



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

MARIANA TAKATU MARQUES

**Eficácia estética, difusão e citotoxicidade trans-amelodentinária de
uma formulação de gel clareador para uso profissional contendo
trimetafosfato e fluoreto**

Araçatuba
2023

MARIANA TAKATU MARQUES

**Eficácia estética, difusão e citotoxicidade trans-amelodentinária de
uma formulação de gel clareador para uso profissional contendo
trimetafosfato e fluoreto**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba
2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que são com certeza o grande motivo por eu ter chegado até aqui. Papai e mamãe, vocês sempre foram e sempre serão minha força e meus exemplos, obrigada por todo apoio e dedicação para que esse sonho pudesse ser realizado. Minhas irmãs, vocês são parte essencial da minha trajetória, agradeço por estarem sempre comigo nas minhas conquistas e também nas dificuldades que encontrei ao longo da caminhada.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Á Deus,

Por ter me dado força e sabedoria para chegar até aqui. Por ser meu amigo nos momentos difíceis e não ter me permitido desistir diante das tempestades. Não tenho palavras que possam exprimir a gratidão por ser chamada filha do Deus vivo e ter meus passos sempre guiados pela tua vontade. Obrigada senhor, por toda dádiva na minha vida.

Ao meu pai, Eliones Marques,

Ao senhor, toda a minha gratidão. Obrigada por todo conselho, amor e carinho e principalmente todo esforço para que eu pudesse hoje, estar concluindo um curso superior. Obrigada por sempre me oferecer o melhor e se preocupar comigo como ninguém. Eu te amo, te admiro e te honro.

Á minha mãe, Luciana Takatu,

À senhora, minha amiga e companheira, agradeço por me ajudar a ser quem sou hoje. Obrigada por ser meu escudo e minha âncora quando eu mais precisei e por sempre ter me incentivado a correr atrás dos meus objetivos. Eu te amo muito.

Ás minhas irmãs, Polyana e Lorraina Takatu,

Deus não poderia ter me concedido melhores irmãs. Sempre seremos nós três, não importa o que aconteça. Que Deus conceda nas suas vidas muitas bênçãos e recompense todo carinho e suporte que recebo de vocês, minha irmã mais velha e minha caçula . Sempre estarei presente por vocês, e unidas , iremos longe.

Á minha avó Eleuza Santos, em memória,

Vovó, não tenho palavras para expressar tudo que a senhora representa na minha vida. Que privilégio o meu ter aprendido tanto e recebido tanto o seu amor. Nos separamos fisicamente, mas tudo que vivemos ficará para sempre no meu coração. Que a senhora de onde estiver, possa olhar por mim e que a realização do meu sonho seja também a sua realização. Te amo eternamente.

Á minha avó, Olga Takatu,

Bá, à senhora, todo meu amor e agradecimento por todos os momentos e dedicação de sempre. Obrigada pelas orações, pela preocupação e por sempre fazer o melhor por nossa família. Te amo.

À minha família,

Em especial à minha tia Lucila, que sempre me amparou e é como uma segunda mãe para mim. Minhas primas, primos e tios, também os agradeço por juntos formarem uma base forte para que eu alcançasse um dos grandes sonhos da minha vida. Sou abençoada demais por ter vocês.

À minha amiga Thaynara Batista,

À você agradeço amiga, por todos os momentos em que estive presente, e posso dizer que em quase todos eventos marcantes você esteve do meu lado. Obrigada por me ajudar nas minhas batalhas, mesmo que do seu jeitinho doido, e por todo esforço que já fez por mim. Você com certeza tem parte nas minhas vitórias. Amo você.

Às minhas amigas de infância Jordanna, Mayane e Oxana,

À vocês minhas amigas, agradeço por todo companheirismo e momentos que vivemos juntas desde tão pequeninhas. Independente do tempo, sei que sempre estaremos torcendo umas pelas outras. Vocês fazem parte da minha história e mesmo longe, foram cruciais no decorrer desses anos. Amo vocês.

Às minhas amigas da faculdade Gabriella de Farias, Gabriela Baccaro, Monara e Lauriene,

Sem vocês com certeza minha jornada acadêmica teria sido mais difícil. Sou grata por de alguma maneira terem contribuído na minha trajetória até aqui. Com vocês aprendi, desaprendi, chorei e desfrutei de momentos que ficarão para sempre guardados. Vocês são especiais demais e sei que juntas transformaremos muitas vidas nessa profissão tão maravilhosa que escolhemos.

Aos meus amigos Doany, Júlia, Samyra, Milena, Luciana, Bruno e Ritipael,

Obrigada por fazerem meus dias mais leves e felizes! O companheirismo de vocês foi essencial para minha chegada até aqui. Dizem que existem anjos em forma de amigos, e acho que é isso que vocês são para mim. “A amizade duplica nossas alegrias e divide nossas tristezas.”

À banca examinadora,

Meu orientador professor Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Agradeço pela oportunidade de poder trabalhar neste departamento tão organizado, exemplar e maravilhoso de nossa faculdade. Obrigada por estar sempre pronto a ajudar. Saiba que nós alunos admiramos sua competência.

Professora Maria Cristina,

Sempre meiga, paciente e disposta a ensinar seus alunos da melhor forma possível. Obrigada por me inspirar professora! Você é uma pessoa admirável.

Ao meu amigo Gabriel Pereira Nunes,

Privilégio o meu poder ter um dos meus grandes amigos como banca. Não tenho nem palavras para te agradecer por tudo que faz por mim. Obrigada por me inserir no mundo da pesquisa, ter paciência e me proporcionar tantas conquistas que só foram possíveis com sua ajuda. Eu te admiro muito meu amigo, gratidão eterna a Deus por ter colocado você na minha vida. Conte sempre comigo.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba e minha turma 64,

Obrigada por me conceder uma formação de excelência e por todos funcionários e professores que passaram por mim e deixaram sua marca. Obrigada turma 64 por todas amizades, trocas e aprendizados em conjunto. Guardarei para sempre.

E a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão!

Epígrafe

“Sede fortes e corajosos; não temais nem vos espanteis
diante deles; porque o senhor teu Deus é o que vai convosco.
Não vos deixará nem vos desampará.”

