



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JAQUELINE APARECIDA DA FONSECA LEOPOLDO

**Efeito de bioprodutos catalisadores e do Led Violeta
na terapia clareadora: análise da microdureza,
rugosidade, difusão e alteração cromática**

**Araçatuba – SP
2023**

JAQUELINE APARECIDA DA FONSECA LEOPOLDO

**Efeito de bioprodutos catalisadores e do Led Violeta
na terapia clareadora: análise da microdureza,
rugosidade, difusão e alteração cromática**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista
(Unesp),, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Cirurgião-
Dentista.

Orientador: Prof^a. Dr^a. André Luiz
Fraga Briso

**Araçatuba – SP
2023**

Dedico o presente trabalho a Deus e a todas as pessoas com as quais compartilhei esta linda caminhada. À minha família que foram suporte, fonte das minhas forças e motivo da minha luta, aos meus animais de estimação que são a luz e felicidade dos meus dias, ao meu namorado que sempre foi meu grande companheiro e porto seguro, as minhas amigas que foram alegria e acalento e aos meus professores que foram meus guias e minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me tornado tão forte e corajosa, por ter me ungido com seu amor, por ter me dado uma família tão linda e ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas. Por me guiar em cada passo e cada escolha, por sempre carregar seus braços quando preciso, por me conceder o dom da vida e me permitir estar realizando meus sonhos.

*Aos meus pais, **Valdomiro e Adriana** por serem a minha maior referência de amor, de força, determinação e humildade. Desde pequena vocês me ensinaram os valores da vida, a lutar pelos meus sonhos e a nunca desistir. Se hoje estou aqui, é por vocês e a minha gratidão será eterna. Nesses 5 anos enfrentamos muitas dificuldades e obstáculos, foram muitas noites mal dormidas, preocupações e desafios, mas nunca desistimos. Deus esteve conosco em todos os momentos, nós conseguimos! Eu amo vocês por toda a eternidade.*

*Ao meu irmão, meu pequeno príncipe, o meu anjo **José Augusto**. Desde que você nasceu eu pude conhecer o amor incondicional, você me transformou de dentro para fora, completou tudo que faltava em mim e eu estarei para sempre ao seu lado, para te apoiar, te aplaudir, te levantar e cuidar de você por toda vida, te amo muito.*

*Ao meu namorado **Wendel**, que sempre esteve ao meu lado, me apoiou em todas minhas escolhas, me ajudou a enfrentar tantos desafios e sempre foi meu grande companheiro e porto seguro. Esteve comigo em todas as etapas, desde quando eu sonhava em estudar odontologia na Unesp, me viu alcançar esse sonho e esteve segurando minhas mãos durante todo esse processo. Iremos compartilhar muitos outros sonhos e conquistas. Obrigada por fazer parte da minha vida, te amo.*

Aos meus animais de estimação, que fazem parte dessa conquista, que são luz, alegria dos meus dias, minha cura diária e os amores da minha vida. São os maiores presentes que Deus me deu, os meus anjinhos, eu amo vocês.

*Ao meu avô **Valdomiro**, que já não está mais conosco, mas que sempre se emocionava de alegria quando eu dizia que seria dentista. Sei que do céu estará sempre torcendo por mim. Às minhas avós **Cecília e Luzia**, ao meu avô **José Augusto**, que são meus maiores exemplos de vida, amo vocês.*

A todos meus familiares que sempre me apoiaram, torceram pelo meu sucesso e compartilham de momentos tão especiais e importantes para meu crescimento como pessoa. Eu amo todos vocês.

A minha melhor amiga Larissa de Oliveira Pedro, desde que nos conhecemos nunca mais nos desgradamos, nos identificamos em tudo. Nunca encontrei alguém que se parecesse tanto comigo como você. Foram tantas risadas, alegrias, preocupações, loucuras e aprendizados, sou muito grata a Deus por ter uma amiga como você ao meu lado. Que possamos continuar compartilhando muitos momentos juntas, você é muito mais que amiga, é uma irmã. Minha profunda admiração por você, obrigada por tudo, Lari.

A minha amiga Evelyn de Moura Silva, você é uma das pessoas mais bondosas que tive a honra de conhecer e chamar de amiga, é paciente e amorosa com todos ao seu redor. Obrigada por me ajudar e acalmar nos momentos difíceis, por partilhar sorrisos e momentos especiais e por ser essa amiga tão maravilhosa e especial, Eve.

A minha amiga Emanuely Lemos, me identifico muito com você, por toda sua garra e determinação. Você está sempre disposta a enfrentar os desafios e nunca se deixa derrotar por nada, eu te admiro muito, minha dupla de Prótese, Manu.

A minha amiga Giovana Zancan, nos aproximamos muito nos últimos anos, compartilhamos momentos muito especiais e você se tornou uma grande amiga. É verdadeira, sempre muito companheira e compreensível com todos. Vou sentir falta de almoçarmos todos os dias juntas na faculdade, obrigada por tudo Gi.

A minha amiga Laise Dias, encontrei em você uma amizade verdadeira, recíproca e sincera. Convivemos e dividimos momentos muito divertidos como dupla, trocamos conhecimentos e vivência de vida, você é iluminada por Deus e eu irei levar você sempre em meu coração, Lai.

A todas minhas amigas, Larissa de Oliveira, Evelyn Moura, Emanuely Lemos, Giovanna Zancan, Livian Custódio, Laise Dias e Mirella Gasperoni. Jesus disse que quando encontramos um amigo, encontramos o maior tesouro de nossas vidas e eu tive a felicidade de encontrar sete tesouros, que tornaram todos esses anos os melhores, a companhia de vocês tornou tudo mais fácil, vou levar comigo todos nossos momentos, amo vocês meninas.

*A **Prof. Lara Maria Bueno Esteves**, te agradeço por todo carinho, cuidado, paciência e compreensão. Você me ensinou tantas coisas, compartilhou seus conhecimentos, me guiou durante essa trajetória tão importante da minha vida. Sem você não seria possível, esse trabalho também é seu. Minha gratidão será eterna e eu irei levar você dentro do meu coração por toda vida.*

*Ao meu **Orientador Prof Dr. André Luiz Fraga Briso**, agradeço imensamente por me dar a oportunidade de ser sua aluna e de fazer parte desse projeto. Tenho imensa admiração pelo professor e profissional que você é. Essa trajetória me fez crescer e adquirir novos conhecimentos que irei levar para a vida toda, obrigada por tudo!*

*À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.*

*A **todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pela paciência e amor, por dedicarem seu tempo, partilharem seus conhecimentos e lutar para nos formar com tanto êxito, vocês são incríveis.*

*A **todos os funcionários**, que sempre cuidam de todos nós com muito carinho e amor, sempre fazendo o possível para nos proporcionar o melhor, vocês são incríveis.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq)**, processo nº134852/2022-2 , pela concessão da bolsa de iniciação científica.*

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

*“Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso! Não se apavore nem
desanime, pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar.*

Josué 1:9

LEOPOLDO, J. A. F. **Efeito de bioprodutos catalisadores e do Led Violeta na terapia clareadora: análise da microdureza, rugosidade, difusão e alteração cromática.** 2023. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o efeito provocado pelo tratamento tradicional com 45 minutos de exposição ao gel a base de peróxido de hidrogênio a 35% associado ao LED Violeta, com as terapias-teste, baseadas na redução do tempo de aplicação do produto para 15 minutos, no uso bioprodutos inovadores, um Scaffold polimérico de nanofibras e um primer polimérico catalisador, associados ao emprego do LED Violeta. Foram selecionados 60 discos de dentes bovinos (n=15), que passaram por seleção prévia baseada nas análises iniciais da microdureza, rugosidade superficial e análise de cor. Os espécimes selecionados foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle (C): sem tratamento;. Gel-LED (GL45): 45 minutos de HP 35% + Led Violeta; Gel-Luz 15 (GL15): 15 minutos de HP 35% + Led Violeta; Gel-Scaffold, Prime Catalisador, Luz (GSPL): receberam o Scaffold e, em seguida, receberam o primer catalisador incorporado ao gel clareador HP35%, associado ao uso do Led Violeta. A análise de alteração cromática foi realizada em todas as sessões clareadoras, bem como 7 dias após o término. Na primeira sessão clareadora os espécimes foram submetidos à análise de difusão trans-amelodentinária. Após a conclusão dos tratamentos, as amostras foram submetidas às análises finais de microdureza e rugosidade superficial. Em seguida, os discos foram seccionados de forma longitudinal e foi analisada a microdureza interna. Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos específicos com nível de significância de 5%. O grupo GL45, com maior tempo de exposição ao HP35% (45'), apresentou a maior redução dos valores de microdureza superficial e interna, além de aumentar significativamente os valores de rugosidade e obter maior difusão, ΔE e melhor ΔWID . A redução do tempo de aplicação do gel para 15', revelou menores alterações da morfologia superficial e interna do esmalte e menor difusão, porém resultou nos menores valores de ΔE e ΔWID . Em contrapartida, o grupo GSPL, com o protocolo de utilização dos bioprodutos para os tratamentos, demonstraram os menores valores estatísticos de alterações na microdureza superficial e interna, rugosidade superficial e difusão. Além disso, atingiu altos valores de ΔE e ΔWID ,

equiparando-se à terapia convencional (GL45). Pode-se concluir que, a utilização dos bioprodutos Scaffold e Primer Catalisador associados a redução do tempo de exposição ao H₂O₂ para 15', demonstraram ser altamente eficazes, proporcionando excelentes resultados de ΔE , além de atuarem como uma barreira de proteção contra os efeitos adversos causadas pela terapia clareadora sobre a morfologia superficial e interna do esmalte.

Palavras-chave: Clareamento Dental. Biomateriais. Catalisador. Peróxido de Hidrogênio. Dureza. Rugosidade.

