

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/06/2023.



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



Uxua Ortecho Zuta

**Influência de um scaffold polimérico de nanofibras e de um primer
polimérico catalisador sobre a alteração de cor e citotoxicidade do
clareamento dental de consultório**

Araraquara

2021



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



Uxua Ortecho Zuta

**Influência de um scaffold polimérico de nanofibras e de um primer
polimérico catalisador sobre a alteração de cor e citotoxicidade do
clareamento dental de consultório**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral; na Área de Prótese.

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2021

O77i

Ortecho-Zuta, Uxua

Influência de um scaffold polimérico de nanofibras e de um primer polimérico catalisador sobre a alteração de cor e citotoxicidade do clareamento dental de consultório / Uxua Ortecho-Zuta. -- Araraquara, 2021

93 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

1. Clareamento dental. 2. Peróxido de hidrogênio - Toxicidade. 3. Odontoblastos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Uxua Ortecho Zuta

Influência de um scaffold polimérico de nanofibras e de um primer polimérico catalisador sobre a alteração de cor e citotoxicidade do clareamento dental de consultório

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Profa. Dra. Vanessa Cavalli Gobbo

3º Examinador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares

4º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

5º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 01 de Junho de 2021

DADOS CURRICULARES

Uxua Ortecho Zuta

NASCIMENTO	07/12/1987 - Iquitos/Loreto/Perú
FILIAÇÃO	Carlos Tercero Ortecho Guevara Sadith Elena Zuta de Ortecho
2005 - 2013	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - UNAP/PERÚ.
2015 - 2017	Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, curso de Mestrado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2016 - 2016	Estágio de Docência em Materiais Restauradores Diretos pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2016 - 2016	Estágio de Docência em Materiais Aplicados à Prótese I pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2017 - 2017	Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2017 - 2017	Estágio de Docência em Prótese Fixa Convencional e Sobre Implantes I pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2018 - 2018	Estágio de Docência em Prótese Fixa Convencional e Sobre Implantes II pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2018 - 2018	Estágio de Docência em Prótese Total I pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2019 - 2019	Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

A Deus,

Por ser meu guia, pela força e coragem para não desistir e seguir adiante durante toda esta longa caminhada; pelas oportunidades colocadas em minha vida; por colocar em meu caminho pessoas extraordinárias e por ter me ajudado a vencer os desafios encontrados.

Aos meus pais Carlos e Elena,

Com todo meu amor e gratidão dedico este trabalho a meus queridos pais. Vocês estão ao meu lado sempre, me apoiando incondicionalmente em todas minhas decisões e acreditando em mim. Vocês são meu exemplo e minha fonte de inspiração e admiração. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Badyr,

Por ser meu apoio; pelo amor e encorajamento para perseguir meus sonhos. Te amo muito!

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, muito obrigada por ter aberto as portas do laboratório e permitido que eu seja parte da equipe do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB), do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP. Sua presença foi extremadamente valiosa para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada professor pela paciência e pelo carinho!

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, muito obrigada pelas sugestões e por contribuir de maneira significativa com seu conhecimento, que foram essenciais no desenvolvimento deste projeto. Sinto muita admiração pela senhora, que além de ser uma professora e pesquisadora maravilhosa é um grande ser humano. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares**, agradeço a Deus por ter colocado a você no meu caminho. Muito obrigada pela confiança e pelo apoio. Para mim você é o exemplo de profissional, pesquisadora e pessoa. Muito obrigada!

Agradeço à **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, obrigada pelas contribuições e seu apoio no desenvolvimento desde o início deste trabalho. Além disso, agradeço a disponibilidade que sempre tive comigo.

Aos meus amigos de laboratório, **Maria Luíza, Igor, Carol, Fernanda, Isabela, Lais, Taísa, Marlon e Beatriz**, pelo companheirismo, pela ajuda, por terem sempre me auxiliado de diversas maneiras durante a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e convivência que tornaram os dias mais agradáveis.

Aos meus companheiros de pesquisa e amigos **Carla e Rafael**, com quem teve a oportunidade de trabalhar em nossos projetos, vocês foram parte fundamental para realização desse estudo. Muito obrigada pelo carinho, confiança, aprendizagem do dia a dia e por sempre me estar ajudando de diversas maneiras, sobretudo muito obrigada pela amizade.

Aos meus amigos **Danny e Eddy**, me ajudaram nos momentos que eu precisei. Obrigada pela amizade, por todos os momentos que vivemos juntos. A companhia de vocês foi muito fundamental neste período da minha vida. Muito obrigada por tudo!

A meus queridos amigos **Midian e Jorge**, considero a vocês parte da minha família. Obrigada por tornar meus dias mais agradáveis, pela companhia e pela amizade. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados que trouxe muita leveza ao dia a dia. Amo a vocês!

À minha amiga **Laura**, obrigada pela amizade, confiança, pelas caminhadas e parcerias em todos os momentos. Sua companhia nestes últimos anos foi fundamental. Muito obrigada por me ouvir e pelo carinho!

À minha família brasileira **Carla, Malu, Cristiane, Rafael, Lays, Roberto, Igor, Carol, Fernanda**, agradeço a Deus por me dar uma família neste país, com quem pude compartilhar inúmeros momentos da minha vida. Obrigada pela convivência do dia a dia, conversar, risadas, lealdade, pelos conselhos, apoio incondicional, amizade e cuidado. Amo muito vocês!

Ao meu querido **Danielito**, muito obrigada pelo apoio incondicional, pela sua ajuda em tudo momento, por sempre me estar dando as forças necessárias para continuar adiante, você mesmo que distante foi um ponto de apoio ao longo de todo período. Muito obrigada por tudo!