Deuteronômio 31:6

MARQUES, M. T. **Eficácia estética, difusão e citotoxicidade trans-amelodentinária de uma formulação de gel clareador para uso profissional contendo trimetafosfato e fluoreto** . 2023. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos do gluconato de cálcio (CaGlu), fluoreto de sódio (NaF), trimetafosfato de sódio (TMP) e NaF/TMP quando adicionado a um gel clareador de peróxido de hidrogênio a 35% (H_2O_2) na mudança de cor, difusão e citotoxicidade transamelodentinal. Discos de esmalte/dentina bovina ($n = 216$) foram divididos de acordo com o gel clareador: 35% H_2O_2 ; 35% H_2O_2 + 0.05% NaF; 35% H_2O_2 + 0.25% TMP; 35% H_2O_2 + 0.05% NaF + 0.25% TMP; 35% H_2O_2 + 0.1% NaF + 1% TMP and 35% H_2O_2 + 2% CaGlu. Os géis clareadores foram aplicados três vezes (40 min/sessão) em intervalos de 7 dias entre cada aplicação. Em seguida, foram determinadas a alteração de cor, difusão transamelodentinária de H_2O_2 , viabilidade e morfologia celular (células MDPC-23 semelhantes a odontoblastos), atividade da fosfatase alcalina (ALP) e deposição de nódulos de mineralização. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todos os géis clareadores apresentaram mudanças de cor significativas após o tratamento ($p < 0,001$). A difusão de H_2O_2 foi menor para 35% H_2O_2 /0,1% NaF/1% TMP; 35% H_2O_2 /2% CaGlu, por sua vez, apresentaram valores superiores, em relação aos demais grupos ($p < 0,001$). A viabilidade celular ficou em torno de 9%, exceto para o gel clareador contendo 35% H_2O_2 /0,1% NaF/1% TMP com 12,8% ($p < 0,05$). ALP foi maior para os grupos TMP do que para outros géis clareadores ($p < 0,05$). A formação de nódulos de mineralização foi maior para os géis contendo NaF/TMP ou CaGlu ($p < 0,05$). As alterações da morfologia celular foram intensas para todos os géis clareadores. Concluiu-se que a adição de NaF/TMP no clareamento de consultório não interferiu na eficácia do clareamento e reduziu a difusão de H_2O_2 e a citotoxicidade trans-amelodentinária.

Palavra- chaves: Clareadores Dentários; Peróxidos; Fosfatos; Fluoreto de Sódio; Estética; Desmineralização Dentária.

.

TAKATU, M. T. **Esthetic efficacy, diffusion and trans-enamel dentinal cytotoxicity of a whitening gel formulation for professional use containing trimetaphosphate and fluoride.** 2023. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of calcium gluconate (CaGlu), sodium fluoride (NaF), sodium trimetaphosphate (TMP), and NaF/TMP when added to a 35% hydrogen peroxide (H_2O_2) bleaching gel on the color change, diffusion, and cytotoxicity trans-amelodentinal. Bovine enamel/dentin disks ($n = 216$) were divided according to the bleaching gel: 35% H_2O_2 ; 35% H_2O_2 + 0.05% NaF; 35% H_2O_2 + 0.25% TMP; 35% H_2O_2 + 0.05% NaF + 0.25% TMP; 35% H_2O_2 + 0.1% NaF + 1% TMP and 35% H_2O_2 + 2% CaGlu. The bleaching gels were applied thrice (40 min/session) at 7-day intervals between each application. Then, the color change, trans-amelodentinal diffusion of H_2O_2 , cell viability and morphology (MDPC-23 odontoblast-like cells), alkaline phosphatase activity (ALP), and deposition of mineralization nodules were determined. The data were submitted to ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). All bleaching gels showed significant color changes after treatment ($p < 0.001$). H_2O_2 diffusion was lower for 35% H_2O_2 /0.1% NaF/1% TMP; 35% H_2O_2 /2% CaGlu, meanwhile, showed higher values, compared to the other groups ($p < 0.001$). Cell viability was around 9%, except for the bleaching gel containing 35% H_2O_2 /0.1% NaF/1% TMP with 12.8% ($p < 0.05$). ALP was higher for TMP groups than other whitening gels ($p < 0.05$). The formation of mineralization nodules was greater for gels containing NaF/TMP or CaGlu ($p < 0.05$). The alterations of cell morphology were intense for all bleaching gels. It was concluded that the addition of NaF/TMP in-office bleaching did not interfere with bleaching efficacy, and reduced H_2O_2 diffusion and cytotoxicity.

Keywords: Demineralization; Cytotoxicity; Dental enamel; Fluoride; Phosphate; Dental bleaching

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Valores médios (SD) de difusão trans-amelodentinária de H₂O₂, de acordo os géis experimentais (n = 12).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –). Valores médios (DP) da alteração de: (A) grau de luminosidade (ΔL^*), (B) grau verde/vermelho (Δa^*), (C) grau azul/amarelo (Δb^*) e cor total (ΔE) pela Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) de acordo com os géis clareadores e o momento da análise (n=12). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença entre os géis clareadores em cada momento de análise e entre os momentos de análise para cada gel clareador (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Figure 2 – Gráficos representativos da porcentagem de viabilidade celular (A), atividade de fosfatase alcalina (B) e formação de nódulos de mineralização (C). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Figure 3 – Fotomicrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura ($\times 500$) dos grupos controle negativo e clareados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Design experimental	13
2.2 Formulação dos géis clareadores e grupos experimentais.....	13
2.3 Análise de alteração de cor.....	14
2.3.1 Seleção e distribuição de discos de esmalte/dentina.....	14
2.3.2 Preparo e pigmentação de discos de esmalte/dentina.....	14
2.3.3 Tratamento com gel clareador e medição de alteração de cor.....	14
2.4 Determinação da difusão transamelodentinária de H ₂ O ₂	15
2.5 Avaliação da citotoxicidade transamelodentinária de H ₂ O ₂	15
2.6 Análise estatística	17
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	20

1. Introdução

A odontologia atual tem sido fortemente afetada pela grande demanda estética, sendo o clareamento dental um dos procedimentos clínicos mais solicitados pelos pacientes. Esse tratamento pode ser realizado pela técnica caseira, que se caracteriza pela exposição diária a peróxidos de baixa concentração, ou pela técnica de consultório, que utiliza peróxidos altamente concentrados nos elementos a serem depurados (Jiang et al., 2008). Ambas as técnicas se baseiam na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, por sua extrema instabilidade, acabam reagindo e clivando os agentes cromóforos presentes na estrutura dentária, transformando-os em moléculas menores e tornando os dentes mais claros. Entretanto, o grande desafio do tratamento clareador é oferecer ao paciente uma técnica segura, rápida, confortável e satisfatória (Soares et al., 2014).

Alguns estudos relatam que agentes clareadores podem causar alterações na morfologia do esmalte (Xu et al., 2011 ; Kwon et al., 2002) e diminuição da dureza do esmalte (Torres et al., 2019 ; Ushigome et al., 2009). Além disso, o esmalte desmineralizado facilitaria a penetração das EROs, levando à sensibilidade dentária, uma vez que também pode atingir o complexo dentina-polpa (Torres et al., 2019 ; de Oliveira Duque et al., 2017), resultando em respostas inflamatórias , alterações celulares e possíveis danos pulpares (Soares et al., 2014 , 2015). Portanto, é fundamental buscar estratégias utilizando agentes remineralizantes, que, quando adicionados aos géis clareadores, podem de alguma forma reduzir ou minimizar a perda mineral e a sensibilidade dentária.