LEOPOLDO, J. A. F. **Effect of bioproducts catalysts and the Violet LED on the bleaching therapy: analysis of microhardness, roughness, diffusion and chromatic change.** 2023. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effect caused by the traditional treatment with 45 minutes of exposure to 35% hydrogen peroxide gel associated with Violet LED, with the test therapies, based on the reduction of the product application time to 15 minutes, in the use of innovative bioproducts, a polymeric Scaffold of nanofibers and a polymeric catalyst primer, associated with the use of Violet LED. Sixty bovine tooth discs (n=15) were selected, which underwent prior selection based on initial analyses of microhardness, surface roughness and color analysis. The selected specimens were randomly divided into 4 groups: Control (C): no treatment; Gel-LED (GL45): 45 minutes of HP 35% + Violet Led; Gel-Light 15 (GL15): 15 minutes of HP 35% + Violet Led; Gel-Scaffold, Prime Catalyst, Light (GSPL): received the Scaffold and then received the catalyst primer incorporated into the HP35% bleaching gel, associated with the use of the Violet Led. The analysis of chromatic change was performed in all bleaching sessions, as well as 7 days after the end. In the first bleaching session, the specimens were submitted to trans-amelodentin diffusion analysis. After completion of the treatments, the samples were submitted to final microhardness and surface roughness analyses. Then, the discs were sectioned longitudinally and the internal microhardness was analyzed. The results obtained were submitted to specific statistical tests with a significance level of 5%. The GL45 group, with the longest exposure time to HP35% (45'), showed the greatest reduction in surface and internal microhardness values, in addition to significantly increasing roughness values and obtaining greater diffusion, ΔE and better ΔWID . Reducing the gel application time to 15' revealed less changes in the surface and internal morphology of the enamel and less diffusion, but resulted in the lowest ΔE and ΔWID values. In contrast, the GSPL group, with the protocol of using the bioproducts for the treatments, demonstrated the lowest statistical values of changes in surface and internal microhardness, surface roughness and diffusion. In addition, it reached high ΔE and ΔWID values, equaling the conventional therapy (GL45). It can be concluded

that the use of Scaffold and Primer Catalyst bioproducts associated with the reduction of H₂O₂ exposure time to 15', proved to be highly effective, providing excellent ΔE results, in addition to acting as a protective barrier against the adverse effects caused by bleaching therapy on the surface and internal morphology of the enamel.

Keywords: Tooth Whitening. Biomaterials. Catalyzer. Hydrogen peroxide. Hardness. Roughness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dentes bovinos com raízes separadas da coroa na junção amelocementária	23
Figura 2- Espécimes cortados em discos de esmalte e dentina com 5,7mm de diâmetro	24
Figura 3- Politriz (Aropol E- Arotec Indústria e Comércio Ltda, Cotia São Paulo, Brazil) utilizada para o aplainamento e polimento da superfície do esmalte	25
Figura 4- Microdurômetro (SHIMADZU, Maryland, USA) utilizado para realizar as análises da microdureza superficial do esmalte	26
Figura 5- Leitura da rugosidade do esmalte utilizando um perfilômetro (modelo SJ-401, Mitutoyo, Kawasaki, Japão)	27
Figura 6- Scaffold polimérico distribuído sobre o coletor plano de alumínio	28
Figura 7- Gel clareador a base de PH 35% (Whiteness HP-FGM)	31
Figura 8- Irradiação da luz de LED Violeta sobre os espécimes	31
Figura 9- Espectrofotômetro (Ultraviolet Visible Model UV-2450; Shimadzu) utilizado para realizar as leituras de ΔE	32
Figura 10- Discos posicionados em câmaras pulpares artificiais (CPAs)	33
Figura 11- Espécimes posicionados nas CPAs em placas de acrílico contendo 1mL de solução tampão de acetato recebendo o tratamento clareador conforme o protocolo de cada grupo	34
Figura 12- Máquina de embutir (Arotec Indústria e Comércio. Cotia, São Paulo, Brasil)	35
Figura 13- Microdurômetro (BUEHLER) utilizado para realizar as análises de microdureza interna do esmalte	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais e tratamentos realizados

28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microdureza superficial média e desvio padrão antes e após a terapia clareadora	33
Tabela 2 - Rugosidade média e desvio padrão antes e após a terapia clareadora	34
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão de alteração cromática e índice de clareamento ao longo das sessões de clareamento	35
Tabela 4 - Média e desvio padrão da difusão trans-amelodentinária nos grupos analisados	35
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da microdureza interna em função das profundidades	36

LISTA DE SIGLAS

μg	Microgramas
C	Grupo Controle
Cm	Centímetro
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GL15	Grupo Gel e Luz - 45 minutos
GL45	Grupo Gel e Luz - 15 minutos
GSPL	Grupo Scaffold, Primer Catalisador, Luz - 15 minutos
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HP35%	Peróxido de Hidrogênio 35%
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HRP	Horseradish Peroxidase
kV	Quilovoltagem
Mg	Miligramas
ML	Mililitros
Mm	Milímetros
mV	Milivolts
Nm	Nanômetros
OH	Hidroxila
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
PCL	Policaprolactona
PrCa	Primer Catalisador
ScP	Scaffold de Nanofibras
ΔE	Alteração Cromática
ΔWID	Índice de Clareamento
μl	Microlitros
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Preparação dos espécimes	23
3.2 Aplainamento e polimento da superfície	24
3.3 Microdureza superficial inicial.....	25
3.4 Rugosidade inicial	26
3.5 Análise da cor inicial.....	27
3.6 Divisão dos grupos.....	27
3.7 Confecção do Scaffold	28
3.8 Confecção do Primer Catalisador.....	30
3.9 Tratamento clareador	30
3.10 Análise alteração cromática	31
3.11 Índice de clareamento (WID).....	32
3.12 Quantificação da difusão de Ph.....	32
3.13 Rugosidade final.....	34
3.14 Microdureza superficial final	34
3.15 Microdureza interna.....	34
3.16 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Microdureza superficial.....	37
4.2 Rugosidade	37
4.3 Análise alteração cromática	38
4.4 Análise da difusão Trans-amelodentinária do PH	39
4.5 Microdureza interna.....	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	56

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Por possuir uma abordagem conservadora, que promove resultados eficientes e com uma relação custo e benefício favorável ao paciente, o clareamento dental vem sendo amplamente requisitado e utilizado nos consultórios odontológicos, sendo indicado principalmente para alterações cromáticas a nível dentinário.¹ A terapia clareadora pode ser realizada pela técnica *in-home*, em que o paciente realiza o tratamento em casa, utilizando moldeiras de acetato carregadas com gel clareador em menor concentração e com a supervisão do dentista ou pela técnica *in-office*, realizada no consultório odontológico, com maiores concentrações de gel clareador e associado ou não a luz. Ambas utilizam o peróxido de hidrogênio como princípio ativo.¹⁻²

O processo de clareamento ocorre independentemente da técnica utilizada, assim que o gel clareador entra em contato com a superfície dentária as moléculas cromóforas reagem com as espécies reativas de oxigênio, denominadas EROs.¹⁻³ Essas moléculas possuem alto poder oxidante e potencial de quebrar cadeias polipeptídicas e componentes orgânicos, incluindo os agentes cromóforos, proporcionando assim, a clivagem das cadeias carbônicas cromóforas, o que resulta em uma aparência mais clara. Apesar dos benefícios estéticos comprovados, cada vez mais são descritos a ocorrência de efeitos adversos pós terapia clareadora, como a sensibilidade dental, principal efeito adverso relatado pelos pacientes, assim como alterações na morfologia estrutural do esmalte.⁴⁻⁹

Uma das possíveis justificativas que se tem para a presença da resposta dolorosa é a presença de moléculas residuais de H_2O_2 , conhecidas como free- H_2O_2 . São moléculas que não reagiram com os cromóforos e apresentam um alto potencial de difusão através dos tecidos mineralizados e capacidade de interação com as células pulpares. Por ser uma espécie reativa tóxica, pode diminuir a viabilidade das células pulpares e causar estresse oxidativo e danos às membranas dessas células que resulta na inflamação pulpar, que repercute clinicamente como a sensibilidade dentária.^{3,8} Segundo Acuña *et al.*,¹⁰ em 2019, os efeitos adversos do clareamento dental sobre o tecido pulpar são bem conhecidos e proporcionais ao tempo e exposição ao peróxido de hidrogênio, pois géis clareadores contendo entre 30-40% de concentração de H_2O_2 geram intensos efeitos tóxicos sobre as células

pulpaes.^{8,10-12} Ainda tem sido demonstrado que, a aplicação do Peróxido de Hidrogênio em grandes concentrações no esmalte pode resultar em sua dissolução parcial e como consequência redução da microdureza, aumento da rugosidade, microporosidades e possível degradação do esmalte dentário.¹³⁻¹⁵

Desta forma, pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de se encontrar métodos que condicionem positivamente a reatividade das EROs através do uso de agentes catalisadores enzimáticos, com o objetivo de aumentar a liberação de EROs, assim como a OH (Hidroxila) e diminuir os possíveis efeitos colaterais vinculados ao tratamento clareador.¹⁶ A enzima Horseradish Peroxidase (HRP) se destaca como um dos agentes catalisadores mais promissores, é obtida através da raiz vegetal da *Armoracia rusticana*, que através do seu centro metálico Fe³⁺, viabiliza a ruptura homolítica do H₂O₂.¹⁷ Nas pesquisas realizadas por Soares *et al.*¹⁸ foi feita a associação do HRP ao espessante do gel clareador e pode-se observar uma redução significativa da difusão de free H₂O₂ pelos tecidos dentários, assim como um aumento de alteração cromática. Já nas pesquisas de Ortecho-Zuta *et al.*¹⁹ foi feito a adição de 10 mg/mL de HRP ao espessante do gel clareador a base de peróxido de Hidrogênio a 35%, pode-se observar logo após a primeira sessão, redução importante na citotoxicidade pulpar, aumento de 34% na viabilidade celular e aumento de 24% nas vantagens estéticas de cor. Ainda assim, os autores relataram que as células pulpaes ainda se apresentaram sensibilizadas, concluindo que o efeito biológico se manteve limitado.