A meus amigos gringos **Jeffersson, Hernan, Paco, Victor, Patty, Nati, Carmelia e Ranulfo**, pela amizade, por tornar meus dias mais agradáveis. Obrigada por todos os momentos compartilhados. Amo a vocês!

Às minhas amigas, **Jessica, Irma e Amalia**, por permanecerem na minha vida durante todos esses anos desde a escola. Mesmo com distância, sempre seremos grandes amigas, é bom saber que sempre posso contar com vocês. As adoro meninas!

Às minhas amigas da graduação, **Karen A, Wendy, Mariela, Karen H, Maria** e ao meu querido amigo **Manuel**, nossa amizade nasceu pelo convívio e afinidade. Agradeço todos os momentos compartilhados que nos fizeram crescer como pessoas e profissionais. Adoro a vocês!

À família **Eléspuru Zuta**, muito obrigada a meus tios **Guido** e **Lilia** por tudo seu apoio e ajuda incondicional. A minha prima **Oriana** por sempre me estar motivando a persistir e ser cada dia melhor. Amo vocês!

À família **Rosario Guevara**, tios(as), primos(as) em especial a minha avó **Melanea**, pelo apoio e carinho. Obrigada por tudo!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)**, representada pelo DD. Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e pela DD. Vice-Diretora Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos permitiram minha formação profissional e pessoal neste período de Pós-Graduação.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr/UNESP**, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo seu coordenador Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde foi efetivada esta pesquisa.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**, A todos os professores e funcionários, agradeço pela disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo durante este período.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina e vice-coordenadora Profa. Dra. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves, por toda acessibilidade durante este período.

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, (CAPES) – Código de financiamento 88887.513642/2020-00.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/22739-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“É quando começa a compreender e dominar de verdade seus pensamento e emoções que você percebe como pode criar a sua própria realidade. É aí que mora a sua liberdade, é aí que mora todo o seu poder.”

Marci Shimoff

Ortecho-Zuta U. Influência de um scaffold polimérico de nanofibras e de um primer polimérico catalisador sobre a alteração de cor e citotoxicidade do clareamento dental de consultório [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver produtos poliméricos capazes de atuar como coadjuvantes no clareamento dental de consultório, acelerando a alteração de cor e reduzindo a citotoxicidade deste tipo de terapia profissional. Para isso, foi desenvolvido um scaffold polimérico de nanofibras (ScP) e um primer polimérico contendo a enzima horseradish peroxidase (PrP). Após avaliar os produtos poliméricos quanto sua caracterização, temperatura, pH e seus efeitos na cinética de degradação do H_2O_2 , a influência do uso individual ou associado do ScP e o PrP sobre a alteração de cor promovido pelo clareamento dental de consultório foi determinado em espectrofotômetro UV-Vis (ΔE). Para este teste, um gel com 35% de H_2O_2 foi aplicado por 3x15 min sobre discos de esmalte/dentina manchados artificialmente (n=8), sendo o esmalte previamente recoberto ou não com ScP e/ou PrP. Discos submetidos apenas ao clareamento de consultório ou não tratados foram usados como controles. Para o teste de citotoxicidade, esses mesmos procedimentos foram realizados sobre discos de esmalte/dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs). Os extratos (meio de cultura + componentes do gel que se difundiram pelos discos) foi recolhido e imediatamente aplicado por 60 minutos sobre células odontoblastóides MDPC-23. Então, a viabilidade (teste de MTT), morfologia (MEV) e estresse oxidativo (carboxy- H_2DCFDA) celular foram avaliados, sendo a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 quantificada (ensaio violeta leuco-cristal). Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA, complementado por Tukey, com nível de significância de 5%. O uso individual ou associado dos ScP e PrP aumentou a formação de radicais livres e radical hidroxila (HO^*), esses efeitos favoreceram a alteração de cor e diminuição da citotoxicidade dos tratamentos em comparação ao controle, onde apenas o gel clareador foi aplicado sobre o esmalte ($p < 0,05$), reduziu a difusão de H_2O_2 , bem como diminuiu o estresse oxidativo celular. Apesar dos melhores resultados gerais terem sido obtidos quando do uso integrado entre ScP e PrP, o procedimento clareador usando os produtos poliméricos ainda reduziu em

cerca de 34% a viabilidade das células MDPC-23. Assim, essa mesma estratégia de clareamento passou a ser avaliada em tempos mais curtos (30 e 15 minutos), porém com 3 sessões consecutivas de aplicação. Dentro desta condição, o gel clareador aplicado por 15 minutos sobre o esmalte revestido com ScP e PrP determinou alteração de cor semelhante ao clareamento convencional de consultório e citotoxicidade estatisticamente igual ao grupo onde nenhum tratamento foi realizado sobre os discos de esmalte/dentina (100% de viabilidade celular) ($p>0,05$). Assim, foi possível concluir que o revestimento do esmalte com o scaffold polimérico de nanofibras e o primer polimérico catalisador previamente a aplicação por 15 minutos do gel clareador com 35% de H_2O_2 , além de ter proporcionado alteração de cor semelhante ao clareamento convencional de consultório, também reduziu significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária causada pela técnica profissional.

Palavras-chave: Clareamento dental. Peróxido de hidrogênio – Toxicidade. Odontoblastos.

