Ab
	3		2	
	3		2	
	2		1	
	2		1	
PH17,5-N	2	2 Aa	1	1 Bb
	1		1	
	2		1	
	3		2	
	3		1	
ph17,5-N-V	3	3 Aa	1	1 Bb
	2		1	
	2		1	

Figura 2- Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, nos tempos imediato e 48 horas após clareamento. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (50x e 400x).



2.2. Análise de imunohistoquímica:

Analisando as imagens da figura 3 e os dados apresentados na tabela 8 e 9 podemos observar que o grupo que recebeu PH 17,5-N e PH17,5-N-V apresentaram os menores padrões de imunomarcação para ambos os marcadores, tanto no tempo imediato quanto após 48h da finalização dos tratamentos. Apenas para o marcador de NOS foi observado uma diminuição no padrão de imunomarcação nos grupos PH9-V e PH17,5, porém mesmo ocorrendo a diminuição, apresentou maior padrão de imunomarcação do que os demais grupos no tempo de 48h.

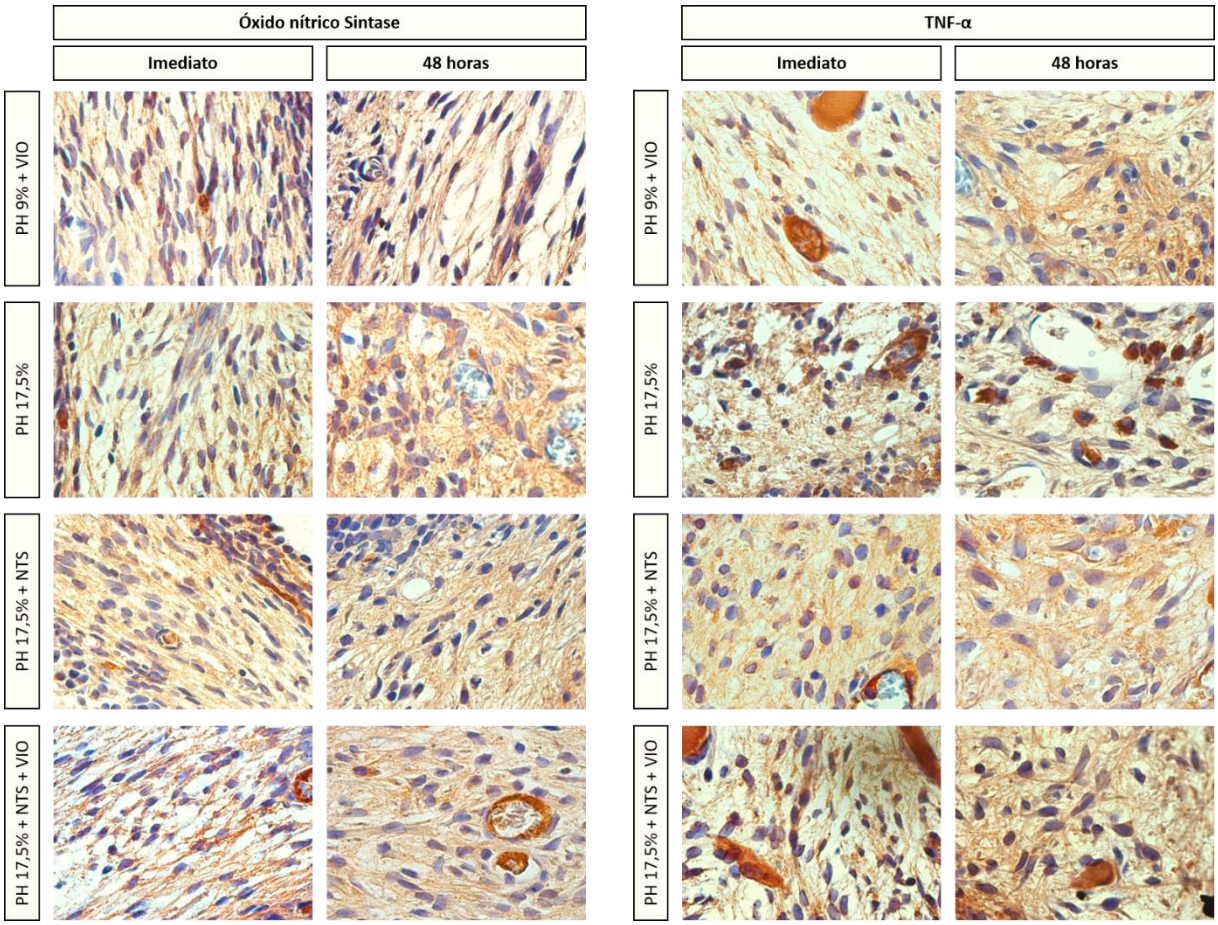
Tabela 8 – Scores e medianas atribuídos ao imunomarcador de óxido nítrico sintase (anti-NOS) no terço coronário da cavidade pulpar do primeiro molar superior dos ratos