Devido a necessidade de reduzir essa limitação, minimizando o estresse oxidativo causado pelas moléculas residuais de free H₂O₂, foram desenvolvidos Scaffolds com base de hydroxipropil metilcelulose (HPMC à 12,5%, com electrospinning de 45'), no qual, apresentam nanopartículas que mimetizam a nano morfologia das estruturas dentárias e potencializam a degradação do H₂O₂ residual presente no gel clareador.^{20,21}

Foi observado em 2021, por Ortecho-Zuta *et al.*²¹ que previamente ao tratamento clareador, o revestimento do esmalte dental com compostos orgânicos formadores de Scaffolds, foram capazes de proporcionar maior alteração cromática e aumento significativo de 72% na viabilidade celular em comparação ao grupo que recebeu o protocolo de clareamento tradicional de consultório. Já em 2022, Ortecho-Zuta *et al.*²² realizou a associação do Primer Catalisador e Scaffold, a fim de

aprimorar as terapias clareadoras e terapias testes, obtendo resultados biologicamente seguros. Em seus estudos in-vitro, o emprego do gel clareador com 35% de Peróxido de Hidrogênio associado a estes biomateriais promissores, reduzindo a técnica para 15', apresentou como resultado, redução em 60% do efeito citotóxico proporcionado pela técnica tradicional com efeito estético análogo ao da terapia com 45' de exposição.

Como estratégia complementar e com o intuito de aumentar a viabilidade da terapia clareadora, tem sido proposta a utilização de LEDs Violeta (VIO), que possuem comprimento de onda relativamente menor em comparação às demais fontes (λ 405 – 410 nm), sendo capaz de produzir efeito de alteração cromática, associado ou não aos géis clareadores, além de causar pouco ou nenhum aquecimento pulpar. ^{.23,24} Através da fotólise, processo de degradação de moléculas orgânicas por meio da radiação luminosa, a emissão de luz na faixa do violeta, leva a absorção das moléculas pigmentadas degradando as estruturas orgânicas coloridas. Ao compararem a aplicação do Led-Violeta com a terapia convencional, Gallinari *et al.*^{23,24} observaram que o emprego do Led pode suceder um efeito favorável na alteração cromática das estruturas dentárias.

Diante das mudanças e melhoras plausíveis que as terapias clareadores vem demonstrando ao longo do tempo, justifica-se a realização de estudos laboratoriais que visem a utilização desses bioprodutos promissores (Primer Catalisador e Scaffolds poliméricos associados ao emprego de Led-violeta nas terapias clareadoras.¹⁸⁻²⁴ Além disso, espera-se que o aumento da reatividade do H₂O₂ com o substrato dental associado a redução do tempo de exposição, aumente o poder de acelerar a resposta clareadora e limite a difusão desta molécula residual as células pulpares ao reduzir a quantidade de radicais livres residuais, ao mesmo tempo que proporcionará redução de danos a morfologia da estrutura dentária.^{10,18,19}

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito provocado pelo tratamento tradicional com 45 minutos de exposição ao gel a base de peróxido de hidrogênio a 35% associado ao LED Violeta, com as terapias-teste associadas à luz violeta, baseadas na redução do tempo de aplicação do produto para 15 minutos, no uso de um Scaffold polimérico de nanofibras e um primer polimérico catalisador, observando suas influências na microdureza e rugosidade superficial, alteração cromática, difusão e microdureza transversal.

As hipóteses nulas deste estudo são:

- a) O uso dos biomateriais Scaffold e Primer Catalisador não alteraria a microdureza superficial;
- b) O uso dos biomateriais Scaffold e Primer Catalisador não influenciaria na microdureza transversal;
- c) O uso dos biomateriais Scaffold e Primer Catalisador não alteraria a rugosidade;
- d) O uso dos biomateriais Scaffold e Primer Catalisador limitaria a difusão de H₂O₂ pelos tecidos.
- e) O uso dos biomateriais Scaffold e Primer Catalisador não alteraria a efetividade clareadora.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação dos espécimes

Foram obtidos 150 incisivos bovinos permanentes obtidos de novilhos com idade entre 24 e 30 meses, que passaram por testes de padronização de modo que se obteve ao final, 60 discos (n=15). Dentes com manchas, desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e trincas no esmalte foram descartados. Os dentes selecionados foram limpos manualmente com curetas e armazenados em solução de Timol 0,1% para evitar proliferação bacteriana. Após a limpeza, os dentes tiveram as raízes separadas da coroa na junção amelocementária. Em seguida, as coroas foram fixadas em um dispositivo ligado à plataforma de uma furadeira de bancada (Ferrari Modelo FGC 16) e com uma ponta diamantada para corte de vidro (Dinser Ferramentas Diamantadas Ltda.), sob refrigeração de água, foram obtidos discos de esmalte/dentina com 5,7 mm de diâmetro a partir do terço médio da face vestibular. Em seguida, a superfície dentinária dos discos foram regularizadas manualmente com lixas de óxido de alumínio de granulação 400 e 600 (T469-SF-Norton, Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), para que ficassem com espessura padronizada de 3,5 mm (1,3 mm de esmalte e 2,2 mm de dentina), medidos a partir de um paquímetro digital (modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda, SP, Brasil). Além disso, foi realizado a remoção da smear layer com a aplicação da solução de EDTA 17,5% por 1 minuto e em seguida, os discos foram lavados com água deionizada por 10 segundos e limpos em ultrassom Branson 2210 (Danbury, Connecticut, USA) durante 10 minutos para remoção dos resíduos.

Figura 1- Dentes bovinos com raízes separadas da coroa na junção amelocementária



Fonte: Autor, 2023

Figura 2- Espécimes cortados em discos de esmalte e dentina com 5,7 mm de diâmetro



Fonte: Autor, 2023

3.2 Aplainamento e polimento da superfície

Os espécimes foram fixados em bases de acrílico, com o esmalte voltado para cima e 1mm acima do nível desta base, com intuito de facilitar o polimento dos discos. Então, para o aplainamento e polimento da superfície a ser estudada dos discos, foi utilizado uma politriz (Aropol E- Arotec Indústria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), empregando discos abrasivos nas granulações 600 e 800 por 2 minutos e 1200 por 4 minutos, em baixa velocidade e sob refrigeração a água, a fim de proporcionar uma superfície mais apta para análise nas seguintes etapas. O polimento final foi realizado com discos de feltro umedecidos em pasta diamantada de 1 μ m (Arotec S.A. Indústria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil), durante 5 minutos.

Figura 3- Politriz (Aropol E- Arotec Indústria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brazil) utilizada para o aplainamento e polimento da superfície do esmalte



Fonte: Autor, 2023

3.3 Microdureza superficial inicial

A microdureza do esmalte foi verificada em microdurômetro (HVM-2000 SHIMADZU, Maryland, USA), com penetrador tipo Knoop, com carga estática de 25 gramas por 5 segundos. Foram realizadas 03 indentações com distância de 100 μ m entre elas. Obtidos esses dados, 60 espécimes com microdureza mais próxima da média foram selecionados.^{25,26}

Figura 4 – Microdurômetro (SHIMADZU, Maryland, USA) utilizado para realizar as análises da microdureza superficial do esmalte

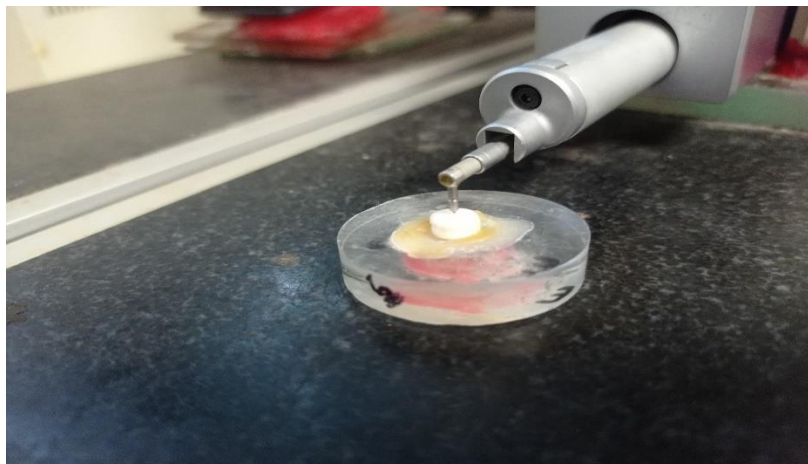


Fonte: Autor, 2023

3.4 Rugosidade inicial

A rugosidade da superfície foi medida com um perfilômetro (modelo SJ-401, Mitutoyo, Kawasaki, Japão), calibrado previamente às leituras. Cada corpo de prova foi fixado em bases de acrílico e a agulha do medidor foi posicionada na superfície do corpo de prova. Para registrar as medidas de rugosidade, a agulha se move a uma velocidade constante de 0,05 mm/seg com uma força de 0,7 mN. Os valores de corte foram fixados em 0,25 mm e a rugosidade superficial foi caracterizada pelos valores de $R_a/\mu\text{m}$. Assim, três leituras foram realizadas e a média foi calculada, de modo que se obteve 60 espécimes padronizados para o estudo.²⁷

Figura 5- Leitura da rugosidade do esmalte realizada utilizando um perfilômetro (modelo SJ-401, Mitutoyo, Kawasaki, Japão)



Fonte: Autor, 2023

3.5 Análise da cor inicial

Para a análise de cor, os espécimes foram colocados em espectrofotômetro de reflexão de luz ultravioleta/visível (Ultraviolet Visible Model UV-2450; Shimadzu). Assim, foi realizada a mensuração das axiais L^* , a^* e b^* , totalizando três leituras na superfície de esmalte de cada espécime de modo que se obteve os dados das coordenadas L^* , b^* e a^* e foi realizada a distribuição aleatória dos espécimes, respectivamente, para que obtivéssemos espécimes com valores semelhantes entre os grupos do estudo. Foram obtidas 60 amostras padronizadas

