

PAULA ELAINE CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AGENTES
CLAREADORES PARA USO CASEIRO E PROFISSIONAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientadora Prof.^a Adj. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

C179a Cardoso, Paula Elaine.
Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores para uso caseiro e
profissional / Paula Elaine Cardoso. __ São José dos Campos : [s.n.], 2009
102f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.
Orientador: Prof. Dra. Márcia Carneiro Valera.

1. Clareamento dental 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Cultura de células. 4.
Citotoxicidade. I. Valera, Márcia Carneiro. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD25

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26 de agosto de 2009.

Assinatura :

E-mail: paula.elaine@bol.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunto Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Adjunto Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Profa. Dra. Simone Helena Gonçalves de Oliveira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 26 de agosto de 2009.

DEDICATÓRIA

À Deus, nosso senhor, que me abençoa todos os dias, dando-me paz e conforto. Meu grande pai que me ajuda a buscar os meus objetivos e nunca me desampara, por todas as bênçãos recebidas.

“Esforça-te, e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares” (Josué 1:9).

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos queridos **Gabriela Elaine** e **Lucca Gustavo**, meus grandes amores. Vocês são a maior felicidade, o que há de melhor em minha vida. Sempre foram e serão meu maior incentivo para buscar e conseguir meus objetivos.

À minha amada mãe **Marta**, por sua enorme dedicação e verdadeira presença em todos os momentos de minha vida. Pelo amor e carinho. Por me apoiar em todas as minhas decisões e ser além de uma maravilhosa mãe, ser a maior e mais verdadeira amiga.

Ao meu amado pai **Sebastião**, exemplo de amor à profissão, por estar mais presente em minha vida.

Meus queridos pais, seus exemplos de amor, dedicação, perseverança e honestidade foram fundamentais na minha formação e serão guardados por toda a minha vida.

Muito obrigada.

A minha irmã **Fernanda** pela paciência e pelo amor e amizade tão preciosa.

Ao meu querido irmãozinho **Pedro**. Sua chegada foi com certeza além de uma grande alegria, mais um incentivo para conseguir buscar meus objetivos.

A meu amado noivo **Rodrigo Dias Nascimento**, por todos os momentos juntos, pela compreensão, enorme paciência, carinho e amor verdadeiro. Pelo exemplo de dedicação e perseverança. Meu amor, sem você esta etapa não poderia ser vencida.

À toda a minha família, minha dedicação especial. Obrigada pelo apoio e amor. À minha tão querida tia **Denise** pelo carinho, ajuda e estímulo desde o início da minha carreira.

Aos meus avós **Aparecida e Annibal e Leontina, Manuel** (in memorium), por todo amor, dedicação, ensinamentos e por todas as maravilhosas conversas e momentos que passamos juntos.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profª Adj. Marcia Carneiro Valera exemplo de amor à profissão, de dedicação ao ensino e a pesquisa, pela orientação, auxílio e amizade durante todo o nosso convívio neste curso. Muito obrigada pelo carinho, pelo suporte adequado na execução do trabalho, pela paciência e por acreditar em mim.

Á Profª Drª. Samira Esteves Afonso Camargo, exemplo de dedicação e competência. Pela grande colaboração na execução deste trabalho, pelos conselhos e incentivos nas horas difíceis, e pela amizade.

Ao Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, grande professor e amigo, pelo constante incentivo na busca de conhecimento e de meus objetivos.

Ao Professor Doutor Clóvis Pagani, pela coordenação e dedicação ao programa de pós-graduação.

Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP**, representada pelo Diretor, **Prof. Adj. José Roberto Rodrigues**, por possibilitar a realização deste Doutorado.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora**, pela oportunidade de realização do curso.

À **CAPES** pelo apoio ao curso de Pós Graduação e à **FAPESP** pelo apoio financeiro.

À secretária do Departamento de Odontologia Restauradora da FOSJC: **Rosângela**, pela colaboração e amizade.

Às técnicas **Josiane e Fernanda**, pela imensa colaboração nas etapas laboratoriais.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consiglio de Souza**, pela atenção e auxílio.

À amada amiga **Samira Esteves Afonso Camargo** pela amizade sincera, pelo carinho e por estar sempre disposta a ajudar quando eu mais precisei.

À querida amiga **Alessandra**, por todas as nossas conversas, pelos conselhos, pelo carinho, e por uma amizade tão preciosa.

À querida amiga **Lilian** por todos os momentos, pela preocupação, pela importante amizade, e pelo carinho.

À querida amiga **Aletéia**, pela amizade, por toda ajuda nesta pesquisa, e por ser sempre muito atenciosa.

À amiga **Regina**, pela grande amizade, pelas conversas e conselhos.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação, pelo convívio e pelas inúmeras colaborações neste estudo. Aos colegas e amigos **Giovana, Lecy, Elaine, Manuela, Alana, Lorraine, Marcos, Daniel, João, Lucas, Guilherme** pela experiências compartilhadas, pelo convívio gratificante e pela nossa amizade.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora **Alessandra, Ana Paula Martins Gomes, Carlos Rocha Gomes Torres, Cláudio Antonio Talge Carvalho, Clóvis Pagani, José Roberto Rodrigues, Maria Amélia Máximo de Araújo, Sergio Eduardo de Paiva**

Gonçalves, pela amizade, por estarem sempre dispostos a ensinar e colaborar e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos.

A professora Dra. **Simone Helena Gonçalves de Oliveira**, docente da disciplina de Anatomia, pelo carinho e amizade.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo** por ceder as células utilizadas nesta pesquisa. Em especial ao professor Prof. Titular Antonio Carlos Bombana e à professora Adj. **Márcia Marques**, que permitiram a utilização do Laboratório de Cultura de Células e auxiliaram durante realização deste trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODO.....	35
4.1 Cultivo das células.....	35
4.1.1 Descongelamento.....	36
4.1.2 Troca de meio.....	37
4.1.3 Subcultura.....	38
4.1.4 Contagem de células.....	39
4.2 Plaqueamento.....	41
4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular.....	41
4.4 Divisão dos grupos experimentais.....	42
4.5 Condicionamento do meio de cultivo.....	44
4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular.....	45
4.7 Mensuração da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio.....	47
4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio.....	47
4.7.1.1 Preparo das soluções.....	48
4.7.1.2 Titulação.....	49
4.7.2 Levantamento da curva padrão.....	51
4.7.2.1 Preparo das soluções.....	52
4.7.2.2 Leitura em espectrofotômetro.....	54
4.7.3 Mensuração do peróxido de hidrogênio liberado nas condições	

experimentais	56
4.8 Análise Estatística.....	57
5 RESULTADO.....	59
5.1 Avaliação da taxa de sobrevivência celular (%).....	59
5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio.....	64
5.3 Estatística descritiva.....	65
5.3.1 Estatística descritiva para metabolismo celular.....	65
5.3.2 Teste análise de variância (Anova).....	70
5.3.2.1 Teste análise de variância (Anova) para a taxa de sobrevivência celular.....	70
5.3.3 Teste de Tukey.....	71
5.3.3.1 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para o período de avaliação 24 horas.....	71
5.3.3.2 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para o período de avaliação 48 horas.....	73
5.3.3.3 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para os diferentes grupos.....	74
5.3.4 Teste análise de variância (Anova).....	75
5.3.4.1 Teste análise de variância (Anova) para a taxa de sobrevivência celular (%)......	75
5.3.4.2 Teste análise de variância (Anova) para a variável tempo.....	76
6 DISCUSSÃO.....	78
6.1 Discussão da metodologia.....	78
6.2 Discussão dos resultados para agentes clareadores de uso profissional.....	81
6.3 Discussão dos resultados para agentes clareadores de uso caseiro supervisionado.....	85
6.4 Considerações finais.....	87
7 CONCLUSÃO.....	91
8 REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO.....	101
ABSTRACT.....	102

Cardoso PE. Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores para uso caseiro e profissional [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade dos peróxidos de hidrogênio (PH) e carbamida (PC), para uso caseiro e profissional, sobre cultura de fibroblastos de mucosa de tecido gengival humano (FMM1). As células utilizadas foram cultivadas em DMEM e após 24 horas foi colocado meio de cultivo condicionado com os agentes clareadores: G1- PC 35% sem fotoativação (SF); G2- PC 35% ativado por luz halógena; G3- PC 35% ativado por diodo emissor de luz (LED); G4- PC 37% SF; G5- PC 37% ativado por luz halógena; G6- PC 37% ativado por LED; G7- PH 3% SF; G8- PH 7,5% SF; G9- PH 9,5% SF; G10- PC 10% SF; G11- PC 15% SF e G12- PC 20% SF. Uma curva padrão de viabilidade celular foi obtida a partir de células que não receberam tratamento (controle). O ensaio com MTT foi realizado após 24 e 48 horas, para avaliar a viabilidade celular. Paralelamente, foi medido colorimetricamente a quantidade de PH liberado nas condições experimentais. Os dados da viabilidade celular obtidos foram analisados estatisticamente através dos testes ANOVA e Tukey, ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Dentre os agentes clareadores para uso profissional o PC 37% apresentou maior citotoxicidade e quantidade de peróxido de hidrogênio liberada que o PC 35%. A ativação por luz halógena ocasionou maior citotoxicidade e maior quantidade de PH liberado. Dentre os agentes clareadores para uso caseiro a base de peróxido de hidrogênio houve uma maior taxa de sobrevivência celular na concentração mais baixa de peróxido de hidrogênio (PH 3%); nos clareadores a base de peróxido de carbamida houve uma maior taxa de sobrevivência celular na concentração mais baixa de peróxido de carbamida (PC 10%). A taxa de sobrevivência celular foi significativamente menor após 48 horas. Concluiu-se que a citotoxicidade foi proporcional à concentração do agente clareador e que a fotoativação com luz halógena aumentou a liberação de peróxido de hidrogênio.

PALAVRAS CHAVE: clareamento dental, peróxido de hidrogênio, cultura de células, citotoxicidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) caixa de acondicionamento de tubos criogênicos; c) tubo criogênico contendo as células FMM1.....	37
Figura 2 –	a) meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina; b) frascos utilizados para realização de subcultura de células.....	39
Figura 3 –	Colocação de suspensão para realização da contagem celular: a) e b) 10 µl de meio com células sendo colocadas na câmara de Neubauer; c) câmara de Neubauer para contagem celular.....	40
Figura 4 –	Agentes clareadores de uso profissional utilizados: a) peróxido de carbamida 37% (Whiteness Super, FGM), b) peróxido de carbamida 35% (Opalescence Quick, Ultradent).	43
Figura 5 –	Agentes clareadores de uso caseiro utilizados: a) peróxido de hidrogênio 3% (Byofórmula – farmácia de manipulação), b) peróxido de hidrogênio 7,5% (PolaDay, SDI), c) peróxido de hidrogênio 9,5% (PolaDay, SDI), d) peróxido de carbamida 10% (Opalescence PF, Ultradent), d) peróxido de carbamida 15% (Opalescence PF, Ultradent), e) peróxido de carbamida 20% (Opalescence PF, Ultradent).....	44
Figura 6 –	Ensaio com MTT: a) DMSO (Sigma Aldrich, Germany) e MTT (Sigma Aldrich, Germany), b) leitora de microplacas espectrofotômetro).....	46
Figura 7 –	Representação gráfica dos valores de absorbância para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.	55
Figura 8 –	Gráfico de barras ilustrando a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.....	65
Figura 9 –	Representação gráfica dos resultados para cada uma das condições experimentais dos agentes clareadores para uso profissional.....	66
Figura 10 -	Representação gráfica dos resultados para cada uma das condições experimentais dos agentes clareadores para uso caseiro.....	67
Figura 11 -	Gráfico das médias da taxa de sobrevivência celular obtidas nos grupos de agentes clareadores de uso profissional comparadas com a curva padrão de	

	viabilidade e crescimento celular (controle).....	69
Figura 12	Gráfico das médias da taxa de sobrevivência celular obtidas nos grupos de agentes clareadores de uso caseiro comparadas com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular (controle).....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Divisão dos grupos experimentais com agentes clareadores para uso em consultório.....	42
Quadro 2 -	Divisão dos grupos experimentais com agentes clareadores para uso caseiro.....	43
Quadro 3 -	Volume de Tiossulfato de Sódio 0,1 N gastos na titulação da amostra de peróxido de hidrogênio.....	50
Quadro 4 -	Volumes de tiossulfato de Sódio 0,1N gastos na titulação do Branco.....	50
Quadro 5 -	Diluições realizadas para obtenção de amostras contendo de 0,5 a 2,5 µg de peróxido de hidrogênio	54
Quadro 6 -	Valores da leitura em espectrofotômetro do metabolismo celular para o grupo controle.....	59
Quadro 7 -	Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso profissional, expressados em porcentagem de células viáveis, após 24 horas.....	60
Quadro 8 -	Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso caseiro, expressados em porcentagem de células viáveis, após 24 horas.....	61
Quadro 9 -	Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso profissional, expressados em porcentagem de células viáveis, após 48 horas.....	62
Quadro 10 -	Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso caseiro, expressados em porcentagem de células viáveis, após 48 horas.....	63
Quadro 11 -	Quantidades de peróxido de hidrogênio, em µg, liberada na simulação das condições experimentais.....	64
Tabela 1 -	Estatística descritiva dos valores de metabolismo celular obtido na avaliação após 24 horas.....	67
Tabela 2 -	Estatística descritiva dos valores de metabolismo celular obtido na avaliação após 48 horas.....	68
Tabela 3 -	Valores referentes às médias da taxa de sobrevivência celular (%) nos diferentes tempos de avaliação (continua). Valores referentes a viabilidade celular nos diferentes tempos de avaliação.....	68
Tabela 4 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso profissional) no tempo 24h.....	71
Tabela 5 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso caseiro) no tempo 24h.....	72

Tabela 6 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso profissional) no tempo 48h.....	73
Tabela 7 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso caseiro) no tempo 48h.....	73
Tabela 8 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador de uso profissional.....	74
Tabela 9 -	Teste de Tukey para a variável agente clareador de uso caseiro.....	75
Tabela 10 -	Valores de p dos agentes clareadores testados em relação ao grupo controle.....	76
Tabela 17 -	Teste Anova para a variável tempo.....	77

1 INTRODUÇÃO

Na busca por sorrisos esteticamente agradáveis, o clareamento é uma opção de tratamento bastante utilizada, uma vez que é de fácil realização e oferece harmonia de cor aos dentes, um componente essencial da estética, além disso, é um tratamento relativamente não-invasivo que permite a preservação dos tecidos dentários.

O clareamento dental foi inicialmente referido como uma opção estética no fim do século XIX (Suliman et al., 2004; Dostalova et al., 2004), entretanto foi na década de 80, com o surgimento do clareamento caseiro, que as técnicas para tornar os dentes mais claros se difundiram, tornando-se um dos procedimentos estéticos dentais mais populares (Papathanasiou et al., 2002), possibilitando corrigir ou melhorar a cor dos dentes com baixo custo (Dostalova et al., 2004).

O clareamento de dentes com vitalidade pulpar pode ser realizado em consultório ou ser administrado pelo próprio paciente sob supervisão do profissional (clareamento caseiro), ou ainda pode ser utilizada a associação das técnicas de consultório e caseira. Para isto, utilizam-se os peróxidos de carbamida ou hidrogênio em concentrações que variam de 10-37% e 3-38%, respectivamente (Valera et al., 2005). Há também o clareamento caseiro sem supervisão, onde os sistemas clareadores são vendidos diretamente ao consumidor, entretanto este método não é indicado pelo cirurgião dentista.

No clareamento de dentes com vitalidade pulpar uma das grandes preocupações do profissional está relacionada à ação do peróxido na polpa, uma vez que este peróxido penetra através do esmalte e dentina podendo atingir a câmara pulpar (Cooper et al., 1992; Gökay et

al., 2000; Benetti et al., 2004; Sulieman et al., 2005). Entretanto, esta penetração é proporcional às concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo que a quantidade de peróxido de hidrogênio que penetra nos tecidos dentários e chega ao tecido pulpar aumenta com a elevação da concentração do agente clareador (Bowles; Ugweneri, 1987; Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998; Gokay et al., 2000; Benetti et al., 2004). Enquanto alguns autores consideram a utilização de agentes clareadores um procedimento seguro (Matis et al., 2000), outros acreditam que o peróxido de hidrogênio possa provocar irritação no tecido pulpar (Li, 1996) ou alteração na estrutura dentária (Benetti et al., 2004).

As técnicas de clareamento para dentes com vitalidade pulpar podem induzir o aparecimento da sensibilidade pós-operatória, sendo este desconforto mais acentuado nas técnicas de consultório (Nathanson, 1997). Essa reação pode ser devida a penetração do peróxido para o interior da câmara pulpar, uma vez que o mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio, as causas da sensibilidade e os efeitos da exposição prolongada dos agentes clareadores para os tecidos ainda não estão totalmente esclarecidos (Kugel; Ferreira, 2005).