	0h	Mediana	48h	Mediana
	4		3	
	4		3	
PH 9-V	4	4 Aa	3	3 Ab
	4		3	
	4		3	
	3		3	
	4		3	
ph17,5	4	4 Aa	3	3 Aa
	4		3	
	4		3	
	3		2	
	2		2	
PH17,5-N	2	2 Ba	1	1 Bb
	3		1	
	2		1	
	2		2	
	2		2	
ph17,5-N-V	3	3 Ba	2	2 Bb
	3		2	
	4		2	

Tabela 9 – Scores e medianas atribuídos ao imunomarcador do fator de necrose tumoral (anti-TNFα) no terço coronário da cavidade pulpar do primeiro molar superior dos ratos

	0h	Mediana	48h	Mediana
	4		3	
	4		3	
PH 9-V	3	4 Aa	4	4 Aa
	4		4	
	3		4	
	4		4	
	4		4	
ph17,5	5	4 Aa	4	4 Aa
	4		5	
	5		4	
	2		2	
	2		2	
PH17,5-N	2	2 Ba	2	2 Ba
	3		3	
	3		2	
	2		3	
	2		3	
ph17,5-N-V	3	3 Ba	2	2 Ba
	3		2	
	3		2	

Figura 3 – Cortes histológicos mostrando padrões de imunomarcação para os marcadores NOS e TNF-α nos tempos imediatamente e 48h após os tratamentos clareadores (1000x)



Discussão

A busca por procedimentos clareadores mais seguros e com menores efeitos adversos têm sido alvo de muitas pesquisas. (26, 37) Em função disso, modificações na composição dos agentes clareadores podem favorecer a redução destes efeitos adversos no elemento dentário bem como aumentar a eficácia clareadora. Estudos tem abordado a incorporação de agentes catalíticos nos géis clareadores com a intenção de acelerar e aumentar a liberação de EROS. (38, 39) Sob esse aspecto, o TiO2 por ser um reagente com ação catalítica, a sua incorporação nos géis clareadores pode resultar na possibilidade de diminuição da concentração do agente clareador no tecido pulpar, principalmente quando associado à ativação por luz laser diodo, obtendo um clareamento eficaz (40) devido ao maior nível de liberação de EROs (41), ou ainda reduzindo o tempo do tratamento clareador pela redução do número de sessões.

Analisando o índice de clareamento das terapias testadas, observou-se que ao final do tratamento clareador os géis de baixa concentração contendo TiO2-nts em sua composição, associados ou não à irradiação do LED violeta (PH9-V, PH9-N-V; PH17,5-N, PH17,5-V e P17,5-N-V) apresentaram valores semelhantes à terapia de consultório padrão com PH 35%. Isso nos mostra que a ação catalítica juntamente com a ação fotoclareadora do LED violeta intensificaram o efeito clareador de baixas concentrações. A incorporação de nanotubos de TiO2 pode ter contribuído para a maior formação e liberação de radicais reativos no início do tratamento, destacando assim sua ação catalítica, o que também pode ser comprado neste estudo a partir das análise da liberação de EROs.(42) Suyama, et al. (2009) também indicaram que a adição de TiO2 com concentrações menores do que 0,1% em géis a base de PH 3,5%, ativado por luz visível ou luz ultravioleta, apresentaram maior eficácia quando comparado à géis que não continham TiO2.(43)