3.6 Divisão dos grupos

Os espécimes selecionados nas análises iniciais, foram divididos em 4 grupos e receberam o tratamento conforme no Quadro 1. Ao final do tempo de exposição aos tratamentos, os corpos-de-prova ficaram imersos em 2mL de saliva artificial a 37°C.²⁶

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais e tratamentos realizados

Grupo	Sigla	Tratamentos
CONTROLE	CN	Não foi realizado tratamento clareador. Os espécimes permaneceram imersos em 2mL de saliva artificial* por todo o tempo do trabalho, com trocas da solução a cada 24h.
GEL 45' + LUZ	GL45'	Gel com 35% de H ₂ O ₂ *** aplicado por 45 minutos (3x15 min) sobre o esmalte, associado ao emprego do LED Violeta **. O produto clareador foi aplicado na quantidade de 0,06mL, aguardado o período de 1 minuto para o molhamento da estrutura dentária e a ponteira acrílica do LED foi ativada por 12 minutos a uma distância de 1,5cm. Ao término da irradiação, o gel continuou reagindo pelos 2 minutos restantes. Em seguida, foi realizada a troca do gel por mais 2 vezes até que se obtive os 45 minutos de exposição, conforme orientação do fabricante do gel clareador.
GEL 15' + LUZ	GL15'	Gel com 35% de H ₂ O ₂ *** aplicado por 15 minutos sobre o esmalte, associado à aplicação do LED Violeta **. Para tanto, o produto clareador foi aplicado na quantidade de 0,06mL, aguardado o período de 1 minuto para o molhamento da estrutura dentária e a ponteira acrílica do LED foi ativada por 12 minutos a uma distância de 1,5cm seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Ao término da irradiação, o gel continuou reagindo pelos 2 minutos restantes.
GEL, SCAFFOLD, CATALISADOR + LUZ	GSPL	Gel com 35% de H ₂ O ₂ *** aplicado por 15 minutos sobre o esmalte, associado à aplicação do LED Violeta **. Para tanto, o produto clareador foi aplicado na quantidade de 0,06mL, aguardado o período de 1 minuto para o molhamento da estrutura dentária e a ponteira acrílica do LED foi ativada por 12 minutos a uma distância de 1,5cm seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Ao término da irradiação, o gel continuou reagindo pelos 2 minutos restantes.

*(1,5 mmol/L de Ca; 50 mmol/L de KCl; 0,9 mmol/L de PO₄; 20 mmol/L de tampão TRIS tri-hidroximetil-aminometano], em pH 7,0)26 / ** LED violeta (Bright Maxx Whitening Light Source, MMOptics Ltda., São Paulo, Brasil / *** Whiteness HP 35% - FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Fonte: Autor, 2023

3.7 Confeção do Scaffold

A confecção dos Scaffolds Poliméricos (ScP) foi realizada no laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-Unesp). Para tanto, uma solução de Policaprolactona (PCL, Sigma-Aldrich Corp.) foi preparada com uma concentração de 12,5% m/v, associada à solução de clorofórmio/dimetilformamida (80:20) (Labsynth Produtos para laboratório, São Paulo, SP, Brasil). A solução inicialmente obtida foi transferida para uma seringa esterilizada de 5 mL (Luer Lock BD, Curitiba, PR, Brasil) com agulha

hipodérmica de aço inoxidável de calibre de 18 gauge (Bunzl Saúde/Labor Import, São Paulo, SP, Brasil), a qual foi conectada num equipamento de injeção automática (KDSscientific, Holliston, MA, EUA), regulado para exercer uma velocidade de injeção de 0,5mL/h. A voltagem da fonte de alta-tensão foi estabelecida em 12 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor foi de 15 cm. Com o intuito de obter uma malha que apresente as nanofibras produzidas distribuídas de forma aleatória, um coletor plano de alumínio foi posicionado perpendicularmente à seringa e, decorrido os 45 minutos de eletrofiação, a malha de nanofibras foi finalizada.^{21,22}

Para desinfecção da malha de nanofibra, antes da aplicação nos discos, esta foi colocada em placa Petri de vidro e imersa por 10 minutos em álcool 50%; por 20 minutos em álcool 70%, com três ciclos; 10 minutos em Tampão fosfato-salino, com dois ciclos, com posterior secagem em temperatura ambiente por 48 horas, antes de sua utilização. Em seguida, para a utilização dos ScPs (malha de nanofibras), esta foi cuidadosamente colocada na bancada de trabalho, onde amostras circulares do produto (6 mm de diâmetro) foram obtidas com punch dérmico (Kolplast Ltda. Itupeva, São Paulo, Brasil). Após posicionar os discos de esmalte/dentina sobre uma placa de cera rosa utilidade nº 7 (Lysanda Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP), os ScPs foram aplicados sobre o esmalte e mantidos em posição com uso de Top Dam (FGM), seguidos da aplicação de gel clareador conforme a descrição dos grupos.^{21,22}

Figura 6- Scaffold polimérico distribuído sobre o coletor plano de alumínio



3.8 Confeção do Primer Catalisador

Para a confecção do Primer Catalisador (PrCa), foi utilizado a enzima Horseradish peroxidase (HRP) (HRP, Sigma-Aldrich Corp. São Paulo, São Paulo, Brasil). Desta forma, antes de cada procedimento clareador, 10 mg de HRP foi incorporado, juntamente 9 gotas de Peróxido de Hidrogênio para 3 gotas de espessante, conforme orientação do fabricante (3:1), sendo o produto final homogeneizado com a própria espátula do kit clareador, em movimentos circulares, por 10 segundos em temperatura ambiente.^{21,22}

3.9 Tratamento clareador

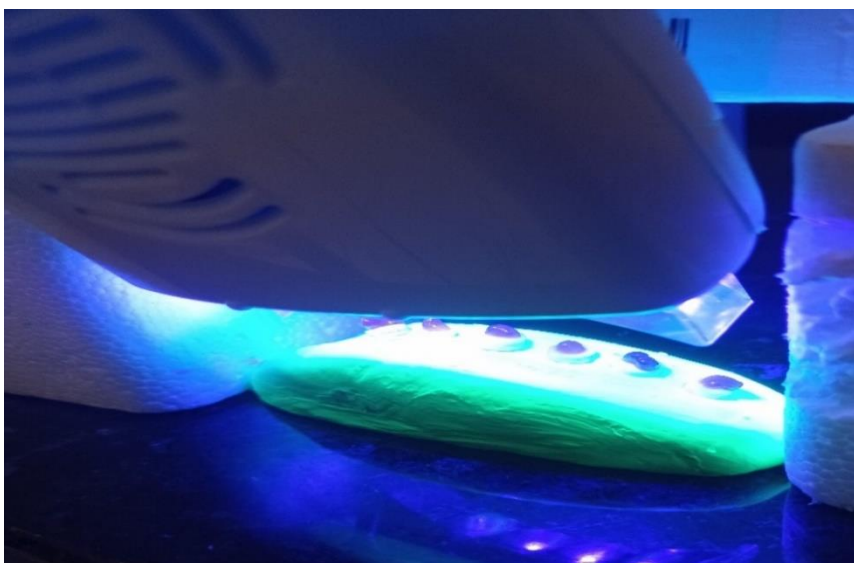
Os espécimes receberam 3 sessões clareadoras com os respectivos protocolos experimentais de cada grupo conforme descrito no item 3.6 (Quadro 1). Para tanto, foi utilizado o produto Whiteness HP (FGM Produtos Odontológicos) a base de peróxido de hidrogênio a 35%. O gel foi manipulado manualmente conforme orientações do fabricante (3:1) e aplicado em um volume padronizado de 0,06 mL com pipeta específica para líquidos viscosos (Microman E, Gilson Inc. Middleton WI, EUA). O tempo de permanência seguiu o determinado para cada grupo experimental. Todos os grupos foram associados à irradiação, através do equipamento LED violeta (Bright Maxx Whitening Light Source, MMOptics Ltda., São Paulo, Brasil). Desta forma, o gel clareador foi aplicado aguardando o período de 1 minuto para o molhamento da estrutura dentária dos espécimes e seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante, seguindo com a terapia clareadora mediante o tempo determinado para cada grupo.

Figura 7- Gel clareador a base de peróxido de hidrogênio 35 % (Whiteness HP- FGM)



Fonte: Autor, 2023

Figura 8- Irradiação da luz de LED Violeta sobre os espécimes



Fonte: Autor, 2023

3.10 Análise alteração cromática

Os espécimes foram submetidos à análise espectrofotométrica 24 horas após cada sessão clareadora, bem como 7 dias após o término das sessões. Os valores obtidos foram comparados aos valores iniciais, através da fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$.

Figura 9- Espectrofotômetro (Ultraviolet Visible Model UV-2450; Shimadzu) utilizado para realizar as leituras de ΔE



Fonte: GALLINARI *et al.* 2019

3.11 Índice de clareamento (WID)

O índice de clareamento (WID) é uma formulação linear simples, obtida usando os valores das três coordenadas cromáticas do CIELab. O índice foi calculado utilizando a seguinte fórmula:²⁸

$$\text{WID} = (0,511 \times L^*) - (2,324 \times a^*) - (1,100 \times b^*)$$

Valores positivos do índice WID indicam maior efeito clareador da amostra, enquanto que valores baixos e até negativos indicam menor efeito clareador da amostra.

3.12 Quantificação da difusão de Ph

A quantificação do Peróxido de Hidrogênio foi realizada na primeira sessão clareadora. Para remoção da smear layer foi aplicada solução de EDTA 17,5% por 1 minuto e em seguida, os discos foram lavados com água deionizada por 10 segundos e limpos em ultrassom Branson 2210 (Danbury, Connecticut, USA) durante 10 minutos para remoção dos resíduos.