Novos agentes à base de fosfato com potencial remineralizante, associados ou não ao fluoreto de sódio (NaF), têm sido estudados. Podem ser fonte de cálcio ou fosfato (Torres et al., 2019), como cloreto de cálcio (CaCl_2), gluconato de cálcio (CaGlu) ou fosfato de cálcio amorfo (ACP), sem, no entanto, evidências claras para minimizar os efeitos colaterais dos agentes de branqueamento. Os outros agentes à base de fosfato atuam como uma barreira contra a difusão ácida e funcionam como nucleadores de fosfato de cálcio tipo apatita (Missel et al., 2016 ; Takeshita et al., 2016 ; Amaral et al., 2018 ; Neves et al., 2018), bem como os ciclofosfatos. O trimetafosfato de sódio (TMP) é um ciclotrifosfato que demonstrou ter grande efeito contra a desmineralização do esmalte (Takeshita et al., 2016 ; Emerenciano et al., 2018) quando associado a cremes dentais com baixo teor de flúor (Missel et al., 2016 ; Takeshita et al., 2016). Segundo estudos sobre desmineralização do esmalte, o TMP pode auxiliar na retenção mineral da hidroxiapatita, formando um cristal mais estável (Amaral et al., 2018). Portanto, seria válido avaliar se a adição de TMP a agentes clareadores com alta concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode inibir a perda mineral, a difusão transamelodentinária e o dano pulpar.

Com base em estudos anteriores (Missel et al., 2016), o TMP teria a capacidade de reduzir a difusão de íons H^+ para o esmalte, reduzindo a desmineralização, bem como se ligaria a ânions de H_2O_2 minimizando a relação dentina-polpa danos complexos. Entretanto, é necessário verificar se o TMP não reduziria a capacidade clareadora quando adicionado à H_2O_2 . Diante do exposto, conhecendo as boas propriedades do TMP e do NaF, seria interessante avaliar a formulação de um novo gel clareador para uso profissional com esses agentes, que visem potencializar o efeito inibidor na desmineralização do esmalte, mantendo a atividade clareadora do H_2O_2 .

Portanto, o presente estudo avaliou os efeitos do gluconato de cálcio (CaGlu), fluoreto de sódio (NaF), trimetafosfato de sódio (TMP) e NaF/TMP adicionados a um gel clareador de peróxido de hidrogênio (35% H_2O_2) na mudança de cor, difusão e citotoxicidade transamelodentinária. A hipótese nula do estudo foi que os géis clareadores contendo 35% de H_2O_2 e NaF/TMP ou CaGlu não apresentam diferença na promoção do efeito clareador e na redução da difusão e da citotoxicidade transamelodentinária em comparação com o gel clareador contendo apenas 35% de H_2O_2 .

2. Materiais e Métodos

2.1 . Design experimental

Discos de esmalte/dentina (5,7 mm de diâmetro $\times$ 3,5 mm de espessura) foram obtidos de dentes incisivos bovinos. Os discos foram limpos em água deionizada e armazenados em solução salina fisiológica contendo timol 0,1% a 4 °C (Borges et al., 2015). Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais gel clareador (n = 12/grupo) contendo 35% de H_2O_2 e NaF e/ou TMP. O tamanho da amostra de 12 discos de esmalte/dentina foi baseado em um estudo piloto, adotando a dureza superficial e transversal como desfechos primários, diferença média entre os grupos (10 e 2800, respectivamente), desvio padrão (4 e 1500, respectivamente). , um erro α de 5% e um erro β de 10%. Após a pigmentação dos discos de esmalte, os géis clareadores foram aplicados uma vez (40 min/sessão), a cada 7 dias, totalizando 3 sessões (21 dias). A alteração de cor foi analisada após a pigmentação, após a 1ª, 2ª e 3ª sessões de clareamento, e 7 e 14 dias após o clareamento.

2.2 . Formulação de géis clareadores e grupos experimentais

Os géis clareadores foram fabricados pela empresa Oralls - Innovation in Oral Health Company (São José dos Campos, SP, Brasil), sem pigmentação e acondicionados em seringas aplicadoras. Os componentes básicos dos géis foram compostos por espessante (12% Carbopol),

agente clareador (35% H_2O_2), glicerina e água (qs), e NaOH necessário para manter o pH de

aproximadamente 7,0. Dependendo do grupo experimental, 0,05% ou 0,1% de NaF e 0,25% ou 1% de TMP foram adicionados (Missel et al., 2016 ; Takeshita et al., 2016). Um gel clareador comercial contendo 35% de H_2O_2 e 2% de CaGlu, pH neutro (Whiteness HP Blue, FGM, Joinville, SC, Brasil), foi utilizado como controle positivo. Assim, foram definidos seis experimentais de gel clareador: 1) peróxido de hidrogênio 35% (35% H_2O_2); 2) 35% H_2O_2 + 0,05% NaF (35% H_2O_2 /0,05% NaF); 3) H_2O_2 a 35% + TMP a 0,25% (H_2O_2 a 35%/TMP a 0,25 %) ; 4) 35% H_2O_2 + 0,05% NaF + 0,25% TMP (35% H_2O_2 /0,05% NaF/0,25% TMP); 5) 35% H_2O_2 + 0,1% NaF + 1% TMP (35% H_2O_2 /0,1% NaF/1% TMP) e 6) 35% H_2O_2 + 2% gluconato de cálcio (35% H_2O_2 /2% CaGlu).

2.3 . *Análise de alteração de cor*

2.3.1 . *Seleção e distribuição de discos de esmalte/dentina*

Após a obtenção dos discos, foi realizada uma leitura inicial preliminar dos valores de cor, de acordo com a Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), que utiliza o sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$ (Borges et al., 2015 ; Sulieman e outros, 2003). Os discos de esmalte/dentina foram fixados em suportes de silicone preto com diâmetro de 5,7 mm e espessura de 3,5 mm, padronizando a incidência do feixe de luz no espectrofotômetro Visible Ultraviolet Reflection (Modelo UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão), com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação de 45/0°. As leituras foram realizadas na face do esmalte, definindo os valores iniciais $L^*a^*b^*$ dos discos esmalte/dentina como padrão neste experimento. Os discos foram divididos aleatoriamente (Excel, Microsoft Corporation, EUA) em 6 grupos experimentais (n = 12) com valores médios (DP) variando entre: $L^* = 62,72$ (2,95) e $65,01$ (1,18) ($p = 0,170$); $a^* = -1,21$ (0,28) e $-0,86$ (0,26) ($p = 0,087$); e $b^* = 5,02$ (1,50) e $6,10$ (1,24) ($p = 0,396$).

2.3.2 . *Pigmentação de discos de esmalte/dentina*

Para a pigmentação dos discos de esmalte/dentina, estes foram armazenados em microtubos (Kasvi K6-0150, 1,5 mL, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo 1 mL de infusão de chá preto em temperatura ambiente. A infusão foi feita com 1,6 g de chá preto (Chá Matte Leão, Curitiba, PR, Brasil) para cada 100 mL de água deionizada (Sulieman et al., 2003). O processo de pigmentação foi monitorado por 6 dias, e a infusão foi trocada diariamente. Em seguida, foi determinada a alteração de cor.