Sayes e colaboradores (2016) realizaram um estudo que comprovam que as partículas de TiO2 em nanoescala podem ser reativas, mesmo na ausência de fontes de ativação, (44) principalmente quando associadas ao peróxido de hidrogênio a 40%. (45) Esse achado também foi identificado no estudo de Sakai et al. (2007), que mostrou que o gel com peróxido de hidrogênio a 3,5% e TiO2 (menos de 1%), mesmo sem ativação do laser diodo (405 nm), gerou radicais de hidroxila, embora em quantidades significativamente menores do que o grupo

irradiado.(41) A ação catalítica do TiO2 possui forte poder oxidativo e alta estabilidade química e é influenciada por reações com moléculas em sua superfície. (33) No entanto, o formato oco dos nanotubos de TiO2 utilizados nesta pesquisa proporciona maior área superficial, aumentando a quantidade de radicais superóxido produzidos, como radicais O2 e hidroxila. (33) Em função disso objetiva-se uma maior eficácia clareadora quando associado a agentes peróxidos de hidrogênio.

Em relação à difusão de PH pela estrutura dentária, podemos observar que os grupos que receberam géis incorporados com os TiO2-nts sem a irradiação do LED violeta, reduziram significativamente a difusão de PH pela estrutura dentária, quando comparados com os grupos que receberam géis na mesma concentração, negando assim a primeira hipótese nula. Isso possivelmente pode ser explicado pela maior quantidade de liberação de ROS do gel, fazendo com que a maior quantidade fique restrita à ação na dentina, promovendo maior reações de oxi-redução das moléculas pigmentantes no local e difundindo menor quantidade de peróxido de hidrogênio para o tecido pulpar. Um estudo *ex-vivo* realizado por Karaarslan e colaboradores (2018) comprovaram que a maior quantidade de EROs liberadas está presente na dentina e não no tecido pulpar, porém na ocasião os autores atribuíram este ocorrido ao fato de a dentina impedir a difusão dos componentes do agente clareador em função do fluxo de fluido dentinário produzido pela pressão intrapulpar e prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, bem como outros componentes intratubulares. (46)

A irradiação do LED violeta, potencializou o efeito catalítico dos TiO-2 presentes nos géis clareadores além de promover o efeito clareador em função do seu mecanismo de ação, (20, 22) negando a segunda hipótese nula. Os dados obtidos neste estudo confirmam os dados obtidos em estudos que comprovaram a eficácia do uso do LED violeta com diferentes concentrações de géis clareadores, e tem comprovado a eficácia desta irradiação na potencialização dos géis, (21-23, 47-50) porém neste caso vale salientar o efeito da irradiação do LED violeta em géis quando os TiO2-nts foram incorporados. Sabe-se que O TiO2 é um agente fotossensível, ativado pela luz visível (com comprimento de onda na faixa de ~405 nm), (40, 51) sendo assim a irradiação do LED violeta ativaria os nanotubos aumentando a eficácia clareadora, como foi possível observar neste estudo.

Em relação às propriedades químicas destes géis experimentais com nanotubos incorporados constatou-se que a adição destes TiO2-nts promoveu maior

estabilidade do pH, fazendo com que permanecessem mais próximo do neutro durante todo o tempo de ativação. A estabilidade dos géis de menores concentrações podem estar relacionado também ao fato da diluição ter sido realizado com água deionizada, que possui pH de 7,5 aproximadamente, elevando o pH do gel clareador em si, porém nota-se que ao longo do tempo de ativação os géis com TiO2-nts permaneceram estáveis, sem muita variação do pH, mesmo quando foi irradiado com o led violeta, o que pode ter impactado na maior taxa de liberação e velocidade dos radicais livres durante a reação de oxidação-redução do agente clareador. (52, 53). A fase anatase do TiO2 pode ser transformada em nanotubos, um potente agente catalítico e fotocatalisador, (33, 54, 55) possui estabilidade química o que pode ter contribuído para a manutenção do pH dos géis próximos ao neutro.