Ortecho-Zuta U. Influence of a nanofibers polymeric scaffold and a catalytic polymeric primer on the color change esthetic outcome and cytotoxicity of the in-office tooth bleaching therapy [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop polymeric products capable of acting as coadjutant on the in-office tooth bleaching, fastening the esthetic outcome and reducing the cytotoxic effects caused by this professional therapy. For this purpose, a nanofibers polymeric scaffold (ScP) and a polymeric primer containing the horseradish peroxidase enzyme (PrP) were developed. After assessing the polymeric products concerning their characterization, temperature, pH, and effects on the kinetics of H₂O₂ degradation, the influence of using the ScP in association or not with the PrP on the esthetic outcome promoted by the in-office tooth bleaching therapy was evaluated using spectrophotometer UV-Vis (ΔE). Then, a bleaching gel with 35% H₂O₂ was applied for 3x15 minutes on enamel of stained enamel/dentin discs (n=8) previously covered or not with ScP and/or PrP. Non treated discs and discs submitted to the conventional in-office tooth bleaching therapy were used as controls. To assess the cytotoxic effects, the same procedures were performed on stained enamel/dentin discs adapted to artificial pulp chambers (APCs). The extracts (culture medium + bleaching gel components that diffused through the discs) were collected and immediately applied for 60 minutes on cultured MDPC-23 pulp cells. Thus, the cells were analyzed concerning their viability (MTT assay), morphology (MEV) and oxidative stress (carboxy-H₂DCFDA assay), and the transenamel/transdental diffusion of H₂O₂ was quantified (violet-leuco-crystal assay). The data obtained were submitted to the analysis of variance for 1 fixed criterion and the Tukey post-test ($p < 0.05$). The application of the ScP associated or not with the PrP on enamel increased the formation of free-radicals and hydroxyl ion (HO[•]), these positive effects enhanced the esthetic outcome and decreased the cytotoxicity of this innovative bleaching strategy in comparison with the control group in which only the bleaching gel was applied on enamel ($p < 0.05$), reduced the H₂O₂ diffusion as well as the oxidative cells stress. Despite the exciting data found when both ScP and PrP were used together to cover the enamel before the bleaching gel application, this experimental therapy still reduced

by 34% the pulp cell viability. Therefore, the assessment of this innovative esthetic therapy was carried out after applying the bleaching gel for shorter periods (30 and 15 minutes) on the polymeric products (3 consecutive sessions). Overall, the bleaching gel applied for 15 minutes on enamel previously covered with ScP and PrP determined an esthetic outcome like that obtained for the conventional in-office bleaching therapy ($p>0.05$). In addition, this shorter bleaching treatment caused a very low cytotoxicity that was not different of the control group in which no treatment was performed (100% cell viability) ($p>0.05$). It was concluded that covering the enamel with the ScP associated with the catalytic PrP before applying the bleaching gel with 35% H_2O_2 for 15 minutes, besides promoting an esthetic outcome similar to the conventional in-office therapy, also reduces the cytotoxicity commonly triggered by the professional therapy.

Keyword: Tooth whitening. Hydrogen peroxide – Toxicity. Odontoblasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	PROPOSIÇÃO	20
2.1	Objetivos Específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	Obtenção dos Discos de Esmalte/Dentina	30
4.2	Padronização da Cor dos Discos de Esmalte/Dentina	31
4.3	Etapa 1: Confeção do Scaffold Polimérico (ScP) / Primer Polimérico Catalisador (PrP).....	34
4.3.1	Confeção do scaffolds polimérico (ScP).....	34
4.3.1.1	Análise morfológica dos ScP	35
4.3.1.2	Influência dos ScP na alteração de cor	35
4.3.1.3	Morfologia do ScP e sua influência na alteração de cor do clareamento de consultório	37
4.3.2	Desenvolvimento do primer polimérico catalisador (PrP).....	39
4.3.2.1	Preparação do PrP.....	39
4.3.2.2	Mensuração do pH.....	40
4.3.2.3	Variação da temperatura	41
4.3.2.4	Avaliação do pH e temperatura do PrP	41
4.3.3	Influência do ScP e PrP na cinética de degradação do H₂O₂	42
4.3.3.1	Produção de radicais livres (RLs) e radical hidroxila (HO•)	42
4.4	Etapa 2: Influência dos Produtos Selecionados sobre a Alteração de Cor e Citotoxicidade Celular	43
4.4.1	Avaliação da alteração de cor	44
4.4.2	Cultura de células odontoblastóides MDPC-23	45
4.4.2.1	Procedimento experimental.....	46
4.4.2.2	Citotoxicidade trans-amelodentinária.....	49
4.4.2.3	Avaliação do estresse oxidativo	49
4.4.2.4	Quantificação da difusão trans-amelodentinaria de H₂O₂	50
4.4.2.5	Morfologia celular	50

4.5	Etapa 3: Seleção e Avaliação do Melhor Protocolo Clareador	
	Aplicado em Diferentes Tempos	51
4.5.1	Análise da alteração de cor	52
4.5.2	Citotoxicidade trans-amelodentinária	53
4.5.2.1	Estresse oxidativo	53
4.5.2.2	Integridade da membrana celular.....	54
4.6	Análise Estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Etapa 1	55
5.1.1	Produção de radicais livres (RLs) e radical hidroxila (HO•)	55
5.2	Etapa 2	57
5.2.1	Alteração de cor.....	57
5.2.2	Citotoxicidade trans-amelodentinária	58
5.2.3	Quantificação da difusão trans-amelodentinária de H ₂ O ₂	62
5.3	Etapa 3	63
5.3.1	Alteração de cor.....	63
5.3.2	Citotoxicidade trans-amelodentinária	65
5.3.3	Quantificação da difusão trans-amelodentinária de H ₂ O ₂	69
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXOS.....	93

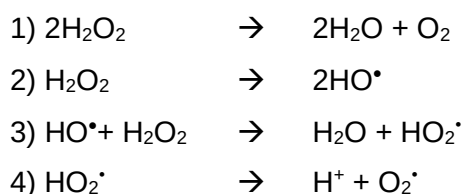
1 INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos adversos do clareamento dental de consultório são proporcionais a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) capaz de se difundir pela estrutura dental e interagir com as células pulpares¹. Sabe-se que géis clareadores contendo entre 30-40% de H_2O_2 na sua composição, os quais são amplamente usados na prática clínica^{2,3}, causam intenso efeito tóxico sobre células da polpa dental. Esses efeitos tóxicos são decorrentes da indução de estresse oxidativo, seguido da ruptura da membrana celular^{4,5}, o que pode desencadear reação inflamatória de variada intensidade na polpa, associada ou não à formação de áreas de necrose⁶⁻⁸. Apesar do excelente resultado estético imediato obtido pela técnica de clareamento de consultório, esta tem sido questionada do ponto de vista biológico^{4,9,10}.

Estudos demonstraram que a toxicidade celular e a efetividade da técnica de clareamento de consultório dependem diretamente da concentração de H_2O_2 presente no gel clareador e de seu tempo de aplicação sobre o esmalte^{1,11,12}. Dessa maneira, modificações nos protocolos de aplicação, tais como redução da concentração de H_2O_2 e do tempo de aplicação do gel sobre a estrutura dental foram avaliados, sendo que os pesquisadores mostraram que essas estratégias podem comprometer a eficácia estética do tratamento^{1,13,14}. Além disso, como há um risco biológico inerente ao clareamento de consultório, tem sido preconizado o clareamento caseiro, no qual é utilizado peróxido de carbamida (PC) em baixas concentrações^{15,16}. Quando aplicado sobre o esmalte, o PC nas concentrações entre 10-22% libera cerca de 3,5-7,0% de H_2O_2 para interagir com o esmalte/dentina. O produto é usado com moldeira individual, a qual é mantida em posição na arcada dentária por um período mínimo diário de 2 horas. Este tipo de tratamento estético caseiro é empregado por períodos que variam de 6 e 28 dias¹⁶. Embora o PC apresente menor risco biológico para complexo dentino-pulpar, a principal crítica da técnica reside no fato do procedimento poder ser realizado sem supervisão profissional, o que pode levar ao uso incorreto e inadvertido do produto, e assim gerar riscos biológicos para os tecidos dentais e periodontais^{17,18}. Outro fator negativo do clareamento caseiro tem sido considerado o longo tempo despendido para se obter um resultado estético satisfatório, como aquele comumente alcançado com o clareamento de consultório^{18,19}.

Diante das desvantagens das técnicas de clareamento caseiro e da possibilidade de danos irreversíveis para a polpa dental causados pelos diferentes protocolos de clareamento profissional (in-office) empregados atualmente, diversos pesquisadores têm proposto modificar a composição química dos géis clareadores de consultório, baseado na compreensão do comportamento cinético do H_2O_2 ^{5,20,21}. O objetivo principal destes pesquisadores tem sido acelerar o clareamento dental por meio do aumento da efetividade estética do produto, eliminando, ou pelo menos reduzindo, ao mesmo tempo, o possível efeito citotóxico deste tipo de terapia. Recentemente, Ortecho-Zuta et al.⁵ demonstraram que a adição de 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica (HRP) ao gel com 35% de H_2O_2 reduziu significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária do produto. Nesse estudo, a presença da HRP no gel clareador fez com que a viabilidade celular fosse cerca de 34% maior quando comparada ao gel sem adição desta enzima. Além disso, os autores observaram que a adição de HRP ao gel aumentou em aproximadamente 24% a eficácia clareadora da terapia após a 1ª sessão. Apesar de melhorar a eficácia clareadora e reduzir a toxicidade celular, este último efeito foi limitado, visto que as células pulpares ainda se apresentaram sensíveis ao estresse oxidativo mediado pelo H_2O_2 ⁵. No entanto, parece evidente que a catálise enzimática, onde o H_2O_2 pode originar outros radicais livres com maior potencial oxidativo, pode ser uma estratégia promissora para obter terapias clareadoras mais efetivas e seguras^{21,22,23}.

Sabe-se que o H_2O_2 é uma espécie reativa derivada do oxigênio (EROs), o qual pode se dissociar em diferentes moléculas de acordo com as condições do ambiente onde a reação se desenvolve, seja em meio aquoso ou quando em contato com um substrato orgânico²⁴. Além disso, a velocidade de reação e os subprodutos gerados a partir da decomposição do H_2O_2 podem ser alterados quando em contato com enzimas oxidantes^{25,26}. A reação de decomposição do H_2O_2 pode formar oxigênio (O_2) e água (H_2O), além de alguns radicais livres e outras EROs mais reativas, como o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peri-hidroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^\bullet$)^{27,28}, tal como demonstrado nas seguintes reações:



Entre as EROs existentes, o $\text{HO}^\bullet$ é aquele que apresenta maior reatividade com o substrato orgânico, proporcionando rápida fragmentação dos cromóforos de pigmentação presentes na dentina subjacente^{29,30}. Por serem consideradas moléculas de natureza simples de degradação, as EROs derivadas de H_2O_2 apresentam curto tempo de meia-vida, o que faz com que sejam rapidamente eliminadas do meio. Dentre as EROs formadas, o $\text{HO}^\bullet$ apresenta menor tempo de meia-vida (10^{-9} segundos) e maior potencial de oxidação ($E^\circ = +2,8\text{V}$)²⁷. Acredita-se, então, que o aumento da reatividade do H_2O_2 com o substrato dental seja crucial para limitar a difusão desta molécula residual para o tecido pulpar a partir da formação de radicais livres e outras EROs, sobretudo o $\text{HO}^\bullet$.

Com base nesses conhecimentos científicos prévios, o objetivo geral do presente projeto de pesquisa é desenvolver dois biomateriais catalisadores universais que possam atuar como coadjuvantes durante a terapia clareadora de consultório, favorecendo e acelerando o resultado estético e prevenindo danos significativos para células pulpares.

7 CONCLUSÕES

1. A solução de 12,5% PCL eletrofiado por 45 minutos permitiu a confecção do scaffold polimérico de nanofibras (ScP) a ser empregado na presente pesquisa e, a solução de 10% HPMC permitiu a preparação do primer polimérico catalisador (PrP);
2. O uso do ScP e PrP sobre o esmalte potencializou a decomposição do H_2O_2 presente no gel clareador, estimulando a produção de radicais hidroxila bem como de outros radicais livres; também aumentou a alteração de cor, favorecendo o resultado estético, além disso, minimizou a citotoxicidade trans-amelodetínario. Esses efeitos foram maiores quando os bioprodutos foram usados em associação;
3. Quando comparado ao clareamento convencional de consultório, a aplicação por 15 minutos do gel clareador com 35% de H_2O_2 sobre o esmalte recoberto com ScP e PrP, reduziu em aproximadamente de 60% a toxidade sobre células pulpare MDPC-23, bem como promoveu alteração de cor semelhante àquele alcançado por esse tipo de terapia profissional.

REFERÊNCIAS*

1. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(8): 2509-20.
2. Lima SNL, Ribeiro IS, Grisotto MA, Fernandes ES, Hass V, de Jesus Tavares RR, et al. Evaluation of several clinical parameters after bleaching with hydrogen peroxide at different concentrations: a randomized clinical trial. *J Dent*. 2018; 68: 91-7.
3. Martins LM, Lima E Souza LA, Sutil E, da Silva LM, Silva JOS, Reis A, et al. Clinical effects of desensitizing prefilled disposable trays in inoffice bleaching: a randomized single-blind clinical trial. *Oper Dent*. 2020; 45(1): E1-10.
4. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent*. 2015; 43(6): 750-6.
5. Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, Leite ML, Bordini E, Basso FG, Hebling J, et al. Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity. *Oper Dent*. 2019; 44(4): 414-23.
6. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 59-64.
7. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J*. 2015; 26(3): 242-8.
8. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci and Eng B*. 2014; 4(6): 178-85.
9. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(3): 458-64.
10. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human pulp response to peroxides. In: Perdigao J, editor. *Tooth whitening*. Switzerland: Springer; 2016. p. 81-97.

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

11. Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia LD, Hebling J, de Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J Dent*. 2014; 42(3): 351-8.
12. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2016; 49(1): 26-36.
13. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent*. 2014; 42(2): 185-9.
14. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1428-36.
15. de Almeida LC, Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam*. 2012; 25(1): 3-8.
16. de Geus JL, Wambier LM, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. At-home vs in-office bleaching: a systematic review and meta-analysis. *Oper Dent*. 2016; 41(4): 341-56.
17. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract*. 2014; 14(Supl): 70-6.
18. Rodrigues JL, Rocha PS, Pardim SLS, Machado ACV, Faria-E-Silva AL, Seraidarian PI. Association between in-office and at-home tooth bleaching: a single blind randomized clinical trial. *Braz Dent J*. 2018; 29(2): 133-9.
19. Faus-Matoses V, Palau-Martínez I, Amengual-Lorenzo J, Faus-Matoses I, Faus-Llácer VJ. Bleaching in vital teeth: combined treatment vs in-office treatment. *J Clin Exp Dent*. 2019; 11(8): e754-8.
20. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig*. 2014; 6(18): 1631-7.
21. Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Zuta U, Basso F, 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*. 2019; 27: e20180453.
22. Travassos AC, Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010; 35(3): 287-94.
23. Gopinath S, James V, Vidhya S, Karthikeyan K, Kavitha S, Mahalaxmi S. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1): 45-9.

24. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 2013; 528: 3-25.
25. Khanmohammadi M, Dastjerdi MB, Ai A, Ahmadi A, Godarzi A, Rahimia A, et al. Horseadish peroxidase-catalyzed hydrolation for biomedical applications. *Biomater Sci.* 2018; 6(6): 1-43.
26. Gantumur E, Sakai S, Nkahata M, Taya M. Horseadish peroxidase-catalydes hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars. *Soft Matter.* 2019; 15(10): 2163-9.
27. Bergendi L, Beneš L, Ďuračková Z, Ferenčík M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19): 1865-74.
28. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res.* 2013; 92(7): 661-5.
29. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 30(1): 45-50.
30. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undersirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig.* 2010; 14(1): 1-10.
31. Elmarakby AM, Aldosart AA, Faihan AS, Almutairi WM, Alenazi RF, Muneer AJ. Teeth bleaching: a closer view. *EC Dent Sci.* 2019; 18: 1677-83.
32. Fernández E, Bersezio C, Bottner J, Avalos F, Godoy I, Inda D, et al. Longevity, esthetic perception, and psychosocial impact of teeth bleaching by low (6%) hydrogen peroxide concentration for in-office treatment: a randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2017; 42(1): 41-52.
33. Goettems ML, Fernandez MDS, Donassollo TA, Henn Donassollo S, Demarco FF. Impact of tooth bleaching on oral health-related quality of life in adults: a triple-blind randomised clinical trial. *J Dent.* 2021; 105: 103564.
34. Kwon S, Dawson D, Schenck D, Fiegel J, Wertz P. Spectrophotometric evaluation of potassium nitrate penetration into the pulp cavity. *Oper Dent.* 2015; 40(6): 614-21.
35. Vildosola P, Vera F, Ramirez J, Rencoret J, Pretel H, Oliveira OBJr, et al. Comparison of effectiveness and sensitivity using two in-office bleaching protocols for a 6% hydrogen peroxide gel in a randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2017; 42(3): 244-52.
36. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa CA. Complications from the use of peroxides. In: Perdigao J, editor. *Tooth whitening.* Switzerland: Springer; 2016. p. 45-79.