Previamente ao tratamento clareador, os discos foram posicionados nas CPAs em placas acrílicas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA,

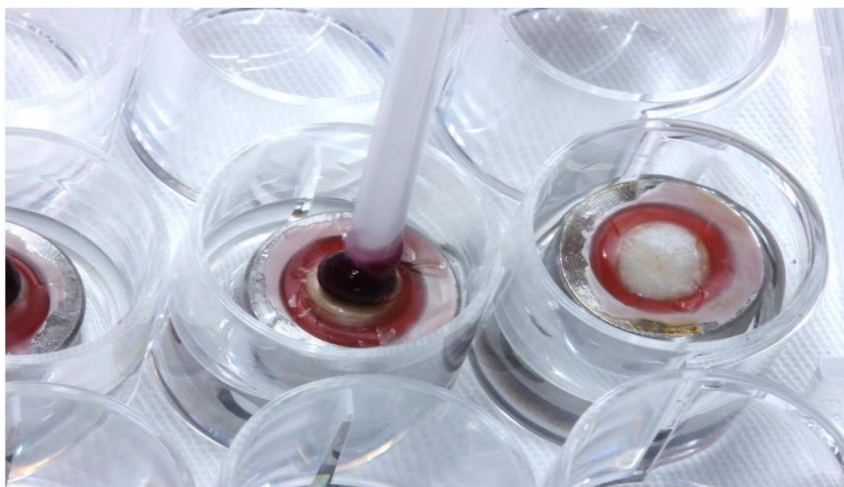
EUA) contendo 1ml de solução tampão de acetato a 2 M (pH 4,5). A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução. Em seguida, os espécimes posicionados receberam o tratamento clareador conforme descrito nos itens 3.6 e (Quadro 1), imediatamente após o clareamento, 100 µl da solução tampão foi transferida para tubos de ensaio contendo 100 µl de corante violeta leuco cristal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,5 mg/ml; 50 µl de peroxidase extraída de rábano silvestre (Sigma Chemical Co.) a 1mg/mL, e 2,750 ml de água destilada. Este método baseia-se na reação do pH com o corante violeta leucocristal, catalisado pela enzima peroxidase. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de peróxido, assim foi possível verificar a quantidade de peróxido difundido. A densidade óptica da solução azul resultante foi mensurada em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão) em comprimento de onda de 596 nm. Uma curva de calibração, com valores de absorbância de soluções de pH de concentrações conhecidas, foi utilizada para converter os valores da densidade óptica obtidos em valores equivalentes a µg de peróxido por mL de solução tampão acetato.

Figura 10- Discos posicionados em câmaras pulpares artificiais (CPAs)



Fonte: GALLINARI *et al.* 2019

Figura 11 – Espécimes posicionados nas CPAs em placas de acrílico contendo 1mL de solução tampão de acetato recebendo o tratamento clareador conforme a descrição de cada grupo



Fonte: GALLINARI *et al.* 2019

3.13 Rugosidade final

A análise de rugosidade após o tratamento clareador foi realizada conforme descrito na rugosidade inicial.

3.14 Microdureza superficial final

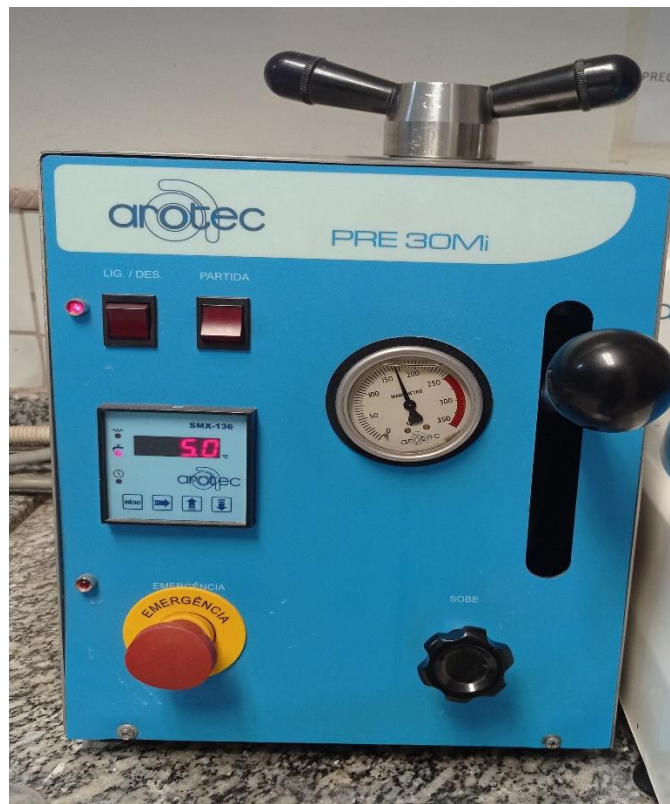
A análise de microdureza após o tratamento clareador foi realizada conforme na microdureza inicial.

3.15 Microdureza interna

Após as terapias clareadoras, 10 espécimes de cada grupo, incluindo os que não foram clareados, foram seccionados longitudinalmente, utilizando-se disco diamantado de dupla face Ø 22 mm (KG Sorensen Ind. e Com., Cotia, SP, Brasil) em baixa velocidade e sob intenso resfriamento a água. Cada espécime foi embutido em resina acrílica utilizando uma máquina de embutir Pré 30 (Arotec Indústria e Comércio, Cotia, São Paulo, Brasil). A superfície interna da estrutura dental foi polida com lixas de óxido de alumínio de 320, 600, 800 e 1200 e pasta de

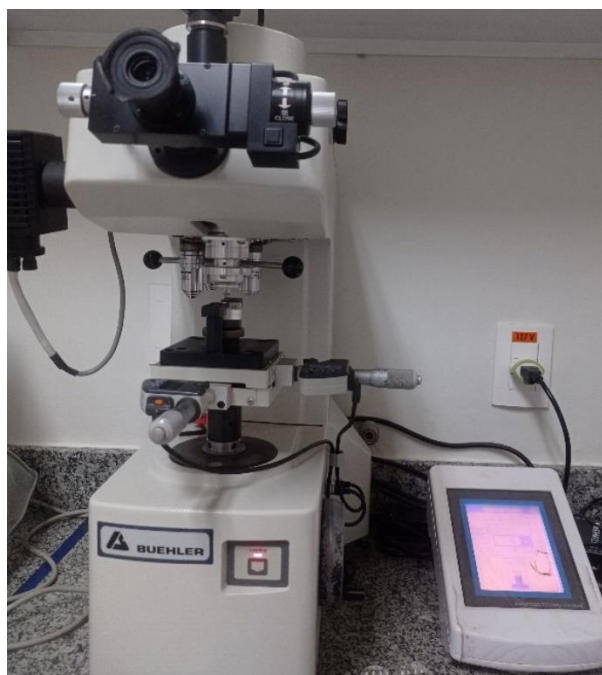
diamante de 1 μm . A dureza da secção transversal foi determinada por um microdurômetro com penetrador tipo Knoop que trabalhara com uma carga estática de 5 g por 10 s. As indentações foram feitas no centro do bloco a distâncias de 10, 20, 30, 60 e 90 μm da superfície do esmalte. Outras duas linhas de recortes foram realizadas; 100 μm à direita e à esquerda das indentações feitas no centro dos discos.²⁹

Figura 12 – Máquina de embutir (Arotec Indústria e Comércio. Cotia, São Paulo, Brasil)



Fonte: Autor, 2023

Figura 13- Microdurômetro (BUEHLER) utilizado para realizar as análises de microdureza interna do esmalte



Fonte: Autor, 2023

3.16 Análise estatística

Após a tabulação, análise descritiva e exploratória dos dados foi verificado o atendimento às pressuposições (normalidade e homogeneidade). Para a análise de microdureza superficial, transversal e rugosidade, foi utilizado o teste estatístico Anova dois fatores. Para a análise de difusão de Peróxido de Hidrogênio foi utilizado o teste Anova um fator. Para a análise de alteração cromática foi utilizado o teste Anova dois fatores com medidas repetidas através do programa estatístico SigmaPlot 12.0, em nível de significância a 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Microdureza superficial

A Tabela 1 avalia os resultados obtidos na análise de microdureza superficial. Foi possível observar que antes dos tratamentos todos os grupos apresentaram resultados semelhantes de microdureza superficial ($p>0.05$). A análise final das amostras revelou que os tratamentos proporcionaram distintos efeitos no substrato. O grupo controle obteve as maiores médias, diferindo-se dos demais. Dentre os grupos clareados, o GSPL apresentou os maiores valores, seguido por GEL15+ Luz e Gel45 +luz, que obteve os menores valores.

Ao avaliar o comportamento de cada grupo ao longo do tempo, observou-se que apenas o grupo controle manteve-se inalterado nas leituras inicial e final, enquanto que, todos os demais grupos, sofreram uma redução significativa nos valores de microdureza superficial.

Tabela 1 - Microdureza superficial média e desvio padrão antes e após a terapia clareadora

Grupos Experimentais	Tempo	
	Inicial	Final
CONTROLE	334,7 ($\pm 3,8$) Aa	334,5 ($\pm 3,6$) Aa
GEL 45 + LUZ	333,0 ($\pm 2,0$) Aa	295,8 ($\pm 6,6$) Db
GEL 15 + LUZ	334,5 ($\pm 3,5$) Aa	311,5 ($\pm 5,1$) Cb
GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	333,7 ($\pm 4,8$) Aa	330,0 ($\pm 5,2$) Bb

Letras maiúsculas iguais (em colunas) indicam que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos antes do tratamento clareador ($p>0.05$); Letras maiúsculas diferentes revelam diferenças estatísticas significativas entre os grupos após terapia clareadora. Letras minúsculas diferentes (em linhas) indicam discordâncias estatísticas de cada grupo em relação ao tempo, antes e após o tratamento.