Existe ainda a possibilidade de realizar, nas técnicas de consultório, a ativação dos agentes clareadores que contém peróxido de hidrogênio com diferentes fontes de luz que possui como objetivo reduzir o tempo clínico ou aumentar o efeito clareador. Para isto, utilizam-se luz alógena, diodo emissor de luz (LED), diferentes tipos de laser (argônio, CO₂ ou Nd:YAG), arco de plasma e luz infravermelha. Embora a ativação do agente clareador permita o clareamento num menor tempo clínico, quando comparado à ativação química do material (Dostalova et al., 2004), não há diferença significativa no resultado final do clareamento obtido, porém pode haver um aumento dos efeitos deletérios (Wetter et al., 2004; Papathanasiou et al., 2002; Sulieman et al., 2005; Marson et al., 2008).

O uso de fontes de ativação para os agentes clareadores pode levar a uma somatória de agressões aos tecidos, especialmente à polpa, uma vez que pode elevar a temperatura intrapulpar e/ou propiciar maior penetração de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar (Papathanasiou et al., 2002; Dahl; Pallesen, 2003; Buchalla & Attin, 2007). A associação de calor e peróxido de hidrogênio pode causar, em curto prazo, alterações desde leve inflamação da polpa e hemorragia (Robertson et al., 1980) até alterações pulpares severas, incluindo alteração de odontoblastos, hemorragia, inflamação e reabsorção interna da dentina (Nathanson, 1997). O aumento de temperatura, em dentes vitais, tem efeito sobre o tecido pulpar, sob risco de ocorrerem danos irreversíveis a este tecido (Zach; Cohen, 1965; Buchalla; Attin, 2007).

Embora alguns autores afirmem que o clareamento dental é relativamente seguro e efetivo desde que seja supervisionado pelo cirurgião-dentista (Aren, 2003; Daduon; Bartlett, 2003), o peróxido de hidrogênio pode reagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, potencializando a ocorrência de danos celulares (Daduon; Bartlett, 2003).

Para avaliar os efeitos biológicos dos materiais dentários, o teste mais comumente utilizado é o de citotoxicidade em cultura de células, fornecendo um rápido e consistente resultado em relação à atividade biológica do material testado (Costa, 2001; Estrela, 2001; Azevedo et al., 2003; Lima et al., 2009). A cultura de células possibilita o controle das condições fisiológicas, pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e CO₂, além de possibilitar a formação de grupos com características homogêneas. Dessa forma, os resultados obtidos a partir dos testes de citotoxicidade apresentam alta reprodutibilidade e credibilidade, uma vez que as variáveis são minimizadas (Freshney, 2000).

Uma vez que o peróxido penetra para o interior da câmara pulpar e que a fotoativação e a concentração dos agentes clareadores influenciam nesta penetração, a realização de estudos para analisar as

reações celulares ao peróxido permitirá estabelecer uma correlação destas alterações com as reações do tecido pulpar ao peróxido de hidrogênio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O clareamento dental é um tratamento de rotina nos consultórios odontológicos desde a década de 70 (Nathanson, 1997). É um dos procedimentos mais empregados na obtenção da estética do sorriso devido sua relativa facilidade e eficácia, além de ser uma opção conservadora de tratamento para dentes escurecidos, quando comparado com restaurações com resina composta, facetas ou coroas (Deliperi et al., 2004; Sulieman et al., 2005).

Atualmente, existem duas técnicas para clareamento para de dentes com vitalidade pulpar: técnica de uso profissional e técnica de clareamento caseiro supervisionada (Haywood; Heymann, 1989). Os agentes clareadores para uso profissional apresentam elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (35%, 37% ou 38%) e peróxido de carbamida (35% ou 37%). Esta técnica geralmente utiliza uma fonte de calor ou luz para acelerar o processo de reação do peróxido de hidrogênio (Gökay et al., 2000). A técnica de clareamento caseiro, introduzida por Haywood e Heymann no ano de 1989 (Haywood; Heymann, 1989) consiste da utilização de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida em concentrações mais baixas (10% a 20%) que os agentes de uso em consultório ou peróxido de hidrogênio (1,5% a 9,5%). Estes agentes químicos são utilizados pelos pacientes em aplicações diárias de 1 a 8 horas com moldeira personalizada, por períodos que podem variar de 2 a 4 semanas (Haywood, 1997). O clareamento dental de uso caseiro supervisionado tem sido amplamente empregado, principalmente pela sua praticidade e baixo custo.

Para o clareamento de uso profissional ou de uso caseiro o agente clareador utilizado é o peróxido de hidrogênio ou produtos que

se dissociam, e possuem o peróxido de hidrogênio como subproduto. O peróxido de carbamida, por ser uma substância instável, quando entra em contato com saliva ou tecidos se dissocia, apresentando o peróxido de hidrogênio como substância ativa. O peróxido de carbamida a 10% dissocia em peróxido de hidrogênio a 3,6% e uréia a 6,4%. O peróxido de hidrogênio degrada-se em oxigênio e água enquanto que a uréia em amônia e dióxido de carbono (Feinman et al., 1987).

Os agentes clareadores dentais, peróxido de carbamida e peróxido de hidrogênio, sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais oxidativos, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas (Kawamoto; Tsujimoto, 2004). As espécies reativas derivadas do oxigênio são conhecidas como promotoras de injúrias às células vivas devido ao estresse oxidativo que promovem. O estresse oxidativo pode causar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade (Li, 1996; Floyd, 1997; Kanno et al., 2003).

O clareamento dentário é possível devido à permeabilidade da estrutura dental aos agentes clareadores, e ao baixo peso molecular de alguns componentes químicos ativos, tal como o peróxido de hidrogênio (Arwill et al., 1969; Pashley et al., 1987; Hanks et al., 1993). Estes dois fatores isoladamente, ou em conjunto, parecem facilitar a livre difusão dos agentes clareadores pelos tecidos dentais (Hanks et al., 1993; Li, 1996).

Alguns autores mostraram que o peróxido de hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, penetra muito facilmente no esmalte e se difunde em profundidade na dentina para alcançar a polpa dental (Hanks et al., 1993; Thitinanthapan et al., 1999; Gökay et al., 2000). Além disso, a difusão do peróxido de hidrogênio pelos tecidos dentais pode ser aumentada quantitativamente pelo contato do agente clareador com áreas expostas de dentina, abrasões, erosões, desgastes, defeitos no esmalte, ou em áreas marginais entre o dente e a restauração.

Desta forma, alguns estudos comprovaram a difusão do peróxido de hidrogênio proveniente de agentes clareadores pelos tecidos dentais e determinaram a quantidade deste composto químico capaz de ultrapassar o esmalte e dentina para alcançar a polpa durante os procedimentos de clareamento dental (Bowles; Ugweneri, 1987; Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Thitinanthapan et al., 1999; Gökay et al., 2000). Estes estudos *in vitro* avaliaram diferentes agentes clareadores em diversas condições experimentais, variando concentração e temperatura.

No trabalho de Bowles e Ugweneri (1987), foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio penetra nos tecidos duros dentais e atinge a câmara pulpar mesmo em baixas concentrações. Os autores determinaram, ainda, que a quantidade de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar pode aumentar com a elevação de sua concentração, sendo que para 1%, 10% e 30% os valores foram de 1,8 µg; 5,8 µg e 25,4 µg, respectivamente. Os autores demonstraram haver penetração substancial de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar.

Utilizando um dispositivo que simulava a câmara pulpar, *in vitro*, Hanks et al. (1993) avaliaram a quantidade peróxido de hidrogênio capaz de se difundir através de discos de dentina de 0,5 mm de espessura. Foram aplicados peróxido de hidrogênio 10% e 3%, e o peróxido de carbamida 10% e 15%. Todos os produtos apresentaram difusão do peróxido de hidrogênio, sendo que quantidades significantes de peróxido de hidrogênio penetraram através da dentina, em um período menor que 15 minutos. Os autores sugeriram que a quantidade de peróxido de hidrogênio que atravessa a dentina depende da concentração do agente clareador e do tempo de aplicação.

Estes dados estão em concordância com os estudos realizados por Gökay et al. (2000) e Benetti et al. (2004), os quais também concluíram que quanto mais elevada a concentração do agente clareador aplicado sobre a estrutura dentária, maior a penetração do

peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar, especialmente se estes dentes apresentarem restaurações.

Recentemente, foi introduzida uma técnica de clareamento que usa tiras flexíveis aplicadas diretamente sobre os dentes. Estas tiras contêm várias concentrações de peróxido de hidrogênio (5,3%, 6,5% e 14%) e eliminam a necessidade da utilização de moldeiras. Gökay et al. (2004) avaliaram *in vitro* a possível penetração de dois agentes clareadores (peróxido de hidrogênio 6,5% e 14%), contidos nestas tiras, para o interior da câmara pulpar. Os resultados indicaram que o peróxido de hidrogênio presente nestas tiras de clareamento realmente penetra na câmara pulpar e é proporcional a concentrações mais altas de peróxido de hidrogênio. Uma tira clareadora e três clareadores líquidos (*paint-on*), encontrados para venda direta ao consumidor, foram avaliados por Gökay et al. (2005) que verificou que o peróxido de hidrogênio oriundo dos quatro produtos testados chegou ao interior da câmara pulpar, sendo a maior quantidade encontrada de peróxido no grupo em que foi aplicada a tira clareadora.

De acordo com Auschill et al. (2005) a comparação entre clareamento caseiro com peróxido de carbamida 10%, tiras clareadoras de venda direta ao consumidor e clareamento de uso profissional com peróxido de hidrogênio 38% mostrou resultados semelhantes, entretanto o número de sessões necessárias para atingir o resultado desejado variou, sendo que em uma concentração maior de peróxido de hidrogênio ocorre um clareamento mais rápido.

Cooper et al. (1992) quantificaram o peróxido de hidrogênio liberado a partir do peróxido de carbamida 10% ou 15% e o gel de peróxido de hidrogênio 5% ou 30% e concluíram que ocorre menor penetração pulpar de peróxido de hidrogênio a partir do peróxido de carbamida quando comparado ao peróxido de hidrogênio livre.

Braun et al. (2007) avaliaram a eficiência do clareamento dental empregando diferentes concentrações de peróxido de carbamida

(10% e 17%). Os resultados indicaram que ambos obtiveram um clareamento similar após uma semana, porém o agente de maior concentração agiu de forma mais rápida.

Outro importante fator que parece ter relação direta com o aumento da difusão dos agentes clareadores através das estruturas dentárias para atingir a polpa dental é o calor (Bowles; Ugweneri, 1987). O peróxido de hidrogênio e o calor são dois componentes importantes que fazem parte da técnica comumente usada no clareamento dental. O calor é aplicado com a finalidade de acelerar a reação química do peróxido de hidrogênio com as estruturas dentárias.

Bowles e Ugweneri (1987), avaliaram a penetração pulpar do peróxido de hidrogênio 10%, expostos ao calor (37°C e 50°C) e demonstraram haver maior penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar quando se utiliza fotoativação com aumento de temperatura.

A utilização de luz na ativação do agente clareador deve ser criteriosa, considerando os riscos potenciais ocasionados por esta modalidade de clareamento (Sydney et al., 2002; Luk et al., 2004, Buchalla; Attin, 2007). A ativação do processo de clareamento tem sido adotada, com grande frequência, como marketing e como forma de agregar valor ao tratamento (Christensen, 2003). O mecanismo de ação dos fotoativadores como laser, fontes de luz e de calor associados ao clareamento mostram-se limitados sob o ponto de vista científico (Buchalla ; Attin, 2007).

Vários estudos mostram que a utilização de fontes de luz não melhora significativamente o efeito clareador e contribui para a ocorrência de efeitos indesejáveis, tanto para tecidos duros dentais quanto para polpa (Papathanasiou et al., 2002; Christensen, 2003; Joiner, 2006). Papathanasiou et al. (2002) avaliaram a efetividade do peróxido de hidrogênio a 35% fotoativado ou não verificando que não houve diferença

no clareamento utilizando-se ou não fotoativação por luz halógena após sessão única.

Ao avaliar os danos causados pelo aumento de temperatura no tecido pulpar, Zach; Cohen (1965), sugeriram que o aumento de temperatura em 5,6°C, 11,2°C e 16,8°C causaram 15%, 60% e 100% de danos pulpares irreversíveis, respectivamente.

Também pesquisando os efeitos da elevação da temperatura, Rotstein et al. (1991) realizaram um trabalho no qual avaliaram o efeito do tempo de contato com o agente clareador e da temperatura na permeabilidade radicular ao peróxido de hidrogênio 30%. Os autores observaram que quanto maior o tempo de contato com o agente clareador e maior a temperatura, maior a penetração do peróxido de hidrogênio na dentina. Os autores sugerem uma diminuição do tempo de clareamento e do uso do calor quando há utilização do peróxido de hidrogênio.

Baik et al. (2001) também estudaram o aumento de temperatura na câmara pulpar após a exposição a diferentes fontes fotoativadoras, arco de plasma, luz halógena convencional, luz halógena de alta intensidade e laser de argônio. De acordo com os autores, a utilização de fontes de alta intensidade, como aparelho de arco de plasma e luz halógena de alta intensidade, elevam a temperatura intrapulpar, podendo causar sensibilidade. Em 2003, Yap e Soh quantificaram e compararam a emissão térmica de LED e luz halógena. A emissão térmica foi significativamente menor com o uso do LED quando comparado a luz halógena.

Luk et al. (2004), avaliaram o efeito clareador e as mudanças de temperatura no dente induzidos por diferentes combinações de agentes clareadores e tipo de luz utilizada no clareamento, sugerindo que a eficiência do clareamento e aumento da temperatura foi influenciada significativamente pela interação entre tipo de luz e agente clareador.

Eldeniz et al. (2005) mediram o aumento de temperatura intrapulpar induzido por agentes clareadores, a base de peróxido de hidrogênio 35%, em dentes submetidos a ativação por luz halógena, LED e laser de diodo. Dentre as unidades de luz avaliadas, o laser diodo induziu um aumento de temperatura maior e o LED menor; ainda, segundo os autores, a elevação da temperatura foi considerada crítica para a saúde pulpar. Entretanto, Sulieman et al. (2005) ao pesquisar o efeito na temperatura pulpar de diferentes fontes de luz, arco de plasma, luz halógena de xenônio, luz halógena convencional e laser de diodo, associadas ao clareamento dental, observaram um aumento de temperatura intrapulpar abaixo do limiar crítico de 5,5°C.

Buchalla; Attin (2007) sugerem uma avaliação criteriosa da necessidade de ativação do agente clareador durante o clareamento de dentes com vitalidade pulpar, devido às possíveis complicações biológicas como a irritação pulpar conseqüente da aplicação de luz ou calor.

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a eficácia de soluções clareadoras com variadas concentrações, com peróxido de hidrogênio ou peróxido de carbamida usados como ingrediente ativo primário (Auschill et al., 2005).

Em um estudo clínico, Jorgensen e Carrol (2002), encontraram sensibilidade pós-operatória em metade dos pacientes avaliados após serem submetidos ao clareamento de uso caseiro supervisionado com peróxido de carbamida 15%, durante 4 semanas. Entretanto, Deliperi et al. (2004) testaram, *in vivo*, a associação do clareamento de consultório (peróxido de hidrogênio 35% e 38%) associado ao clareamento caseiro (peróxido de carbamida 10%) e não verificaram diferença significativa no efeito clareador dos dois agentes de consultório. Também, não houve relato de sensibilidade por nenhum dos pacientes, fato que foi atribuído à limitação de uma hora de aplicação do agente, à formulação dos agentes clareadores (presença de nitrato de

potássio e flúor no gel de peróxido de carbamida), à presença de 35% a 37% de água nos agentes clareadores de consultório e à ausência de fotoativação.

O aumento nas concentrações de peróxido nos produtos para clareamento dental, gera preocupação sobre os efeitos deletérios causados pelo clareamento sobre os tecidos bucais, sendo que o uso indiscriminado de agentes clareadores podem potencialmente causar alterações em todos os tecidos dentários, em especial sobre a polpa dentária (Pugh et al., 2005). De acordo com Naik et al. (2006) o peróxido de hidrogênio é uma substância altamente reativa, que pode causar danos aos tecidos orais, principalmente quando está presente em altas concentrações e com exposição por tempo prolongado.

Quando o clareamento não é realizado adequadamente pode causar injúrias aos tecidos bucais, sendo que uma alta dosagem de peróxido de hidrogênio (30% a 35%) pode causar queimaduras no tecido gengival (Dahl; Pallesen, 2003; Naik et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Tredwin et al., 2006). De acordo com o estudo *in vitro* de Tipton et al. (1995), os agentes clareadores mostraram-se tóxicos para fibroblastos de origem gengival, apresentando efeitos significantes na viabilidade, morfologia, proliferação e atividades funcionais, que são importantes para a manutenção do tecido e da saúde deste.

Cohen e Chase (1979) analisaram cortes histológicos do tecido pulpar, de dentes humanos, submetidos ao clareamento com peróxido de hidrogênio 35% associado à aplicação de calor, sendo que não encontraram evidências de alterações teciduais significantes. A análise histopatológica mostrou que as condições pulpares dos grupos experimentais foram semelhantes ao controle em todos os tempos pós-operatórios avaliados, sendo que a camada de odontoblastos estava intacta.

Nathanson (1997), afirma que tanto o clareamento de consultório quanto o caseiro são capazes de induzir desconforto pós-

operatório em número significativo de pacientes, que parece ser reduzido com a utilização de concentrações menores de peróxido e/ou tempo de aplicação reduzido.

Fugaro et al. (2004) também avaliaram a resposta pulpar após o clareamento caseiro com gel peróxido de carbamida 10%. De acordo com os resultados da análise microscópica a maioria dos dentes não apresentou reações pulpares significantes. Além disso, as alterações pulpares desapareceram após duas semanas do tratamento clareador, sugerindo que o clareamento dental com peróxido de carbamida 10% é seguro para a polpa dental. Neste mesmo ano Gerlack et al. (2004) avaliaram a efetividade e a segurança no uso de tiras impregnadas com peróxido de hidrogênio a 10% (Whitestrips). Os resultados mostraram que o uso de Whitestrips promoveu significativa melhora da cor. O tratamento foi bem tolerado pelos pacientes demonstrando a segurança no uso.

Anderson et al. (1999), avaliaram a resposta pulpar após clareamento com peróxido de carbamida 10%. Utilizaram um marcador imunohistoquímico para verificar a presença da enzima HO-1 (Heme oxigenase-1). O aumento da HO-1 é uma reação de defesa contra os efeitos dos radicais livres, tal como o peróxido de hidrogênio. As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada. Porém, as células pulpares localizadas no centro da polpa e região radicular, mostraram resultado imunohistoquímico negativo. Os resultados indicaram que a polpa responde ao estresse oxidativo em nível molecular, o que pode representar um componente inicial de resposta de defesa mediada por células específicas em locais estratégicos no tecido pulpar, precedendo a resposta inflamatória clássica.

No trabalho de Bowles e Thompson (1986) foi avaliado, em nível molecular, o efeito do peróxido de hidrogênio e do calor, sobre enzimas presentes no tecido pulpar de dentes bovinos, as quais estão diretamente envolvidas no metabolismo de glicose e aminoácidos. De

acordo com os autores as enzimas pulpareas são significativamente inibidas pelo peróxido de hidrogênio, principalmente quando associado ao calor, e afirmam que estes dados sugerem que a combinação de calor e peróxido de hidrogênio tem potencial para causar danos biológicos.

Entretanto, Robertson e Melfy (1980) encontraram alterações pulpareas em dentes submetidos ao clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35% associado ao calor. Os autores avaliaram histologicamente a resposta pulpar em dentes humanos hígidos submetidos à aplicação de duas sessões de 5 minutos de peróxido de hidrogênio na concentração de 35%, associado ou não à aplicação de calor. Após análise histológica verificou-se que nos dentes submetidos ao tratamento de calor associado ao peróxido de hidrogênio havia discreta resposta inflamatória, limitada ao tecido pulpar superficial, com presença de leucócitos e linfócitos, indicativos de resposta aguda, além de indícios de reação quimiotática. As reações foram classificadas como leves e possivelmente reversíveis e a conclusão foi que o peróxido de hidrogênio associado ao calor causa irritação do tecido pulpar. Todavia, está evidente que a aplicação de calor sobre a estrutura dentária com o objetivo de favorecer e acelerar o clareamento dental pode ocasionar danos ao tecido pulpar em períodos curtos de avaliação.

Seale et al. (1981) avaliaram em dentes de cães a aplicação de peróxido de hidrogênio 35% e/ou calor. Os resultados mostraram que aos 3 e 15 dias após o tratamento, havia resposta inflamatória intensa na polpa coronária dos dentes dos cães, com destruição dos odontoblastos, ausência de pré- dentina, denso infiltrado inflamatório e áreas de erosão sugestivas de reabsorção interna. Estes resultados foram semelhantes para os dentes tratados com peróxido de hidrogênio isoladamente ou peróxido de hidrogênio associado ao calor. No entanto, estas intensas alterações pulpareas iniciais apresentaram evidências de reversibilidade após 60 dias.

Surge então a preocupação com os possíveis danos sobre o tecido e células da polpa.

Todos os materiais ou agentes químicos desenvolvidos para utilização na área odontológica ou médica, antes de serem introduzidos no mercado, devem ser submetidos a testes preliminares de citotoxicidade e biocompatibilidade, os quais avaliam as propriedades biológicas e os fatores de risco. Especificamente para a área odontológica, a avaliação completa de um material dentário necessita, de acordo com a ANSI/ADA, ISO e *Federation Dentaire International*, passar por uma seqüência de testes: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação clínica (pré-clínico). Os testes iniciais são realizados com a intenção de determinar os efeitos tóxicos de um material e inclui vários métodos, como por exemplo, o teste em cultura de células, devendo sempre simular as condições de uso no tecido de destino.

Quando devidamente padronizados, os testes de citotoxicidade em cultura de células são facilmente reproduzíveis, produzem resultados rápidos e bastante sensíveis, além de possibilitarem o controle da maior parte das variáveis. Estes testes são de custo relativamente baixo, e, determinam de maneira preliminar, o possível efeito citopático de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados, determinando a necessidade de dar continuidade na avaliação do material nos demais níveis de pesquisa, podendo reduzir inclusive a necessidade de testes em animais (Costa, 2001). Por definição, citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este agente provoca às células (Li, 1996).

A interação dos materiais e seus componentes com as células em nível molecular é responsável por grande parte das reações teciduais, tais como inflamação, necrose, alterações imunológicas, mutagênicas e carcinogênicas. Além disso, os testes de citotoxicidade em cultura de células podem avaliar, também, os efeitos provocados por um determinado agente nas alterações metabólicas, crescimento das células,

alterações na permeabilidade da membrana e citopatogenéticas. Desta maneira, testes iniciais foram recomendados e estandardizados por importantes Organizações, Federações e Associações internacionais, e se caracterizam, até os dias de hoje, como métodos essenciais para se avaliar a toxicidade de um material ou técnica nova.

Até o momento existem poucos estudos relatando os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores sobre as células da polpa, sendo que a maioria destes estudos foram realizados in vivo. Alguns estudos realizados in vitro avaliaram os efeitos do peróxido de hidrogênio diretamente sobre fibroblastos de ratos em cultura.

Quanto a citotoxicidade dos agentes clareadores, Aren (2003) e Hanks et al. (1993) verificaram que o peróxido de hidrogênio apresenta citotoxicidade sobre fibroblastos de carcinoma mamário FM3A e em fibroblastos Balb/c 3T3, respectivamente.

No trabalho de Hanks et al. (1993), utilizando uma câmara pulpar in vitro, os autores relataram que quando peróxidos são aplicados diretamente sobre a dentina existe uma maior probabilidade de danos pulpares, particularmente devido à elevada permeabilidade da dentina exposta. Observaram que a citotoxicidade era influenciada tanto pelo tempo de exposição quanto pela concentração do agente clareador, e relataram ser importante observar alguns fatores como espessura da dentina e áreas de dentina exposta antes da aplicação do agente clareador sobre dentes com vitalidade pulpar. E, no estudo de Aren (2003) a avaliação foi realizada com a aplicação direta do agente clareador sobre a cultura de células de carcinoma mamário de ratas (FM3A). Encontrou alteração na viabilidade e no crescimento celular, sendo que os valores encontrados foram de 60% na taxa de viabilidade celular para o peróxido de hidrogênio 35% e de 43,5% para o peróxido de carbamida 20% em relação ao grupo controle (99,1%). Segundo o autor, ambos agentes clareadores demonstraram citotoxicidade, entretanto as técnicas de clareamento são relativamente seguras e efetivas, devendo

ser aceitas como opção de tratamento, desde que o paciente saiba dos riscos e benefícios.

Koulaouzidou et al. (1998) analisaram, em linhagens celulares L929 e BHK21/C13, a citotoxicidade de diferentes diluições do peróxido de uréia e peróxido de hidrogênio, e verificaram um efeito citotóxico tanto para o peróxido de uréia quanto o peróxido de hidrogênio. A citotoxicidade foi influenciada pela concentração do agente clareador e tempo de exposição. Também Ribeiro et al. (2005) verificaram que a concentração do agente clareador está diretamente relacionado ao dano celular. Estes autores verificaram o dano genético induzido por agentes clareadores (16% - Clarigel Gold, Whitespeed, Nite White Excel 2 e Magic Bleaching; 35%- Whiteness HP e Lase Peroxide) em células de linfoma de rato, e, todos os agentes clareadores testados contribuíram para danos no DNA celular.

Lima et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade transdentinária do gel de peróxido de carbamida 10% e 16% sobre células pulpares em cultura (linhagem odontoblástica MDPC-23), e analisaram o potencial antioxidante do ascorbato de sódio 10% na proteção destas células. A viabilidade celular foi mensurada através do teste de MTT. De acordo com os autores a difusão de componentes do PC 16% através dos túbulos dentinários causou o maior efeito tóxico para as células quando comparado aos demais grupos, e que o ascorbato de sódio 10% protegeu estas células.

Os trabalhos apresentados nesta revisão mostram que ainda há necessidade de pesquisas sobre os efeitos biológicos resultantes da utilização dos agentes clareadores. Portanto, este estudo propõe avaliar este efeito utilizando-se o teste de citotoxicidade.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar em cultura de fibroblastos pulpares gengivais a citotoxicidade de diferentes agentes clareadores:

- a) peróxidos de hidrogênio 3%, 7,5% e 9,5%;
- b) peróxidos de carbamida 10%, 15% e 20%;
- c) peróxidos de carbamida 35% e 37% sem e com fotoativação. Utilizando duas fontes de ativação: LED ou luz halógena.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo 1).

4.1 Cultivo das células

Foram utilizados fibroblastos de linhagem primária estabelecida a partir de tecido gengival humano (FMM1 – Laboratório de Cultura de Células - FOUSP). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Figura 2a), suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo (Prolab, São Paulo, Brasil) e após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas com auxílio de solução de tripsina 0,25% diluída em solução salina de tampão de fosfato (PBS) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), a fim de reduzir a toxicidade da tripsina. Em seguida, essas células foram semeadas em novo frasco. Após as passagens necessárias de subcultura (6ª passagem), as células foram semeadas em placas com 96 poços (Prolab, São Paulo, Brasil), onde receberam posteriormente os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco grande de cultura de célula (garrafa 75 cm² – 270 ml), foram pipetados 10 ml de meio de cultura recém preparado; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. Paralelamente, em um tubo de ensaio (Prolab, São Paulo, Brasil) de 15 ml foram colocados 10 ml de meio de cultura, que serviu para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância na qual a célula é congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) que continham as células desejadas (Figura 1a e 1b). Um tubo criogênico (Prolab, São Paulo, Brasil) (Figura 1c), contendo as células, foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no tubo de ensaio contendo meio de cultura. O tubo de ensaio foi então levado à centrífuga (Qumis, Brasil) por 5 minutos a 1000 rpm e ao ser retirado observou-se a formação de um precipitado de células, chamado de *pelet*. Na capela o meio de cultura sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio fresco e então colocadas no frasco para cultura de células previamente preparado. O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).

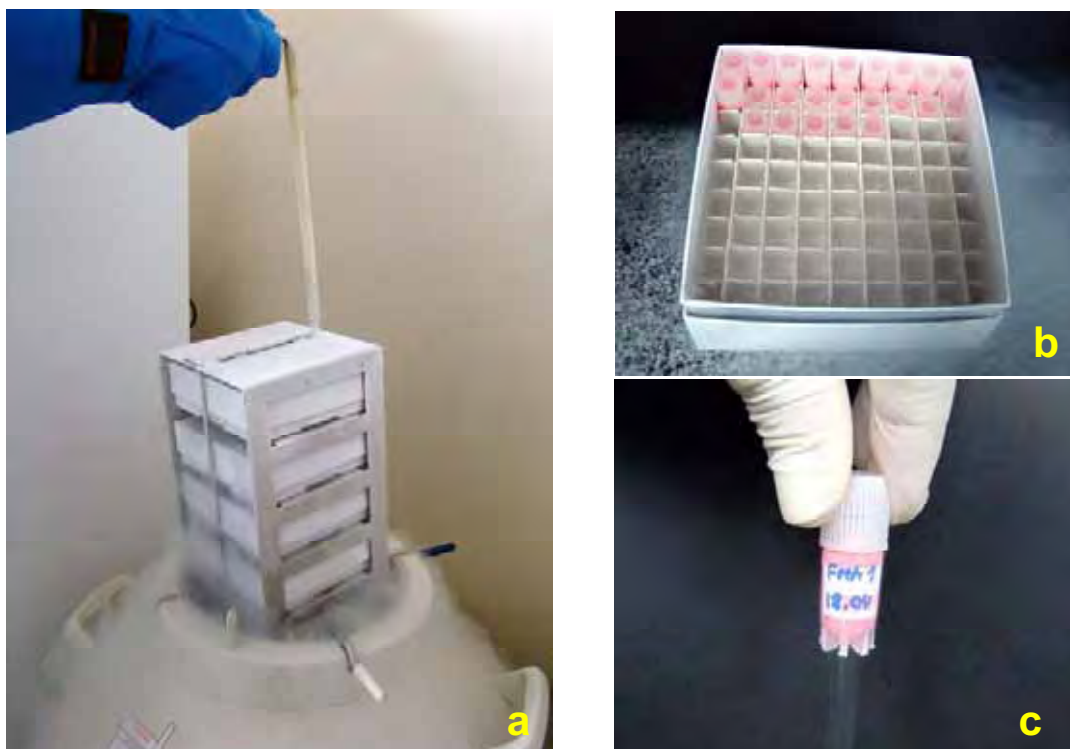


Figura 1 – a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) caixa de acondicionamento de tubos criogênicos; c) tubo criogênico contendo as células FMM1.

4.1.2 Troca de meio

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Para isto, as células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com PBS para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco, o qual foi levado novamente para a estufa.

4.1.3 Subcultura

Quando observou-se um crescimento celular ocupando quase todo o frasco (80% de confluência) foi necessário realizar subcultura, passando as células de um frasco para dois ou mais (Figura 2b), de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi retirado com auxílio de um pipetador automático (High Tech Lab, Poland) e reservado em um tubo de ensaio. As células foram então lavadas com 5 ml de PBS (Figura 2a) que foi aspirado em seguida. Foi adicionado ao frasco 5 ml de tripsina (Figura 2a), utilizada para destacar as células. O frasco com tripsina foi levado à estufa onde permaneceu por 2 a 3 minutos e em seguida leve batidas no fundo do frasco foram realizadas, para auxiliar na remoção destas. Estando as células prontas, o meio de cultura reservado foi colocado sobre elas, neutralizando a tripsina. Todo este conteúdo foi levado à centrífuga para obtenção do *pelet*. O sobrenadante foi novamente aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de meio fresco e após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 10 ml de meio de cultura, preparados previamente (Figura 2b). Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células atingissem entre a quinta e décima passagem e estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento da parte experimental.



Figura 2 - a) meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina; b) frascos utilizados para realização de subcultura de células.

4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada

em cada poço das placas (96 poços). Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*; sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 µl, os quais foram levados à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany) (Figura 3), que foi levada ao microscópio de luz invertida para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos.

Para obtenção da quantidade de células por ml, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^4 = \text{n}^\circ \text{ células/ml}$$

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos. Foram plaqueadas 2000 células em 200 µl de meio em cada poço.

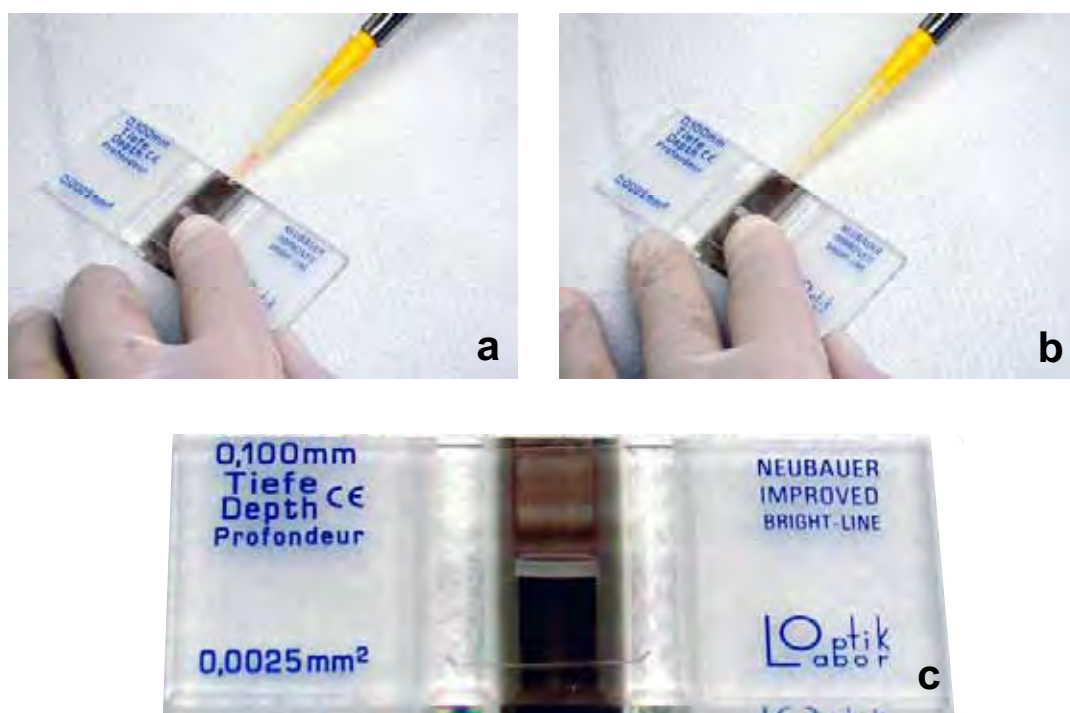


Figura 3 – Colocação de suspensão para realização da contagem celular: a) e b) 10 µl de meio com células sendo colocadas na câmara de Neubauer; c) câmara de Neubauer para contagem celular.

4.2 Plaqueamento

Foram utilizadas 3 placas de 96 poços para cada período de avaliação, duas para os grupos experimentais e uma para o grupo controle, totalizando 6 placas para cada repetição do experimento. Em cada período, foram utilizados quatro espécimes (poço) por grupo. As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 24 horas, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes por período, para cada grupo experimental.

4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação das células cultivadas sem aplicação dos tratamentos em teste. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT nos períodos de 24 e 48 horas. Foram avaliados doze espécimes para cada período, que corresponderam ao grupo controle.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Para o experimento foram utilizados 12 grupos experimentais, que foram divididos de acordo com o agente clareador, sua concentração e presença ou não de fotoativação. Os quadros 1 e 2 ilustram a divisão dos grupos experimentais e as Figuras 4 e 5 mostram os agentes clareadores utilizados.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais com agentes clareadores para uso em consultório

Grupo Experimental	N	Agente de condicionamento do meio	Procedência	Fotoativação
G1	12	Peróxido de carbamida 35%	Opalescence Quick, Ultradent	Sem fotoativação
G2	12	Peróxido de carbamida 35%	Opalescence Quick, Ultradent	Luz Halógena
G3	12	Peróxido de carbamida 35%	Opalescence Quick, Ultradent	LED
G4	12	Peróxido de carbamida 37%	Whiteness Super, FGM	Sem fotoativação
G5	12	Peróxido de carbamida 37%	Whiteness Super, FGM	Luz Halógena
G6	12	Peróxido de carbamida 37%	Whiteness Super, FGM	LED

Quadro 2 – Divisão dos grupos experimentais com agentes clareadores para uso caseiro

Grupo Experimental	N	Agente de condicionamento do meio	Procedência	Fotoativação
G7	12	Peróxido de hidrogênio 3%	Byofórmula – farmácia de manipulação	Sem fotoativação
G8	12	Peróxido de hidrogênio 7,5%	PolaDay, SDI	Sem fotoativação
G9	12	Peróxido de hidrogênio 9,5%	PolaDay, SDI	Sem fotoativação
G10	12	Peróxido de carbamida 10%	Opalescence PF, Ultradent	Sem fotoativação
G11	12	Peróxido de carbamida 15%	Opalescence PF, Ultradent	Sem fotoativação
G12	12	Peróxido de carbamida 20%	Opalescence PF, Ultradent	Sem fotoativação



Figura 4 - Agentes clareadores de uso profissional utilizados: a) peróxido de carbamida 37% (Whiteness Super, FGM), b) peróxido de carbamida 35% (Opalescence Quick, Ultradent).



Figura 5 - Agentes clareadores de uso caseiro utilizados: a) peróxido de hidrogênio 3% (Byofórmula – farmácia de manipulação), b) peróxido de hidrogênio 7,5% (PolaDay, SDI), c) peróxido de hidrogênio 9,5% (PolaDay, SDI), d) peróxido de carbamida 10% (Opalescence PF, Ultradent), e) peróxido de carbamida 15% (Opalescence PF, Ultradent), f) peróxido de carbamida 20% (Opalescence PF, Ultradent).

4.5 Condicionamento do meio de cultivo

Os agentes clareadores foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e colocados em tubos Falcon. Em cada tubo foi colocado 0,4 g de agente clareador e em seguida 2 ml de meio de cultura fresco, mantendo a proporção preconizada pela *American Society for Testing Materials* (Cavalcanti et al., 2005). Este método, descrito por Freshney, 2000, e empregado por Cavalcanti et al., 2005, simula a

situação de contato dos produtos liberados pelo material em teste (clareador) com camadas mais profundas dos tecidos, onde não há contato direto entre as células e o material e sim com os produtos liberados por estes. Para o grupo controle foi colocado apenas meio fresco. O meio foi mantido por 30 minutos em contato com os agentes clareadores, tendo sido anteriormente realizada a fotoativação dos grupos G2, G3, G5 e G6. A fotoativação destes grupos foi realizada com luz halógena (fotopolimerizador de luz halógena Curing Light (2500- 3M, 670mW/cm²) (G2- PC35% e G5-PC37%) ou diodo emissor de luz (LED) (Ultraled - Dabi-Atlante (130mW/cm²) (G3- PC35% e G6-PC37%), durante trinta segundos. Durante os 30 minutos de contato com o agente clareador o meio foi mantido em estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ a 5%. Após o condicionamento, 200 µl do meio condicionado foi colocado em cada poço correspondente a cada grupo experimental (contendo células), onde permaneceram por mais trinta minutos em estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ a 5%. Após este período o meio condicionado foi substituído por meio fresco e as análises com MTT foram realizadas nos períodos previstos (24 e 48 horas).

4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular

A avaliação foi realizada pela mensuração da atividade mitocondrial celular através do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT nas mitocôndrias. As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células

viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotíde e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT.

O ensaio com MTT foi realizado com o preparo do reagente, diluindo-se 0,5 mg de MTT (Sigma Aldrich Co., Germany) (Figura 6a) em 1 ml de solução de PBS. Como essa solução é sensível a luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 µl da solução de MTT foram adicionados em cada poço. Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu na estufa por uma hora. Após este período, o MTT foi removido e foram adicionados 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich Co., Germany) (Figura 6a) em cada poço, permanecendo na estufa por 10 minutos. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 minutos e a placa foi levada à leitora (Asys Hitech GmbH, Austria) previamente programada (Figura 6b). A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm.



Figura 6 – Ensaio com MTT: a) MTT (Sigma Aldrich, Germany) e b) leitora de microplacas (espectrofotômetro); DMSO (Sigma Aldrich, Germany).

4.7 Mensuração da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio

O condicionamento do meio de cultura fez com que o agente clareador liberasse peróxido de hidrogênio no mesmo. Dessa forma foi importante saber o quanto de peróxido foi efetivamente liberado a fim de relacionar este dado com o dano celular causado.

Para tornar possível esta etapa foi necessário conhecer a real concentração da solução de estoque de peróxido de hidrogênio, através da padronização do peróxido, para a obtenção de soluções de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio que foram utilizadas para o levantamento da curva padrão. Esta etapa, por sua vez, também foi de extrema importância para obter-se a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado nos meios de cultura em μg .

4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio

A padronização da solução de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo método da iodometria, reação do peróxido com solução de iodeto de potássio 1 M em meio ácido, liberando iodo, resultando numa solução âmbar escuro. O iodo liberado foi titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio 1 M, adicionada gota a gota, até que todo o iodo dissolvido na solução foi consumido e esta se tornou incolor. Durante este processo, ocorreram as seguintes reações:



4.7.1.1 Preparo das soluções

Para a realização da padronização foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de iodeto de potássio

Foram dissolvidos 16,6 g de iodeto de potássio (KI – Merck, Germany) p.a. em 1000 ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de 1,0 M;

- Solução padrão de tiosulfato de sódio

Foram pesados 6,205 g de tiosulfato de sódio pentahidratado p.a. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich Co., Germany) e dissolvidos em 250 ml de água deionizada para a obtenção da solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1 N;

- Solução de amido

Foram dissolvidos 0,25 g de amido solúvel p.a. (Synth – Labsynth Ltda, São Paulo, Brasil) em 50 ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de amido a 5,0 g/l. A solução foi fervida durante cinco minutos e após seu resfriamento, foi filtrada com algodão;

- Mistura ácida

Em um Becker submetido a banho de gelo, foram dissolvidos 0,09 g de Molibdato de amônio tetrahidratado p.a. $[(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ – Sigma Aldrich, Germany] em 375,0 ml de água deionizada.

O molibdato de amônio serviu como catalisador da reação. Em seguida, foram vagarosamente acrescentados 160ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 – Cinética Química Ltda, Brasil), em resfriamento constante. A mistura ácida foi essencial para que ocorresse a reação e, portanto, liberação de iodo;

- Solução da amostra de peróxido de hidrogênio

Foram transferidos 5,0 ml da solução de peróxido de hidrogênio a 35% v/v (H_2O_2 a 35% v/v, Asepticper – Solvay, Peróxidos do Brasil Ltda, Brasil) para um balão volumétrico de 1000 ml contendo 250,0 ml de água deionizada e duas gotas de ácido sulfúrico p.a. O volume do balão foi completado com água deionizada.

4.7.1.2 Titulação

Uma bureta de 25,0 ml foi preenchida com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 N. Foram transferidos, com pipeta volumétrica, 20,0 ml da solução de peróxido de hidrogênio para um erlenmeyer contendo 200,0 ml de água deionizada, assim como 10,0 ml da solução de iodeto de potássio 1,0 M e 25,0 ml da mistura ácida. O frasco foi agitado, tampado e permaneceu em repouso em local escuro durante dez minutos.

A solução do erlenmeyer foi titulada com a solução de tiossulfato de sódio, adicionando gotas da solução de amido próximo ao ponto de viragem, até se obter uma solução incolor. A quantidade de solução de tiossulfato utilizada na titulação foi inserida no Quadro 3.

Quadro 3- Volume de Tiossulfato de Sódio 0,1 N gastos na titulação da amostra de peróxido de hidrogênio

Amostra	Volume de Tiossulfato de Sódio (ml)
A1	23,4
A2	23,4
A3	23,4
Média	23,4

Paralelamente, duas provas em branco foram realizadas, nas mesmas condições da amostra, porém isentas da solução de peróxido de hidrogênio (Quadro 4).

Quadro 4 – Volumes de tiossulfato de Sódio 0,1 N gastos na titulação do Branco

Amostra	Volume de Tiossulfato de Sódio (ml)
B1	0,25
B2	0,25
Média	0,25

A concentração da solução de peróxido de hidrogênio em g/l foi calculada empregando-se a fórmula:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 85,04}{V}$$

Sendo:

A= Volume de Tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

B= Volume de Tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco;

C= Concentração da Solução de peróxido de hidrogênio;

V= Volume da Amostra de peróxido de hidrogênio pipetada para diluição, em ml.

$$C = \frac{(23,4 - 0,25) \times 85,04}{5} = 393,74 \text{ g/l}$$

Assim:

A padronização do peróxido de hidrogênio foi necessária para confirmar a concentração real da solução de peróxido de hidrogênio, que serviu como parâmetro para o preparo de soluções padrões, com volumes conhecidos de peróxido de hidrogênio, para que fosse obtida a curva padrão.

4.7.2 Levantamento da curva padrão

A curva padrão foi necessária para possibilitar a conversão dos valores de peróxido de hidrogênio liberado em microgramas de peróxido de hidrogênio.

4.7.2.1 Preparo das soluções

- Solução de corante violeta leucocristal

Foram pesados 30,0 mg do corante violeta leucocristal (ISigma Aldrich, Germany) e dissolvidos em 60,0 ml de solução de ácido clorídrico (HCl 0,5% v/v – Merck, Brasil), obtendo-se uma solução de 0,5 mg/ml;

- Solução tampão de acetato

a) preparo da solução de acetato de sódio 2,0 M/l ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

$$1 \text{ mol} = 136,08 \text{ g} \text{-----} 1 \text{ litro}$$

$$2 \text{ M/l} = 272,16 \text{ g} \text{-----} 1 \text{ litro}$$

$$x = 27,22 \text{ g} / 0,1 \text{ litro}$$

Dissolver 27,22 g de acetato de sódio triidratado (Ecibra, Brasil) e completar o volume para 100ml com água deionizada;

b) preparo da solução de ácido acético 2,0 M/l

Densidade do ácido acético $d=1,05 \text{ g/ml}$,
PM=60,05 g

$$\text{Sendo } 1 \text{ mol/l} \text{ ----- } 60,05 \text{ g/litro}$$

$$2 \text{ moles/l} \text{ ---- } 120,10 \text{ g/litro}$$

Para o preparo de 100 ml tem-se 12,01 g. Sendo $d = m/v$, o volume de ácido acético (Merck, Alemanha) será 11,44 ml;

c) preparo do tampão acetato

O tampão acetato foi obtido pela mistura de volumes iguais de acetato de sódio 2,0 M/l e ácido acético 2,0 M/l, ajustando-se o pH em 4,5 em pHâmetro calibrado (HANNA – modelo HI9224) com ácido acético glacial concentrado p.a.

- Solução de peroxidase extraída de rábano silvestre (Cochlearia armoracia)

Foram pesados 10,0 mg de peroxidase (peroxidase from horseradish P6782 – Sigma Aldrich, Germany) e dissolver em um mínimo de água deionizada. Foi transferido para um balão volumétrico de 10 ml e completar cuidadosamente o volume com água deionizada. Sendo que esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização.

- Soluções padrão de peróxido de hidrogênio

a) preparo de 100 ml solução de H_2O_2 (Asepticper – Solvay, Peróxidos do Brasil Ltda) de concentração $5000 \mu\text{g/ml} = 0,005 \text{ g/ml}$.

$$100 \text{ ml} \times 0,005 \text{ g/ml} = 0,5 \text{ g/100ml de solução}$$

1 ml de solução concentrada de

$$H_2O_2 \sim 35\% \text{ --- } 0,39373 \text{ g/ml}$$

$$x \text{ --- } 0,5\text{g}$$

$$x = 1,27 \text{ ml de } H_2O_2 \text{ 35\%}$$

Todas as soluções foram preparadas em tampão acetato.

Foram necessários 1,27 ml da solução de H_2O_2 35% para se obter 0,5 g de H_2O_2 .

Adicionou-se 1,27 ml da solução de H_2O_2 ~35% em balão de 100 ml e completou-se o volume com solução tampão acetato;

b) preparo da solução de H_2O_2 de concentração 50 $\mu\text{g/ml}$

Diluir a 1 ml da solução de 5000 $\mu\text{g/ml}$ a 100 ml com tampão acetato. Dessa forma, cada 1 ml terá 50 μg de H_2O_250 μg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$. Esta solução serviu de base para que novas diluições fossem realizadas, a fim de obter-se amostras contendo 0,5/1,0/1,5//2,0/2,5 μg de peróxido de hidrogênio, de acordo com o Quadro 5.

Quadro 5 – Diluições realizadas para obtenção de amostras contendo de 0,5 a 2,5 μg de peróxido de hidrogênio

Volume(em μl) da solução padrão de 50 $\mu\text{g/ml}$	Volume (em μl) da solução tampão	Concentração do padrão
50	50	2,5
40	60	2,0
30	70	1,5
20	80	1,0
10	90	0,5

4.7.2.2 Leitura em espectrofotômetro

Cada concentração de peróxido de hidrogênio foi feita em triplicata, totalizando 15 tubos de ensaio. Em cada tubo foram introduzidos 2750 μl de água deionizada, 100 μl de solução de corante violeta leucocristal, 100 μl de solução padrão de peróxido de hidrogênio e 50 μl de

solução de peroxidase. Para as diferentes concentrações de peróxido foram obtidas diferentes graduações de azul.

Paralelamente às amostras, foram realizadas duas provas em branco, nas mesmas condições citadas anteriormente, porém isentas da solução padrão de peróxido de hidrogênio.

De cada tubo de ensaio foram extraídos 2,0 ml utilizando-se uma micropipeta (P1000 - Pipetman, Gilson S.A. B.P. 45-954000 Villers-le-Bel – France) e colocados em uma cubeta, levada ao espectrofotômetro (UV-Vis Spectrophotometer UV-1203 - Shimadzu) a um comprimento de onda de 596 nm.

Os valores das concentrações das soluções padrão utilizadas e de absorbância relativas às concentrações foram submetidos a uma regressão linear dos pontos encontrados, utilizando-se o programa computacional Graph-Pad Prism, versão 3,0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, U.S.A), representados por uma reta (Figura 7).

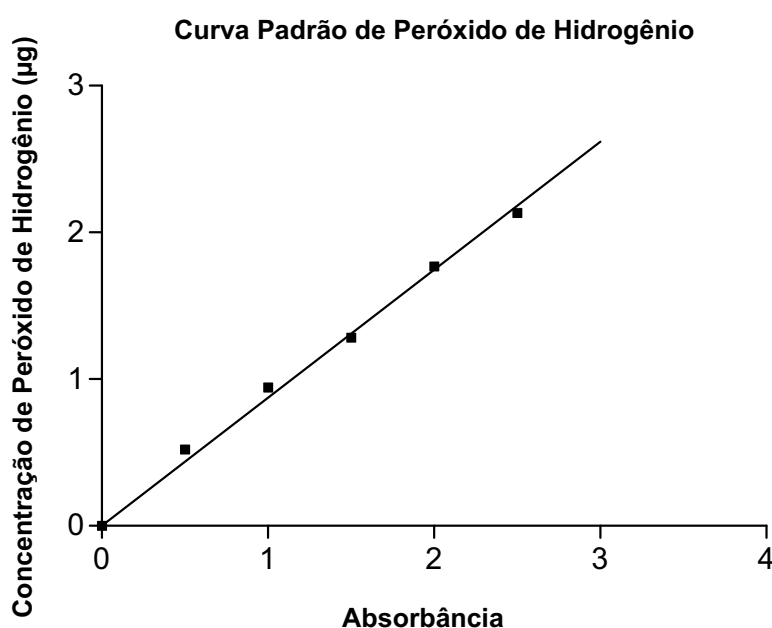


Figura 7 – Representação gráfica dos valores de absorbância para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio

A partir da curva linear obtida, pôde-se extrair o fator de calibração (Fc), que corresponde à razão entre a concentração da solução padrão de peróxido de hidrogênio e sua respectiva absorbância, e está demonstrado na fórmula:

$$F_c = \frac{\text{solução padrão}}{\text{absorbância}}$$

O fator de calibração foi necessário na conversão dos dados das amostras experimentais em microgramas de peróxido de hidrogênio. Para cada ponto da curva linear que representa a concentração da solução padrão e sua respectiva absorbância, existe um fator de calibração. Foram calculados os fatores de calibração a partir de cada ponto da curva, sendo o valor médio:

$$F_c = 1,145$$

4.7.3 Mensuração do peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais

Após estudo piloto observou-se que não seria possível mensurar a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada diretamente no meio de cultura, pois a cor do meio interfere na leitura do espectrofotômetro, inviabilizando a metodologia empregada. Assim, optou-se por substituir o meio de cultura por solução tampão de acetato 2 M a fim de possibilitar a quantificação do peróxido de hidrogênio.

As soluções de tampão de acetato, peroxidase e corante violeta leucocristal foram preparadas de acordo com o descrito para o levantamento da curva padrão.

Foram pesados 0,4 g de cada um dos agentes clareadores em tubos Falcons. Sobre o gel foram adicionados 2 ml de solução tampão de acetato. Os tubos foram levados à estufa a 37 °C, onde permaneceram

por trinta minutos. Em seguida, 100 µl de cada placa foram removidos e colocados em um tubo de ensaio. Este procedimento foi realizado três vezes para cada situação experimental, totalizando 18 tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 2750 µl de água deionizada, 100 µl de solução de corante violeta leucocristal e 50µl de solução de peroxidase. Da solução obtida, 2 ml foram removidos, colocados em uma cubeta e levados para leitura em espectrofotômetro a 596 nm. A partir do fator de calibração obtido com o levantamento da curva padrão foi possível quantificar o peróxido liberado no meio durante o condicionamento em µg de peróxido.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística é determinada pelo planejamento experimental.

A unidade experimental é a placa com células semeadas e as condições experimentais foram designadas aleatoriamente a cada uma delas.

No experimento com agentes clareadores de consultório, as variáveis experimentais para avaliação da taxa do metabolismo celular foram: o agente clareador (peróxido de carbamida 35% e peróxido de carbamida 37%), a fotoativação (sem fotoativação, luz halógena e LED) e o tempo até a avaliação (24h e 48h). Assim, o resultado foi um experimento seguindo um esquema fatorial do tipo 2 x 3 x 2, resultado em 12 condições experimentais sob 12 repetições. A variável resposta foi o metabolismo celular mensurado indiretamente através do ensaio com MTT.

As variáveis experimentais para avaliação da taxa do metabolismo celular, nos grupos de agentes clareadores para uso caseiro foram: o agente clareador (peróxido de hidrogênio 3%, peróxido de

hidrogênio 7,5%, peróxido de hidrogênio 9,5%, peróxido de carbamida 10%, peróxido de carbamida 15% e peróxido de carbamida 20%) e o tempo até a avaliação (24 h e 48 h). Assim, o resultado foi um experimento seguindo um esquema fatorial do tipo 6 x 2, resultando em 12 condições experimentais sob 12 repetições. A variável resposta é o número de células resultante do processo de contagem através do ensaio com MTT.

Os 144 dados obtidos (12 condições experimentais multiplicadas por 12 repetições) com os estudos dos agentes clareadores para uso profissional e os 144 dados obtidos (12 condições experimentais multiplicadas por 12 repetições) com os estudos dos agentes clareadores para uso caseiro foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTICA for Windows, version 5.5 (StatSoft Inc, Tulsa, USA, 2000).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, já a estatística inferencial consistiu nos testes: análise de variância (ANOVA) três fatores (efeito fixo) e teste de Tukey, tendo como nível de significância o valor convencional de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da taxa de sobrevivência celular (%)

Os resultados obtidos a partir da leitura do espectrofotômetro correspondem indiretamente ao metabolismo celular, pois representam a inibição da atividade da succinil desidrogenase ocasionada pelo peróxido de hidrogênio. No Quadro 6, estão representados os resultados da leitura do metabolismo celular do grupo controle, que correspondem à curva padrão de viabilidade e crescimento celular.

Quadro 6 - Valores da leitura em espectrofotômetro do metabolismo celular para o grupo controle

Controle	
24 horas	48 horas
0,082	0,178
0,081	0,189
0,079	0,152
0,083	0,173
0,077	0,165
0,083	0,176
0,074	0,190
0,078	0,139
0,064	0,170
0,059	0,169
0,057	0,162
0,065	0,137

Os resultados da citotoxicidade, em porcentagem, após contato com os gantes clareadores, estão descritos nos Quadros 7, 8, 9 e 10. Estes resultados correspondem a taxa de sobrevivência celular de cada grupo experimental, expressos em porcentagem em relação às médias dos grupos controles, que foram padronizados em 100%.

Quadro 7 – Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso profissional, expressados em porcentagem de células viáveis, após 24 horas

Grupos	Valores da taxa do metabolismo celular (%)					
Grupo 1 (PC 35%)	61.22	61.22	48.98	58.50	58.50	47.62
	68.03	48.98	97.96	70.75	61.22	48.98
Grupo 2 (PC 35% + luz halógena)	42.18	44.90	47.62	57.14	63.95	78.91
	53.06	63.95	66.67	93.88	54.42	13.61
Grupo 3 (PC 35% + LED)	57.14	58.50	55.78	62.59	44.90	78.91
	55.78	48.98	58.50	50.34	51.70	92.52
Grupo 4 (PC 37%)	47.62	48.98	55.78	58.50	36.73	34.01
	34.01	46.26	42.18	34.01	34.01	31.29
Grupo 5 (PC 37% + luz halógena)	27.21	27.21	20.41	31.29	34.01	36.73
	27.21	42.18	40.82	40.82	39.46	31.29
Grupo 6 (PC 37% + LED)	42.18	42.18	40.82	27.21	42.18	24.49
	40.82	28.57	44.90	42.18	54.42	40.82

Quadro 8 – Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso caseiro, expressados em porcentagem de células viáveis, após 24 horas

Grupos	Valores da taxa de metabolismo celular (%)					
Grupo 7 (PH 3 %)	20.41	21.77	21.77	21.77	31.29	29.93
	34.01	27.21	50.34	42.18	51.70	53.06
Grupo 8 (PH 7,5%)	10.88	10.88	19.05	9.52	16.33	21.77
	20.41	20.41	20.41	19.05	6.80	9.52
Grupo 9 (PH 9,5%)	24.49	14.97	23.13	14.97	20.41	14.97
	17.69	8.16	6.80	12.24	16.33	2.72
Grupo 10 (PC 10%)	44.90	38.10	43.54	57.14	34.01	29.93
	80.27	36.73	32.65	32.65	38.10	36.73
Grupo 11 (PC 15%)	21.77	32.65	23.13	20.41	42.18	43.54
	17.69	35.37	17.69	36.73	29.93	38.10
Grupo 12 (PC 20%)	25.85	31.29	39.46	48.98	8.16	6.80
	5.44	13.61	54.42	43.54	23.13	13.61

Quadro 9 – Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso profissional, expressados em porcentagem de células viáveis, após 48 horas

Grupos	Valores da taxa de metabolismo celular (%)					
Grupo 1 (PC 35%)	3,60	2,40	4,20	0,60	37,82	12,61
	15,01	45,02	1,20	33,01	16,81	24,61
Grupo 2 (PC 35% + luz halógena)	22,21	9,60	9,60	12,61	19,81	17,41
	18,01	21,01	14,41	21,01	12,00	13,81
Grupo 3 (PC 35% + LED)	1,80	1,20	1,80	0,60	18,61	29,41
	24,01	25,81	30,01	15,01	29,41	16,21
Grupo 4 (PC 37%)	6,00	3,60	4,20	1,80	4,80	8,40
	9,60	9,60	11,40	12,61	12,00	22,21
Grupo 5 (PC 37% + luz halógena)	5,40	3,60	3,00	1,80	9,00	11,40
	12,00	18,61	9,60	10,80	2,40	3,60
Grupo 6 (PC 37% + LED)	4,20	4,20	7,20	2,40	13,21	9,00
	10,80	10,20	12,00	11,40	3,60	8,40

Quadro 10 – Resultados da citotoxicidade dos agentes clareadores para uso caseiro, expressados em porcentagem de células viáveis, após 48 horas

Grupos	Valores da taxa de metabolismo celular (%)					
Grupo 7 (PH 3 %)	1,80	1,80	1,20	3,00	4,20	3,00
	2,40	10,20	2,40	6,00	8,40	4,80
Grupo 8 (PH 7,5%)	1,20	1,20	1,80	1,20	4,20	1,80
	6,00	4,80	6,60	6,00	2,40	7,20
Grupo 9 (PH 9,5%)	2,40	1,20	0,60	0,00	9,60	6,60
	8,40	6,60	6,00	4,20	9,60	8,40
Grupo 10 (PC 10%)	7,20	3,60	9,00	5,40	11,40	25,81
	22,21	26,41	36,01	46,82	31,81	35,41
Grupo 11 (PC 15%)	2,40	3,60	4,20	2,40	9,00	28,81
	23,41	33,01	12,61	57,02	4,80	39,62
Grupo 12 (PC 20%)	3,60	2,40	7,80	12,61	25,21	15,01
	7,20	23,41	7,20	11,40	4,20	61,82

5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio

A partir do fator de calibração, foi possível calcular a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada na simulação das condições experimentais realizadas (Quadro 11).

Quadro 11 - Quantidades de peróxido de hidrogênio, em µg, liberada na simulação das condições experimentais

GRUPOS	Condição experimental	Média (µg)
Controle	Sem tratamento	0,010
Grupo 1	PC35%	1,077
Grupo 2	PC35% + luz halógena	1,110
Grupo 3	PC 35% + LED	1,064
Grupo 4	PC37%	1,089
Grupo 5	PC37% + luz halógena	1,259
Grupo 6	PC 37% + LED	1,214
Grupo 7	PH 3%	0,861
Grupo 8	PH7,5%	1,160
Grupo 9	PH9,5%	1,174
Grupo 10	PC10%	1,008
Grupo 11	PC15%	1,098
Grupo 12	PC20%	1,114

A figura 8 representa graficamente as quantidades de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.

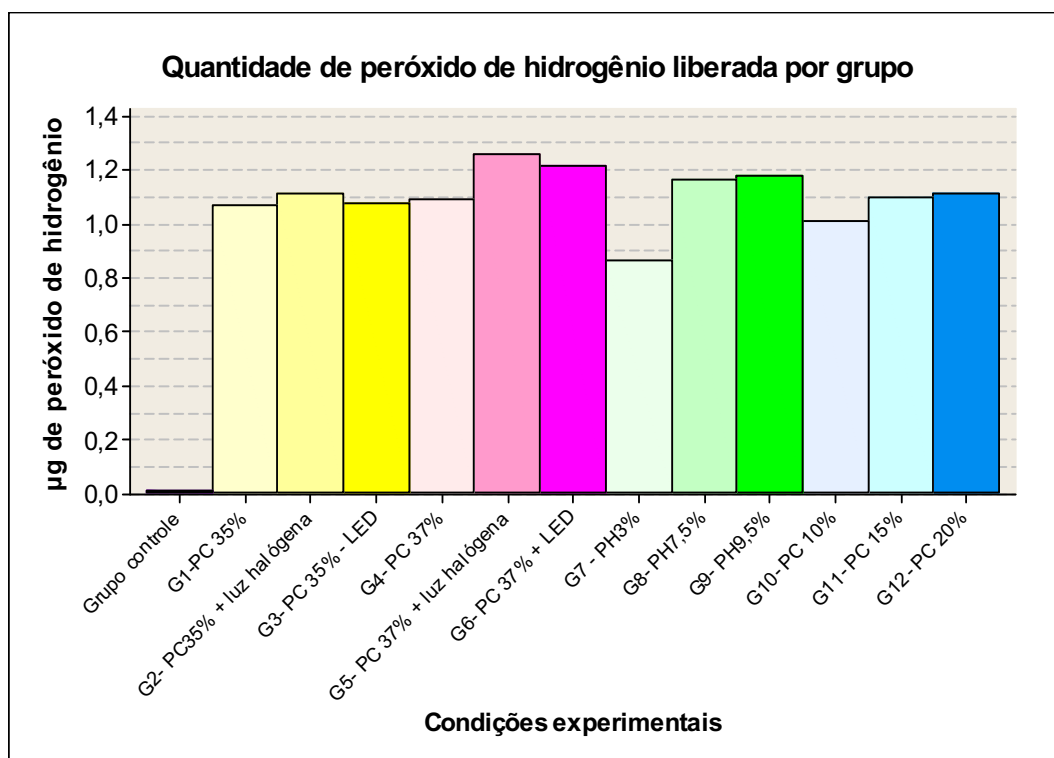


Figura 8 – Gráfico de barras ilustrando a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.

5.3 Estatística descritiva

5.3.1 Estatística descritiva para metabolismo celular

A Figura 9 apresenta o Gráfico de colunas e médias dos grupos de estudo com agentes clareadores para uso profissional, comparando os resultados da taxa de sobrevivência celular obtidos em cada uma das condições experimentais através da leitura dos ensaios de MTT.

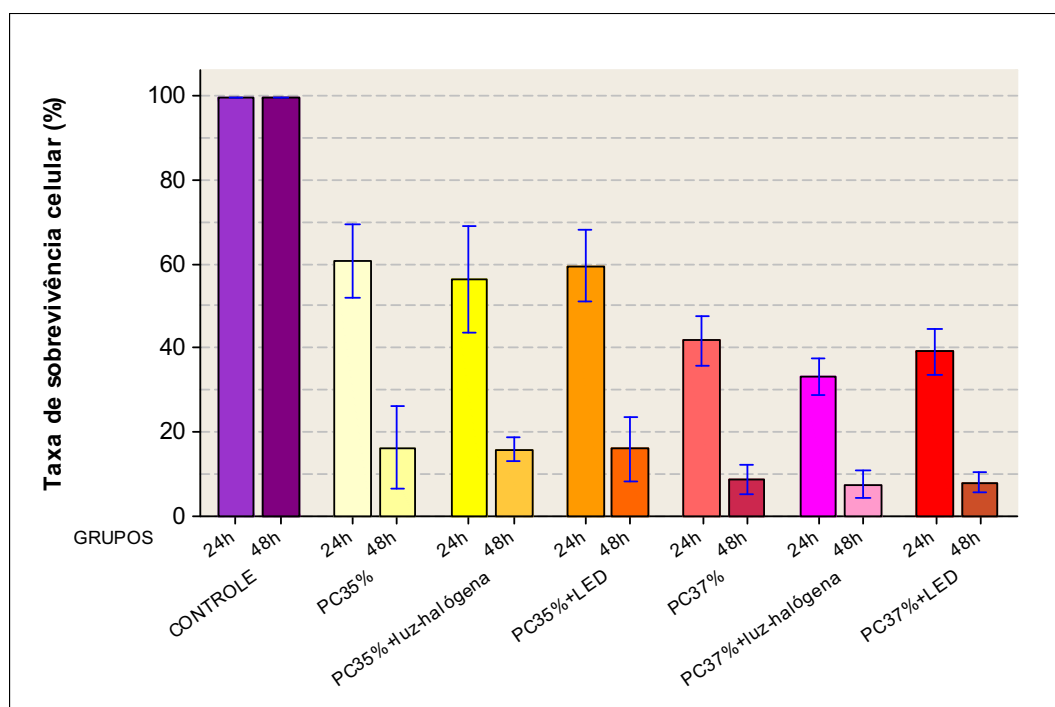


Figura 9 – Representação gráfica dos resultados da taxa de sobrevivência celular para cada uma das condições experimentais dos agentes clareadores para uso profissional.

A Figura 10 apresenta o Gráfico de colunas e médias dos grupos de estudo com agentes clareadores para uso caseiro comparando os resultados da taxa de sobrevivência celular obtidos em cada uma das condições experimentais através da leitura dos ensaios de MTT.

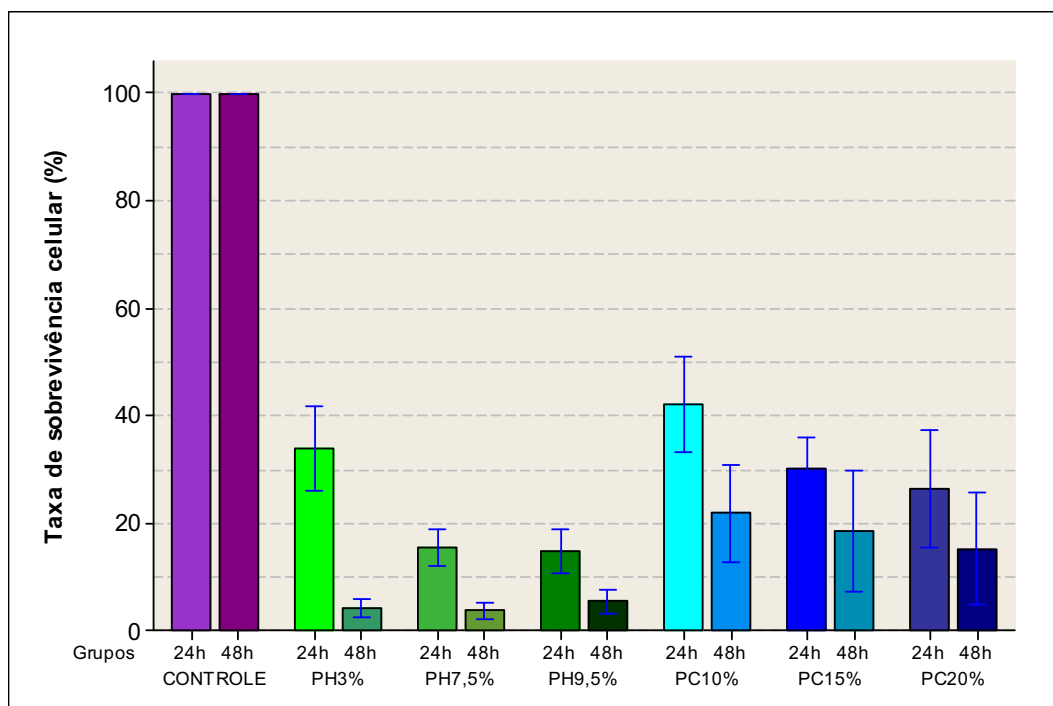


Figura 10 – Representação gráfica dos resultados da taxa de sobrevivência celular para cada uma das condições experimentais dos agentes clareadores para uso caseiro supervisionado.

As Tabelas 1 e 2 mostram o resultado da análise estatística descritiva para os diferentes tempos de avaliação.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores de metabolismo celular obtido na avaliação após 24 horas

GRUPOS	Agente clareador	N	Média	Desvio Padrão
Controle	Sem tratamento	12	100.0	0.00
Grupo 1	PC35%	12	61.00	13.93
Grupo 2	PC35% + luz halógena	12	56.69	19.97
Grupo 3	PC 35% + LED	12	59.64	13.42
Grupo 4	PC37%	12	41.95	9.33
Grupo 5	PC37% + luz halógena	12	33.22	6.93
Grupo 6	PC 37% + LED	12	39.23	8.42
Grupo 7	PH 3%	12	33.79	12.48
Grupo 8	PH7,5%	12	15.42	5.46
Grupo 9	PH9,5%	12	14.74	6.51
Grupo 10	PC10%	12	42.06	14.06
Grupo 11	PC15%	12	29.93	9.48
Grupo 12	PC20%	12	26.19	17.26

Tabela 2 - Estatística descritiva dos valores de metabolismo celular obtido na avaliação após 48 horas

GRUPOS	Agente clareador	N	Média	Desvio Padrão
Controle	Sem tratamento	12	100.00	0.00
Grupo 1	PC35%	12	16.41	13.81
Grupo 2	PC35% + luz halógena	12	15.96	15.91
Grupo 3	PC 35% + LED	12	16.16	17.41
Grupo 4	PC37%	12	8.85	9.00
Grupo 5	PC37% + luz halógena	12	7.60	7.20
Grupo 6	PC 37% + LED	12	8.05	8.70
Grupo 7	PH 3%	12	4.10	3.00
Grupo 8	PH7,5%	12	3.70	3.30
Grupo 9	PH9,5%	12	5.30	6.30
Grupo 10	PC10%	12	21.76	24.01
Grupo 11	PC15%	12	18.41	10.81
Grupo 12	PC20%	12	15.16	9.60

A Tabela 3 apresenta a média da taxa de sobrevivência celular para cada grupo nos diferentes tempos de avaliação, comparando-se ao controle (curva padrão de viabilidade e crescimento).

Tabela 3 – Valores referentes às médias da taxa de sobrevivência celular (%) nos diferentes tempos de avaliação.

GRUPOS	Agente clareador	24h	48h
Controle	Sem tratamento	100.0	100.00
Grupo 1	PC35%	61.0	16.41
Grupo 2	PC35% + luz halógena	56.69	15.96
Grupo 3	PC 35% + LED	59.64	16.16
Grupo 4	PC37%	41.95	8.85
Grupo 5	PC37% + luz halógena	33.22	7.60
Grupo 6	PC 37% + LED	39.23	8.05
Grupo 7	PH 3%	33.79	4.10
Grupo 8	PH7,5%	15.42	3.70
Grupo 9	PH9,5%	14.74	5.30
Grupo 10	PC10%	42.06	21.76
Grupo 11	PC15%	29.93	18.41
Grupo 12	PC20%	26.19	15.16

As Figuras 11 e 12 ilustram a média da taxa de sobrevivência celular (%) dos grupos de agentes clareadores para uso profissional e para uso caseiro, respectivamente.

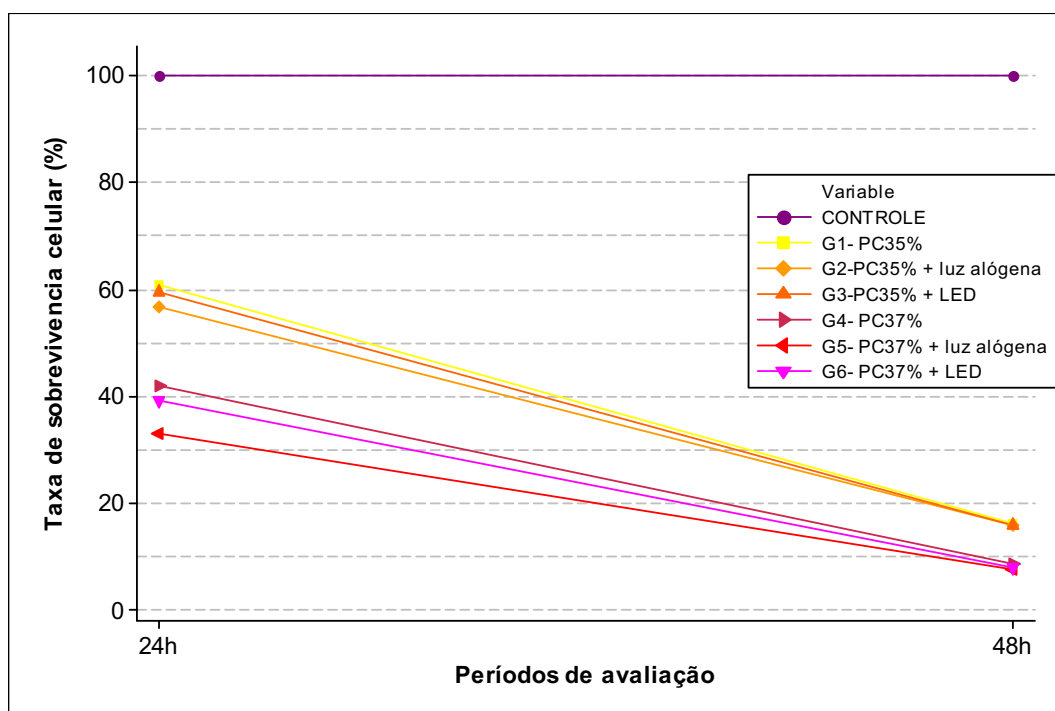


Figura 11 – Gráfico das médias da taxa de sobrevivência celular obtidas nos grupos de agentes clareadores de uso profissional comparadas com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular (controle).

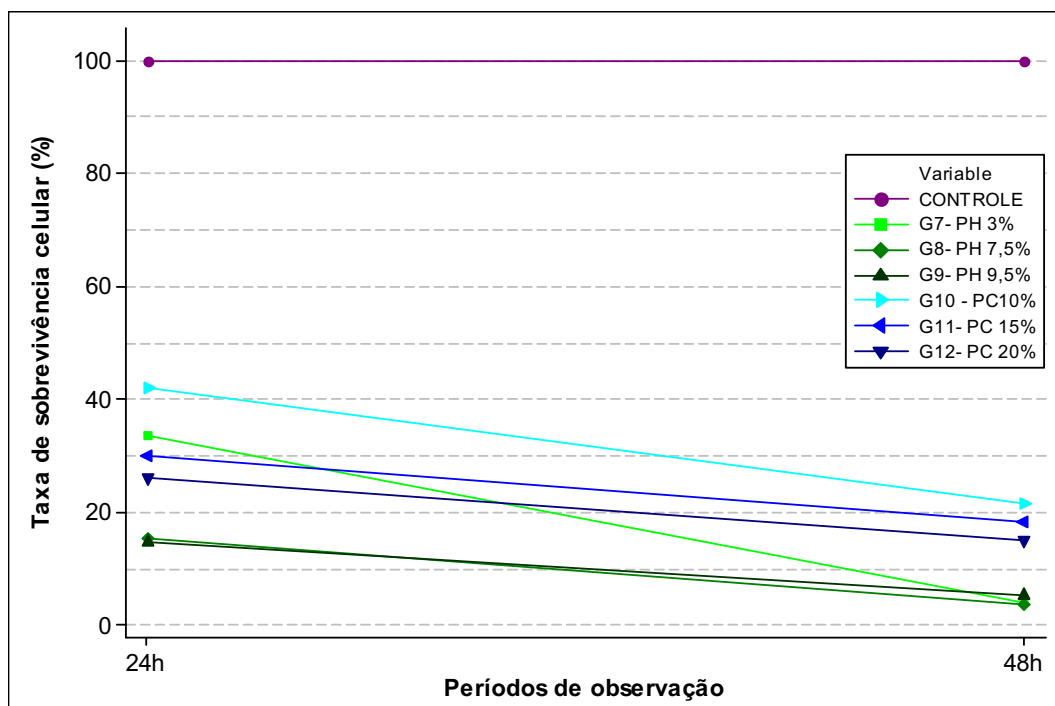


Figura 12 – Gráfico das médias da taxa de sobrevivência celular obtidas nos grupos de agentes clareadores de uso caseiro comparadas com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular (controle).

5.3.2 Teste análise de variância (Anova)

5.3.2.1 Teste análise de variância (Anova) para a taxa de sobrevivência celular

O Teste Anova foi utilizado para comparar cada uma das condições experimentais com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular. O resultado do teste para os grupos de experimentais de agentes clareadores de uso profissional e uso caseiro mostrou que todos os grupos em qualquer dos dois tempos de avaliação diferem do controle com $p < 0,001$.

5.3.3 Teste de Tukey

O teste de Tukey foi aplicado a fim de verificar quais grupos apresentaram diferença estatística entre si. Letras iguais representam grupos sem diferença estatisticamente significativas.

5.3.3.1 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para o período de avaliação 24 horas

Tabela 4 - Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso profissional) no tempo 24h

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos
CONTROLE	100	Sem tratamento	A
GRUPO 1	60.997	PC35%	B
GRUPO 3	59.637	PC 35% + LED	B
GRUPO 2	56.691	PC35% + luz halógena	B
GRUPO 4	41.948	PC37%	C
GRUPO 6	39.231	PC 37% + LED	C
GRUPO 5	33.220	PC 37% + luz halógena	C

Dentre os agentes clareadores para uso profissional os grupos a base de peróxido de carbamida 35% não apresentaram diferença estatisticamente significativa, também os grupos com agentes clareadores a base de peróxido de carbamida 37% não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Os grupos condicionados com peróxido de carbamida 37% (Grupo 4, Grupo 5 e Grupo 6) apresentaram uma taxa de sobrevivência celular menor estatisticamente significativa que os grupos condicionados com peróxido de carbamida 35% (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3).

Tabela 5 - Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso caseiro) no tempo 24h

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos			
CONTROLE	100	Sem tratamento	A			
GRUPO 10	42.063	PC 10%	B			
GRUPO 7	33.787	PH 3%	B	C		
GRUPO 11	29.933	PC 15%	B	C		
GRUPO 12	26.191	PC 20%		C	D	
GRUPO 8	15.419	PH 7,5%			D	
GRUPO 9	14.740	PH 9,5%			D	

Dentre os agentes clareadores para uso caseiro a base de peróxido de hidrogênio, o grupo 7 (PH 3%) apresentou diferença estatística dos grupos 8 (PH 7,5%) e 9 (PH 9,5%), sendo que houve uma maior taxa de sobrevivência celular na concentração mais baixa de peróxido de hidrogênio (Grupo 7- PH 3%).

Dentre os grupos de agentes clareadores a base de peróxido de carbamida, o grupo 10 (PC 10%) apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo 11 (PC e 15%) e grupo 12 (PH 20%), sendo que houve uma maior taxa de sobrevivência celular na concentração mais baixa de peróxido de carbamida (Grupo 10- PC 10%).

O Grupo 12 (PC 20%), o qual apresenta maior concentração de peróxido de carbamida dos agentes clareadores para uso caseiro, apresentou semelhança estatística dos grupos de maior concentração de peróxido de hidrogênio, Grupo 8 (PH 7,5%) e Grupo 9 (PH 9,5%).

5.3.3.2 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para o período de avaliação 48 horas

Tabela 6 - Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso profissional) no tempo 48h

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos
CONTROLE	100	Sem tratamento	A
GRUPO 1	16.41	PC35%	B
GRUPO 3	16.16	PC35% + LED	B
GRUPO 2	15.96	PC 35% + luz halógena	B
GRUPO 4	8.85	PC37%	B
GRUPO 5	7.60	PC 37% + luz halógena	B
GRUPO 6	8.05	PC 37% + LED	B

Dentre os grupos de agentes clareadores para uso profissional não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7 - Teste de Tukey para a variável agente clareador (de uso caseiro) no tempo 48h

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos
CONTROLE	100	Sem tratamento	A
GRUPO 10	21.76	PC 10%	B
GRUPO 11	18.41	PC 15%	B C
GRUPO 12	15.16	PC 20%	B C D
GRUPO 9	5.30	PH 9,5%	C D
GRUPO 7	4.10	PH 3%	D
GRUPO 8	3.70	PH 7,5%	D

No período de observação 48 horas, dentre os grupos de agentes clareadores para uso caseiro, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos a base de peróxido de hidrogênio.

Dentre os grupos de agentes clareadores a base de peróxido de carbamida, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.3.3.3 Teste de Tukey para a taxa de sobrevivência celular (%) para os diferentes grupos

O teste de Tukey foi aplicado a fim de verificar quais grupos apresentaram diferença estatística entre si, independente do período de observação.

Tabela 8 - Teste de Tukey para a variável agente clareador de uso profissional

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos	
CONTROLE	100.00	Sem tratamento	A	
GRUPO 1	38.70	PC35%	B	
GRUPO 3	37.90	PC35% + LED	B	
GRUPO 2	36.32	PC 35% + luz halógena	B	C
GRUPO 4	25.40	PC37%	B	C
GRUPO 6	23.64	PC 37% + LED	B	C
GRUPO 5	20.41	PC 37% + luz halógena		C

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de agentes clareadores para uso profissional a base de peróxido de carbamida 35%.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de agentes clareadores para uso profissional a base de peróxido de carbamida 37%.

Os grupo condicionado com peróxido de carbamida 37% e fotoativado com luz halógena (Grupo 5) apresentaram uma taxa de sobrevivência celular menor estatisticamente significativa que o grupo

condicionado com peróxido de carbamida 35% sem fotoativação (Grupo 1) e que o grupo condicionado com peróxido de carbamida 35% fotoativado com LED (Grupo 3).

Tabela 9 - Teste de Tukey para a variável agente clareador de uso caseiro

Grupos	Média	Condição experimental	Grupos homogêneos			
CONTROLE	100,00	Sem tratamento	A			
GRUPO 10	31,91	PC 10%	B			
GRUPO 11	24,17	PC 15%	B	C		
GRUPO 12	20,67	PC 20%	B	C	D	
GRUPO 7	18,94	PH 3%		C	D	
GRUPO 9	10,02	PH 9,5%			D	
GRUPO 8	9,56	PH 7,5%			D	

Dentre os grupos de agentes clareadores para uso caseiro, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos a base de peróxido de carbamida.

Dentre os grupos de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.3.4 Teste análise de variância (Anova)

5.3.4.1 Teste análise de variância (Anova) para a taxa de sobrevivência celular

O Teste Anova foi utilizado para comparar cada uma das condições experimentais com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular. O resultado do teste para os grupos de experimentais de agentes clareadores de uso profissional e uso caseiro mostrou que todos os grupos diferem do controle com $p < 0,001$.

Tabela 10 - Valores de p dos agentes clareadores testados em relação ao grupo controle

GRUPOS	Agente clareador	P
Grupo 1	PC35%	0,000*
Grupo 2	PC35% + luz halógena	0,000*
Grupo 3	PC 35% + LED	0,000*
Grupo 4	PC37%	0,000*
Grupo 5	PC37% + luz halógena	0,000*
Grupo 6	PC 37% + LED	0,000*
Grupo 7	PH 3%	0,000*
Grupo 8	PH7,5%	0,000*
Grupo 9	PH9,5%	0,000*
Grupo 10	PC10%	0,000*
Grupo 11	PC15%	0,000*
Grupo 12	PC20%	0,000*

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

5.3.4.2 Teste análise de variância (Anova) para a variável tempo

O Teste Anova foi utilizado para comparar cada uma das condições experimentais em relação ao período de observação. Quando feita análise estatística dos períodos de avaliação para cada grupo experimental podemos observar que houve diferença estatística significativa entre a avaliação após 24h e 48h para todos os grupos estudados (Tabela 11) com $p < 0,001$, exceto grupos 11 e 12.

Tabela 11 – Teste Anova para a variável tempo

Condições experimentais	Valores de p dos agentes clareadores testados relação ao tempo
Grupo 1- 24h x Grupo 1 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 2- 24h x Grupo 2 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 3- 24h x Grupo 3 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 4- 24h x Grupo 4 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 5- 24h x Grupo 5 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 6- 24h x Grupo 6 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 7 - 24h x Grupo 7 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 8 - 24h x Grupo 8 - 48h	p= 0,0000*
Grupo 9 - 24h x Grupo 9 - 48h	p= 0,0002*
Grupo 10 - 24h x Grupo 10 - 48h	p= 0,0020*
Grupo 11 - 24h x Grupo 11 - 48h	p= 0,0615
Grupo 12 - 24h x Grupo 12 - 48h	p= 0,1228

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da metodologia

Esse estudo avaliou, em cultura celular, a toxicidade de agentes clareadores de uso externo (para dentes com vitalidade pulpar). Dentre estes clareadores, utilizou-se produtos, indicados para o clareamento realizado em consultório ou para uso caseiro.

Durante o processo de clareamento externo em dentes com vitalidade pulpar, o peróxido de hidrogênio, independente do agente clareador utilizado, atravessa o esmalte e dentina, liberando radicais oxidativos que atingem o tecido pulpar (Rotstein et al., 1991; Weiger et al., 1994; Lee et al., 2004; Gokay et al., 2008; Lima et al., 2009). Estes radicais por sua vez tem efeitos diretos sobre os fibroblastos presentes no tecido pulpar. Desta forma, a citotoxicidade de agentes clareadores sobre cultura de células obtidas a partir de fibroblastos pode ter relação direta com os efeitos ocorridos no tecido pulpar *in vivo*, sendo então de grande importância avaliar-se os danos celulares que os agentes clareadores podem causar.

Quando o clareamento não é realizado adequadamente pode causar injúrias aos tecidos bucais, sendo que uma alta dosagem de peróxido de hidrogênio (30% a 38%) pode causar queimaduras no tecido gengival (Dahl; Pallesen, 2003; Naik et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Tredwin et al., 2006). De acordo com o estudo *in vitro* de Tripton et al. (1995), os agentes clareadores mostraram-se tóxicos para fibroblastos de origem gengival, apresentando efeitos significantes na viabilidade, morfologia, proliferação e atividades funcionais, que são importantes para a manutenção da saúde dos tecidos vivos.

Este trabalho utilizou experimento *in vitro*, sobre um modelo de cultivo celular, que constitui um teste inicial para a avaliação de materiais empregados na odontologia. Para este tipo de análise diferentes tipos de células podem ser utilizados; estas células podem ser provenientes de linhagens imortalizadas ou de linhagens primárias (Schmalz, 1994; Freshney, 2000). Nesta pesquisa optou-se pelo uso de células de linhagem primária, obtidas a partir do tecido gengival humano (FMM1- cedidas pelo banco de células da Faculdade de Odontologia de São Paulo - USP), pelo fato destas células possuírem potencial metabólico específico mais próximo das condições *in vivo* (Schmalz, 1994; Koulaouzidou et al., 1998; Freshney, 2000).

Existem poucos estudos relatando os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores sobre cultivo celular e a maioria destes estudos foi realizado *in vivo*. Os testes de citotoxicidade em cultura celular podem avaliar os efeitos provocados por uma concentração específica do agente, seja danificando componentes, estruturas ou reações bioquímicas dentro das células. A análise da toxicidade de agentes clareadores sobre cultivo celular foi escolhida por possibilitar controle das variáveis que nem sempre é possível num estudo *in vivo*. Este tipo de teste foi utilizado por outros autores que obtiveram resultados bastante coerentes ao testar diferentes tipos de agentes clareadores (Aren, 2003; Hanks et al., 1993).

Para a realização dos testes de citotoxicidade é possível utilizar diferentes formas de contato dos agentes clareadores com as células. Alguns autores (Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998 e Kinomoto et al., 2001) realizaram diluições do peróxido de hidrogênio, para aplicar sobre as células, avaliando a sua citotoxicidade. Aren (2003) condicionou o meio de cultura celular com o agente clareador testado antes da aplicação sobre as células, assemelhando-se mais à utilização clínica. Desta forma, para o presente estudo optou-se também pelo condicionamento do meio de cultura. Este método permite que as substâncias liberadas durante a aplicação e fotoativação do agente

clareador sejam concentradas no meio de cultivo, sem que ocorra contato direto das células com o agente clareador (Freshney, 2000; Cavalcanti et al., 2005). Entretanto, no presente estudo utilizou-se agentes clareadores de diferentes procedências e observou-se que estas diferenças influenciaram a liberação dos produtos no meio. Sendo assim, é possível que nestas condições seria mais adequado a realização da diluição do produto ao invés do condicionamento do meio. Esta observação abre espaço para continuidade das pesquisas nesta área, aprimorando a metodologia para avaliação da citotoxicidade.

Para a avaliação da viabilidade celular pode-se utilizar vários métodos, porém neste estudo optou-se pelo ensaio com MTT por ser um teste de execução rápida e objetiva, baseado em uma reação colorimétrica. O sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) entra na mitocôndria da célula viável e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais formazan, de coloração azul escuro. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (Kim et al., 2007). Muitos autores utilizaram este teste para citotoxicidade de diversos materiais odontológicos (Chen et al., 2003; Jafarania et al., 2009; Lima et al., 2009), sendo também o teste utilizado nesta pesquisa, por ser sensível a pequenas alterações no metabolismo celular e oferecer resultados bastante precisos.

No presente estudo observou-se que no cultivo celular sem aplicação do agente clareador (grupo controle) obteve-se valores significativamente maiores da taxa de sobrevivência celular do que nos grupos em que foram utilizados os agentes clareadores, para os dois tempos de avaliação. Este fato indica que a quantidade de células padronizadas para os poços da placa de cultura foi adequada.

6.2 Discussão dos resultados dos grupos para agentes clareadores de uso profissional

O peróxido de hidrogênio proveniente dos agentes clareadores, mesmo em baixas concentrações, penetra nos tecidos dentários alcançando o tecido pulpar (Cohen; Chase, 1979; Bowles; Thompson, 1986; Bowles; Ugweneri, 1987; Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Thitinanthapan et al., 1999; Gökay et al., 2000; Benetti et al., 2004; Camargo et al., 2009). A quantidade de peróxido de hidrogênio que penetra nos tecidos dentários e chega ao tecido pulpar aumenta com a elevação da concentração do agente clareador (Bowles; Ugweneri, 1987; Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998; Gokay et al., 2000; Benetti et al., 2004).

Segundo Nathanson (1997) a concentração e o tempo de utilização do agente clareador podem influenciar na sensibilidade pulpar após o clareamento, provavelmente devido à maior penetração do peróxido de hidrogênio e radicais oxidativos na câmara pulpar (Tredwin et al., 2006; Dahl, 2003).

Em relação à concentração do agente clareador, pode-se observar, na avaliação após 24 horas, que a maior concentração de peróxido de carbamida (37%) apresentou taxa de sobrevivência celular significativamente menor em relação ao peróxido de carbamida 35%. Esta relação direta entre concentração e maior citotoxicidade era esperada, visto que ocorre maior liberação de peróxido de hidrogênio e radicais oxidativos quando se utiliza agentes clareadores mais concentrados (Pretti et al., 2004; Pretti, 2007).

Do mesmo modo, Ribeiro et al. em 2005 e em 2006, ao avaliar a citotoxicidade de agentes clareadores, em células de linfoma de rato e em células de ovário de hamster chinês (CHO), sugeriram que os agentes clareadores dentais aumentam o nível de danos no DNA, e que a

concentração do agente clareador está diretamente relacionada ao dano celular, sendo que peróxido de hidrogênio mais concentrado produziu efeitos nocivos mais severos, confirmando o maior efeito citotóxico dos agentes clareadores com maior concentração.

Os dados obtidos no presente trabalho também estão de acordo com Hanks et al. (1993), que observaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio em fibroblastos Balb/c 3T3, *in vitro*, e relataram que todos os produtos causaram efeitos citotóxicos sobre as células e que a atividade enzimática celular foi suprimida com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio. Além do efeito inibitório do peróxido de hidrogênio sobre as enzimas do tecido pulpar, Kanno et al. (2003), também mostrou que o peróxido de hidrogênio 30% produziu estresse oxidativo, causou citotoxicidade, apoptose e genotoxicidade sobre as células de ratos (P388). Também Gökay et al. (2000) e Benetti et al. (2004), sugeriram que quanto mais elevada a concentração do agente clareador aplicado sobre a estrutura dentária, maior a penetração do peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar. Portanto, se o agente clareador penetra mais, as reações celulares também serão intensificadas pela ação deste produto nos tecidos vivos.

Estas observações foram confirmadas por Pretti, em 2007, que ao avaliar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio liberado por diferentes agentes clareadores de uso profissional (peróxido de hidrogênio 35% e 38%), sobre cultura de fibroblastos de polpa humana (FP5), observaram que a citotoxicidade foi proporcional à concentração do agente clareador.

Verificou-se ainda que nos grupos que utilizou-se fotoativação, a citotoxicidade foi ligeiramente maior do que nos grupos sem fotoativação. A fotoativação pode ser utilizada durante o clareamento dental de uso profissional com o intuito de reduzir o tempo clínico, melhorar o resultado final e, principalmente, como forma de *marketing*. Várias fontes de luz são utilizadas para esta finalidade. Entretanto, as

fontes de ativação mais comumente utilizadas no clareamento de uso profissional são o LED e a luz halógena, motivo da escolha destas fontes no presente estudo. Deve-se ressaltar que os clareadores contendo peróxido de carbamida não são indicados com fotoativação. Entretanto, o que se observa na clínica diária, é o uso de ativação, mesmo nestes agentes, com finalidade de agregar valores e marketing para realização do clareamento. Sendo assim, a opção pelo uso da ativação associada ao peróxido de carbamida foi realizada para mostrar que os efeitos tóxicos dos clareadores são potencializados.

Comparando-se os resultados da taxa de sobrevivência celular entre os grupos ativados por LED, luz halógena e sem fotoativação, verificou-se que os piores resultados foram encontrados nos grupos fotoativados por luz halógena, seguidos pelos grupos que receberam fotoativação por LED e pelos grupos sem fotoativação. Este resultado pode ser devido à maior liberação de radicais oxidativos pela ativação com luz halógena quando comparada ao LED.

No desenvolvimento deste estudo a citotoxicidade foi avaliada com meio já condicionado, porém *in vivo* os danos celulares provocados pela fotoativação podem ser ainda maiores, uma vez que há também aumento da temperatura ocorrida com a fotoativação além da maior liberação do peróxido. Portanto, o procedimento de clareamento *in vivo* pode levar a danos celulares maiores e até irreversíveis.

Ao analisar a penetração de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar com ou sem fotoativação com luz halógena sobre um mesmo gel clareador (peróxido de hidrogênio 35%), Camargo et al (2009) verificaram maior penetração de peróxido para o interior da câmara pulpar nos dentes que receberam fotoativação do que naqueles que não receberam, indicando que o uso de luz pode influenciar na quantidade de peróxido que atinge a câmara pulpar. Logo, se uma maior quantidade de peróxido de hidrogênio foi capaz de penetrar na câmara pulpar com a fotoativação, possivelmente uma maior quantidade de

peróxido de hidrogênio é liberada no meio de cultura, causando maiores danos sobre as células.

Além disto, a emissão térmica é significativamente menor com o uso do LED quando comparado a luz halógena (Yap; Soh, 2003), podendo reafirmar que os resultados do presente estudo são coerentes uma vez que a fotoativação por LED foi semelhante ao grupo que não foi fotoativado.

De acordo com Buchalla e Attin (2006), os tipos de luz utilizados na prática clínica não possuem capacidade de ativar o agente clareador por fotólise, mas são capazes de acelerar o processo de clareamento principalmente pelo aumento de temperatura. Porém dentre as fontes ativadoras, o LED propicia o menor aumento de temperatura, quando comparado ao laser de Diodo, luz halógena convencional e de alta intensidade (Eldeniz et al., 2005). Analisando a penetração do peróxido de hidrogênio 35% para o interior da câmara pulpar com diferentes fontes de ativação, Pretti et al. (2004) averiguaram que os grupos que receberam ativação por LED ou que não receberam ativação não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo que recebeu ativação pelo laser Nd-YAG. A quantidade de peróxido que penetrou na cavidade pulpar indica que o LED propiciou quantidade de peróxido de hidrogênio livre semelhante à obtida sem fotoativação.

Ainda Pretti (2007) observou que a ativação por luz halógena ocasionou maior citotoxicidade, e a ativação com LED foi estatisticamente semelhante à ausência de ativação. Este resultado foi semelhante ao observado no presente estudo em que os grupos fotoativados com luz halógena apresentaram maior citotoxicidade, embora sem significância estatística.

Sendo assim, no presente estudo, nos grupos em que utilizou-se produtos para uso profissional, as médias do metabolismo

celular mostraram que o agente clareador mais citotóxico foi o de maior concentração (PC37%), fotoativado com luz halógena.

6.3 Discussão dos resultados dos grupos para agentes clareadores de uso caseiro

Dentre os agentes clareadores para uso caseiro pode-se observar que o peróxido de hidrogênio e o peróxido de carbamida também apresentaram maior citotoxicidade quanto maior a concentração do agente clareador.

De acordo com os resultados deste estudo, na avaliação 24 horas, o peróxido de carbamida de uso caseiro com maior concentração (20%) apresentou citotoxicidade significativamente maior que o peróxido de carbamida de menor concentração (10%), concordando com Lima et al. em 2009, que avaliaram a citotoxicidade transdientária do gel de peróxido de carbamida 10% e 16% sobre células pulpares em cultura (linhagem odontoblástica MDPC-23) e verificaram que a maior concentração (16%) de peróxido de carbamida avaliada causou o maior efeito tóxico para as células quando comparado ao peróxido de carbamida de menor concentração (10%).

Em um estudo clínico, Jorgensen e Carrol (2002), encontraram sensibilidade pós-operatória em metade dos pacientes avaliados após serem submetidos ao clareamento de uso caseiro supervisionado com peróxido de carbamida 15%, durante 4 semanas, indicando possivelmente uma inflamação do tecido pulpar resultante da penetração do agente clareador para a cavidade pulpar. Este resultado, concorda com os obtidos em nosso experimento, no qual o peróxido de carbamida 15% mostrou ser citotóxico nos dois períodos de observação.

Numa pesquisa *in vivo* Anderson et al. (1999) investigaram a presença da enzima Heme oxigenase-1 (HO-1; Heat shock

Protein 32 – HSP32) em dentes tratados com peróxido de carbamida 10%. O aumento da HO-1 é uma reação de defesa contra os efeitos dos radicais livres, como o peróxido de hidrogênio. As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram um resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada, decorrente do possível efeito citotóxico do peróxido de carbamida. Também, de acordo com o presente trabalho, foi possível observar a citotoxicidade do peróxido de carbamida 10%, sendo que os grupos condicionados com este agente clareador apresentaram taxa de sobrevivência celular de 42.06% no período 24 horas, e de 21.76% no período 48 horas, havendo queda da taxa de sobrevivência celular estatisticamente significativa em relação ao grupo controle nos dois tempos avaliados. Do mesmo modo, Woolverton et al. (1993) observaram que o peróxido de carbamida 10% foi citotóxico em cultura de fibroblastos de ratos (L929).

Entretanto, ao avaliar histologicamente a polpa de dentes tratados com peróxido de carbamida 10%, González-Ochoa (2002) sugeriu que o clareamento dental com este agente clareador pode ser considerado seguro para a polpa dental. Também através de análise clínica e histológica, Schulte et al. (1994), estudaram os efeitos do peróxido de carbamida 10%, e observaram que os dentes expostos a este agente clareador apresentaram aparente normalidade do tecido pulpar. Entretanto, estes estudos são histológicos e não avaliam a citotoxicidade como no presente trabalho.

Cooper et al. (1992) quantificaram o peróxido de hidrogênio liberado a partir do peróxido de carbamida 10% ou 15% e o gel de peróxido de hidrogênio 5% ou 30% e concluíram que ocorre menor penetração pulpar de peróxido de hidrogênio a partir do peróxido de carbamida quando comparado ao peróxido de hidrogênio livre. De acordo a taxa de sobrevivência celular obtida no presente trabalho, pode-se observar uma alta citotoxicidade dos agentes clareadores caseiros a base

de peróxido de hidrogênio, sendo que após 48 horas a sobrevivência celular, para todas as concentrações foi menor ou igual a 5%.

6.4 Considerações finais

Ao avaliarmos diferentes concentrações de agentes clareadores de uso profissional e de uso caseiro, verificou-se que tanto a taxa de sobrevivência avaliada após 24 horas quanto após 48 horas foram afetadas. Os resultados também mostraram que a taxa de sobrevivência celular foi maior no período após 24 horas, reduzindo nas avaliações após 48 horas. Esta redução entre os períodos avaliados indica uma diminuição no metabolismo celular sem recuperação celular, possivelmente devido à ação dos agentes clareadores impedindo o crescimento celular. Estes resultados condizem com aqueles encontrados por Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998 e Aren, 2003, que também encontraram redução na viabilidade e crescimento celular após exposição a agentes clareadores, e confirmaram o efeito citotóxico dos agentes clareadores.

Porém, os dados do presente trabalho diferem dos resultados obtidos por Pretti em 2007, que observaram um metabolismo celular maior no período após 48 horas em relação ao período após 24 horas. Provavelmente esta diferença é devido aos diferentes tipos celulares utilizados; Pretti (2007) avaliou a citotoxicidade sobre fibroblastos de polpa humana (FP5) e no presente estudo utilizou-se fibroblastos de mucosa gengival (FMM1). As diferentes linhagens celulares utilizadas nas variadas pesquisas podem justificar a discrepante sensibilidade destas células em cultura com relação aos materiais testados.

Em relação à citotoxicidade dos agentes clareadores à base de peróxido de carbamida, pode-se observar que os agentes clareadores caseiros apresentaram uma taxa de sobrevivência celular inferior aos agentes clareadores de uso profissional. Valera et al., 2007, também verificou que ocorre maior penetração de peróxido da superfície externa para a câmara pulpar nos peróxidos de carbamida caseiros quando comparados aos peróxidos de carbamida para uso profissional. Este fato pode ser explicado pelas diferenças na fabricação dos produtos. O peróxido de carbamida é produzido a partir da adição da uréia ao peróxido de hidrogênio e de acordo com as condições, como temperatura e luz ambiente, este produto pode alterar sua concentração final. Outro fato é o espessante utilizado na fabricação dos géis que alteram a liberação final do produto. Sendo assim, produtos com mesmas concentrações mas de diferentes procedências ou lotes de fabricação, podem apresentar liberação de radicais oxidativos diferentes. No presente estudo utilizou-se produtos de diferentes procedências, o que pode justificar os resultados obtidos.

Em relação à citotoxicidade de agentes clareadores Cooper et al. (1992) e Thintinanthapan et al. (1999) afirmaram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental não é proporcional à concentração do agente químico aplicado, o qual parece estar associado aos componentes do produto.

Esta conclusão foi confirmada pelo trabalho de Thintinanthapan et al. (1999), onde foram testadas três marcas comerciais diferentes de peróxido de carbamida, todos em concentração de 10% (Opalescence, Sparkle, e Rembrandt). Os autores mostraram valores diferentes na difusão dos produtos testados. De acordo com os autores a penetração do peróxido de hidrogênio para a polpa dentária varia significativamente em vários produtos comerciais, embora estes produtos apresentem a mesma concentração de peróxido. Foi relatado também que esta diferença pode estar associada à quantidade de carbopol

(carboxypolyethylene polymer) no produto, uma vez que este composto é adicionado ao material com o objetivo de aumentar a viscosidade e retardar a liberação de peróxido de hidrogênio.

Para o estudo de citotoxicidade o ideal seria avaliar-se a concentração do peróxido que atinge a câmara pulpar *in vivo*. Entretanto, é difícil obter-se esta padronização em função dos reagentes utilizados, diferentes produtos, marcas comerciais e outros interferentes da simulação *in vitro* das condições *in vivo*. Assim, as limitações dos testes de citotoxicidade *in vitro* precisam ser reconhecidas ao se elaborar um estudo e interpretar os seus resultados. Existem diferenças substanciais, incluindo parâmetros fisiológicos e bioquímicos, entre o ambiente de cultura celular e todo o sistema animal, *in vivo*. Os processos metabólicos em sistemas animais são mais complexos e dinâmicos que os processos em cultura de células. Além disso, quando um agente é adicionado em cultura, ele está prontamente disponível para as células, o que não ocorre nos sistemas vivos.

É importante entender que um material dentário considerado como altamente citotóxico quando aplicado diretamente sobre células em cultura, pode não impor significativo risco ao complexo dentino-pulpar quando da interposição de estruturas dentárias, tal como a dentina, a qual age como uma barreira biológica que reduz ou dilui os componentes solúveis dos materiais. Também a limitação dos efeitos citotóxicos pode ocorrer devido ao tempo insuficiente de contato dos componentes com os tecidos e pela existência do sistema de defesa intrínseca do organismo. Todavia, as diversas metodologias recomendadas para avaliar os efeitos citotóxicos e a biocompatibilidade de novos materiais e técnicas de aplicação, trazem, a cada momento, dados científicos importantes, os quais somados caracterizam e direcionam a segurança de sua aplicação clínica.

Os resultados do presente estudo indicam citotoxicidade para todos os agentes clareadores testados. Estes dados transportados

para a clínica, podem indicar que ocorre muita destruição celular com conseqüências no mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar, embora, alguns autores, ao realizar análise histopatológica, afirmem que os danos teciduais após clareamento sejam reversíveis (Robertson; Melfy, 1980; Anderson et al., 1999; Fugaro et al., 2004).

Esta hipótese foi comprovada por Miranda (2005), que verificou em dentes de cães submetidos ao clareamento, ocorrência de necrose de coagulação em alguns espécimes, após 30 dias, e fibrosamento pulpar em todas as polpas 60 dias após o clareamento.

Sendo o clareamento um procedimento cada vez mais procurado e realizado em consultórios odontológicos, é importante que paciente e profissional se preocupem com os efeitos indesejáveis, possíveis de ocorrer. Quando houver real necessidade da realização do clareamento, deve-se indicar corretamente a técnica e agente clareador que promovam menores efeitos indesejáveis ao paciente, uma vez que os resultados encontrados neste e em outros estudos indicam que os agentes clareadores podem apresentar efeitos deletérios, em especial quando do uso de luz halógena como fonte de fotoativação. Além disso, faz-se necessárias outras pesquisas para melhor explicar o mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio em nível celular e tecidual, assim como seus possíveis efeitos no organismo.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- quanto aos agentes clareadores para uso profissional verificou-se que todos os produtos são citotóxicos, sendo que a citotoxicidade é proporcional à concentração do produto, e a luz halógena promove maior queda no metabolismo celular;
- quanto aos agentes clareadores para uso caseiro supervisionado verificou-se que todos os produtos são citotóxicos sendo que o peróxido de hidrogênio é mais citotóxico que o peróxido de carbamida.

8 REFERÊNCIAS*

Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999;25(4):247-50.

Aren G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence Int*. 2003;34(5):361-5.

Arwill T, Myrberg N, Soremark R. Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentin. II. Transfer of Na in fresh and chemically treated dental tissues. *Odontol Revy* 1969;20(1):47-54.

Auschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Scullan A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent*. 2005;30(2):156-63.

Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates use as retrograde filling material: an in vitro analysis. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(2):113-8.

Baik JW, Rueggeberg FA, Liewehr FR. Effect of light-enhanced bleaching on in vitro surface and intrapulpal temperature rise. *J Esthet Restor Dent*. 2001;13(6):370-8.

Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004;37(2): 120-4.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bowles WH, Thompson HR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986;12(3):108-12.

Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987;13(8):375-7.

Braun A, Jepsen S, Krause F. Spectrophotometric and visual evaluation of vital tooth bleaching employing different carbamide peroxide concentrations. *Dent Mater.* 2007Feb;23(2):165-9.

Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser—A systematic review. *Dent Mater.* 2007;23(5):586–96. Epub 2006 Jul 3.

Camargo SEA, Cardodo PE, Valera MC, Araújo MAM, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *The Europ J Esthet Dent.* 2009;4(1):82-8.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9.

Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent.* Mar;31(3):223-9, 2003.

Christensen GJ. Bleaching teeth – Which way is best? *J Est Restor Dent.* 2003; 15(3):137-9.

Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod.* 1979;5(5):134-8.

Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992;18(7):315-7.

Costa CAS. Teste de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. Metodologia científica – ensino e pesquisa em odontologia. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001.p.146-160.

Daduon MP, Bartlett DW. Safety issues when using carbamide peroxide to bleach vital teeth – a review of the literature. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2003;11(1):9-13.

Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching—a critical review of the biological aspects. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):292-304.

Deliperi S, Bardwell DN, Papathanasiou A. Clinical evaluation of a combined in-office and take-home bleaching system. J Am Dent Assoc. 2004;135(5):628-34.

Dostalova T, Jelinkova H, Housova D, Sulc J, Nemec M, Miyagi M, Brugnara Jr A, Zanin F. Diode laser-activated bleaching. Braz Dent J. 2004;15(special issue):SI 3-8.

Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;72(2):254-9.

Estrela CASC. Metodologia científica – ensino e pesquisa em odontologia. 1ª Edição,2001.

Feinman RA, Goldstein RE, Garber DA. Bleaching teeth. Chicago: Quintessence Books;1987.

Floyd RA. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. J Am Dent Assoc. 1997;128(suppl):S37- 40.

Freshney RI. Culture of Animal Cells: a manual of basic technique. 4ª ed., 2000.

Fugaro JO et al. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent*. 2004;29(4):363-8.

Gerlack RW, Sagel PA, Barker ML, Karpinia KA, Magnusson I. Placebocontrolled clinical trial evaluating a 10% hydrogen peroxide whitening strip. *J Clin Dent*. 2004;15(4):118-22.

Gökay O, Müjdecı A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod*. 2004;30(12):887-9.

Gökay O, Müjdecı A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005;38(8):516–520.

Gökay O, Yılmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod*. 2000;26(2):92-4.

Gökay O, Zıraman F, Çalı Asıl A, Saka OM. Radicular peroxide penetration from carbamide peroxide gels during intracoronar bleaching. *Int Endod J*. 2008;41:556–560.

González-Ochoa JG. Histological assessment of dental pulp after vital bleaching with 10% carbamide peroxide. [thesis MSD]. Indiana: University School of Dentistry;2002.

Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res*. 1993;72(5):931-8.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989;20(3):173-6.

Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and reserch. *J Am Dent Assoc*. 1997;128(Suppl):S19-25.

Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* May;107(5):739-44, 2009.

Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent.* 2006;34(1):412-19.

Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(8):1076-82

Kanno, S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxideinduced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci.* 2003;92(4):166-70.

Kawamoto K., Tsujimoto Y. Effect of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J.Endod.* 2004;30(1):45-50.

Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D.Science. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science.* 2007Aug17;317(5840):961-4.

Kinomoto Y, Carnes DL, Ebisu S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *J Endodon* 2001;27:574-577.

Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dental Traumatol.* 1998;14(1):21-5.

Kugel G, Ferreira S. The art and science of tooth whitening. *J Mass Dent Soc.* 2005;53(4):34-7.

Lee GP, Lee MY, Lum SOY, Poh RSC, Lim KC. Extraradicular diffusion of hydrogen peroxide and pH changes associated with intracoronary bleaching of discoloured teeth using different bleaching agents. *Int Endod J.* 2004;37(7): 500-6.

Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food Chem Toxicol.* 1996;34(5):887-904.

Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009Apr7.

Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(2):194-201, quiz 228-9.

Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent.* 2008;33(1):15-22.

Matis BA, Mousa HN, Cochran MA, Eckert GJ. Clinical evaluation of bleaching agents of different concentrations. *Quintessence International* 2000;31:303–10.

Miranda CB. Resposta pulpar de dentes de cães submetidos ao tratamento clareador [tese]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Odontologia;2005.

Naik S, Tredwin CJ, Scully C Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology.* 2006;42(7):668– 674.

Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc.* 1997;128(suppl):41-4 S.

Papathanasiou A, Kastali S, Perry RD, Kugel G. Clinical evaluation of a 35% hydrogen peroxide in-office whitening system. *Compend Contin Educ Dent.* 2002;23(4):335-46.

Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in permeability of human dentine. *Arch Oral Biol.* 1987;32(7):519-23.

Pretti M, Valera MC, Mancini MN, Benetti AR, Miranda CB. Penetração de peroxide de hidrogênio na câmara pulpar após clareamento com agentes de consultório fotoativado ou não [resumo]. Braz Oral Res. 2004 Sep;18(Supplement):91.

Pretti M. Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores dentais de uso profissional variando o mecanismo de ativação, em fibroblastos de polpa humana [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP;2007.

Pugh Jr G, Zaidel L, Lin N, Stranick M, Bagley D. High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: effects on enamel and pulp. J Esthet Restor. Dent. 2005;17:40–5.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Assesment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by using single cell gel (comet) assay. J Oral Rehabil. 2005;32(10):766-71.

Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. Braz Oral Res. 2006;20(1):47-51.

Robertson WD, Melfy RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. J Endod. 1980;6(7):645-9.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. J Endod 1996;22(1):23-5.

Rotstein I, Torek Y, Lewinstein I. Effect of bleaching time and temperature on the radicular penetration of hydrogen peroxide. Endod. Dent. Traumatol. 1991;7(5):196-8.

Seale NS, McIntosh JE ; Taylr AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. J Dent Res. 1981;60(5):948-53.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J dent.* 1994;22(Suppl.2):S6-S11.

Schulte JR, Morrisette DB, Gasior EJ, Czajewski MV. The effects of bleaching application time on the dental pulp. *J Am Dent Assoc.* 1994;125(10):1330-5.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees J. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: a in vitro study. *J Dent.* 2004;32(4):295-9.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees J S. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. *J Dent.* 2005;33(1):33-40.

Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J.* 2005;199(1):37-40;discussion 32.

Sulieman M, Macdonald E, Rees JS, Addy M. Comparison of three in-office bleaching systems based 35% hydrogen peroxide with different light activators. *Am J Dent.* 2005;18(3):194-7.

Sydney GB, Barletta FB, Sydney RB. In vitro analysis of effect of heat used in dental bleaching on human dental enamel. *Braz Dent J.* 2002;13(3):166-9.

Thitinthapan W, Satamanont P, Vongsavan N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent.* 1999;11(5):259-64.

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J.* 2006;200(7):371-6.

Tripton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1995;66(1):7-13.

Valera MC, Kubo CH, Assis NMP. Clareamento e microabrasão dental. In: Araújo MAM, Pagani C, Valera MC, Rodrigues JR, di Nicoló R. (Org.). Estética para o clínico geral. São Paulo: Artes Médicas; 2005.p.113-78.

Weiger R, Kuhn A, Lost C. In vitro comparison of various types of sodium perborate used for intracoronal bleaching of discolored teeth. J. Endod. 1994;20(7):338-341.

Wetter NU, Walverde DA, Kato IT, Eduardo CP. Bleaching effect of whitening agents activated by xenon lamp and 960-nm diode radiation. Photomed Laser Surg. 2004;22(6):489-493.

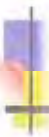
Woolverton CJ, Haywood VB, Heymann HC. Toxicity of two carbamide peroxide products used on nightguard vital bleaching. Am J Dent. 1993;6(6):310-4.

Yap AU, Soh MS. Thermal emission by different light-curing units. Oper Dent. 2003;28(3):260-6.

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol. 1965;19(4):515-30.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

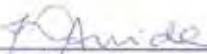
		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Lages, 777 – Jd. São Elmano CEP 12201-070 – F. (12) 3947-9028 Fax (12) 3947-9010 / janete@fao.unesp.br		



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 058/2008-PH/CEP, sobre “Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores para uso caseiro e profissional”, sob a responsabilidade de **PAULA ELAINE CARDOSO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 23 de setembro de 2008.



Profa. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Cardoso PE. Evaluation of cytotoxicity of different bleaching agents for nightguard vital bleaching and office bleach technique in vitro [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of hydrogen peroxide (HP) and carbamide peroxide (CP) on fibroblasts from mucosa of human gingival tissue (FMM1). The cells were cultivated in DMEM and was placed in contact with conditioned medium with bleaching agents: G1- 35% CP without curing, G2-35% CP activated by halogen light; G3- 35% CP activated by light emission diode (LED); G4- 37% CP without curing; G5- 37% CP activated by halogen lamp; G6- 37% CP activated by LED; G7- 3% HP without curing; G8- 7.5% HP without curing; G9 - 9.5% HP without curing; G10- 10% CP without curing, G11-15% CP without curing, and G12- 20% CP without curing. A standard curve of cell growth and viability was obtained from cells that received no treatment (control). The MTT test was performed after 24 and 48 hours to assess the viability and cell growth. In parallel, was measured the amount of PH released under the experimental conditions. The data of cell viability were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's tests ($p < 0.05$). All groups showed significant differences in relation to the control group. Among the bleaching agents for office application, the 37% CP showed higher cytotoxicity and the 35% CP released the higher quantity of hydrogen peroxide. The activation by halogen light promoted the higher cytotoxicity and higher HP released. Among the home bleaching agents based on hydrogen peroxide there was a higher rate of cell survival in low concentration of hydrogen peroxide (3% HP); the bleaching based on carbamide peroxide had a higher cell survival rate in low concentration of carbamide peroxide (CP 10%). The cell viability was significantly lower after 48 hours. It was concluded that the cytotoxicity was related to the concentration of bleaching agent and the curing with halogen light increased the hydrogen peroxide release.

Keywords: bleaching, hydrogen peroxide, cell culture, cytotoxicity.