Essa maior liberação de EROs pode ser comprovada a partir dos resultados deste estudo, o qual constatou que géis PH17,5 que receberam a incorporaçãode 1% dos nanotubos de TiO2, tiveram maior taxa de liberação de EROs logo após a homogeinização do gel clareador (tempo imediato) quando comparado com os demais grupos que receberam gel a base de PH17,5%, porém sem a incorporação dos nanotubos. A maior liberação de EROs destes géis ocorreu provavelmente em função de que o TiO2 afeta de forma significativa as propriedades físico-químicas do agente clareador, o que levou à rejeição da primeira hipótese nula do presente estudo. (56) A presença de 1% de TiO2 no agente clareador foi capaz de manter o pH próximo ao neutro ao durante todo o tempo de ativação do gel clareador. O aumento do pH é capaz de acelerar a taxa de degradação do peróxido de hidrogênio, desencadeando a liberação de radicais livres que promovem melhora na eficácia do clareamento. (52, 53, 57, 58)

Durante os tratamentos clareadores, foi realizado a mensuração da porcentagem de peroxido presente em cada gel clareador ao longo do tempo de ativação e verificou-se que neste caso os grupos que receberam a incorporação dos TiO2-nts na composição mantiveram-se mais estáveis, ou seja, a concentração do gel clareador teve as menores alterações quando analisadas os demais grupos. No entanto a irradiação da luz violeta foi o que mais provocou a degradação dos géis clareadores no presente estudo. Essa maior estabilidade dos géis pode ser justificada pelo alto nível de estabilidade química que o dióxido de titânio apresenta, promovendo maior estabilidade no gel clareador.

No presente estudo, os achados histológicos mostraram que a maioria dos espécimes tratados com o gel sem a presença dos nanotubos ou com a irradiação do LED violeta (ph9%, ph17,5% e ph17,5%+nts+vio) exibiram infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos congestionados, polpa desorganizada especialmente nos cornos pulpares de ambos os grupos e grandes áreas de necrose. Isso sugere que a difusão intensa e rápida do H2O2 no tecido duro dental pode estar além da capacidade e velocidade do mecanismo de proteção da polpa, resultando em uma resposta imediata a esse composto altamente agressivo. O problema está em não saber exatamente a concentração de H2O2 que a polpa dentária pode tolerar sem danos. No entanto, nossos resultados sugerem que a irradiação com LED violeta, independente da concentração do gel utilizado, causa intensas alterações nos tecidos dentais. Quando utilizado os nanotubos de TiO2 sem a irradiação, foi possível observar uma diminuição no padrão inflamatório, provavelmente se deve ao fato deste grupo apresentar menor difusão de H2O2 no tecido pulpar e menor degradação do mesmo, como observado nos dados obtidos das análises in vitro.

Imediatamente após o tratamento, a imunomarcação de TNF-α nos grupos ph9%+vio e ph17,5%+nts+vio foi maior do que a observada para o grupo ph17,5%+nts e ph17,5%. Este achado indica que o LED violeta teve um efeito significativo quando associado ao gel. Quando comparado ao tratamento realizado exclusivamente com géis clareadores, este severa imunomarcação pode estar relacionado à capacidade da luz em aumentar a sensibilidade dos dentes. Esta hipótese é corroborada pelos resultados relatados por Gallinari et al. (23), que encontraram o tratamento associado (HP+LED) para tornar os dentes mais sensíveis aos estímulos frios, permanecendo sensibilizados após o término do tratamento clareador. A duração da sensibilidade dentária relatada neste estudo clínico justifica nossos resultados, que encontraram imunocoloração moderada mesmo 15 dias após o tratamento.

Diante do exposto, vale salientar que os dados coletados na análise in vitro do presente estudo não refletem com precisão as condições existentes em um dente vital submetido à terapia clareadora. Isso ocorre porque nesta situação clínica, o dente apresenta movimento para fora do fluido dentinário, componentes orgânicos intratubulares e mecanismos de defesa fisiológicos, que por sua vez podem minimizar a difusão transamelodental do HP e seus derivados tóxicos, os radicais livres, que danificam a polpa. (13, 14) Já em relação aos dados coletados

das análises in vivo, devem ser interpretados considerando o baixo volume de polpa e tecidos duros e o tempo de reparo, sem serem diretamente extrapolados para uma condição humana, o que pode ser uma limitação. No entanto, apesar da diferença na espessura do esmalte e da dentina entre dentes humanos e de ratos, ambos apresentam a mesma proporção dessas estruturas (43,44). Os molares de ratos também apresentam pequenas regiões de dentina exposta na superfície oclusal (45), o que pode influenciar no resultado final, pois pode intensificar a penetração do HP, bem como a ação da luz. No entanto, essa característica permanece para todos os grupos, permitindo a comparação entre eles e a avaliação das diferentes terapias analisadas.

Levando em consideração as limitações relacionadas à metodologia deste estudo, os resultados sugerem que a inclusão de nanotubos de TiO2 parece ser promissora (especialmente no clareamento de consultório), embora a relação ideal entre os nanotubos de TiO2 e as concentrações do agente clareador deva ser mais investigada para proporcionar uma melhoria mais relevante no efeito clareador, e promover um procedimento mais seguro e eficaz para os pacientes, com menos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

1. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int. 1989;20(3):173-6.
2. Bernardon JK, Ferrari P, Baratieri LN, Rauber GB. Comparison of treatment time versus patient satisfaction in at-home and in-office tooth bleaching therapy. J Prosthet Dent. 2015;114(6):826-30.
3. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. Dent Mater. 2007;23(5):586-96.
4. Arwill T, Myrberg N, Soremark R. Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentine. II. Transfer of 22Na in fresh and chemically treated dental tissues. Odontol Revy. 1969;20(1):47-54.
5. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. J Dent Res. 1993;72(5):931-8.
6. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. Int Endod J. 1988;21(2):143-54.
7. Williams HA, Rueggeberg FA, Meister LW. Bleaching the natural dentition to match the color of existing restorations: case reports. Quintessence Int. 1992;23(10):673-7.
8. Perdigao J. Dental whitening--revisiting the myths. Northwest Dent. 2010;89(6):19-21, 3-6.
9. Goncalves RS, Costa CA, Soares DG, dos Santos PH, Cintra LT, Briso AL. 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.
10. de Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari Mde O, Costa CA, dos Santos PH, et al. At-Home Bleaching: Color Alteration, Hydrogen Peroxide Diffusion and Cytotoxicity. Braz Dent J. 2015;26(4):378-83.
11. de Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, de Souza Costa CA, Dos Santos PH, Briso AL. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. Clin Oral Investig. 2015;19(3):673-80.

12. 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.
13. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, et al. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. Int Endod J. 2010;43(7):572-80.
14. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109(4):e59-64.
15. Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. J Dent Res. 1981;60(5):948-53.
16. Gallinari MO, Cintra LTA, Benetti F, Rahal V, Ervolino E, Briso ALF. Pulp response of rats submitted to bleaching and the use of different anti-inflammatory drugs. PLoS One. 2019;14(1):e0210338.
17. 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.
18. Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Mendez S, Rios-Osorio N, Lombana N, Munoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. J Endod. 2008;34(12):1462-5.
19. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. J Dent. 2014;42(2):185-98.
20. Zanin F. Recent Advances in Dental Bleaching with Laser and LEDs. Photomed Laser Surg. 2016;34(4):135-6.
21. Gallinari MO, Cintra LTA, Souza MBA, Barboza ACS, Esteves LMB, Fagundes TC, et al. Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: a case series with split-mouth design. Photodiagnosis And Photodynamic Therapy. 2019.
22. Gallinari MO FT, da Silva LMAV, Barboza ACS, Briso ALF. A new approach dental bleaching using violet light with or without the use of whitening gel: study of bleaching effectiveness. Oper Dent. 2018.
23. Gallinari MO, Cintra LTA, S. BAC, da Silva LMAV, de Alcantara S, Dos Santos PH, et al. 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 and photodynamic therapy. 2020;30.
25. Rezende M, Ferri L, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. Combined Bleaching Technique Using Low and High Hydrogen Peroxide In-Office Bleaching Gel. Operative dentistry. 2016;41(4).
26. Esteves LMB, Dos Santos PH, Fagundes TC, Gallinari MO, de Mello Antonaccio GB, Cintra LTÂ, et al. Effect of bleaching gel volume on color change and postoperative sensitivity: a randomized clinical study. Clinical oral investigations. 2021.
27. Cardoso PdC, Reis A, Loguercio AD, Vieira LCC, Baratieri LN. Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. J Am Dent Assoc. 2010;141(10):1213-20.
28. Esteves LMB, Fagundes TC, Dos Santos PH, da Silva L, de Alcântara S, Cintra LTA, et al. Does the Bleaching Gel Application Site Interfere With the Whitening Result? A Randomized Clinical Trial. Operative dentistry. 2022.
29. Lima DA, Aguiar FH, Pini NI, Soares LE, Martin AA, Liporoni PC, et al. In vitro effects of hydrogen peroxide combined with different activators for the in-office bleaching technique on enamel. Acta odontologica Scandinavica. 2015;73(7).
30. Padovani GC, Feitosa VP, Sauro S, Tay FR, Durán G, Paula AJ, et al. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. Trends in biotechnology. 2015;33(11).
31. Torres CRG, Guimarães CA, Ribeiro ZE, Borges AB. Influence of Different Types and Concentrations of Chemical Catalysts on Dental Bleaching Efficiency. The journal of contemporary dental practice. 2015;16(11).
32. Elsaka SE, Hamouda IM, Swain MV. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. Journal of dentistry. 2011;39(9).
33. Komatsu O, Nishida H, Sekino T, Yamamoto K. Application of Titanium Dioxide Nanotubes to Tooth Whitening. Nano Biomedicine. 2014;6(2):63-72.
34. Suyama Y, Otsuki M, Ogisu S, Kishikawa R, Tagami J, Ikeda M, et al. Effects of light sources and visible light-activated titanium dioxide photocatalyst on bleaching. Dental materials journal. 2009;28(6).

35. Cuppini M, Leitune VCB, Souza M, Alves AK, Samuel SMW, Collares FM. In vitro evaluation of visible light-activated titanium dioxide photocatalysis for in-office dental bleaching. Dental materials journal. 2019;38(1).
36. Monteiro NR, Basting RT, Amaral FLBD, FranÇa FMG, Turssi CP, Gomes OP, et al. Titanium dioxide nanotubes incorporated into bleaching agents: physicochemical characterization and enamel color change. Journal of applied oral science : revista FOB. 2020;28.
37. Arruda LB, Santos CMd, Orlandi MO, Schreiner WH, Lisboa-Filho PNJCI. Formation and evolution of TiO2 nanotubes in alkaline synthesis. 2015;41:2884-91.
38. Borges AB, de Abreu FS, Mailart MC, Zanatta RF, Torres C. Efficacy and Safety of Bleaching Gels According to Application Protocol. Operative dentistry. 2021;46(2).
39. Mailart MC, Ferracioli CD, Torres CR, Palo RM, Borges AB. Hydrogen peroxide degradation of bleaching systems with different trays: Randomized clinical trial. American journal of dentistry. 2020;33(2).
40. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. J Dent. 2003;31(6):415-22.
41. Mottola HA, Simpson BE, Gorin G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal Chem*. 1970;43(3):410-1.
42. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto Rde C, et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. J Appl Oral Sci. 2016;24(1):95-104.
43. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Rahal V, Briso ALF. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth, J. Endod. 2013;39:1576–1580.
44. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry, Lab. Anim. 2010;44:1–6
45. Hunt HR, Rosen S, Hoppert CA. Morphology of molar teeth and occlusion in young rats, J. Dent. Res.1970;49:508–514