Fonte: Autor, 2023

4.2 Rugosidade

Os valores da rugosidade do esmalte antes e após o tratamento clareador estão representados na Tabela 2. A análise inicial mostra que todos os grupos apresentaram a mesma rugosidade antes de receber os tratamentos superficiais. Já a análise final mostrou que o grupo GSPL obteve resultados semelhantes aos obtidos pelo grupo controle, bem como ao GL15. O grupo GL45 apresentou os

maiores valores de rugosidade, diferindo-se estatisticamente de todos os grupos.

A análise do desempenho de cada grupo ao longo do tempo mostra que o grupo controle manteve seus valores de rugosidade inalterados. Contudo, ao comparar os demais grupos antes e após a terapia clareadora, todos diferiram entre si estatisticamente.

Tabela 2 - Rugosidade média e desvio padrão antes e após a terapia clareadora

Grupos Experimentais	Tempo	
	Inicial	Final
CONTROLE	0,044 ($\pm 0,002$) Aa	0,044 ($\pm 0,002$) Aa
GEL 45 + LUZ	0,042 ($\pm 0,002$) Aa	0,050 ($\pm 0,002$) Cb
GEL 15 + LUZ	0,043 ($\pm 0,002$) Aa	0,047 ($\pm 0,002$) Bb
GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	0,043 ($\pm 0,003$) Aa	0,045 ($\pm 0,002$) ABb

Letras maiúsculas iguais (em colunas) indicam que não houve diferenças estatísticas entre os grupos antes do tratamento clareador; letras maiúsculas diferentes revelam diferenças estatísticas significativas entre os grupos após terapia clareadora. Letras minúsculas diferentes (em linhas) indicam discordâncias estatísticas de cada grupo em relação ao tempo, antes e após o tratamento.

Fonte: Autor, 2023

4.3 Análise alteração cromática

Na análise de ΔE apresentada na tabela constata-se que todos os grupos obtiveram diferenças estatísticas entre si em todos os tempos analisados, cabendo salientar que o grupo GL45 apresentou os maiores valores de alteração cromática. Em seguida, o grupo teste GSPL, apresentou resultados interessantes, diferindo de GL15 e C. Além disso, todos os grupos apresentaram alterações cromáticas crescentes ao longo do tempo, com os maiores resultados observados na terceira sessão de clareamento e no tempo controle.

Na análise de Wid, o grupo GL45 apresentou os maiores índices de clareamento em todas as sessões clareadoras, não diferindo da terapia teste (GSPL) na segunda sessão clareadora. Observou-se também que todos os grupos demonstraram aumento do índice de clareamento ao longo das terapias clareadoras, com maior índice após a terceira sessão de clareamento.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão de alteração cromática e índice de clareamento ao longo das sessões de clareamento

Grupos		T1	T2	T3	T4
ΔE	CONTROLE	0,64 (±0.3) Da	0,89 (±0.3) Da	0,87 (±0.3) Da	0,89 (±0.3) Da
	GEL 45 + LUZ	9,87 (±0.4) Ac	14,12 (±0.5) Ab	19,39 (±0.5) Aa	19,47 (±0.5) Aa
	GEL 15 + LUZ	4,95 (±1.4) Cc	8,78 (±1.3) Cb	10,61 (±1.1) Ca	10,32 (±1.1) Ca
	GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	8,23 (±1.8) Bc	12,07(±2.3) Bb	16,01 (±1.2) Ba	15,76 (±1.2) Ba
ΔWID	CONTROLE	0,72 (±0.5) Da	0,84 (±0.5) Ca	0,91 (±0.5) Da	0,75 (±0.3) Da
	GEL 45 + LUZ	11,99 (±1.9) Ac	15,56 (±1.9) Ab	21,38 (±2.6) Aa	21,1 (±2.4) Aa
	GEL 15 + LUZ	6,14 (±0.7) Cc	9,19 (±0.7) Bb	14,17 (±0.7) Ca	13,94 (±0.7) Ca
	GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	8,61 (±1.3) BCc	14,99 (±1.6) Ab	19,08 (±1.7) Ba	19,03 (±1.6) Ba

Letras maiúsculas diferentes (em colunas) revelam diferenças estatísticas entre os grupos ao longo das sessões de clareamento. Letras minúsculas diferentes (em linhas) indicam discordâncias estatísticas de cada grupo ao longo de cada sessão do tratamento clareador (tempo).

Fonte: Autor, 2023

4.4 Análise da difusão Trans-amelodentinária do PH

Em relação à difusão e com base nos dados apresentados pela Tabela 4, é possível observar que, todos os grupos diferiram do grupo controle. O grupo GL45 apresentou os maiores valores de difusão, enquanto que o grupo que recebeu o protocolo de utilização do bioproduto e o Primer Catalisador, demonstrou os menores valores de difusão.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da difusão trans-amelodentinária nos grupos analisados

Grupos Experimentais	Difusão
CONTROLE	0,11 (±0,09) D
GEL 45 + LUZ	7,93 (±2,50) A
GEL 15 + LUZ	4,27 (±1,01) B
GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	2,76 (±0,62) C

Médias seguidas por letras distintas, as letras maiúsculas nas colunas revelam as diferenças estatísticas de difusão trans-amelodentinária do H2O2 entre os grupos avaliados. As letras estão representadas de acordo com os maiores valores de difusão (A) até os menores valores (D).

Fonte: Autor, 2023

4.5 Microdureza interna

Ao analisar a Tabela 5 observa-se que o grupo GL45 apresentou as maiores alterações de microdureza interna, com diferença estatística nas cinco profundidades analisadas em relação aos demais grupos. Em sequência, o grupo GL15 também demonstrou diferenças estatísticas significativas. No entanto, é possível observar que, o grupo C e o grupo GSPL não diferiram estatisticamente entre si, mantendo os valores de microdureza interna inalterados em todas as profundidades.

Além disso, é possível relatar que as diferenças mais significativas dos grupos GL45 e GL15 ocorreram nas profundidades de 10µm e 20µm e 30µm, mais próximas à superfície do esmalte. A partir da profundidade de de 60µm, não houve diferença estatística detectada.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão de microdureza interna em função das profundidades

Grupos experimentais	Profundidades				
	10 µm	20 µm	30 µm	60 µm	90 µm
CONTROLE	372.40 (±3.34) Aa	373.03 (±3.06) Aa	373.11 (±1.71) Aa	373.50 (±2.53) Aa	373.75 (±3.01) Aa
GEL 45 + LUZ	326.72 (±3.14) Cb	338.38 (±4.27) Cb	339.75 (±3.84) Cab	342.97 (±4.73) Ca	343.19 (±3.40) Ca
GEL 15 + LUZ	349.85 (±3.42) Bb	357.77 (±2.75) Bb	360.91 (±2.94) Ba	361.44 (±3.36) Ba	362.06 (±3.72) Ba
GEL SCAFFOLD PRIMER + LUZ	362.32 (±3.28) Aa	370.02 (±3.56) Aa	372.57 (±3.47) Aa	372.59 (±2.39) Aa	373.04 (±2.84) Aa

As letras maiúsculas diferentes (em colunas) comparam as diferenças estatísticas de microdureza interna entre os grupos analisados e as letras minúsculas diferentes (em linhas) comparam as diferenças estatísticas de cada grupo em relação às profundidades analisadas.

Fonte: Autor, 2023

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A estética dental está diretamente relacionada a dentes mais claros, bem alinhados e corretamente contornados. A obtenção de dentes claros por meio de técnicas clareadoras consiste em uma abordagem mais conservadora e ao mesmo tempo apresenta excelentes resultados quanto às alterações cromáticas dos elementos dentários.^{2,30} No entanto, este procedimento pode causar efeitos adversos irreversíveis sobre o tecido pulpar, além de acarretar danos a morfologia estrutural do esmalte, podendo causar microporosidades, aumento da rugosidade e diminuição da dureza.^{4-7,10-12}

Pesquisas realizadas revelam que os efeitos adversos sobre os tecidos dentários estão diretamente relacionados com o tempo de aplicação (em média 45 minutos) dos géis clareadores de alta concentração (30-40%), utilizados na terapia clareadora de consultório.^{6,8,10} Desta forma, com o intuito de manter o sucesso estético alcançado pela utilização de géis com altas concentrações e proporcionar maior segurança, o presente estudo, realizou terapias testes com a redução do tempo de aplicação do gel a base de H₂O₂ para 15', sobre o esmalte previamente recoberto ou não, com biomateriais poliméricos experimentais Scaffold (ScP) e Primer Catalisador (PrCa) comparando-as com a técnica convencional, todos associados a irradiação de LEDs Violeta, que tem sido amplamente utilizado para acentuar o efeito clareador.^{23,24}

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e policaprolactona (PCL) são polímeros que têm sido amplamente utilizados na preparação de biomateriais por serem biodegradáveis, atóxicos e biocompatíveis.^{31,32} Além disso, a enzima peroxidase (HRP) tem sido amplamente utilizada devido ao seu potencial catalisador e capacidade intensificar a eficácia clareadora. Esses produtos foram usados para preparar os biomateriais utilizados neste estudo, ScP e PrCa, que catalisam e limitam a difusão de H₂O₂ para gerar espécies reativas mais potentes, acentuando a efetividade clareadora, além de diminuir a quantidade de moléculas residuais de H₂O₂ (free-H₂O₂), que não reagiram com os cromóforos e são altamente tóxicas ao tecido pulpar e exercem efeito deletério sobre as estruturas morfológicas do esmalte.^{10,18,19,22}

Neste estudo in vitro, as análises superficiais da microdureza e

rugosidade, mostraram que o grupo GL45 com protocolo convencional de 45' minutos de exposição ao HP35% associado a irradiação de luz, foi capaz de provocar redução significativa de microdureza e aumento da rugosidade superficial. Esses dados corroboram com os estudos feitos por Pimenta-Dutra *et al.*³³ e Pinto *et al.*³⁴, no qual, demonstraram que os elementos dentários quando submetidos ao tratamento clareador com géis de alta concentração por maior tempo de exposição, causam alterações significativas na superfície do esmalte, alterando a dureza e rugosidade. Um dos fatores mostrados na literatura responsáveis por essas modificações na estrutura superficial do esmalte são a composição dos géis clareadores e presença de pH ácido que, quando associados a um maior tempo de aplicação, resultam em maiores alterações.³³ Isso pode-se confirmar no presente estudo, pois, quando foi reduzido o tempo de aplicação para 15' no grupo GL15 os impactos sobre a estrutura superficial do esmalte foram menores, enquanto que a utilização dos bioprodutos ScP e PrCa associados a redução do tempo de aplicação para 15' resultaram em alterações mínimas.