2.3.3 . *Tratamentos com gel clareador e medição de alteração de cor*

Após a pigmentação, os géis clareadores foram aplicados na superfície do esmalte (0,04 mL), por 40 min, utilizando uma seringa dosadora e um microbrush (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil). Durante 21 dias, foram realizadas 3 sessões de clareamento com intervalos de 7 dias. Os géis foram removidos com gaze, seguido de lavagem com água deionizada por 30 segundos. Entre as sessões de clareamento, os discos foram mantidos em recipientes plásticos individuais contendo 2 mL de saliva artificial (Borges et al., 2015) com a seguinte formulação: 1,5 mmol/L de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,9 mmol/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 150 mmol/L de KCl; em 0,1 mol/L de tampão cacodilato de sódio, pH 7,0 (Missel et al., 2016). A saliva artificial foi renovada todos os dias. A mensuração das cores foi realizada após a 1ª, 2ª e 3ª sessões de clareamento, bem como no 7º e 14º dias após o término do clareamento. Em seguida, foram calculadas as diferenças absolutas (Δ) das coordenadas de cor (L^* , a^* , b^*) entre o tempo de análise (pós-coloração, pós-sessões de clareamento e pós 7 e 14 dias) e os valores iniciais: ΔL^* (valor positivo indica mais luz; negativo indica mais escuro), Δa^* (positivo indica mais vermelho; negativo indica mais verde) e Δb^* (positivo indica mais amarelo; negativo indica mais azul). Para determinar a alteração total de cor entre as três coordenadas, foi utilizada a seguinte fórmula: $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (Borges et al., 2015 ; Sulieman et al., 2003).

2.4 . Determinação da penetração transamelodentinária de H_2O_2

Os discos de esmalte/dentina (n = 12/grupo) foram fixados ao compartimento superior da câmara pulpar artificial (APC) utilizando anéis de silicone e selados com cera rosa derretida nº 7 (Wilson®, Polidental, Cotia, SP, Brasil), com base no estudo de Trindade et al. (2009) . Os compartimentos inferiores das APCs, contendo a superfície da dentina , foram imersos em 1 mL de solução tampão de acetato de sódio (2,0 mol/L, pH 4,5 por ácido acético, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) colocados em 24 poços de placas de cultura celular (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) (Briso et al., 2014). Nessas condições e em ambiente úmido a 37°C, os géis clareadores foram aplicados uma vez conforme descrito anteriormente. Para determinar a quantidade de H_2O_2 na solução tampão, o Mottola et al. (1970) método colorimétrico foi usado. Após 30 min de clareamento, 1 mL de leucocristal violeta (0,5 mg/mL em HCl, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), 50 µL da enzima peroxidase de rábano (1 mg/mL em água, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e 3 mL de água deionizada (Briso et al., 2014). Uma curva padrão das concentrações de H_2O_2 (0,5–5,0 µg/mL) nas mesmas condições das amostras foi construída e as leituras foram feitas utilizando espectrofotômetro (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 596 nm.

2.5 . Avaliação da citotoxicidade transamelodentinária

Para avaliar a citotoxicidade transamelodentinária, 30.000 células/cm² da linhagem de células semelhantes a odontoblastos imortalizadas (MDPC-23) foram semeadas em cada poço de placas estéreis de 24 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e mantidos em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37 °C por 72 h (Trindade et al., 2009). Os ACPs contendo discos de esmalte/dentina (n = 5), foram previamente esterilizados por gás óxido de etileno (Trindade et al., 2009). Os géis clareadores foram aplicados conforme a análise da difusão trans-amelodentinária de H₂O₂, e após 30 min, 1 mL de meio de cultura contendo os componentes permeados do H₂O₂ foi adicionado à cultura de células semelhantes a odontoblastos previamente preparada. A análise da viabilidade celular (n = 5) foi realizada por meio do ensaio enzimático de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Sigma). As células foram incubadas por 4 h com solução de MTT (Sigma-Aldrich Corp.) a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, a absorbância dos cristais de formazan nas células viáveis foi avaliada em um leitor de microplacas ELISA (570 nm) (Tp Reader, Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China). A absorbância média do grupo controle negativo foi considerada com 100% de viabilidade celular e a porcentagem de viabilidade celular para os grupos clareados foi calculada com base neste parâmetro (Trindade et al., 2009).

Para determinação da atividade da fosfatase alcalina (ALP, Labtest Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG, Brasil), as células foram submetidas à lise celular com 150 µL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) durante 40 min. 50 µL das células lisadas, 100 µL de monofosfato de timolftaleína (22 mmol/L, pH 10,1) foi adicionado em banho-maria a 37 °C. Após adição do reagente corante (94 mmol/L de carbonato de sódio em 250 mmol/L de hidróxido de sódio), este reagiu com timolftaleína hidrolisada por fosfatase alcalina (Soares et al., 2013). Os valores de absorbância para ALP foram determinados no comprimento de onda de 570 nm (Synergy H, Biotek, Winooski, Vermont, EUA). Os valores de ALP foram normalizados pela proteína total medida nas amostras restantes adicionando 100 µL de solução reagente de Lowry (Sigma) por 20 min e 50 µL de solução reagente de fenol Folin (Sigma). Após 30 min, a absorbância no comprimento de onda de 655 nm sob uma curva padrão de proteína (13–100 µg/mL) foi determinada. Os valores da atividade de ALP foram expressos em mg de proteína e o percentual foi calculado considerando o grupo controle negativo como 100% de atividade.

A formação de nódulos de mineralização foi determinada após fixação das células em etanol 70% (4 °C por 1 h), banho-maria e incubação em Alizarin Red (40 mmol/L, pH 4,2; Sigma) por 15 min sob agitação. Após três instâncias de enxágue com água, uma solução de cloreto de cetilpiridina (10 mmol/L, solução tampão de fosfato-PBS, pH 7,0; Sigma) foi aplicada por 15 min

para produzir a dissolução do nódulo. A absorbância a 570 nm foi medida e a porcentagem foi

calculada conforme descrito anteriormente. Para análise da morfologia celular, as células foram desidratadas em uma sequência crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% 2×, 100%; 30 min cada) seguido de enxágue 3 vezes (20 min/enxágue) com 200 µL de 1,1,1,3,3,3-hexametildissilazano (HMDS 98%, ACROS Organics, New Jersey, NY, EUA). Em seguida, lamínulas foram montadas em stubs metálicos, mantidas em dessecador a vácuo por 72 h, revestidas por pulverização catódica com uma camada de ouro (Soares et al., 2013). A morfologia das células foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOLJMS-T33A Scanning Microscope, Tóquio, Japão) em ampliação $\times$ -500.

2.6.. *Análise estatística*

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® for Windows versão 12.0, com nível de significância de 5%. Para os dados de alteração de cor, foram considerados como fatores de variação os diferentes géis clareadores e a análise do tempo e, como variáveis, os parâmetros CIE: L^* , a^* , b^* e ΔE . Os dados foram heterogêneos e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para análise de difusão de H_2O_2 e avaliação de citotoxicidade, os valores foram considerados como variáveis, e os géis clareadores como fator de variação. Os valores foram homogêneos e foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

3. Resultados

O processo de pigmentação da amostra de esmalte reduziu a luminosidade ($p < 0,001$; Fig. 1 A), aumentou a cromatografia vermelha ($p < 0,001$) e amarela ($p < 0,001$) (Fig. 1 B–C), com grande aumento na diferença total de cor entre as coordenadas ($p < 0,001$; fig. 1 D) e sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Após a 1ª sessão de clareamento, o esmalte ficou mais claro ($p < 0,001$), menos vermelho ($p < 0,05$) e mais azulado ($p < 0,001$). Com a 2ª e 3ª sessões de clareamento, estabeleceu-se esmalte mais claro com baixo teor de vermelho e maior teor de azul, diferindo da 1ª sessão ($p < 0,001$). Isso se refletiu no aumento da alteração total da cor (Fig. 1D). A estabilidade cromática não diferiu estatisticamente após 7 e 14 dias da última sessão de clareamento ($p > 0,05$), exceto para o grupo 35% H_2O_2 / NaF 0,05% ($p < 0,05$).

O gel clareador contendo CaGlu apresentou os maiores valores de penetração transamelodentinária de H_2O_2 ($p < 0,001$) e 35% H_2O_2 /0,1% NaF/1% TMP levou aos menores ($p < 0,001$). Todos os grupos reduziram a viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina e a

formação de nódulos de mineralização em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). A

viabilidade foi em torno de 9% (Fig. 2 A), exceto para o gel clareador contendo 35% H_2O_2 /0,1% NaF/1% TMP com 12,8% ($p < 0,05$). A atividade da fosfatase alcalina (Fig. 2 B) foi maior para os grupos contendo TMP em comparação com outros géis clareadores ($p < 0,05$). A formação de nódulos de mineralização (Fig. 3C) foi maior para os géis contendo NaF/TMP ou CaGlu ($p < 0,05$). O número de células aderidas à lamínula teve grande redução para os grupos contendo 35% de H_2O_2 em comparação com o controle negativo (Fig. 3). Essa redução foi menor para os grupos contendo NaF/TMP; no entanto, as alterações da morfologia celular foram intensas para todos os géis clareadores (Fig. 3).

4. Discussão

É extremamente importante manter as propriedades funcionais e a eficácia clínica de um produto ao adicionar e/ou alterar sua composição química. A adição de NaF/TMP não alterou as propriedades clareadoras do gel de 35% H_2O_2 ; no entanto, reduziu a difusão e a citotoxicidade transamelodentinária de . Assim, a hipótese nula foi parcialmente rejeitada. Todos os géis clareadores, independentemente da adição de NaF, TMP, CaGlu ou associação NaF/TMP, mantiveram a capacidade clareadora do H_2O_2 , produzindo resultados clinicamente relevantes. O aumento nos valores ΔL^* (Fig. 1 A) e uma diminuição nos valores Δa^* e Δb^* (Fig. 1B-C) indica claramente a mudança de cor para branco e uma diminuição da tonalidade avermelhada e amarelada, produzindo o efeito de clareamento da estrutura dentária (Sagel e Gerlach, 2007). Esses resultados estão de acordo com Borges et al. (2015) para H_2O_2 a 35% . Para os pacientes, a satisfação com o clareamento está mais relacionada com variações na coordenada b^* do que a^* e L^* (Borges et al., 2015). Apesar de ser considerado menos importante no clareamento, no presente estudo o componente a^* apresentou grande variação, provavelmente devido à pigmentação produzida anteriormente. Nesse caso, a redução dos valores de a^* teve grande impacto na mudança total de cor.

Todos os géis produziram as mudanças mais pronunciadas na primeira sessão de clareamento. Esses achados estão de acordo com os de Kwon et al. (2002) , que também observaram um efeito de clareamento acentuado após a primeira sessão com 35% H_2O_2 e menos alterações cromáticas nas sessões subsequentes. Segundo Sun (2000) , isso ocorre porque as moléculas mais escuras reagem mais facilmente com os radicais livres, causando grande impacto visual mesmo na primeira aplicação do clareamento dental com agente altamente concentrado. Tão importante quanto a capacidade de clareamento, a manutenção da cor ou estabilidade cromática ao longo do tempo (7 dias e 14 dias após o clareamento) foi mantida para todos os géis clareadores. De acordo com Bizhang et al. (2007), a degradação da cor é mínima e linear ao longo do tempo, apresentando uma estabilidade de cor adequada ao longo de um pós-tratamento de 18

meses. A alteração da cor e sua manutenção ao longo do tempo é consequência da grande penetração do H_2O_2 nos prismas do esmalte e da reação com as moléculas cromóforas resultando em maior reflexão e menor absorção da luz (Kwon et al., 2002).

A presença de agentes remineralizantes nos géis clareadores, como cálcio (Torres et al., 2019) ou flúor (Torres et al., 2019) ou suas associações (Torres et al., 2019) podem reduzir a penetração de H_2O_2 . Reduzir a difusão do peróxido através do esmalte e da dentina pode levar a um efeito clareador menor, mas clinicamente perceptível a olho nu (Soares et al., 2014 ; Torres et al., 2019). O olho humano é capaz de perceber uma mudança na cor quando o valor ΔE é maior que 3,3. Assim, tanto o processo de pigmentação quanto o processo de iluminação realizados no experimento estavam dentro do limiar de percepção do olho humano. No entanto, valores de ΔE maiores que 3 indicariam um clareamento aceitável desde que associado a redução dos valores de $b \times$ e aumento dos valores de L^* (Paravina et al., 2015 ; Torres et al., 2019). Isso foi observado para todos os géis experimentais testados após as sessões de tratamento (Fig.1). Exceto após a pigmentação que, apesar de apresentar valores de ΔE maiores que 12, os valores de Δb^* positivo e ΔL^* negativo indicam esmalte escurecido. Apesar da redução na difusão de H_2O_2 nos grupos com TMP (Tabela 1), não foi possível verificar relação no efeito clareador (Fig.1). Essas reduções foram em torno de 14%–26%; metade do percentual observado no estudo de Soares et al. (2014) , quando houve menor efeito do raio. Ao contrário de estudos anteriores (Torres et al., 2019; Cavalli et al., 2018), a adição de cálcio e flúor não reduziu a difusão de H_2O_2 (Tabela 1). Provavelmente os melhores resultados com a adição de flúor são devidos a uma concentração maior (0,2%–1,1% NaF) (Cavalli et al., 2011, 2018) do que o do presente estudo (0,05% e 0,1% NaF).

Durante a difusão do agente clareador nos prismas do esmalte, os produtos da degradação do H_2O_2 (moléculas reativas de oxigênio e ânions de peróxido de hidrogênio) reagem não apenas com as moléculas cromóforas de cor escura, mas também com as moléculas orgânicas (como proteínas , lipídios e substâncias que mancham os dentes) e componentes inorgânicos do esmalte (Jiang et al., 2008). A remoção ou degradação da matriz protéica localizada entre os prismas do esmalte e os cristais de hidroxiapatita pode reduzir as propriedades mecânicas do esmalte (Jiang et al., 2008). Levando em consideração o que foi dito anteriormente, a adição de agentes remineralizantes aos géis clareadores deve ter como objetivo não apenas reduzir a desmineralização da hidroxiapatita, mas também minimizar a degradação do componente proteico do esmalte. No entanto, a difusão do H_2O_2 através do esmalte e da dentina é necessária para o efeito clareador, contudo o dano celular foi grave (Fig.2 , Fig.3). Mesmo a adição de 0,1% de NaF e 1% de TMP apresentando menor citotoxicidade quando comparada aos demais géis clareadores, a viabilidade celular foi reduzida em 87% (Fig.2A).

Embora o TMP mostre um potencial para reduzir a difusão de H_2O_2 , esse efeito fica muito

aquém do necessário para prevenir danos celulares. Isso indica uma grande difusão amelodentinária de H_2O_2 não degradado, principalmente devido ao longo tempo de aplicação e alta concentração de H_2O_2 , e estresse celular oxidativo induzido por subprodutos de H_2O_2 (Soares et al., 2014, 2015; de Oliveira Duque et al., 2017). Talvez concentrações de TMP acima de 3% e NaF acima de 0,2% ou o uso de TMP nanométrico possam aumentar ainda mais o potencial protetor dos géis clareadores. Isso ocorre porque o TMP é adsorvido, mas não penetra no esmalte, ligando-se aos grupos OH^- da hidroxiapatita (Amaral et al., 2018) formando um $\text{TMP-Ca}^{2+}\text{-PO}_4^-$ e/ou TMP- Camada de $\text{Ca}^{2+}\text{-F}$ sobre o esmalte (Neves et al., 2018). Com base nisso, a camada de TMP pode se ligar aos ânions (HO_2^- ; OH^-) e cátions (H^+) derivados da degradação do H_2O_2 , o que explica o efeito na redução da difusão de H_2O_2 , mas que é insuficiente para prevenir alterações na morfologia celular e na morte celular (Fig.3).

Além da viabilidade celular, o potencial regenerativo celular foi avaliado pela expressão de dois indicadores de diferenciação odontogênica: atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização (de Oliveira Duque et al., 2017). Com a adição de TMP a géis clareadores contendo 35% de H_2O_2 , a expressão desses marcadores foi maior, independentemente da concentração de flúor, quando comparada ao clareamento sem TMP (Fig.2 B e C). Esse resultado foi próximo ao encontrado com H_2O_2 a 10% quando aplicado por 45 min (de Oliveira Duque et al., 2017), embora relacionado às células que permaneceram viáveis (Fig.2A e Fig.3). Conforme descrito anteriormente, a capacidade regenerativa observada com a presença de TMP pode estar relacionada à menor difusão de H_2O_2 ; outra possibilidade teria sido uma penetração mais lenta nesses grupos e menor quantidade de subprodutos de H_2O_2 (espécies relativas de oxigênio) (Soares et al., 2014, 2015) retidos pelo TMP. Assim, as evidências científicas obtidas na presente investigação para o gel com as associações de TMP e NaF podem ser consideradas promissoras. Os géis clareadores avaliados apresentam-se como alternativas interessantes a serem testadas em futuras pesquisas clínicas, podendo resultar no surgimento de terapias clareadoras de consultório esteticamente viáveis e biologicamente compatíveis com o complexo dentino-polpa, de forma a reduzir efetivamente os efeitos colaterais dos dentes clareamento, aumentando a segurança do procedimento.

5. Conclusão

Levando em consideração os dados obtidos e as limitações do modelo experimental, podemos concluir que: (1) a adição de NaF/TMP ao gel clareador não interfere na eficácia clareadora; (2) a presença de TMP nos géis de H_2O_2 a 35% reduziu a penetração do trans-amelodentinal; (3) a viabilidade celular e a capacidade regenerativa foram maiores, principalmente o gel com NaF 0,1% e TMP a 1%.

Referências

- Amaral, J.G., Pessan, J.P., Souza, J.A.S., Moraes, J.C.S., Delbem, A.C.B., 2018. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 2553–2564. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34072>.
- Bizhang, M., Müller, M., Phark, J.H., Barker, M.L., Gerlach, R.W., 2007. Clinical trial of long-term color stability of hydrogen peroxide strips and sodium percarbonate film. *Am. J. Dent.* 20, 23A–27A, 19681255.
- Borges, A.B., Zanatta, R.F., Barros, A.C.S.M., Silva, L.C., Pucci, C.R., Torres, C.R.G., 2015. Effect of hydrogen peroxide concentration on enamel color and microhardness. *Operat. Dent.* 40, 96–101. <https://doi.org/10.2341/13-371-L>.
- Briso, A.L.F., Lima, A.P.B., Gonçalves, R.S., Gallinari, M.O., dos Santos, P.H., 2014. Transenamel and transdental penetration of hydrogen peroxide applied to cracked or microabraded enamel. *Operat. Dent.* 39, 166–173. <https://doi.org/10.2341/13-014-L>.
- Cavalli, V., Rodrigues, L.K., Paes-Leme, A.F., et al., 2011. Effects of the addition of fluoride and calcium to low-concentrated carbamide peroxide agents on the enamel surface and subsurface. *Photomed. Laser Surg.* 29, 319–325. <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2797>.
- Cavalli, V., Rosa, D., Silva, D., Kury, M., Liporoni, P., Soares, L., Martins, A., 2018. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. *J. Appl. Oral Sci.* 26 <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0589>, 0589.
- de Oliveira Duque, C.C., Soares, D.G., Basso, F.G., Hebling, J., de Souza Costa, C.A., 2017. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin. Oral Invest.* 21, 2509–2520. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>.
- Emerenciano, N.G., Delbem, A.C.B., Pessan, J.P., Nunes, G.P., Souza Neto, F.N., Camargo, E.R., Danelon, M., 2018. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch. Oral Biol.* 96, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.019>.
- Jiang, T., Ma, X., Wang, Y., Tong, H., Shen, X., Hu, Y., Hu, J., 2008. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering
- Kwon, Y., Huo, M., Kim, K., Kim, S., Kim, Y., 2002. Effects of hydrogen peroxide on

- the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J. Oral Rehabil.* 29, 473–477. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2002.00856.x>.
- Missel, E.M.C., Cunha, R.F., Vieira, A.E.M., Cruz, N.V.S., Castilho, F.C.N., Delbem, A.C. B., 2016. Sodium trimetaphosphate enhances the effect of 250 p.p.m. fluoride toothpaste against enamel demineralization in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* 124, 343–348. <https://doi.org/10.1111/eos.12277>.
- Mottola, H.A., Simpson, B.E., Gorin, G., 1970. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal. Chem.* 42, 410–411. <https://doi.org/10.1021/ac60285a017>.
- Neves, J.G., Danelon, M., Pessan, J.P., Figueiredo, L.R., Camargo, E.R., Delbem, A.C.B., 2018. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch. Oral Biol.* 90, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.03.008>.
- Paravina, R.D., Ghinea, R., Herrera, L.J., Bona, A.D., Igiel, C., Linninger, M., Sakai, M., Takahashi, H., Tashkandi, E., Perez, M.M., 2015. Color difference thresholds in dentistry. *J. Esthetic Restor. Dent.* 27, S1–S9. <https://doi.org/10.1111/jerd.12149>.
- Sagel, P.A., Gerlach, R.W., 2007. Application of digital imaging in tooth whitening randomized controlled trials. *Am. J. Dent.* 20, 7A–14A, 19681252. Soares, D.G., Basso, F.G., Hebling, J., Costa, C.A.S., 2014. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J. Dent.* 42, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>.
- Soares, D.G., Gonçalves Basso, F., Hebling, J., Souza Costa, C.A., 2015. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J. Dent.* 43, 750–756. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.12.006>.
- Soares, D.G., Ribeiro, A.P., Silveira-Vargas, F., Hebling, J., Souza Costa, C.A., 2013. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin. Oral Invest.* 17, 1901–1909. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0883-1>.
- Sulieman, M., Addy, M., Rees, J.S., 2003. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J. Dent.* 31, 415–422. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(03\)00069-1](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(03)00069-1).
- Sun, G., 2000. The role of lasers in cosmetic dentistry, *Dent. Clin. North. Am.* 44, 831–

- 850, 11048275. Takeshita, E.M., Danelon, M., Castro, L.P., Cunha, R.F., Delbem, A.C., 2016. Remineralizing potential of a low fluoride toothpaste with sodium trimetaphosphate: an in situ study. *Caries Res.* 50, 571–578. <https://doi.org/10.1159/000449358>.
- Torres, C.R.G., Zanatta, R.F., Silva, T.J., Borges, A.B., 2019. Effect of calcium and fluoride addition to hydrogen peroxide bleaching gel on tooth diffusion, color, and microhardness. *Operat. Dent.* 44, 424–432. <https://doi.org/10.2341/18-113-L>, 2019.
- Trindade, F.Z., Ribeiro, A.P.D., Sacono, N.T., Oliveira, C.F., Lessa, F.C., Hebling, J., Costa, C.A.S., 2009. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int. Endod. J.* 42, 516–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01544.x>.
- Ushigome, T., Takemoto, S., Hattori, M., Yoshinari, M., Kawada, E., Oda, Y., 2009. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface-cross-sectional analysis. *Dent. Mater. J.* 28, 315–323. <https://doi.org/10.4012/dmj.28.315>.
- Xu, B., Li, Q., Wang, Y., 2011. Effects of pH values of hydrogen peroxide bleaching agents on enamel surface properties. *Operat. Dent.* 36, 554–562. <https://doi.org/10.2341/11-045-1>.

Tabela 1 –Valores médios (SD) de difusão trans-amelodentinária de H₂O₂, de acordo os géis experimentais (n = 12).

Geis Clareadores	Variável
	H ₂ O ₂ (µg/mL)
35% H ₂ O ₂	8.83 ^a (0.64)
35% H ₂ O ₂ /0.05% NaF	8.83 ^a (0.32)
35% H ₂ O ₂ /0.25% TMP	7.57 ^b (0.56)
35% H ₂ O ₂ /0.05%NaF/0.25% TMP	7.91 ^b (0.54)
35% H ₂ O ₂ /0.1%NaF/1% TMP	6.52 ^c (0.73)
35% H ₂ O ₂ /2% CaGlu	10.01 ^d (0.26)

Letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferença estatística entre os géis clareadores em cada variável (teste de Student–Newman–Keuls, $p < 0,001$).

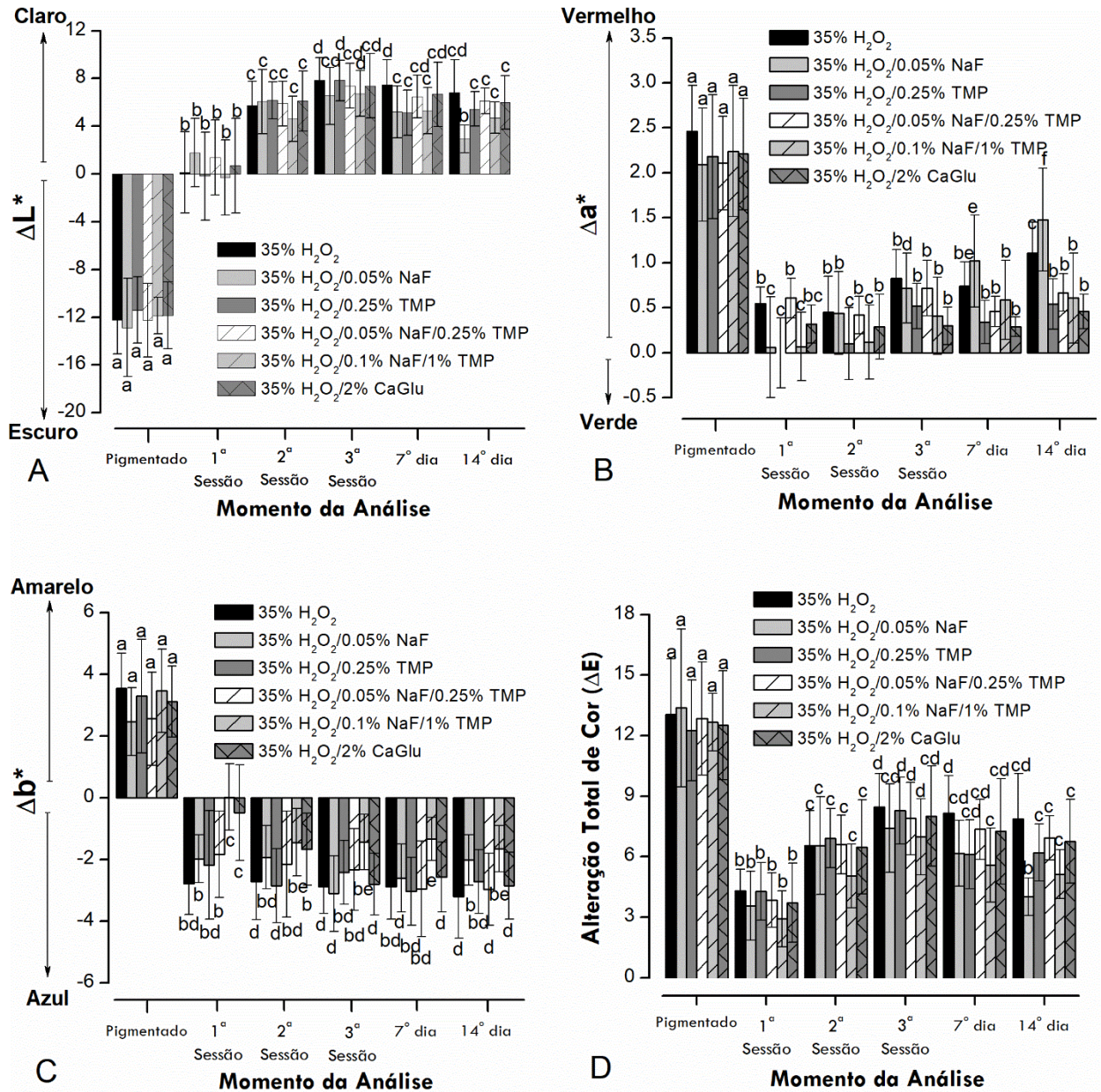


Figura 1 – Valores médios (DP) da alteração de: (A) grau de luminosidade (ΔL^*), (B) grau verde/vermelho (Δa^*), (C) grau azul/amarelo (Δb^*) e cor total (ΔE) pela Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) de acordo com os géis clareadores e o momento da análise (n=12). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença entre os géis clareadores em cada momento de análise e entre os momentos de análise para cada gel clareador (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

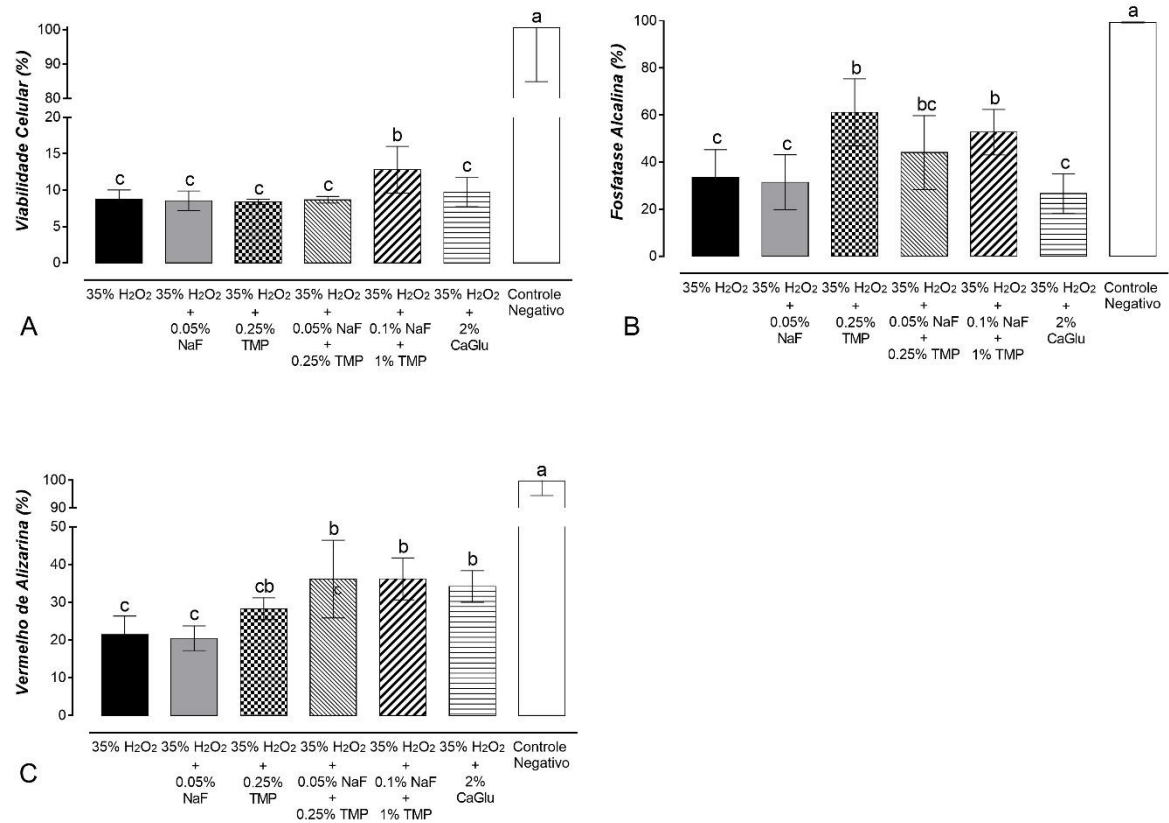


Figure 2 – Gráficos representativos da porcentagem de viabilidade celular (A), atividade de fosfatase alcalina (B) e formação de nódulos de mineralização (C). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

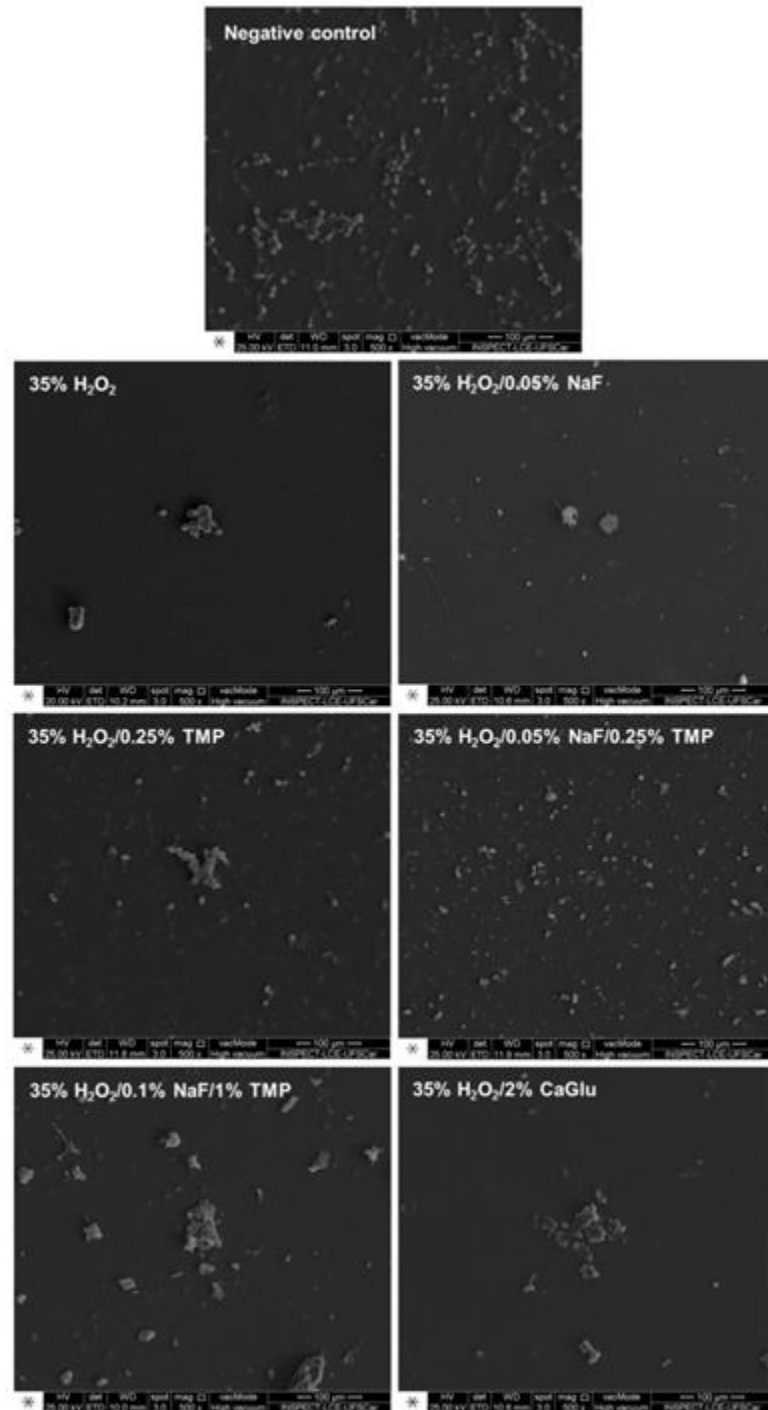


Figure 3 – Fotomicrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura ($\times 500$) dos grupos controle negativo e clareados.