37. Acuña ED, Parreiras SO, Favoreto MW, Cruz GP, Gomes A, Borges CPF, 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*. 2019; doi: 10.1111/jerd.12453. [Epub ahead of print].
38. Ozdemir ZM, Surmelioglu D. Effects of different bleaching application time on tooth color and mineral alteration. *Ann Anat*. 2021; 233: 151590.
39. Martin J, Fernandez E, Bahamondes V, Werner A, Elphick K, Oliveira OB Jr., et al. Dentin hypersensitivity after teeth bleaching with in-office systems: randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2013; 26(1): 10-4.
40. de Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, et al. In-office bleaching with a two-and seven-day intervals between clinical sessions: a randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent*. 2015; 43(4): 424-9.
41. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desentizer before light activated bleaching. *Oper Dent*. 2011; 36(1): 12-7.
42. Pontes M, Gomes J, Lemos C, Leão RS, Moraes S, Vasconcelos B, et al. Effect of bleaching gel concentration on tooth color and sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Oper Dent*. 2020; 45(3): 265-75.
43. Rezende M, Loguercio AD, Kossatz S, Reis A. Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: a multi regression and logistic analysis. *J Dent*. 2016; 45: 1-6.
44. do Amaral FL, Sasaki RT, da Silva TC, Franca FM, Florio FM, Basting RT. The effects of home-use and in office bleaching treatments on calcium and phosphorus concentrations in tooth enamel: an in vivo study. *JADA*. 2012; 143(6): 580-6.
45. Kury M, Perches C, da Silva DP, André CB, Tabchoury CPM, Giannini M, et al. Color change, diffusion of hydrogen peroxide, and enamel morphology after in-office bleaching with violet light or nonthermal atmospheric plasma: an in vitro study. *J Esthet Restor Dent*. 2020; 32(1): 102-12.
46. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(5): 1013-20.
47. Silva-Costa RS, Ribeiro AE, Assunção IV, Araújo Júnior RF, Araújo AA, Guerra GC, et al. In-office tooth bleaching with 38% hydrogen peroxide promotes moderate/severe pulp inflammation and production of Il-1 β , TNF- β , GPX, FGF-2 and osteocalcin in rats. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26: e20170367.
48. Benetti F, Lemos CAA, de Oliveira Gallinari M, Terayama AM, Briso ALF, de Castilho Jacinto R, et al. Influence of different types of light on the response of the pulp tissue in dental bleaching: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(4): 1825-37.

49. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod.* 2013; 39(12): 1576-80.
50. Vaz MM, Lopes LG, Cardoso PC, Souza JB, Batista AC, Costa NL, et al. Inflammatory response of human dental pulp to at-home and in-office tooth bleaching. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24(5): 509-17.
51. de Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari MO, de Souza Costa CA, Santos PH, et al. At-home bleaching: color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Braz Dent J.* 2015; 26(4): 378-83.
52. Suty H, De Traversay C, Cost M. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol.* 2004; 49(4): 227-33.
53. Lertsukprasert N, Locharoenrat K. Efficiency of tooth bleaching agent on staining and discoloration characteristics of nicotine stained dental enamel model. *BMC Oral Health.* 2020; 20(1): 221.
54. Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Flury S. Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide. *Oper Dent.* 2016; 41(1): 39-47.
55. Ferreira AF, Perez FM, Júnior Fde A, Moura MF, Sousa FB. Graded changes in enamel component volumes resulted from a short tooth bleaching procedure. *Arch Oral Biol.* 2016; 65: 52-8.
56. Ramotowska S, Zarzeczkańska D, Dąbkowska I, Wcisło A, Niedziałkowski P, Czaczyk E, et al. Hydrogen bonding and protonation effects in amino acids' anthraquinone derivatives - spectroscopic and electrochemical studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019; 222: 117226.
57. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso Alf, Ortecho-Zuta U, de Oliveira Ribeiro RA, Hebling J, et al. Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. *Oper Dent.* 2020; 45(6): 632-42.
58. Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent.* 2012; 40 (Suppl 2): e25-33.
59. Torres CR, Souza CS, Borges AB, Huhtala MF, Caneppele TM. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013: 193241.
60. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, et al. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent.* 2015; 40(1): 72-9.
61. Machado LS, Anchietra RB, dos Santos PH, Briso AL, Tovar N, Janal MN, et al. Clinical comparison of at-home and in-office dental bleaching procedures: a randomized trial of a split-mouth design. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2016; 36(2): 251-60.

62. Haywood VB, Sword RJ. Tray bleaching status and insights. *J Esthet Restor Dent*. 2021; 33(1): 27-38.
63. Kossatz S, Martins G, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associated with use of a calcium containing in-office bleaching gel. *J Am Dent Assoc*. 2012; 143(12): e81-7.
64. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, et al. Light augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(2): 167-75.
65. Klaric E, Rakic M, Marcus M, Ristic M, Sever I, Tarle Z. Optical effects of experimental light-activated bleaching procedures. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(3): 160-7.
66. Zanin F. Recent advances in dental bleaching with laser and LEDs. *Photomed Laser Surg*. 2016; 34(4): 135-6.
67. Santos A, Bussadori SK, Pinto MM, Pantano Junior DA, Brugnera AJr, Zanin F, et al. Evaluation of in-office tooth whitening treatment with violet LED: protocol for a randomised controlled clinical trial. *BMJ Open*. 2018; 8(9): e021414.
68. Gallinari MO, Fagundes TC, da Silva LM, de Almeida Souza MB, Barboza A, Briso A. A new approach for dental bleaching using violet light with or without the use of whitening gel: study of bleaching effectiveness. *Oper Dent*. 2019; 44(5): 521-9.
69. Morales Urrea DA, Haure PM, García Einschlag FS, Contreras EM. Horseradish peroxidase mediated decolourization of orange II: modelling hydrogen peroxide utilization efficiency at different pH values. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(20): 19989-20002.
70. Schrank SG, José HJ, Moreira RF, Schröder HF. Applicability of fenton and H₂O₂/uv reactions in the treatment of tannery wastewaters. *Chemosphere*. 2005; 60(5): 644-55.
71. Santana MA, Nahsan FP, Oliveira AH, Loguercio AD, Faria-e-Silva AL. Randomized controlled trial of sealed in-office bleaching effectiveness. *Braz Dent J*. 2014; 25(3): 207-11.
72. Maran BM, Ziegelmann PK, Burey A, de Paris Matos T, Loguercio AD, Reis A. Different light-activation systems associated with dental bleaching: a systematic review and a network meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(4): 1499-12.
73. Silva Daltro TW, Gomes de Almeida SA, Dias MF, Lins-Filho PC, da Silva CHV, Guimarães RP. The influence of violet LED light on tooth bleaching protocols: In vitro study of bleaching effectiveness. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 32: 102052.
74. Kobayashi RS, Picolo MZD, Kury M, Resende BA, Esteban Florez FL, Cavalli V. Effects of dental bleaching protocols with violet radiation on the color and chemical composition of stained bovine enamel. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021; 34: 102194. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102194. [Epub ahead of print].

75. Kury M, Wada EE, Silva DPD, Tabchoury CPM, Giannini M, Cavalli V. Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2020; 28: e20190720.
76. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent.* 1993; 69(1): 46-8.
77. Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy-in vitro study. *J Dent.* 2010; 38(10): 838-46.
78. Lancaster L, Bulutoglu B, Banta S, Wheeldon I. Enzyme colocalization in protein-based hydrogels. *Methods Enzymol.* 2019; 617: 265-85.
79. Sperl JM, Sieber V. Multi-enzyme cascade reactions – status and recent advances. *ACS Catal.* 2018; 8: 2385-96.
80. Ruales-Salcedo AV, Higueta JC, Fontalvo J, Woodley JM. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2019; 74(3-4): 77-84.
81. Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szöke H, Henriksen A, Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature.* 2002; 417(6887): 463-8.
82. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 2004; 65(3): 249-59.
83. Sato S, Nakamura K, Nakamura H. Horseradish-peroxidase-catalyzed tyrosine click reaction. *Chembiochem.* 2017; 18(5): 475-8.
84. Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003; 24(5): 801-8.
85. Oyane A, Uchida M, Choong C, Triffitt J, Jones J, Ito A. Simple surface modification of poly(epsilon-caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid. *Biomaterials.* 2005; 26(15): 2407-13.
86. Santoro M, Sarita RS, Walker JL, Mikos AG. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 107: 206-12.
87. Rabionet M, Yeste M, Puig T, Ciurana J. Electrospinning PCL scaffolds manufacture for three-dimensional breast cancer cell culture. *Polymers (Basel)* 2017; 9(12): 328.
88. Dabouian A, Bakhshi H, Irani S, Pezeshki-Modaress M. β -carotene: a natural osteogen to fabricate osteoinductive electrospun scaffolds. *RSC Adv.* 2018; 8(18): 9941-5.

89. Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2002; 3(6): 1233-9.
90. Lee BJ, Ryu SG, Cui JH. Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999; 25(4): 493-501.
91. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T. Influence of water-soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release*. 2002; 81(1-2): 165-72.
92. Mamani PL, Ruiz-Caro R, Veiga MD. Matrix tablets: the effect of hydroxypropyl methylcellulose/anhydrous dibasic calcium phosphateratio on the release rate of a water-soluble drug through the gastrointestinal tract I. In vitro tests. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2012; 13(4): 1073-83.
93. Stefani I, Cooper-White JJ. Development of an in-process UV-crosslinked, electrospun PCL/aPLA-co-TMC composite polymer for tubular tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2016; 36: 231-40.
94. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater*. 2014; 30(7): 769-84.
95. de Souza Costa CA. Biological aspects of dental materials. *J Adhes Dent*. 2020; 22(5): 540-4.
96. Camps J, Tardieu C, Déjou J, Franquin JC, Ladaique P, Rieu R. In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent Mater*. 1997; 13(1): 34-42.
97. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine (TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012; 45(5): 439-48.
98. Barbosa JG, Benetti F, Gallinari MO, Carminatti M, da Silva ABD, Lopes INI, et al. Bleaching gel mixed with MI paste plus reduces penetration of H₂O₂ and damage to pulp tissue and maintains bleaching effectiveness. *Clin Oral Invest*. 2020; 24(3): 1299-309.
99. Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res*. 1992; 100(4): 193-9.
100. Giachetti L, Bertini F, Bambi C, Nieri M, Scaminaci Russo D. A randomized clinical trial comparing at-home and in-office tooth whitening techniques: a ninemonth follow-up. *J Am Dent Assoc*. 2010; 141(11): 1357-64.
101. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(4): 474-82.

102. de Almeida ACP, Barros S, Ribeiro M, Ribeiro MES, Baia JCP, Silva e Sousa Junior, et al. Influence of different time intervals among the in-office bleaching sessions on the tooth enamel mass variation. *J Health Sci.* 2020; 21(4): 342-7.
103. Thacker M, Che YN, Li CP, Lin FH. Nitrogen-doped titanium dioxide mixed with calcium peroxide and methylcellulose for dental bleaching under visible light activation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3579): 1-11
104. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(5): 355-61.
105. Puppini-Rontani RM, Caldo-Teixeira AS. Effect of sodium hypochlorite on different substrates - a SEM analysis. *Acta Microscopica.* 2003; 12(1): 169-73.
106. Tanaka JL, Medici Filho E, Salgado JA, Salgado MA, Moraes LC, Moraes ME, et al. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz Oral Res.* 2008; 22(4): 346-51.
107. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992;71(Spec): 913-9.
108. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod.* 2001; 27(1): 23-30.
109. Fonseca RB, Haider-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11): 919-22.
110. Krifka S, Borzsonyi A, Koch A, Hiller KA, Schmalz G, Friedl KH. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel – human vs. bovine primary teeth in vitro. *Dent Mater.* 2008; 24(7): 888-94.
111. Attin T, Schmidlin PR, Wegehaupt F, Wiegand A. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: a review. *Dent Mater.* 2009; 25(2): 143-57.
112. Felipe Akabane ST, Danelon M, Nunes GP, Gruba AS, Alberto de Souza-Costa C, Caroline de Oliveira Duque C, et al. Evaluation of the aesthetic effect, enamel microhardness and trans-amelodentinal cytotoxicity of a new bleaching agent for professional use containing trimetaphosphate and fluoride. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021; 114: 104225.
113. Moreira JC, Gallinari MO, Rahal V, Fagundes TC, Santos PH, Moura MR, et al. Effect of dental pigmentation intensity on the transenamel and transdentinal penetration of hydrogen peroxide. *Braz Dent J.* 2016; 27(4): 399-403.
114. Cavalli V, Silva BGD, Berger SB, Marson FC, Tabchoury CPM, Giannini M. Decomposition rate, pH, and enamel color alteration of at-home and in-office bleaching agents. *Braz Dent J.* 2019; 30(4): 385-96.

115. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009; 42(6): 516-24.
116. de Souza Costa CA, Figueiredo JAP, Hebling J, Estrela C. Pulpal biology. In: Estrela C, editor. *Endodontics Science*. Brasil: Artes Medicas; 2009. p. 1-22.
117. Fuks AB, Hebling J, de Souza Costa CA. The primary pulp: developmental and biomedical background. In: Fuks A, Peretz B, editors. *Pediatric endodontics: current concepts in pulp therapy for primary and young permanent teeth*. Switzerland: Springer; 2016. p. 7-22.
118. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, et al. Human odontoblasts express functional thermo-sensitive trp channels: implications for dentin sensitivity. *Pain*. 2011; 152(10): 2211-23.
119. Nilsen BW, Mouhat M, Haukland T, Örtengren UT, Mercer JB. Heat development in the pulp chamber during curing process of resin-based composite using multi-wave LED light curing unit. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2020; 12: 271-80.
120. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 19(2): 515-30.
121. Xu B, Li Q, Wang Y. Effects of pH values of hydrogen peroxide bleaching agents on enamel surface properties. *Oper Dent*. 2011; 36(5): 554-62.
122. Balladares L, Alegría-Acevedo LF, Montenegro-Arana A, Arana-Gordillo LA, Pulido C, Salazar-Gracez MT, et al. Effects of pH and application technique of in-office bleaching gels on hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber. *Oper Dent*. 2019; 44(6): 659-67.
123. Torres CR, Crastechini E, Feitosa FA, Pucci CR, Borges AB. Influence of pH on the effectiveness of hydrogen peroxide whitening. *Oper Dent*. 2014; 39(6): E261-8.
124. Bersezio C, Martín J, Prieto MV, Meneses P, Angel P, Eduardo Fernández G, et al. One-year bleaching efficacy using two hp products with different pH: a double-blind randomized clinical trial. *J Esthet Restor Dent*. 2019; 31(5): 493-9.
125. Wijetunga CL, Otsuki M, Hiraishi N, Luong MN, Tagami J. Effect of pH of bleaching agent on tooth bleaching action in vitro. *Dent Mater J*. 2021 Jan 15. doi: 10.4012/dmj.2020-191. [Epub ahead of print].
126. Lima DA, Aguiar FH, Pini NI, Soares LE, Martin AA, Liporoni PC, et al. In vitro effects of hydrogen peroxide combined with different activators for the in-office bleaching technique on enamel. *Acta Odontol Scand*. 2015; 73(7): 516-21.
127. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(9): 1387-404.

128. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1): 1-15.