Em contrapartida, as pesquisas realizadas por Manzoli *et al.*³⁵ não revelaram alterações significativas na microdureza e rugosidade superficial do esmalte clareado com HP35%. Porém, esses resultados podem estar relacionados ao protocolo utilizado para o tratamento clareador, no qual, foi empregado redução do tempo de aplicação para 30' e em apenas duas sessões de clareamento, tendo em vista que o tempo de exposição e a duração das sessões é um requerimento que influencia tanto a eficácia como os efeitos adversos do procedimento clareador. Titley, Torneck e Smith³⁶ sugerem que quanto maior o tempo de exposição aos agentes clareadores, maiores são as alterações estruturais e formação de porosidade, além disso, considera que o calor gerado durante o processo de clareamento associado a irradiação da luz, pode levar a solubilização do esmalte e potencializar os danos na morfologia estrutural.

Já os resultados de microdureza interna analisados expressaram diferenças estatísticas entre os grupos e em todas as profundidades analisadas. No entanto, o grupo GL45 apresentou valores mais pronunciados de redução da microdureza interna quando comparado aos demais grupos e em relação ao grupo controle, no qual, não recebeu o tratamento clareador. Os valores foram diferentes até a profundidade 30µm e, a partir da profundidade de 60µm, não foram detectadas

alterações significativas. Pesquisas realizadas por Borges *et al.*³⁷ e Cavalli *et al.*³⁸ também revelaram alterações significativas na microdureza transversal do esmalte clareado com peróxido de hidrogênio 35 % pelo protocolo convencional de 45', corroborando com os achados do presente estudo. Tal efeito, pode ser explicado pelo maior tempo de exposição ao HP35%, pois ao analisar o grupo GL15, o efeito adverso sobre a microdureza interna do esmalte foi menos significativo. Adiante, o grupo GSPL não apresentou valores significativos de redução da microdureza transversal, com valores estatisticamente muito semelhantes ao grupo C.

Portanto, pode-se afirmar que, a utilização do protocolo com os biomateriais Spc e PrCa no grupo GSPL, resultou nos maiores valores de microdureza superficial e interna e menores valores de aumento da rugosidade após as sessões de clareamento comparado aos demais grupos, demonstrando que não causou alterações significativas na morfologia estrutural do esmalte, com valores muito semelhantes ao grupo Controle, enfatizando mais uma vez a plausibilidade da técnica utilizando o Scaffold e Primer Catalisador.

Outra variável avaliada neste estudo, foi a capacidade de alteração cromática. Ao analisar os dados de ΔE , todos os grupos diferiram entre si estatisticamente, mas apresentaram médias muito semelhantes entre si ($p < 0.05$). Ainda demonstraram mudanças de cor gradativas e contínuas até a terceira sessão de clareamento, com exceção do grupo controle. O grupo GL15, em que permaneceu por menor tempo com o gel clareador (HP35%), apresentou os menores valores de ΔE comparados aos grupos GL45 e GSPL ao longo das sessões de clareamento, mas teve aumento gradativo de ΔE ao longo das sessões. Esses resultados corroboram com os de Kose *et al.*³⁹, no qual se verificou que o grupo clareado com HP35% por 15' demonstrou os valores de ΔE reduzidos em relação aos grupos clareados por maior tempo.^{36,40}

Do mesmo modo, foi possível observar neste estudo que o grupo GL45 no qual os dentes ficaram expostos ao HP35% por um tempo total de 45', revelou as maiores diferenças estatísticas em relação aos demais grupos, com maiores valores de alterações de cor e que foram tornando-se mais pronunciadas ao longo das sessões de clareamento. Contudo, pode-se verificar que a utilização do Scaffold e Primer Catalisador com redução do tempo de aplicação para 15', apresentou eficácia de ΔE muito semelhantes à técnica convencional (GL45) com valores

gradativamente altos de alteração de cor ao longo dos tratamentos realizados, resultados que também foram constatados pelos estudos realizados por Ortecho-Zuta *et al.*²² Com isso, é possível atestar que mesmo ao reduzir o tempo de aplicação do gel clareador para 15', ao utilizar os bioprodutos pode-se obter excelente eficácia clareadora, uma vez que a catálise dos produtos do H₂O₂ deve proporcionar um efeito clareador semelhante ao da terapia convencional, com rápida degradação das moléculas residuais do H₂O₂, de modo que limite os efeitos adversos a estrutura interna e superficial do esmalte ao mesmo tempo que promove excelente eficácia branqueadora.²²

Neste mesmo contexto, o índice de clareamento de Wid apresentou os mesmos resultados que as ΔE para todos os grupos analisados. No entanto, apesar das diferenças estatísticas observadas, ao analisar os valores das médias entre os grupos, constatou-se que as médias foram muito semelhantes ($p < 0.05$) tanto ΔE como para Δwid . Além disso, um ponto importante ao analisar os resultados é considerar os parâmetros de perceptibilidade (capacidade de detectar diferença de cor visível entre dois valores) e aceitabilidade (diferença inaceitável do ponto de vista clínico). Neste estudo, os valores de ΔE foram avaliados de acordo com os parâmetros estabelecidos por Paravina *et al.*,⁴¹ no qual, determinou-se como limite de perceptibilidade o valor de (1,2) e de aceitabilidade o valor de (2,7). Já para o ΔWid , os resultados foram analisados segundo Yang *et al.*,⁴² que estabeleceu como limite de perceptibilidade o valor de (0,72) e para aceitabilidade (2,62). De acordo com esses dados, na primeira (T1) e segunda sessão clareadora (T2) as diferenças entre os grupos GL45 e GSPL estiveram dentro dos limites de perceptibilidade e aceitabilidade de ΔE , no entanto, na terceira (T3) sessão e tempo controle (T4) os valores ultrapassaram os limites aceitáveis. Já o grupo GL15 ultrapassou os limites de perceptibilidade e aceitabilidade em comparação aos demais grupos e em todos os tempos analisados. Ao examinar os padrões para Δwid , em T1 o grupo GL45 ultrapassou os limites de perceptibilidade e aceitabilidade em relação ao grupo GSPL. Contudo, em T2, T3 e T4, as diferenças foram perceptíveis, porém aceitáveis. Enquanto isso, o grupo GL15 demonstrou valores que ultrapassaram os limites de perceptibilidade e aceitabilidade acerca dos demais grupos e em todos os tempos observados.^{41,42}

Para as análises de difusão trans-amelodentinária, é importante salientar

que a sensibilidade dentária e o estresse oxidativo do tecido pulpar compõem outros importantes efeitos adversos relacionados à penetração das espécies reativas no complexo dentino-pulpar. Sabe-se que quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entra em contato com os tecidos dentários, este libera as espécies reativas de oxigênio (EROS), que possuem baixo peso molecular e rápida difusão para os tecidos. Ao reagirem com as moléculas cromóforas proporcionam a aparência mais clara ao dente. Além disso, o H_2O_2 libera moléculas residuais denominadas free- H_2O_2 que possuem alto poder de difusão por todas as estruturas dentárias, chegando facilmente à polpa e por ser uma espécie reativa tóxica, causa danos às células pulpares. Marson *et al.*⁴³ relatou que este fenômeno da difusão interna do H_2O_2 está diretamente relacionado à concentração do H_2O_2 no gel clareador, assim como o tempo em que o esmalte fica exposto a este produto.

No presente estudo, constatou-se na análise de difusão do H_2O_2 que, todos os grupos diferiram do grupo controle e diferiram entre si. O grupo GL45, com maior tempo de aplicação do HP35%, resultou nos maiores valores de difusão do H_2O_2 , quando comparados aos demais grupos analisados. Esses resultados são ratificados com os estudos realizados por Soares *et al.*⁴⁰ em que os grupos que permaneceram por maior tempo exposto ao HP35% (45') apresentaram os valores mais significativos, enquanto os grupos com menor tempo de aplicação do HP35% resultaram em valores reduzidos de difusão e, conseqüentemente, menores efeitos citotóxicos às células pulpares. Na pesquisa *in vitro* realizada por Ortecho-Zuta *et al.*²², foi relatado que a utilização do Scaffold e Primer Catalisador associados a redução do tempo de aplicação para 15' atenuaram a citotoxicidade sobre o tecido pulpar. Nesta conjunção, o grupo GSPL destacou-se com baixos valores de difusão, o que demonstra que a aplicação do Scaffold e Primer Catalisador atuaram como uma barreira de proteção impedindo a alta difusão do H_2O_2 pelos tecidos.

Além disso, o alto poder reativo e potencial oxidativo das free- H_2O_2 , podem causar aumento da permeabilidade dos tecidos e quando presentes nas estruturas mineralizadas do esmalte, essas moléculas levam a dissolução da matriz orgânica e como conseqüência pode haver o rompimento da matriz proteica e conseqüente perda do mineral cristalino que estava envolto por essa matriz, resultando dessa forma, em uma redução da dureza, microporosidades e possível degradação do esmalte dentário.¹⁵ O presente estudo revelou que o tratamento

clareador a base HP35% associado a luz de LED altera a estrutura interna do esmalte, não se limitando apenas às alterações superficiais. Devido ao baixo peso molecular, o H_2O_2 pode penetrar no esmalte sendo capaz de chegar à subsuperfície, onde o conteúdo orgânico é maior e as moléculas free- H_2O_2 podem exercer de forma mais intensa seu efeito oxidativo, causando também alterações na morfologia interna esmalte.⁴⁴

Assim, todas as hipóteses nulas deste estudo foram negadas, uma vez que, o uso dos bioprodutos Scaffold e Primer Catalisador revelaram ser altamente eficazes para as alterações de cor, além de atuar como uma barreira impedindo a alta difusão do peróxido de hidrogênio pelos tecidos e protegendo contra os efeitos adversos provocados pelas terapias clareadoras sobre a morfologia estrutural superficial e interna do esmalte.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, a utilização dos bioprodutos inovadores Scaffold e Primer Catalisador com protocolo de aplicação do peróxido de hidrogênio por 15 minutos associados a luz de LED não promoveram alterações significativas na rugosidade e microdureza superficial e interna. Além disso, apresentaram baixa difusão do H_2O_2 e excelentes resultados de alteração cromática e índice de clareamento, muito semelhantes à técnica de tratamento clareador convencional. Sendo possível constatar que o emprego desses bioprodutos proporcionaram resultados eficientes e mais seguros para a terapia clareadora.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 BARBOSA, D. C. *et al.* Comparative study of tooth whitening techniques in office and supervised at home in vital teeth: a literature review. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, v. 27, n. 3, p. 244-452, 2015.
- 2 FRANCCI, C. *et al.* Clareamento dental: técnicas e conceitos atuais. **Rev. APCD**, v.64, p.78-89, 2010.
- 3 BERGENDI, L. *et al.* Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life. Sci.**, v. 65, n. 18-19, p. 1865-1874, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00439-7).
- 4 YUSOF, E. M.; ABDULLAH, S. A.; MOHAMED, N. H. Influence of light and laser activation of tooth bleaching systems on enamel microhardness and surface roughness. **J. Conserv. Dent.**, v. 23, n. 5, p. 473, 2020. DOI: https://10.4103/JCD.JCD_509_20.
- 5 WIJETUNGA, C. L. *et al.* The effect of in-office bleaching materials with different pH on the surface topography of bovine enamel. **Dent. Mater. J.**, v. 40, n. 6, p. 1345-1351, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4012/dmj.2021-010>.
- 6 VILHENA, K. F. B. *et al.* Dental enamel bleached for a prolonged and excessive time: Morphological changes. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0214948, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214948>.
- 7 VIEIRA, I. *et al.* Effect of in-office bleaching gels with calcium or fluoride on color, roughness, and enamel microhardness. **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 12, n. 2, p. e116, 2020. DOI: <https://10.4317/jced.56006>.
- 8 GOLDBERG, M.; GROOTVELD, M.; LYNCH, E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. **Clin. Oral. Investig.**, v. 14, p. 1-10, 2010. DOI: [10.1007/s00784-009-0302-4](https://doi.org/10.1007/s00784-009-0302-4).
- 9 ARRUDA, A. M. *et al.* Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the de-remineralization process: an in situ study. **Oper. Dent.**, v. 37, n. 5, p. 518-525, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2341/11-112-L>.

10 ACUÑA, E. D. *et al.* 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.**, v. 34, n. 2, p. 322-327, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jerd.12453>.

11 OLIVEIRA DUQUE, C. C. *et al.* Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. **Oper. Dent.**, v. 45, n. 6, p. 632-642, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2341/19-013-L>.

12 BENETTI, F. *et al.* Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: effects of the dental bleaching in pulp. **Arch. Oral Biol.**, v. 81, p. 103-109, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.013>.

13 SOARES, D. G. *et al.* Mineral loss and morphological changes in dental enamel induced by a 16% carbamide peroxide bleaching gel. **Braz. Dent. J.**, v. 24, p. 517-521, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302225>.

14 SPALDING, M. **Estudo 'in vitro 'do aspecto morfológico da superfície do esmalte e alteração na permeabilidade dentária após a clareação.** 2000. 140 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, Bauru, 2000.

15 SOUSA, J. D.; ARCURI, T. **O efeito dos agentes clareadores na microdureza e rugosidade superficial do esmalte dental humano.** 2020. 6 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Faculdade de Odontologia, Brasília, 2019.

16 LANCASTER, L. *et al.* Enzyme colocalization in protein-based hydrogels. **Methods Enzymol.**, v. 617, p. 265-285, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.12.006>.

17 SATO, S.; NAKAMURA, K.; NAKAMURA, H. Horseradish-peroxidase-catalyzed tyrosine click reaction. **Chem. Bio. Chem.**, v. 18, n. 5, p. 475-478, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.201600649>.

18 SOARES, D. G. *et al.* Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 27, p. e20180453, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0453>.

19 ORTECHO-ZUTA, U. *et al.* Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity. **Oper. Dent.**, v. 44, n. 4, p. 414-423, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2341/17-276-L>.

20 DABOUIAN, A. *et al.* β -Carotene: a natural osteogen to fabricate osteoinductive electrospun scaffolds. **RSC Adv.**, v. 8, n. 18, p. 9941-9945, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7RA13237A>.

21 ORTECHO-ZUTA, U. *et al.* Polymeric biomaterials maintained the esthetic efficacy and reduced the cytotoxicity of in-office dental bleaching. **J. Esthet. Restor. Dent.**, v. 33, n. 8, p. 1139-1149, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jerd.12805>.

22 ORTECHO-ZUTA, U. *et al.* Strategy for reducing cytotoxicity and obtaining esthetic efficacy with 15 min of in-office dental bleaching. **Clin. Oral. Investig.**, v. 26, n. 5, p. 4099-4108, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04379-z>.

23 GALLINARI M. O. *et al.* A new approach for dental bleaching using violet light with or without the use of whitening gel: study of bleaching effectiveness. **Oper. Dent.**, v.44, n.5, p.521-529; 2019. DOI: <https://doi.org/10.2341/17-257-L>.

24 GALLINARI M. O. *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. Photodyn. Ther.**, v 30, p. 101679, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101679>.

25 BRISO, A. L. F. *et al.* In vitro evaluation of surface roughness and microhardness of restorative materials submitted to erosive challenges. **Oper. Dent.**, v. 36, n. 4, p. 397-402, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2341/10-356-L>.

26 OLIVEIRA, L. C. Wear, roughness and microhardness analyses of single increment restorative materials submitted to different challenges in vitro. **Eur. Arch. Paediatr Dent.**, v.22, n.2, p.247-255. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40368-020-00554-6>.

27 SANTOS, P. H. *et al.* Effect of whitening and desensitizing dentifrices on composite surfaces treated with surface sealants. **J. Investig. Clin. Dent.**, v. 4, n. 2, p. 101-106, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jicd.12004>.

- 28 ESTEVES, L. M. B. *et al.* Effect of bleaching gel volume on color change and postoperative sensitivity: a randomized clinical study. **Clin. Oral. Investig.**, v.26, n.3, p.2527-2536, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-021-04220-z> .
- 29 BRISO, A. L. F. *et al.* Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. **Braz. Dent. J.**, v. 26, p. 135-140, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300225>.
- 30 MENDES, J. F. *et al.* clareamento dental-verificação da eficácia, estabilidade de cor e nível de sensibilidade. **Arch. Health. Investig.**, v. 11, n. 1, p. 64-73, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v11i1.5457>.
- 31 SAKO, K. *et al.* Influence of water soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. **J. Control. Release**, v. 81, n. 1-2, p. 165-172, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00067-6).
- 32 SANTORO, M. S. *et al.* Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 107, p. 206-212, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.019>.
- 33 PIMENTA-DUTRA, A. C. *et al.* Effect of bleaching agents on enamel surface of bovine teeth: A SEM study . **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 9, n. 1, p. e46, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4317/jced.53011>.
- 34 PINTO, C. F. *et al.* Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. **Braz. Oral. Res.**, v. 18, p. 306-311, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-83242004000400006>.
- 35 MANZOLI, T. M. *et al.* Microstructural effect of different concentrations of hydrogen peroxide photoactivated with LED/laser. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 42, p. 103613, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103613>.
- 36 TITLEY, K.; TORNECK, C. D.; SMITH, D. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphology of human tooth enamel. **J. Endod.**, v. 14, n. 2, p. 69-74, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(88\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(88)80004-9) .
- 37 BORGES, A. B. *et al.* Influence of potentially remineralizing agents on bleached enamel microhardness. **Oper. Dent.**, v. 34, n. 5, p. 593-597, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2341/08-081-L>.

38 CAVALLI, V. *et al.* Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. **J. Appl. Oral. Sci.**, v. 26, p. e20170589, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0589>.

39 KOSE, C. *et al.* Comparison of the effects of in-office bleaching times on whitening and tooth sensitivity: a single blind, randomized clinical trial. **Oper. Dent.**, v. 41, n. 2, p. 138-145, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2341/15-085-C>.

40 SOARES, D. G. *et al.* Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. **J. Dent.**, v. 42, n. 2, p. 185-198, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>.

41 PARAVINA, R. D. *et al.* Color difference thresholds in dentistry. **J. Esthet. Restor. Dent.**, v. 27, p. S1-S9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jerd.12149>.

42 YANG, X. *et al.* Time-dependent efficacy and safety of tooth bleaching with cold plasma and H₂O₂ gel. **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02601-8>.

43 MARSON, F. C. *et al.* Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. **Odontol. Oper.**, v. 40, n. 1, p. 72-79, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2341/13-270-L>.

44 HEGEDÜS, C. *et al.* An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. **J. Dent.**, v. 27, n. 7, p. 509-515, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(99\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(99)00006-8).

ANEXOS

ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeito de bioprodutos catalizadores e do Led Violeta na alteração cromática e na sensibilidade produzidas pelo tratamento clareador – estudo in vitro**", Processo FOA nº 0191-2022, sob responsabilidade de André Luiz Fraga Briso apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Abril de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 09 de Maio de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Junho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effect of catalyst bioproducts and Led Violet on chromatic change and sensitivity produced by the bleaching treatment – in vitro study**", Protocol FOA nº 0191-2022, under the supervision of André Luiz Fraga Briso presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 25, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 09, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 09, 2023.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator