



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



Uxua Ortecho Zuta

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

Araraquara

2021



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



Uxua Ortecho Zuta

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

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

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2021

O77i

Ortecho-Zuta, Uxua

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

93 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Uxua Ortecho Zuta

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

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

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

2º Examinador: Profa. Dra. Vanessa Cavalli Gobbo

3º Examinador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares

4º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

5º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 01 de Junho de 2021

DADOS CURRICULARES

Uxua Ortecho Zuta

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

Dedicatória

A Deus,

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

Aos meus pais Carlos e Elena,

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

Ao meu irmão Badyr,

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

Agradecimentos Especiais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

Marci Shimoff

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

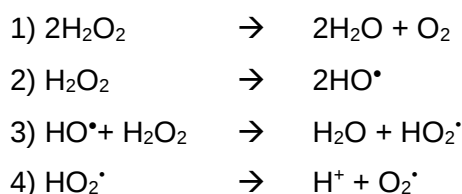
1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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



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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste projeto foi avaliar dois novos biomateriais poliméricos (um scaffold polimérico de nanofibras e um primer polimérico catalisador), a serem indicados para aplicação sobre o esmalte dentário antes da realização do clareamento de consultório, de tal maneira que esta nova estratégia clareadora acelere a obtenção de resultados estéticos satisfatórios sem causar toxicidade para células pulpares.

2.1 Objetivos Específicos:

ETAPA 1. Empregar diferentes concentrações de uma solução de policaprolactona (PCL - 12,5 e 15% m/v) para confeccionar scaffold polimérico de nanofibras (ScP) e o polímero hydroxipropil metilcelulose (HPMC) para preparar um primer polimérico catalisador (PrP).

ETAPA 2. Avaliar a influência do uso do ScP e do PrP na alteração de cor e citotoxicidade trans-amelodentinária do protocolo de clareamento de consultório, onde um gel com 35% de H_2O_2 é aplicado por 45 minutos (3x15 min) sobre o esmalte dentário.

ETAPA 3. Determinar, a partir dos melhores resultados obtidos nas etapas 1 e 2 deste projeto, a influência da redução do tempo de realização do clareamento de consultório (2x15 e 1x15 min), na alteração de cor e citotoxicidade do procedimento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Um crescente número de pessoas tem procurado tratamentos odontológicos com o objetivo principal de manter ou melhorar a aparência de seus dentes. Diversos fatores têm sido considerados essenciais para alcançar um sorriso harmônico e agradável, sendo a cor dos dentes um dos aspectos estéticos mais relevantes³¹. Múltiplos fatores extrínsecos e intrínsecos podem ser responsáveis pela coloração dos dentes, sendo que a intensidade da pigmentação dentária é responsável por problemas cosméticos capazes de resultar em danos psicossociais aos pacientes^{32,33}. Dentro deste contexto, o clareamento dental representa, sem dúvida, o protocolo clínico mais comumente usado na Odontologia Estética contemporânea, sendo esta terapia capaz de modificar a cor e aumentar a luminosidade dos elementos dentários^{34,35}. Diversos pesquisadores têm relatado que grande parte do sucesso do clareamento dental se deve ao fato deste tipo de terapia ser considerada relativamente simples, eficaz, conservadora e de baixo custo³⁶.

A terapia clareadora mais amplamente utilizada é aquela realizada em consultório (in-office tooth bleaching), pois resultados estéticos satisfatórios podem ser alcançados de forma relativamente rápida. Para executar este tipo de tratamento, géis clareadores a base de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em elevadas concentrações (30-40%) são aplicados sobre o esmalte dental, onde são mantidos por períodos que variam de 30 a 45 minutos em cada sessão clínica^{3,36-38}. Diversos estudos clínicos demonstraram que alterações na cor dos dentes ocorre logo após a primeira sessão clareadora, sendo que sessões adicionais podem ser realizadas até se obter o resultado estético desejado pelos pacientes^{17,39,40}. Por outro lado, a sensibilidade dentária tem sido considerada o efeito colateral mais frequentemente relatado pelos pacientes submetidos ao clareamento dental de consultório^{2,41,42}. Alguns estudos recentes demonstraram que entre 80 e 100% dos pacientes que realizaram este tipo de clareamento profissional apresentaram sensibilidade dentária, cuja intensidade variou de moderada a severa^{3,15,39,40,43}. Esse desconforto, apesar de ser temporário, tem sido caracterizado pelos pacientes como uma experiência desagradável e irritante, a qual pode interferir na continuidade do tratamento dentário^{40,44}.

Diversos pesquisadores demonstraram que os possíveis efeitos tóxicos causados pelo clareamento dental de consultório são proporcionais a concentração

de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não reagido com os componentes orgânicos presentes no esmalte e dentina^{1,11,13}. Assim, esta molécula residual (free- H_2O_2), a qual tem potencial para se difundir pelos tecidos mineralizados do dente⁴⁵ e interagir com as células pulpares, pode causar lesão celular irreversível¹. Alguns estudos mostraram que o H_2O_2 presente nos géis clareadores induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células da polpa, o que pode interferir no potencial regenerativo deste tecido em longo prazo⁴⁶⁻⁴⁸. O free- H_2O_2 liberado dos géis clareadores também pode se dissociar em outras moléculas tóxicas altamente reativas, as quais induzem estresse oxidativo e ruptura da membrana celular^{1,5,13}. Esses efeitos citotóxicos causados in vitro pelo protocolo tradicional clareador de consultório, parece desencadear, in vivo, um quadro inflamatório associado ou não a formação de áreas de necrose pulpar^{6-8,49}. Apesar do excelente resultado estético imediato obtido pela técnica de clareamento realizada em consultório, os danos causados às células pulpares e ao próprio complexo dentino-pulpar^{4,9,10}, associados à frequente sensibilidade dentária pós-tratamento relatada pelos pacientes⁴¹⁻⁴³, tem feito com que este tipo de terapia seja questionado do ponto de vista biológico^{10,50}.

Além da concentração de H_2O_2 presente nos géis clareadores, outros fatores podem aumentar os efeitos adversos do clareamento dental de consultório, tais como a espessura do esmalte e dentina, o tempo de aplicação do produto sobre o esmalte e o número de sessões clareadoras^{1,49,14}. Por meio de um cuidadoso trabalho de pesquisa laboratorial, de Oliveira Duque et al.¹ aplicaram o protocolo clareador de consultório (gel com 35% de H_2O_2) em discos de esmalte/dentina com espessuras de 2,3 mm e 4,0 mm, os quais simulavam dentes incisivos e pré-molares, respectivamente. Os autores observaram intensos danos celulares e maior quantidade de free- H_2O_2 difundido pelo esmalte e dentina quando o gel foi aplicado nos discos de menor espessura. Esses dados laboratoriais foram corroborados por um importante estudo clínico/histopatológico, onde uma técnica clareadora de consultório realizada em incisivos inferiores humanos resultou em extensas áreas de necrose na polpa coronária e inflamação na polpa radicular, associado a sensibilidade pós-tratamento⁶. Por outro lado, os autores relataram que esta mesma terapia aplicada em dentes com maior espessura de esmalte/dentina (pré-molares) não causou alterações pulpares relevantes. Em outros estudos clínicos mais recentes, onde géis com concentrações de 35-38% de H_2O_2 foram usados, relatos de

sensibilidade dentária ocorreu na maioria dos incisivos clareados^{18,51}. Assim, baseado nos dados científicos de pesquisas laboratoriais e clínicas apresentados até o momento, tem sido possível considerar que o clareamento dental convencional de consultório é um procedimento agressivo para o complexo dentino-pulpar de dentes com menor espessura de esmalte e dentina, tal como os dentes anteriores, os quais são os alvos principais deste tipo de terapia estética não invasiva³⁶.

Para compreender a etiologia dos efeitos colaterais negativos causados pelo uso de géis clareadores com elevadas concentrações de H_2O_2 , e assim avançar no desenvolvimento de estratégias inovadoras mais eficazes e seguras, é importante entender o mecanismo envolvido no processo de tornar os dentes mais claros¹². O clareamento dental ocorre devido à capacidade de oxidação apresentada pelo H_2O_2 , o qual, por ser uma espécie reativa derivada do oxigênio (EROs) de baixo peso molecular (34,01g/mol), consegue se difundir rapidamente pelas estruturas mineralizadas (esmalte e dentina) do dente. O H_2O_2 apresenta comprovado potencial de oxidação ($E^\circ = +1,8\text{V}$), medida que determina a tendência de uma espécie química em doar elétrons, o que pode causar oxidação e fragmentação do substrato orgânico com o qual esta molécula interage⁵². Diversas EROs, tais como o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peri-hidroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^\bullet$) são gerados pela degradação do H_2O_2 ^{17,30}. Essas EROs e alguns radicais livres (RLs) derivados do H_2O_2 são moléculas altamente instáveis e reativas, capazes de clivar ligações duplas de cadeias polipeptídicas de componentes orgânicos^{30,53}. Tem sido demonstrado que essas EROs e RLs clivam cadeias polipeptídicas de cromóforos presentes no esmalte e dentina^{54,55}, os quais definem o padrão de cor do elemento dentário^{17,28}. Os cromóforos são moléculas com grande afinidade por conteúdo orgânico⁵⁶, o que permite que eles se depositem facilmente na dentina rica em colágeno e outras estruturas orgânicas. Tem sido relatado que os cromóforos, os quais podem ter origem intrínseca ou extrínseca, são moléculas orgânicas com cadeias conjugadas de ligações simples ou duplas, que geralmente incluem hetero-átomos, anéis carbonil e/ou fenil⁵⁷. Portanto, a ruptura dessas cadeias conjugadas e outros grupos funcionais pela ação direta do H_2O_2 e seus subprodutos resulta na formação de moléculas coloridas menores, as quais facilitam a passagem de luz, fazendo com que o elemento dental passe a exibir aparência mais clara^{17,30,58}. Assim, elevadas concentrações de H_2O_2 estão presentes nos géis clareadores de consultório com o objetivo de fazer com

que essa molécula degrade a maior quantidade possível de cromóforos localizados no esmalte e dentina. Porém, sabe-se que uma grande parte do H_2O_2 liberado dos géis não interage com os componentes orgânicos coloridos dos dentes, fazendo com que o free- H_2O_2 consiga se deslocar em direção à câmara pulpar via substância interprismática e túbulos dentinários^{5,12}. Já foi demonstrado que essa difusão transamelodentinária de H_2O_2 ocorre poucos minutos após aplicação do gel clareador sobre a superfície do esmalte dentário^{28,59,60}. Assim, tem sido possível sugerir que a sensibilidade dentária causada pelo clareamento de consultório, a qual pode ocorrer mesmo durante a realização desta terapia, seja resultado dos efeitos tóxicos imediatos causados pelo contato direto do free- H_2O_2 com as células pulpares, o que resulta em áreas de necrose e inflamação pulpar¹⁰.

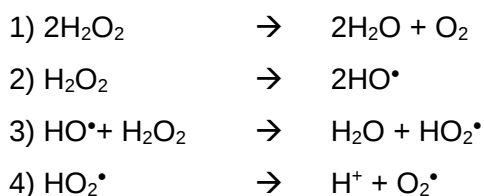
Diante dos desastrosos efeitos colaterais causados pelo clareamento dental supervisionado nos consultórios odontológicos, tem sido preconizado o clareamento caseiro, no qual é utilizado peróxido de carbamida (PC) em baixas concentrações^{61,62}. Quando aplicado sobre o esmalte, o PC nas concentrações entre 10-22% acaba liberando cerca de 3,5-7,0% de H_2O_2 para interagir com o esmalte e dentina. O produto é aplicado em moldeira individual, a qual é mantida em posição na arcada dentária por um tempo mínimo diário de 2 horas, sendo que este tipo de tratamento estético caseiro realizado por períodos que variam de 6 a 28 dias¹⁶. Embora o PC apresente menor risco biológico para complexo dentino-pulpar, o principal contraponto da técnica reside no fato do procedimento poder ser realizado sem supervisão profissional, o que pode levar ao emprego incorreto e inadvertido do produto, colocando em risco os tecidos dentários e periodontais dos usuários^{17,63}. Outro fator negativo do clareamento caseiro tem sido considerado o longo tempo despendido para se obter um resultado estético satisfatório, como aquele alcançado com o clareamento de consultório¹⁸. Dentro deste contexto e frente as limitações da terapia clareadora caseira, diversos pesquisadores passaram a propor e investigar diferentes protocolos de clareamento para serem realizados em consultório e sob cuidadosa supervisão profissional, os quais devem ser mais seguros do que àqueles praticados atualmente^{1,13,14}.

Redução na concentração de H_2O_2 presente nos géis clareadores, associado ou não à diminuição do tempo de aplicação do produto sobre a estrutura

dental foram recentemente estudados^{1,14}. Porém, os autores observaram que estas estratégias podem comprometer a eficácia clareadora do tratamento, exigindo que diversas sessões sejam realizadas para se alcançar os resultados estéticos desejados. Este fato parece limitar o uso destas estratégias clareadoras na prática clínica. A fotocatalise dos géis clareadores também tem sido empregada na terapia clareadora de consultório com objetivo de aumentar a efetividade do H_2O_2 no processo de oxidação do substrato orgânico⁴⁸. O princípio da fotocatalise se baseia na degradação homolítica do H_2O_2 , o que geraria a produção de dois mols de radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$)⁶⁴. Muitos pesquisadores também têm avaliado o uso do calor proveniente de diferentes fontes luminosas para acelerar e aumentar a eficácia estética do tratamento clareador de consultório⁶⁵⁻⁶⁷. Esta associação se baseia na absorbância da energia térmica pelo gel clareador, o que acelera a degradação do H_2O_2 e assim aumenta a liberação de outras EROs com maior potencial oxidativo^{34,68}. No entanto, apesar de ser uma técnica bastante divulgada e aceita pelos cirurgiões dentistas, a limitação do emprego de fontes de luz para irradiar géis clareadores consiste no fato do H_2O_2 ser acromático e não conseguir absorver a luz visível, de tal modo que esta molécula teria limitado poder de absorção de luz com comprimento de onda acima de 280 nm⁶⁹. Para que ocorra a fissão homolítica do H_2O_2 , somente a radiação rica em energia e com onda curta na faixa ultra-violeta é eficaz; porém já foi demonstrado que este tipo de luz é extremamente nocivo aos organismos vivos⁷⁰. Por este motivo, a irradiação de géis clareadores a base de H_2O_2 com fontes de luz no espectro visível apresenta limitado efeito sobre a eficácia clareadora^{40,71}. Numa revisão de literatura recente, Maran et al.⁷² concluíram que ainda não há dados científicos suficientes que determinem que a ativação de géis clareadores com luz melhore o resultado estético do procedimento. Os autores ainda relataram que a fotoativação dos géis clareadores eleva o nível de sensibilidade dental e estimula a difusão trans-amelodentinária do H_2O_2 , o que pode aumentar os danos para células pulpares^{40,67,72}. Com o objetivo de minimizar esses efeitos colaterais decorrentes da fotocatalise do H_2O_2 , tem sido atualmente proposto a utilização do LED Violeta (VIO) (λ 405 – 410 nm), o qual é capaz de produzir efeito clareador quando associado ou não à géis com elevadas concentrações de H_2O_2 . A emissão de luz na faixa do VIO corresponde com o máximo de absorção das moléculas pigmentadas (cromóforos), o que pode resultar em efeito clareador por fotólise destas estruturas orgânicas coloridas^{66,73,74}. Estudos recentes, observaram alterações cromáticas nas estruturas

dentárias quando foi empregado o VIO, independentemente de sua associação com um gel clareador. O uso isolado da luz violeta foi capaz de clarear os dentes, porém em menor grau quando este tipo de luz foi associado a um gel clareador de consultório^{68,73,75}. Apesar de alguns resultados promissores quanto ao uso da luz violeta na terapia clareadora de consultório, esta estratégia é relativamente recente, sendo que estudos ainda são necessários para avaliar sua real eficácia estética a longo prazo, bem como seus possíveis efeitos colaterais⁶⁸.

Desde que as diferentes estratégias anteriormente propostas não foram bem-sucedidas ou ainda necessitam de mais testes para serem implementadas na clínica odontológica com segurança, alguns pesquisadores têm aplicado os conhecimentos básicos da cinética de degradação do H_2O_2 , o qual está presente em elevada concentração nos géis clareadores de consultório, para favorecer o resultado estético da terapia, sem causar danos celulares relevantes^{5,21}. Nos últimos anos, alguns estudos estabeleceram que a velocidade de reação e os subprodutos gerados a partir da oxidação do H_2O_2 podem ser alterados quando esta molécula é colocada em contato com enzimas oxidantes^{25,26}. Tal como demonstrado abaixo, a reação de decomposição do H_2O_2 pode formar oxigênio (O_2) e água (H_2O)⁷⁶, bem como outras moléculas altamente reativas, tais como radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peri-hidroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^\bullet$)^{27,28}:



Entre as EROs geradas pela decomposição do H_2O_2 , o $\text{HO}^\bullet$ é aquele que apresenta maior reatividade com o substrato orgânico, proporcionando rápida fragmentação dos cromóforos de pigmentação presentes nos tecidos duros do dente^{17,29,30}. Por serem consideradas moléculas de natureza simples e com potencial de se degradar rapidamente, as EROs derivadas de H_2O_2 apresentam tempo de meia-vida bastante curto, o que faz com que elas sejam rapidamente eliminadas do meio. Dentre as EROs geradas da fragmentação do H_2O_2 , o $\text{HO}^\bullet$ é aquela que apresenta o menor tempo de meia-vida (10^{-9} segundos) e o maior potencial de oxidação

($E^\circ = +2,8V$)²⁷. Então, acredita-se que o estímulo à degradação do H_2O_2 (longo tempo de meia-vida e baixo potencial oxidativo) quando em contato com o substrato dental, para gerar $HO^\bullet$ (curto tempo de meia-vida e intenso potencial oxidativo), seja crucial para eliminar, ou pelo menos reduzir a difusão de elevadas concentrações de H_2O_2 residual para o tecido pulpar. A estratégia usada atualmente para produzir $HO^\bullet$ a partir do H_2O_2 se baseia nos princípios do Processo Oxidativo Avançado (POA), onde uma molécula catalisadora é usada para degradar H_2O_2 , originando RLs e outras EROs com alto poder de oxidação, como o $HO^\bullet$ ⁵². O emprego dos conhecimentos do POA para a área da Odontologia Estética relacionada com o clareamento dental teve como objetivo principal acelerar a obtenção dos resultados estéticos esperados pelos pacientes, sem a ocorrência de danos pulpares e a consequente sensibilidade pós-tratamento. Resultados estéticos favoráveis foram observados por alguns pesquisadores quando metais de transição altamente oxidantes foram adicionados em géis clareadores^{20-22,59}. Quando óxido de manganês e moléculas ricas em íon ferroso (Fe^{2+}) foram usados para induzir a decomposição de H_2O_2 por meio das reações de Fenton e Fenton-like, a quantidade de H_2O_2 residual que atingiu a polpa foi dramaticamente reduzido^{23,77}. Duque et al.²⁰ relataram que a adição de sulfato de ferro num gel clareador com 35% de H_2O_2 aumentou significativamente a eficácia estética do tratamento, bem como diminuiu a difusão de H_2O_2 pela estrutura dental, reduzindo os efeitos tóxicos sobre células odontoblastóides em cultura. Porém, o uso de íons ferro como agentes catalizadores do H_2O_2 pode causar precipitação de subprodutos de hidróxido de ferro - $Fe(OH)^{2+}$ ^{52,70}, gerar a formação excessiva de bolhas e resultar em aumento na temperatura do gel clareador, fatores que podem limitar o uso clínico desta estratégia para realizar o clareamento dental de consultório²⁰.

Ativadores enzimáticos também tem sido proposto para aumentar a liberação de RLs e EROs, tal como o $HO^\bullet$ ^{5,21-23}. Agentes catalizadores enzimáticos têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica e química, bem como na área da engenharia tecidual para desenvolvimento de biomateriais⁷⁸. Isso ocorre porque a maioria das cascatas enzimáticas imitam os processos biológicos que ocorrem na natureza⁷⁹ e devido ao fato da biocatálise ser controlada em temperatura ambiente, sem que ocorra danos teciduais significativos⁸⁰. Dentre os catalisadores químicos enzimáticos mais estudados, a enzima horseradish peroxidase (HRP) é um

dos mais importantes, sendo obtida de fonte vegetal a partir da raiz da *Armoracia rusticana*; essa enzima, a qual tem sido amplamente estudada e aplicada em bioquímica^{81,82}, apresenta um centro metálico Fe^{3+} na sua composição, o que favorece a cisão homolítica do H_2O_2 ⁸³. Assim, com o objetivo de avançar no desenvolvimento de estratégias mais seguras para realizar o clareamento dental de consultório, Soares et al.²¹ empregaram esses conhecimentos básicos de catálise química num estudo onde HRP, bem como sulfato ferroso, cloreto de manganês e catalase foram incorporados num gel clareador com 35% de H_2O_2 . Os autores observaram que todos os catalisadores aumentaram a eficácia estética da terapia e reduziram a difusão trans-amelodentinária de free- H_2O_2 . Porém, quando os ativadores químicos foram comparados, os melhores resultados estéticos e biológicos ocorreram para a enzima HRP. Ortecho-Zuta et al.⁵ demonstraram que a adição de 10 mg/mL de HRP num gel com 35% de H_2O_2 reduziu significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária do produto. Nesse estudo laboratorial, os autores observaram que a presença da HRP no gel fez com que a viabilidade celular fosse cerca de 34% maior quando comparado ao gel sem adição da enzima. Além disso, os autores relataram que o gel contendo HRP aumentou em aproximadamente 24% a eficácia estética do tratamento logo após a 1ª sessão de clareamento. Apesar de todos esses resultados positivos observados por meio da catálise enzimática do H_2O_2 , os autores consideraram que o benefício desta estratégia clareadora se manteve limitado, pois as células pulpares ainda se apresentaram sensíveis ao estresse oxidativo mediado pelo H_2O_2 ⁵. Entretanto, ficou evidente o fato de que o emprego da catálise enzimática, onde o H_2O_2 pode originar outras moléculas com maior potencial oxidativo e menor tempo de meia-vida, pode ser uma estratégia promissora para se alcançar novas terapias clareadoras mais efetivas e seguras²¹⁻²³. Assim, parece interessante, neste momento, propor e avaliar novas terapias onde o esmalte dentário seja recoberto com polímeros orgânicos contendo ou não catalisadores enzimáticos, antes da aplicação do gel clareador de consultório.

Diversos polímeros vêm sendo utilizados nas diversas áreas da saúde, sendo que desde a década os 80 esses produtos são empregados na produção de fios de sutura reabsorvíveis e em procedimentos cirúrgicos^{84,85}. O policaprolactona (PCL) é um polímero sintético orgânico muito utilizado no desenvolvimento de biomateriais para regeneração tecidual⁸⁶. Este produto, além de ser atóxico,

biodegradável e biocompatível, também apresenta estabilidade química e baixo custo^{87,88}, bem como tem potencial para ser eletrofiado. A técnica de electrospinning tem sido comumente utilizada para produzir biomateriais com potencial para mimetizar a nano-morfologia estrutural e diferentes tecidos⁸⁸. Os espaços entre as nanofibras podem limitar ou até mesmo impedir a passagem de partículas, microrganismos, bactérias, vírus, pós finos⁸⁹, porém mantendo a permeabilidade adequada para a modalidade de terapia que esses scaffolds serão empregados. Assim, usar a PLC para preparar scaffolds com compostos orgânicos capazes de degradar H_2O_2 , e com estrutura porosa suficiente para limitar a chegada desse EROs no esmalte, pode caracterizar uma interessante estratégia para realizar procedimentos clareadores mais biocompatíveis. O hydroxipropil metilcelulose (HPMC), têm sido usados no desenvolvimento de biomateriais para uso em diferentes áreas da saúde. O HPMC é um polímero semi-sintético biodegradável e biocompatível, derivado da celulose; esse produto forma um gel hidrófilo, o qual, além de ser amplamente usado na indústria cosmética, agrícola e farmacêutica para liberação controlada de fármacos, apresenta excelente custo-benefício⁹⁰⁻⁹². Assim, a incorporação de catalizadores no HPMC pode originar um primer com potencial para degradar parcialmente o H_2O_2 presente nos géis clareadores antes desse EROs atingir o esmalte. Dessa maneira, a aplicação do gel clareador sobre o esmalte previamente revestido com o primer catalisador também pode limitar a quantidade de H_2O_2 capaz de atingir as estruturas dentárias, prevenindo possíveis efeitos tóxicos deste tipo de terapia estética.

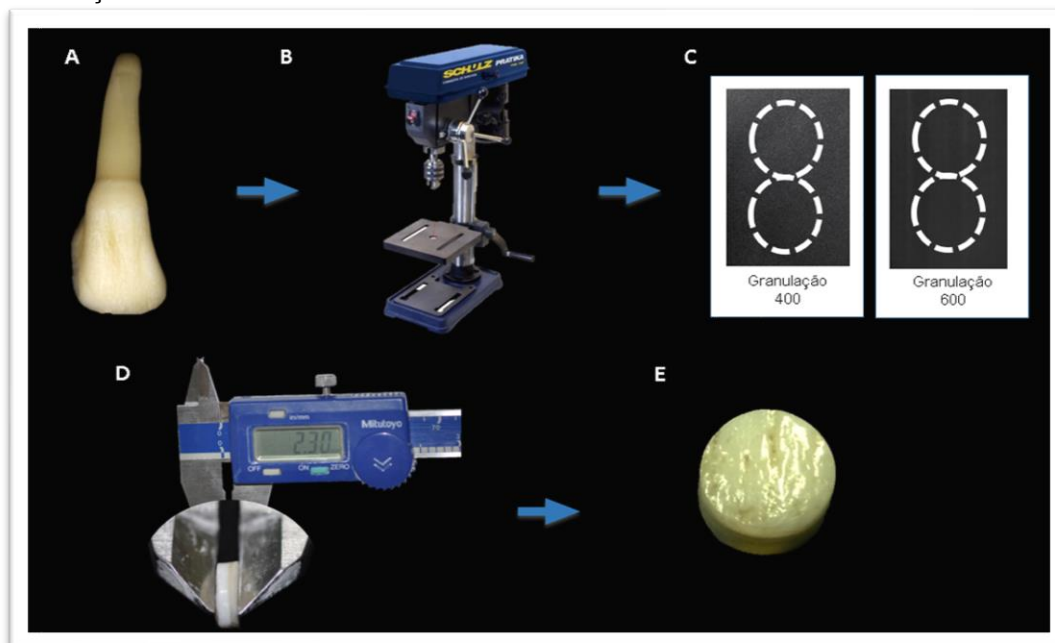
De acordo com o exposto até aqui, julga-se importante, neste momento, associar os dados científicos disponíveis na área da Odontologia contemporânea com os conceitos e fundamentos já estabelecidos no campo da Engenharia Química/Tecidual e Biotecnologia, para estabelecer bioprodutos inovadores, eficientes e seguros para atuarem como coadjuvantes no clareamento dental de consultório. Assim surgiu a proposta de desenvolver dois biomateriais poliméricos, sendo um deles caracterizado por um scaffold permeável de nanofibras à base de PCL e o outro um primer catalisador à base HPMC. Esses biomateriais seriam usados individualmente ou em conjunto, para revestir o esmalte dentário antes da aplicação de géis clareadores de consultório contendo elevada concentração de H_2O_2 .

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Obtenção dos Discos de Esmalte/Dentina

Discos de esmalte/dentina foram obtidos da porção média da face vestibular de incisivos bovinos íntegros. Foram excluídos deste estudo dentes com alterações morfológicas da coroa, trincas no esmalte e/ou desgaste excessivo do terço incisal. Broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil), acoplada em furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil), foi usada para obter os discos de esmalte/dentina com 5,6 mm de diâmetro. Para evitar que o aquecimento gerado pela ação de corte da broca viesse causar trincas ou alterações morfológicas indesejadas nesses discos, todo procedimento foi realizado com os dentes imersos em água destilada na temperatura de 4°C⁵⁷. A espessura dos discos foi padronizada em 2,3 mm por meio de desgastes da superfície dentinária com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) amolecidas com água, empregando para isso movimentos em oito manuais para cada granulação¹ (Figura 1).

Figura 1 - Imagens sequenciais representativas dos procedimentos usados para obtenção dos discos de esmalte/dentina



A - Incisivo bovino íntegro; B - Furadeira de bancada usada para obtenção dos discos de esmalte/dentina; C - A espessura dos discos foi padronizada através de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600; D - Disco com espessura de 2,3 mm; E - Disco padronizado.

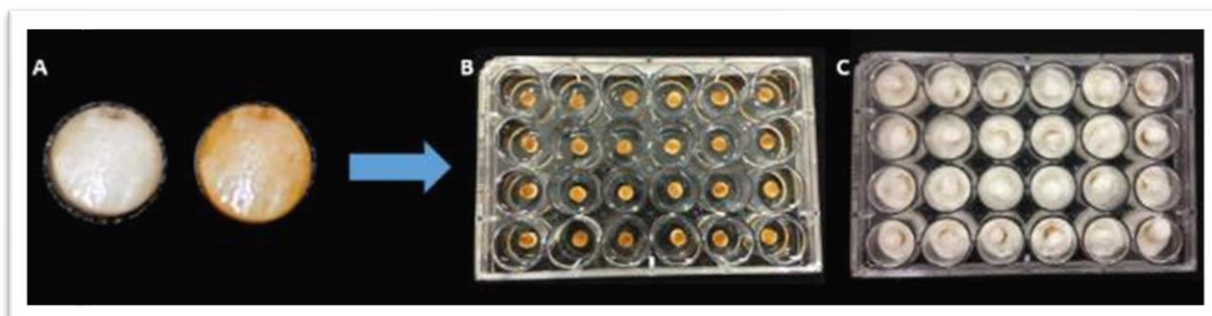
Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, com uma broca diamantada cilíndrica (MF3099, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) acoplada a motor de alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi realizado um leve desgaste na borda dos discos (marcação). Esse procedimento teve como objetivo padronizar o posicionamento dos discos quando da realização de todas as leituras de cor dos espécimes antes e após os procedimentos clareadores. Resíduos e pigmentos foram removidos da superfície do esmalte e dentina com pedra-pomes (S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, usando para isso escova de Robinson (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) adaptada em um motor de baixa rotação (Micromotor e contra ângulo, D700, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Então, a superfície da dentina foi tratada por 30 segundos com EDTA disódico 0,5N (pH 7,2 - ácido etilenodiamino tetra-acético; Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, EUA) para remoção da smear layer¹.

4.2 Padronização da Cor dos Discos de Esmalte/Dentina

A cor dos discos foi determinada por meio do sistema CIE L*a*b*, com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação de 45/0°. Para realizar a padronização da cor inicial dos discos de esmalte/dentina, esses foram submetidos ao protocolo de manchamento extrínseco com chá preto⁵⁷. Para isso, os discos foram imersos numa solução de chá-preto (Leão Jr S. A., Fazenda Rio Grande, PR, Brasil), produzida pela filtração de 3,2 g de chá em 100 mL de água fervente (5 min). Então, após serem incubados por 24 horas a 37°C, os resíduos e pigmentos superficiais dos discos foram mecanicamente removidos com pasta de pedra-pomes (S.S. White) e água, tal como descrito anteriormente. Em seguida, os discos foram imersos em água deionizada e armazenados por 24 horas em incubadora (37°C) para eliminação de pigmentos que por ventura não tenham sido absorvidos pela dentina. Na sequência, para manter a hidratação dos discos, estes foram armazenados por 72 horas com a dentina em contato com algodão embebido em água deionizada, e com o esmalte em contato com algodão embebido em solução tipo saliva (3,9% fosfato de potássio monobásico, 3,6% cloreto de cálcio, 2% cloreto de sódio, 2% cloreto de potássio, 3,7% cloreto de magnésio, 0,2% phenochem, 10% gel de natrosol, água destilada qsp)^{5,57} (Figura 2).

Figura 2 - Imagens representativas do protocolo usado para manchamento dos discos de esmalte/dentina



A - Discos de esmalte/dentina antes e após manchamento com chá-preto; B - Discos manchados individualmente posicionados em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos; C - Para manter a hidratação dos discos, a superfície de dentina foi recoberta com algodão embebido em água e a superfície de esmalte em contato com uma solução do tipo saliva.

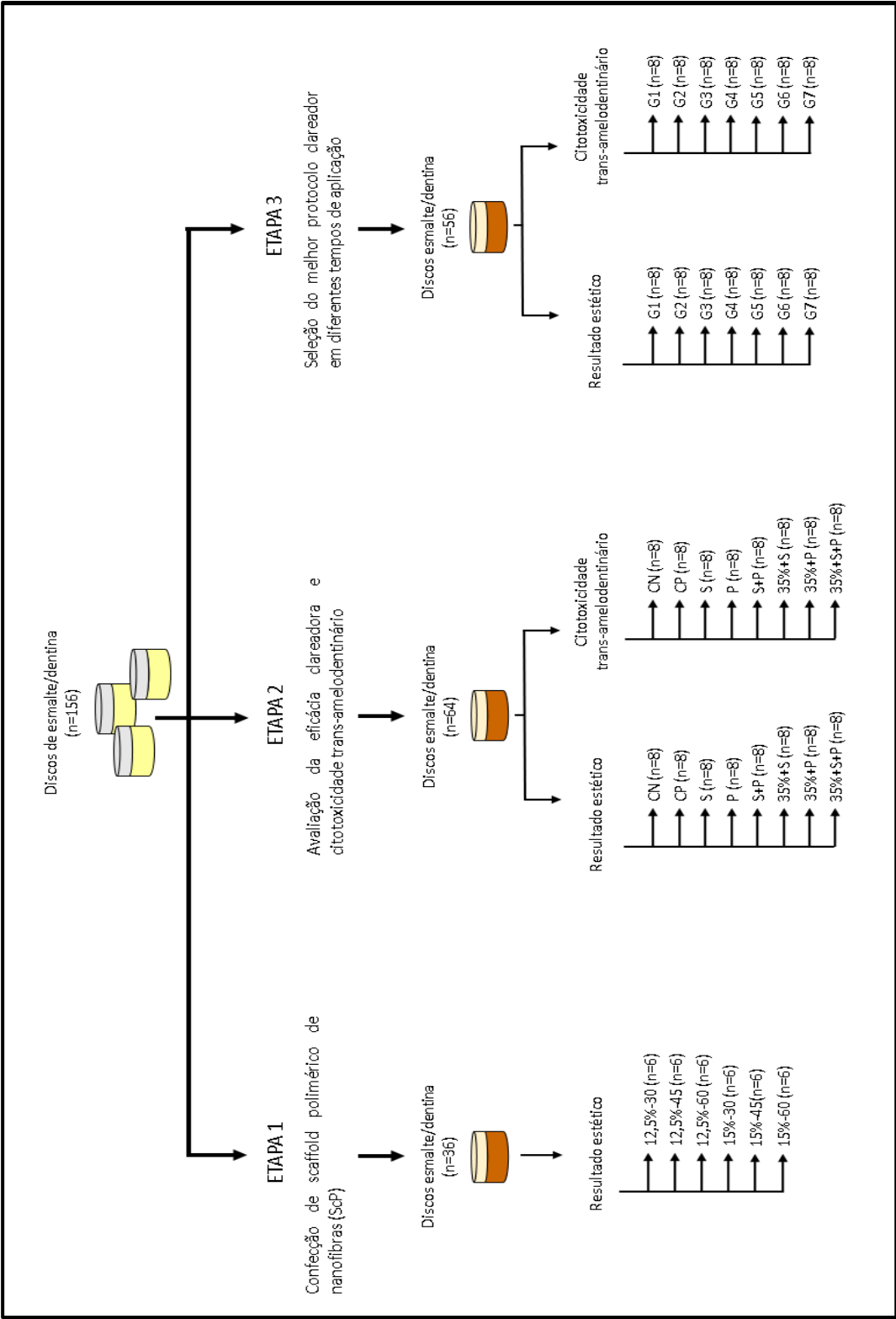
Fonte: Elaboração própria.

Finalmente, os discos de esmalte/dentina com valores de ΔE estatisticamente similares foram selecionados e distribuídos nos grupos experimentais e controles. Para análise da alteração de cor (ΔE^*), os valores de $L^*a^*b^*$ foram obtidos antes e após protocolo de manchamento e, 72 horas após o clareamento, sendo aplicada a seguinte equação:

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

Os discos de esmalte/dentina obtidos foram distribuídos de acordo com os diferentes protocolos laboratoriais realizados neste estudo, os quais foram descritos dentro das três etapas inicialmente estabelecidas. O fluxograma representativo da distribuição dos discos está apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma representativo da distribuição dos discos de esmalte/dentina, de acordo com as etapas do estudo e dentro dos protocolos laboratoriais executados em cada uma delas.



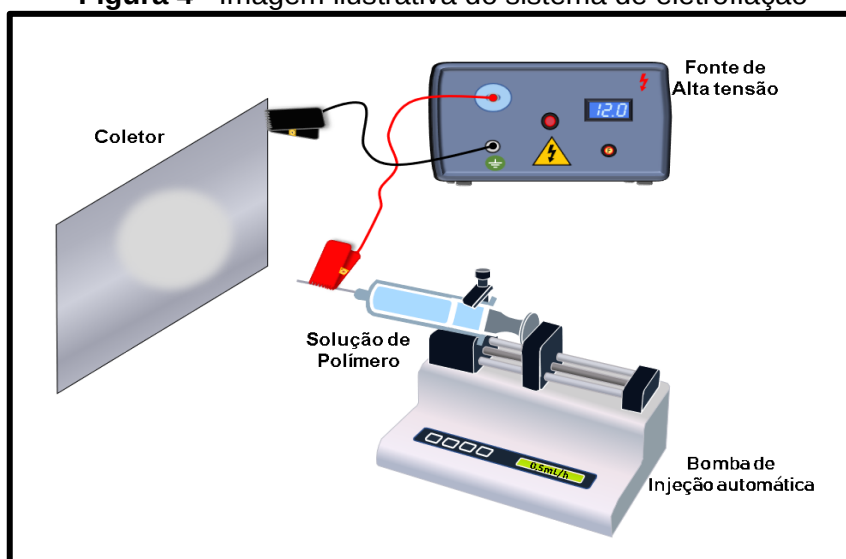
Fonte: Elaboração própria.

4.3 Etapa 1: Confeção do Scaffold Polimérico (ScP) / Primer Polimérico Catalisador (PrP)

4.3.1 Confeção do scaffold polimérico (ScP)

Para confeccionar os ScPs, foram usadas duas concentrações (12,5% e 15% m/v) de uma solução de policaprolactona (PCL, Sigma-Aldrich Corp.), a qual tem sido amplamente empregada no campo da engenharia tecidual. Essas diferentes concentrações de PCL foram preparadas usando uma solução de clorofórmio/dimetilformamida (80:20) (Labsynth Produtos para laboratório, São Paulo, SP, Brasil). A técnica de electrospinning foi empregada para confeccionar os ScPs, sendo que para isso diferentes tempos de eletrofiação (30, 45 e 60 min) foram estabelecidos. Cada solução inicialmente obtida foi transferida para uma seringa esterilizada de 5 mL (Luer Loc BD, Curitiba, PR, Brasil) com agulha hipodérmica de aço inoxidável de calibre de 18 gauge (Bunzl Saúde/Labor Import, São Paulo, SP, Brasil), a qual foi conectada num equipamento de injeção automática (KDScientific, Holliston, MA, EUA). Este equipamento foi regulado para exercer uma pressão sobre o êmbolo da seringa, de tal maneira a atingir uma velocidade de injeção de 0,5 mL/h. A voltagem da fonte de alta tensão foi estabelecida em 12 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor foi de 15 cm. Para obter ScPs com nanofibras distribuídas de forma “aleatória”, foi utilizado um coletor plano de alumínio, o qual foi posicionado perpendicularmente à seringa (Figura 4).

Figura 4 - Imagem ilustrativa do sistema de eletrofiação



Fonte: Elaboração própria.

Os grupos Estabelecidos para esta primeira etapa do projeto estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos de acordo com as concentrações de PCL e tempo empregado para realizar a eletrofiação

GRUPOS	CONCENTRAÇÕES DE PCL	TEMPOS DE ELETROFIAÇÃO
12,5%-30	PCL 12,5%	30min
12,5%-45	PCL 12,5%	45min
12,5%-60	PCL 12,5%	60min
15%-30	PCL 15%	30min
15%-45	PCL 15%	45min
15%-60	PCL 15%	60min

Fonte: Elaboração própria.

4.3.1.1 Análise morfológica do ScP

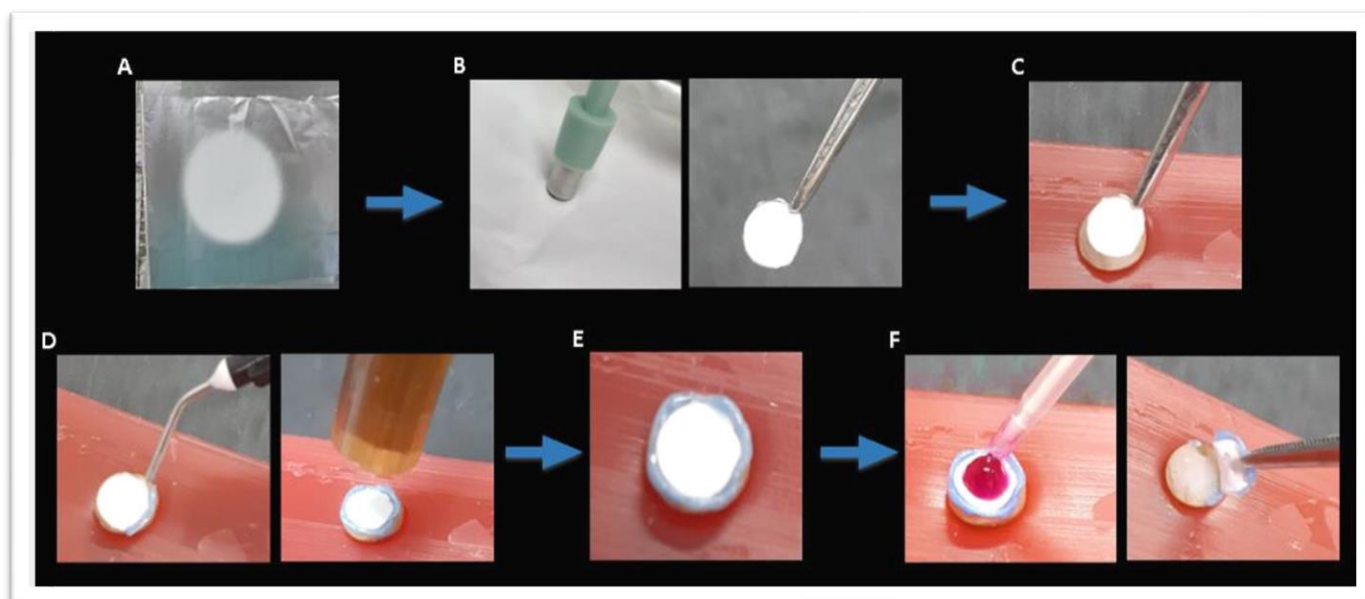
Para esta análise, os ScPs preparados foram colocados em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil), onde permaneceram por 7 dias. Passado esse período, amostras circulares dos ScPs (6 mm de diâmetro) foram obtidas com uso de um *punch* dérmico (Kolplast Ltda., Itupeva, SP, Brasil) e posicionadas em *stubs* metálicos recobertos com fita de carbono (Koch Electron Microscopy Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Então, as amostras foram metalizadas (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil) por 40 segundos e submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura (Philips FEG XL 30, Oxford Instruments, Inc., Concórdia, MA, EUA).

4.3.1.2 Influência do ScP na alteração de cor

Após utilizar as formulações demonstradas no Quadro 1 para obter os ScPs, foi realizada a análise da influência desses biomateriais na alteração de cor de um gel comercial com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP 35%, FGM, Joinvile, SC, Brasil).

Para isso, os ScPs (malha de nanofibras) aderidos na superfície do coletor plano de alumínio foram cuidadosamente removidos e colocados na bancada de trabalho, onde amostras circulares do produto (6 mm de diâmetro) foram obtidas com punch dérmico (Kolplast Ltda.). Após posicionar os discos de esmalte/dentina sobre uma placa de cera rosa utilidade nº 7 (Lysanda Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP), os ScPs foram aplicados sobre o esmalte, onde foram mantidos em posição com uso de uma barreira gengival polimerizável (Top Dam; FGM). Então, 20 μ L do gel clareador foi pipetado e aplicado por 45 minutos (3x15 min) sobre os ScPs. A sequência da terapia clareadora, utilizando uma amostra de ScPs circular está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 - Imagens representativas da sequência da terapia clareadora usando ScPs



A - Malha de nanofibras aleatórias aderida na superfície do coletor plano de alumínio; B - Punch dérmico sendo usado para obter uma amostra do ScP com 6 mm de diâmetro; C - ScP aplicado sobre o esmalte do disco de esmalte/dentina, o qual está posicionado sobre uma placa de cera; D - Top Dam sendo aplicado e polimerizado nas bordas do ScP para mantê-lo em posição sobre o esmalte; E - Espécime preparado; F - Gel clareador sendo aplicado sobre o ScP; imediatamente após concluir o tratamento, o ScP é removido da superfície do esmalte.

Fonte: Elaboração própria.

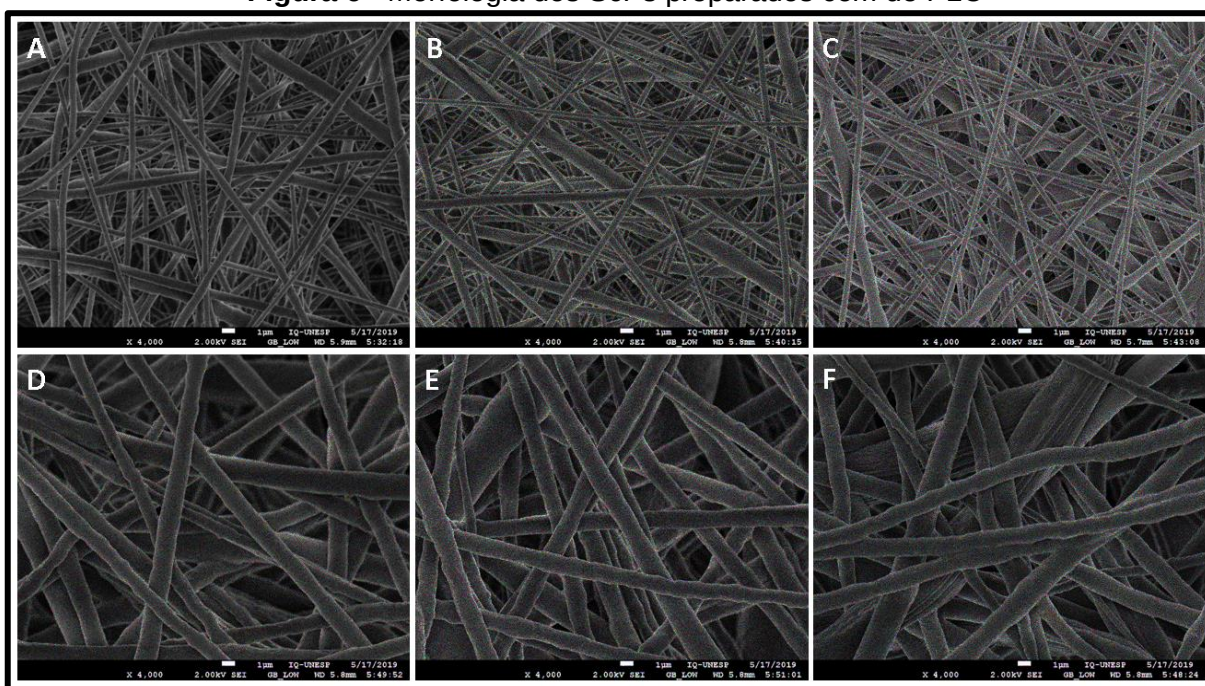
Imediatamente após concluir o procedimento clareador, os géis foram aspirados, os ScPs removidos do esmalte dentário e os discos de esmalte/dentina novamente mantidos em condições de hidratação, tal como anteriormente descrito.

Após 72 horas, os valores de L^* a^* b^* foram novamente mensurados, tal como descrito em detalhe no item 4.2.

4.3.1.3 Morfologia do ScP e sua influência na alteração de cor do clareamento de consultório

As características morfológicas dos ScPs preparados com PCL nas concentrações de 12,5% e 15% m/v estão apresentadas na Figura 6. Após eletrofiação das soluções poliméricas nos períodos de 30, 45 e 60 minutos, foi possível observar que as fibras estavam homoganeamente distribuídas de maneira aleatória nos scaffolds em todos os grupos. De maneira geral, os grupos onde foi usado PCL 12,5% (Figura 6 A, B, C) apresentaram fibras poliméricas mais delgadas do que aquelas observadas para os grupos PCL 15% (Figura 6 D, E, F). Quanto mais longo o tempo de eletrofiação, maior a condensação das fibras e menor os espaços interfibrilares, o que pode reduzir a permeabilidade dos scaffolds. Porém, espaços interfibrilares estavam presentes nos ScPs de todos os grupos, independente da concentração de PCL usado e do tempo de eletrofiação.

Figura 6 - Morfologia dos ScPs preparados com de PLC

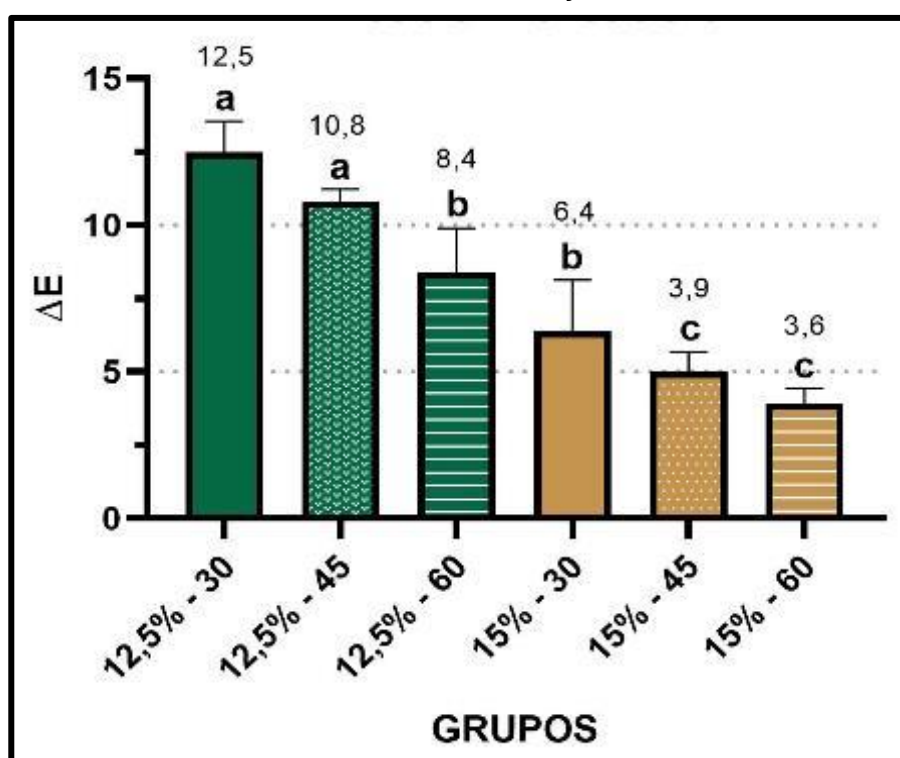


A - Grupo 12,5%-30; B - Grupo 12,5%-45; C - Grupo 12,5%-60; D - Grupo 15%-30; E - Grupo 15%-45; F - Grupo 15%-60. MEV, 4000x.

Fonte: Elaboração própria.

Os dados de alteração cromática, estabelecidos pelos valores de ΔE obtidos para cada grupo, estão apresentados na Figura 7. A aplicação sobre o esmalte do ScP com menor concentração de PLC e nos dois tempos mais curtos de eletrofiação (grupos 12,5%-30 e 12,5%-45), resultou nos maiores valores de alteração cromática dos discos de esmalte/dentina submetidos ao clareamento de consultório por 45 minutos (3x15 min). Assim, as alterações de cor obtidas para esses dois grupos foram estatisticamente superiores aos demais grupos ($p < 0,05$), porém não diferiram entre si ($p > 0,05$). No grupo 12,5%-30 o ScP apresentou forte aderência ao esmalte, o que dificultou sua remoção do substrato após a conclusão do procedimento clareador. Levando em consideração todos esses resultados obtidos por meio da análise dos ScPs preparados e aplicados em associação com o gel clareador, o scaffold pertencente ao grupo 12,5%-45 foi selecionado para as avaliações realizadas nas etapas seguintes deste estudo.

Figura 7 - Análise da alteração de cor



Barras representam valores médios e desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($n=6$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

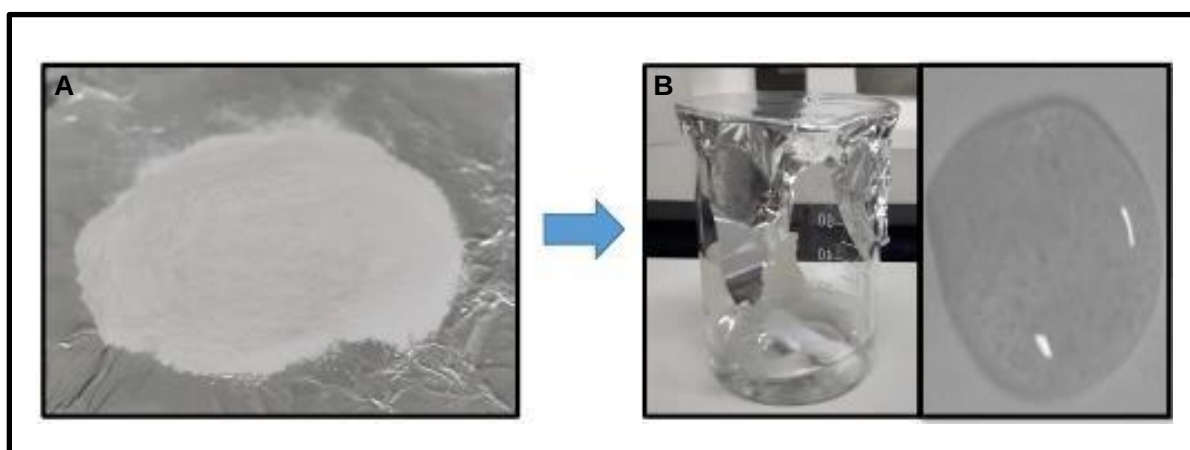
4.3.2 Desenvolvimento do primer polimérico catalisador (PrP)

O objetivo principal desse biomaterial é formar uma delgada película resistente ao escoamento, a qual deve recobrir o esmalte antes da aplicação do gel clareador. Desta maneira, para preparar o PrP foi usado hydroxipropil metilcelulose (HPMC, hypromellose 2208; Sigma-Aldrich Corp.) como polímero base, no qual foi adicionado a enzima horseradish peroxidase (HRP, Sigma-Aldrich Corp.) como agente catalizador.

4.3.2.1 Preparação do PrP

Para desenvolvimento do PrP, 1g de pó de HPMC (Sigma-Aldrich Corp.) na viscosidade de 100 mPa foi diluído em 10 mL de água destilada basificada com hidróxido de sódio (NaHO, Sigma-Aldrich Corp.) até atingir o valor de pH=12,0. Esse polímero base foi preparado sob agitação magnética (Vortex Mixer VM300, Vixar; Plymouth, MN, EUA) em temperatura ambiente por 6 horas, sendo em seguida armazenado por 24 horas na temperatura de 4°C (Figura 8).

Figura 8 - Imagens representativas da formulação do primer

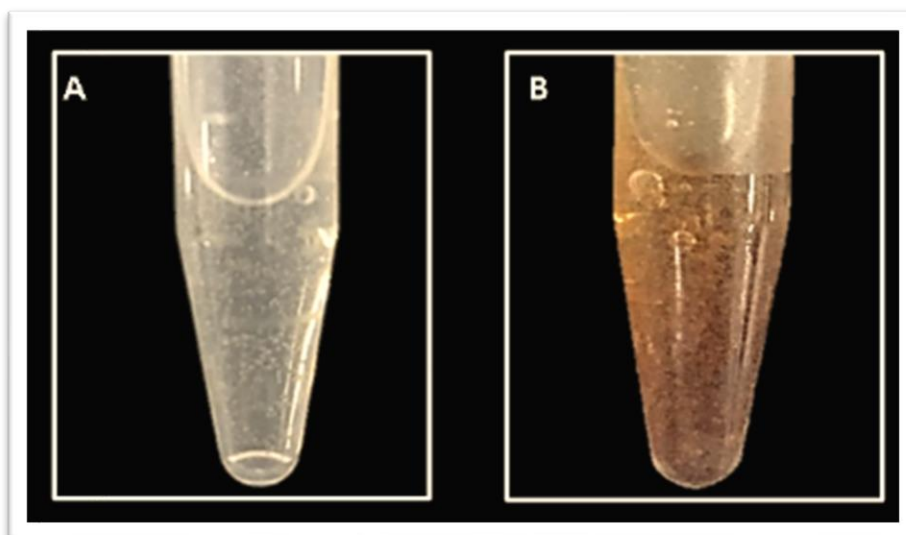


A - 1g do pó de HPMC colocado sobre uma folha de alumínio; B - HPMC diluído em 10 mL de água destilada sob agitação magnética em temperatura ambiente, o que resultou num polímero base viscoso e resistente ao escoamento.

Fonte: Elaboração própria.

Antes de cada procedimento clareador, 10 mg de HRP foi incorporado em 1mL do polímero base, sendo o produto final homogeneizado por 10 segundos em temperatura ambiente, usando para isso um agitador magnético (Vortex Mixer VM300). De maneira geral, a incorporação da HRP ao polímero base não resultou em efervescência ou formação excessiva de bolhas. A análise visual do produto permitiu definir que a enzima parece ter se dissolvido completamente no polímero base, sendo que o resultado foi a formação de um PrP homogêneo e de coloração ligeiramente amarelada (Figura 9).

Figura 9 - Imagens representativas da formulação do PrP



A - Polímero base; B - HRP incorporada ao polímero base, o que resultou na formação de um produto homogêneo e de coloração amarelada.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.2.2 Mensuração do pH

O pH do polímero base foi determinado antes e imediatamente após a incorporação do HRP e da aplicação do gel clareador. Após ter sido preparado, o PrP foi transferido para um eppendorf (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), onde seu pH foi determinado e em seguida monitorado a cada 5 minutos durante o período total de 15 minutos. Para isso, foi usado um pHmetro digital de bancada, ao qual estava acoplado um microelétrodo previamente calibrado (HI-2221 Calibration Check pH/Bench Meter, Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, AD, Reino Unido).

4.3.2.3 Variação de temperatura

A variação da temperatura do PrP foi verificada por meio do emprego de um termômetro acoplado ao pHmetro de bancada (pHmetro Digital PG 2000, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). Esta análise foi realizada com objetivo de determinar a possível ocorrência de reação exotérmica após incorporação da HRP ao polímero base. Assim como para análise de pH, a temperatura do PrP foi monitorada durante 15 minutos após sua preparação, sendo o produto recoberto ou não com o gel clareador.

4.3.2.4 Avaliação do pH e temperatura do PrP

Independente do polímero HPMC ter sido avaliado isoladamente, contendo a enzima horseradish peroxidase (HRP), ou ainda associado ao gel clareador com 35% de H_2O_2 , o pH do produto se manteve estável no transcorrer dos períodos de análise estabelecidos. Porém, foi observado que quando o PrP foi associado ao gel clareador, discreta variação de pH (entre 7,40 e 7,84) ocorreu (Figura 10). Da mesma maneira, a temperatura do HPMC contendo a enzima HRP, associado ou não ao gel clareador, se manteve estável nos períodos de análise, não ultrapassando 26,8°C ao final do tempo mais longo avaliado (Figura 11).

Figura 10 - Análise de variação de pH

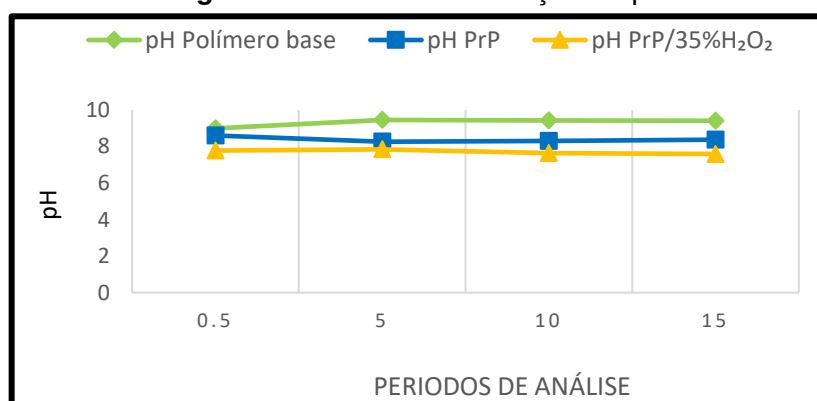


Gráfico demonstrativo do pH dos produtos ao longo do período de 15 minutos após sua preparação.

Fonte: Elaboração própria.

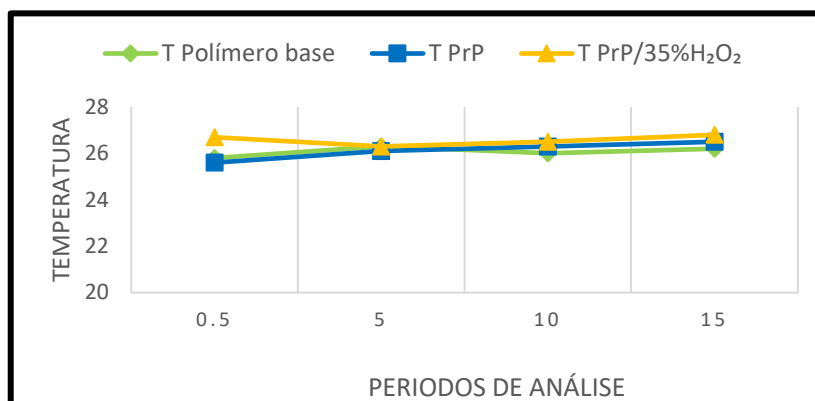
Figura 11 - Análise da variação de temperatura (°C)

Gráfico demonstrativo da variação da temperatura dos produtos ao longo do período de 15 minutos após sua preparação.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Influência do ScP e PrP na cinética de degradação do H₂O₂

Esta análise do gel clareador com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP 35%, FGM) foi realizada na presença ou não dos ScPs e PrP, de acordo com os grupos demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2 - Grupos estabelecidos para análise da degradação do H₂O₂ (n=8)

GRUPOS	TRATAMENTOS
CN	Sem tratamento (Blank)
CP	35% H ₂ O ₂
35%+S	35% H ₂ O ₂ + ScP
35%+P	35% H ₂ O ₂ + PrP
35%+S+P	35% H ₂ O ₂ + ScP + PrP

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3.1 Produção de radicais livres (RLs) e radical hidroxila (HO•)

Amostras circulares do ScP com 4 mm de diâmetro (n=8) foram obtidas e individualmente posicionadas no fundo de compartimentos de uma placa esterilizada

de 96 compartimentos (KASVI Imp.). Para quantificar o total de RLs produzidos, os compartimentos contendo uma amostra de cada grupo, ScP (35%+S), 10 μ L de PrP (35%+P) ou os dois produtos em associação (35%+S+P), tal como demonstrado no Quadro 2, foram recobertos com uma alíquota de 20 μ L do gel clareador. Os produtos em contato com o gel clareador foram incubados a 37°C por 45 minutos com 100 μ L da sonda carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 1 mM na proporção 1:1. Então, nos períodos seguintes de 30 segundos, 5, 10 e 15 minutos, a intensidade de fluorescência foi avaliada a 492 nm de excitação e 527 nm de emissão (Synergy H1, Biotek, Winooski, VT, EUA)⁵. No grupo CN, foi usado água ultra-pura (Invitrogen) em substituição ao H₂O₂ presente na reação, sendo os valores normalizados pelo grupo CN. Para determinar a produção de HO•, os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados, porém os produtos foram recobertos por 30 minutos com 140 μ L da sonda fluorescente do kit OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity Activity Assay (HORAC, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA). A fluorescência foi monitorada a 480 nm de excitação e 530 nm de emissão (Synergy H1, Biotek) nos mesmos períodos estabelecidos anteriormente. Na presença de HO•, ocorre redução na emissão de fluorescência pela sonda HORAC⁵. Desta forma, a emissão de fluorescência da sonda sem presença de amostra foi empregada para calcular a produção de HO•, sendo os resultados calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\boxed{\text{Produção de HO}^\bullet} = \boxed{\begin{array}{c} \text{emissão de fluorescência} \\ \text{no grupo controle negativo} \\ \text{(100\% de fluorescência)} \end{array}} - \boxed{\begin{array}{c} \text{emissão de} \\ \text{fluorescência no} \\ \text{grupo experimental} \end{array}}$$

4.4 Etapa 2: Influência dos Produtos Poliméricos Selecionados Sobre a Alteração de Cor e Citotoxicidade Celular

A partir dos interessantes resultados obtidos com a execução dos ensaios anteriores, foi possível iniciar a análise da influência dos produtos formulados (ScP e PrP) sobre a alteração de cor e o efeito citotóxico trans-amelodentinário causado pelo

clareamento de consultório, onde em cada sessão clareadora um gel com elevada concentração de H_2O_2 (35%) é aplicado sobre o esmalte por 45 minutos (3x5 min).

4.4.1 Avaliação da alteração de cor

Os grupos estabelecidos e os protocolos utilizados nesta etapa do estudo estão demonstrados no Quadro 3.

Quadro 3 - Distribuição dos grupos experimentais e controles (n=8) para avaliação da alteração de cor.

GRUPOS	PROTOCOLOS REALIZADOS
CN	Controle negativo. Não foi realizado tratamento clareador
CP	Controle positivo. Gel com 35% de H_2O_2 aplicado por 45 minutos (3x15 min) sobre o esmalte
S	Aplicação do ScP sobre o esmalte. Não foi realizado tratamento clareador
P	Aplicação do PrP sobre o esmalte. Não foi realizado tratamento clareador
S+P	Aplicação do ScP + PrP sobre o esmalte. Não foi realizado tratamento clareador
35%+S	Aplicação do ScP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador comercial com 35% de H_2O_2 por 45 minutos (3x15 min)
35%+P	Aplicação do PrP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador comercial com 35% de H_2O_2 por 45 minutos (3x15 min)
35%+S+P	Aplicação do ScP + PrP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador comercial com 35% de H_2O_2 por 45 minutos (3x15 min)

Fonte: Elaboração própria.

Nos grupos onde foi utilizado o ScP, amostras circulares (6 mm de diâmetro) desse bioproduto fibrilar foram obtidas, as quais foram colocadas sobre o esmalte dos discos de esmalte/dentina manchados e mantidas em posição com Top Dam (FGM). Estes procedimentos foram previamente descritos em detalhe no item 4.3.1. Nos grupos onde foi usado o PrP, uma alíquota de 20 μL deste bioproduto

catalizador foi aplicada com pipeta específica para líquidos viscosos (MICROMAN E, Gilson Inc. Middleton WI, EUA) sobre o esmalte dos discos de esmalte/dentina. Nos grupos onde ScP e PrP foram associados, num primeiro momento a superfície do esmalte foi recoberta com ScP (6 mm de diâmetro), sendo em seguida aplicado sobre ele uma alíquota de 20 µL do PrP. Então, uma única sessão clareadora foi realizada por meio da aplicação, sobre os produtos poliméricos, de uma alíquota de 20 µL do gel clareador, o qual foi renovado a cada 15 minutos até alcançar o tempo total de 45 minutos. O ScP foi mantido na superfície do esmalte durante os 45 minutos de duração da sessão clareadora. Porém, a alíquota de PrP foi renovada a cada 15 minutos, tal como aconteceu com o gel clareador. Após concluir o último período de 15 minutos da sessão de clareamento, o gel clareador foi aspirado e os produtos poliméricos removidos da superfície do esmalte. Finalmente, todos os discos foram armazenados por 72 horas no ambiente úmido como descrito no item 4.2, para avaliação da possível alteração de cor.

4.4.2 Cultura de células odontoblastóides MDPC-23

Células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23, armazenadas no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp, foram descongeladas e cultivadas em recipientes plásticos estéril de 75 cm² (KASVI Imp.). Para isso, foi usado meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO). As células foram incubadas em atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Fisher Scientific, RCO3000T-5-VBC, Asheville, NC, EUA), sendo que passagens foram realizadas a cada 3 dias até se obter o número de células necessárias para a realização do experimento. Então, um total de 60.000 e 10.000 células foram semeadas em cada compartimento de placas de acrílico esterilizadas (KASVI Imp.) de 24 e 96 compartimentos, respectivamente. Porém, antes de semear as células na placa de 24 compartimentos, uma lâmina redonda esterilizada de vidro (13 mm de diâmetro, KASVI Imp.) foi colocada, individualmente no fundo de cada compartimento. Isso foi realizado para permitir que as células que viessem a se aderir ao vidro, após

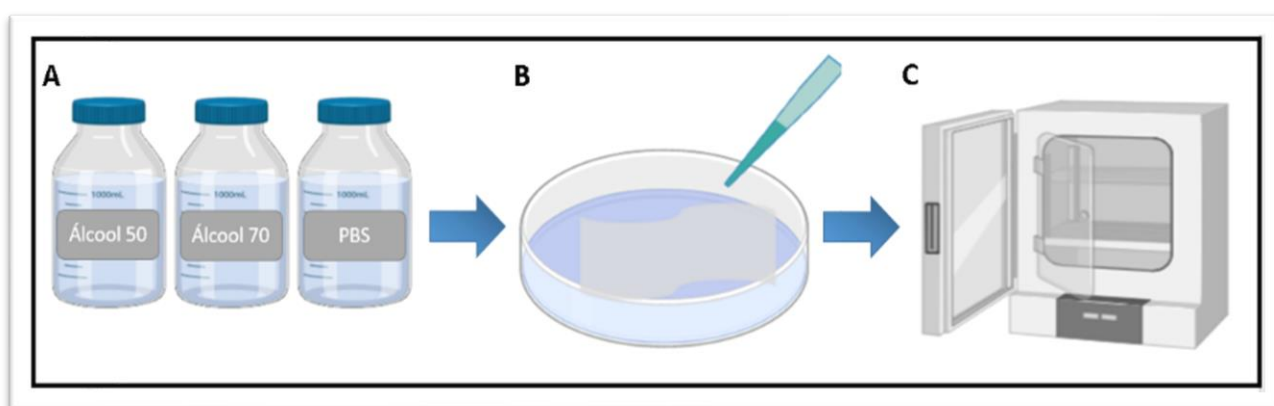
a realização dos procedimentos experimentais, pudessem ser processadas para análise de sua morfologia em MEV⁵.

4.4.2.1 Procedimento experimental

Discos de esmalte/dentina previamente submetidos ao protocolo de manchamento, foram adaptados, através do uso de anéis de silicone, em câmaras pulpares artificiais (CPAs). A periferia dos discos foi vedada com cera utilidade, sendo os conjuntos disco/CPA esterilizados por óxido de etileno (ACECIL Com. Ind. Ltda, Campinas, SP, Brasil)²¹.

Amostras de ScP foram posicionadas numa placa de petri esterilizada (KASVI Imp.) e submetidas ao protocolo de assepsia/lavagem com álcool 50% (10 min - 1x), álcool 70% (20 min - 3x) e solução salina de tampão fosfato - PBS (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) (10 min - 2x)⁹³. Após este procedimento, as amostras foram mantidas em PBS overnight. Para secagem dessas amostras, o PBS foi aspirado e a placa com os ScPs foi mantida por 48 horas em incubadora na temperatura de 37°C (Figura 12).

Figura 12 - Imagens representativas do protocolo de assepsia e lavagem dos ScPs

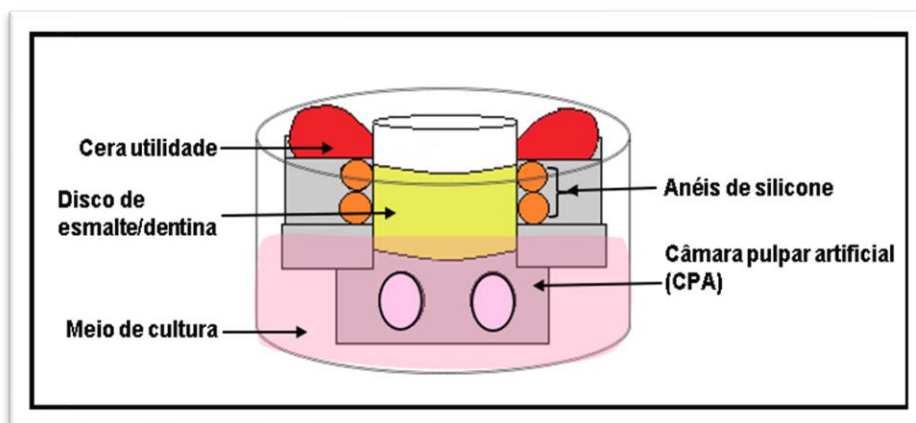


A - Os ScPs foram tratados com álcool 50% (10 min - 1x), álcool 70% (20 min - 3x) e PBS (10 min - 2x); B - As amostras foram mantidas em PBS overnight; C - Após aspiração do PBS, a secagem das amostras foi realizada em incubadora na temperatura de 37°C.

Fonte: Elaboração própria.

Em ambiente asséptico, os conjuntos disco/CPA esterilizados foram individualmente colocados de forma invertida em compartimentos de placas esterilizadas de 24 compartimentos (KASVI Imp.). Este procedimento permitiu que a superfície de dentina dos discos de esmalte/dentina fosse mantida para cima. Em seguida, 2 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (DMEM-SFB) foi aplicado em cada compartimento e os conjuntos disco/CPA girados para que o esmalte pudesse ficar voltado para cima. Neste momento, 1 mL do DMEM-SFB foi aspirado de cada compartimento, de tal maneira que esta solução se manteve em contato apenas com a superfície da dentina; por outro lado, o esmalte (voltado para cima) se manteve exposto para receber os tratamentos estabelecidos no Quadro 3 (Figura 13). Esse protocolo de colocação e manipulação dos conjuntos disco/CPA nos compartimentos, previne a formação de bolhas na região de contato entre a dentina e o meio de cultura, o que faz com que essa metodologia produza resultados confiáveis e reproduzíveis, o que faz com que ela seja amplamente usada em testes de citotoxicidade indireta de novos materiais dentários^{10-14,20,57,94,95}.

Figura 13 - Representação gráfica do conjunto disco/CPA

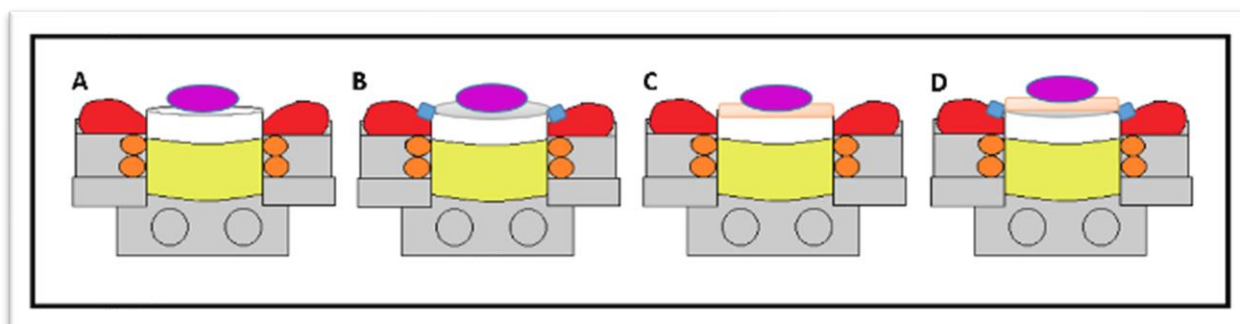


Conjunto disco/CPA colocado no compartimento de uma placa de 24 compartimentos. Observe o disco de esmalte/dentina adaptado na CPA, onde é mantido em posição com anéis de silicone e suas bordas são seladas com cera utilidade. O meio de cultura é mantido em contato direto com a superfície dentinária (voltada para baixo) do disco, sendo que o esmalte (voltado para cima) permanece exposto para receber os tratamentos.

Fonte: Elaboração própria.

Com os conjuntos disco/CPA devidamente posicionados nas placas de 24 compartimentos, foram realizados os procedimentos clareadores estabelecidos para cada grupo (Figura 14), os quais foram descritos anteriormente e também apresentados no Quadro 3.

Figura 14 - Esquema representativo dos procedimentos realizados sobre os discos



A - Grupo CP: Gel clareador aplicado sobre o esmalte do disco montado na CPA; B - Grupo 35%+S: O gel clareador foi aplicado sobre o ScP, o qual foi previamente posicionado sobre o esmalte e mantido no local com Top Dam; C - Grupo 35%+P: Após revestir o esmalte com o PrP, o gel clareador foi aplicado sobre esse biomaterial catalizador; D - Grupo 35%+S+P: O PrP foi aplicado sobre o ScP que revestia o esmalte do disco. Então, o gel clareador foi aplicado sobre o PrP.

Fonte: Elaboração própria.

Para o grupo controle negativo (CN), todos os protocolos laboratoriais de preparação dos conjuntos disco/CPA foram executados, porém nenhum tratamento foi realizado sobre o esmalte exposto. Após concluir os procedimentos clareadores, os extratos (meio de cultura em contato com a dentina + componentes do gel clareador e/ou dos produtos poliméricos que se difundiram pelos discos de esmalte/dentina) foram coletados, homogeneizados e distribuídos em alíquotas de 500 μ L e 100 μ L, as quais foram usadas posteriormente nas diferentes análises biológicas propostas neste estudo. As alíquotas de 500 μ L obtidas de cada grupo, foram aplicadas nas células MDPC-23 previamente cultivadas (60.000 células) sobre as lamínulas de vidro posicionadas nos compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (KASVI Imp.). As alíquotas de 100 μ L dos extratos obtidos de cada grupo foram aplicadas sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas (10.000 células) em placas de 96 compartimentos (KASVI Imp.). As células em contato com

os extratos foram mantidas por 1 hora em incubadora umidificada com 5% de CO₂, na temperatura de 37°C²¹. Finalmente, as células MDPC-23 foram submetidas aos ensaios laboratoriais descritos abaixo (do item 4.6.4 ao 4.6.7).

4.4.2.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

A avaliação da citotoxicidade celular (n=8) foi realizada pelo teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma-Aldrich Corp.), o qual determina a viabilidade das células por meio da análise de sua respiração mitocondrial. Para isso, após terem sido expostas aos extratos, as células MDPC-23 semeadas nas placas de 96 compartimentos foram incubadas por 4 horas em contato com uma solução composta por 90 µL de DMEM-SFB e 10 µL da solução de MTT (previamente preparada pela adição de 5 mg de sal de MTT em 1mL de PBS), na proporção de 10:1. A enzima desidrogenase succínica, produzida durante a respiração mitocondrial das células viáveis, quebram a estrutura do sal de tetrazolium, formando cristais de formazan de coloração azul. Assim, após expor as células MDPC-23 a solução contendo o sal de MTT, os cristais de formazan depositados pelas células que permaneceram nos compartimentos são dissolvidos em 100 µL da solução de isopropanol (Sigma-Aldrich Corp.) acidificado em HCl (Sigma-Aldrich Corp.) a 0,04N, sendo a absorbância mensurada a 570 nm (Synergy H1, Biotek). O valor médio de absorbância obtido no grupo controle negativo (CN, sem tratamento) foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo a porcentagem de viabilidade dos demais grupos experimentais calculado a partir deste parâmetro.

4.4.2.3 Avaliação do estresse oxidativo

Esta análise permitiu estimar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelas células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos para cada grupo deste estudo. Para realizar esse teste, 10.000 células previamente semeadas em cada compartimento de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos foram primeiramente expostas por 30 minutos a 100 µL da sonda fluorescente carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen) na concentração de 5 mM (n=8). Na sequência, as

células pré-tratadas com a sonda fluorescente foram expostas às alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo. A membrana celular é permeável a esta sonda, a qual fluoresce quando entra em contato com EROs produzidas pelas células. Assim, imediatamente após terem sido expostas aos extratos, a fluorescência das células foi monitorada em leitor de fluorescência a 492 nm de excitação e 517 nm de emissão (Synergy H1, Biotek). Os dados foram normalizados pelo grupo CN.

4.4.2.4 Quantificação da difusão trans-amelodentinária de H₂O₂

Para esta análise, alíquotas de 100 µL dos extratos obtidos para cada grupo deste estudo (n=8) foram transferidas para tubos de ensaio de 2 mL (KASVI Imp.) contendo 900 µL de solução tampão acetato (previamente preparada pela misturar de volumes iguais de duas soluções: solução acetato de sódio + solução ácido acético, 2 M, pH=4,5). Em seguida, 500 µL desta solução foi coletada e aplicada em tubos de ensaio contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich Corp.). Os tubos foram agitados, sendo adicionado 50 µL de uma solução com 1 mg/mL da enzima HRP (Sigma-Aldrich Corp.). Este método baseia-se na reação do H₂O₂ com o corante violeta leucocristal, catalisado pela enzima HRP⁶⁰. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de H₂O₂ presente, o que possibilita avaliar a quantidade desta molécula que conseguiu se difundir pelos discos de esmalte/dentina para alcançar o espaço pulpar da CPA. A absorbância da solução resultante foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 596 nm (Synergy H1, Biotek). Uma curva padrão de H₂O₂ foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em µg de H₂O₂ por mL de extrato.

4.4.2.5 Morfologia celular

Para esta análise, as alíquotas de 500 µL dos extratos obtidos para cada grupo deste estudo foram aplicadas sobre as células MDPC-23 previamente semeadas sobre lamínulas de vidro posicionadas em placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (KASVI Imp.). Após o período de 1 hora de incubação das células em contato com os extratos (n=3), o extrato foi aspirado e as células aderidas

nas lamínulas de vidro foram fixadas em 200 µL de uma solução de glutaraldeído 2,5% (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 1 hora. Posteriormente, duas lavagens sequenciais (5 min cada) foram realizadas em cada compartimento, usando para isso 1 mL de PBS. Então, as células MDPC-23 foram pós-fixadas por 1 hora com 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich Corp.) em temperatura ambiente e dentro de uma capela de exaustão (QUIMIS, Aparelhos Científicos LTDA., Q-216-12, Diadema, SP, Brasil). Após efetuar outras duas lavagens de 5 minutos com PBS, as células foram submetidas ao processo de desidratação por meio de trocas seriadas (30 min cada) crescentes de 1 mL de etanol à 30%, 50% e 70%, 95% (2x) e 100% (2x). Em seguida, 200 µL da solução de 1,1,1,3,3,3,- Hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich Corp.) foi aplicado por 20 minutos em cada compartimento contendo as lamínulas com as células aderidas sobre elas, sendo esse procedimento repetido por mais 2 vezes. Neste momento, as lamínulas de vidro foram cuidadosamente removidas dos compartimentos das placas e imediatamente colocadas sobre stubs metálicos com uma fita de carbono (Koch Electron Microscopy, Rave Scientific, Heller Park Lane Somerset, NJ, EUA). Após manter os stubs com as lamínulas por 72 horas em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil), a metalização (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil) com ouro foi realizada por 40 segundos. Finalmente, a morfologia das células que permaneceram aderidas sobre as lamínulas de vidro foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL JSM-6610LV, Peabody, MA, EUA).

4.5 Etapa 3: Seleção e Avaliação do Melhor Protocolo de Clareador Aplicado em Diferentes Tempos

O objetivo específico desta última fase final do estudo foi determinar, a partir dos melhores resultados obtidos nas duas etapas anteriores, a influência da redução do tempo de realização do clareamento de consultório sobre a eficácia estética e citotoxicidade do procedimento. Desta maneira, baseado nos dados científicos alcançados até este momento, o protocolo de clareamento empregando a associação do ScP + PrP com a posterior aplicação do gel com 35% de H₂O₂ (grupo 35%+S+P) foi selecionado. Isso aconteceu devido ao fato deste grupo ter resultado

na formação da maior quantidade de RLs e HO*, bem como na melhor alteração de cor e menor efeito tóxico para as células odontoblastóides MDPC-23. Diante disso, o grupo 35%+S+P passou a ser avaliado nos períodos mais curtos de 30 minutos (2x15 min) e 15 minutos. Para essa etapa do estudo, foram realizadas 3 sessões (3S) de clareamento.

4.5.1 Análise da alteração de cor

Para esta análise, foram estabelecidos 7 grupos (Quadro 4).

Quadro 4 - Distribuição dos grupos de acordo com os protocolos realizados (n=8)

GRUPOS	PROTOCOLOS REALIZADOS (3S)
G1	Grupo controle negativo. Não foi realizado tratamento clareador
G2	Grupo controle positivo. Gel clareador aplicado sobre o esmalte por 45 minutos (3x15 min)
G3	Gel clareador aplicado sobre o esmalte por 30 minutos (2x15 min)
G4	Gel clareador aplicado sobre o esmalte por 15 minutos (1x15 min)
G5	Aplicação do ScP + PrP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador por 45 minutos (3x15 min)
G6	Aplicação do ScP + PrP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador por 30 minutos (2x15 min)
G7	Aplicação do ScP + PrP sobre o esmalte + aplicação do gel clareador 15 minutos (1x15 min)

Fonte: Elaboração própria.

A obtenção e manchamento dos discos de esmalte/dentina, bem como todos os procedimentos relacionados com a análise preliminar de cor, distribuição dos espécimes nos grupos e preparação deles para receber os tratamentos estabelecidos nesta etapa do estudo, foram realizados como anteriormente descrito. Então, 72 horas após concluir a aplicação dos tratamentos sobre o esmalte, seguindo os protocolos

demonstrados no Quadro 4 (n=8), os discos foram novamente mensurados quanto a alteração de cor. Para isso, foi usado o sistema CIE L*a*b*, com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação de 45/0^o.

4.5.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

A obtenção e manchamento dos discos de esmalte/dentina, bem como todos os procedimentos relacionados com a montagem deles nas CPAs, posterior esterilização dos conjuntos disco/CPA e preparação laboratorial dos espécimes para receber os tratamentos propostos nesta etapa do estudo, seguiram os métodos anteriormente descritos. Assim, após realizar os tratamentos estabelecidos no Quadro 4, os extratos obtidos foram divididos em alíquotas, tal como previamente relatado em detalhes neste projeto. Alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo foram aplicadas sobre células MDPC-23 previamente cultivadas (10.000 células) em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (KASVI Imp.). As células em contato com os extratos foram mantidas por 1 hora em incubadora umidificada com 5% de CO₂, na temperatura de 37°C. Finalmente, os possíveis efeitos citotóxicos sobre as células MDPC-23 foram avaliados através da análise de viabilidade celular, onde o teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma-Aldrich Corp.) foi empregado tal como relatado no item 4.6.4 deste estudo.

4.5.2.1 Estresse oxidativo

Alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo demonstrado no Quadro 4 foram aplicadas por 1 hora sobre células MDPC-23 cultivadas (10.000 células) em placas de 96 compartimentos (KASVI Imp.) e que haviam sido previamente expostas a sonda fluorescente carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen) na concentração de 5 µM durante 10 minutos (n=4). Após serem lavadas em PBS, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (VETEC Química Fina LTDA.) por 1 hora, sendo a intensidade de fluorescência celular avaliada através de imagens obtidas em microscópio de

fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). O método empregado para realizar esta análise de estresse oxidativo celular foi descrito em detalhe no item 4.6.5 deste estudo.

4.5.2.2 Integridade da membrana celular

Para esta análise, foi empregado o kit Live/Dead® (Invitrogen), no qual dois marcadores fluorescentes são empregados (n=4). Enquanto o marcador Calcein AM (verde) fluoresce células viáveis com atividade de esterases citoplasmáticas, o marcador EthD-1 (vermelho) atravessa a membrana citoplasmática rompida de células lesadas para se ligar aos nucleotídeos delas. Assim, para executar este protocolo laboratorial, alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo demonstrado no Quadro 4 foram aplicadas por 1 hora sobre células MDPC-23 cultivadas (10.000 células) em placas de 96 compartimentos. Então, as células foram lavadas em PBS, e incubadas por 30 minutos em contato com 150 µL de uma solução composta por DMEM-SFB suplementado com Calcein AM e EthD-1 na concentração de 1:1000. Em seguida, as células que permaneceram aderidas ao fundo dos compartimentos foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B) para obtenção de imagens representativas de cada grupo.

4.6 Análise Estatística

Os dados compilados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e ao teste de Levene para determinação da homocedasticidade. Em seguida, os dados obtidos foram submetidos a análise de variâncias a um e dois critério ANOVA, complementado pelo pós-teste de Tukey. Todos os testes estatísticos empregaram um nível de significância de 5%.

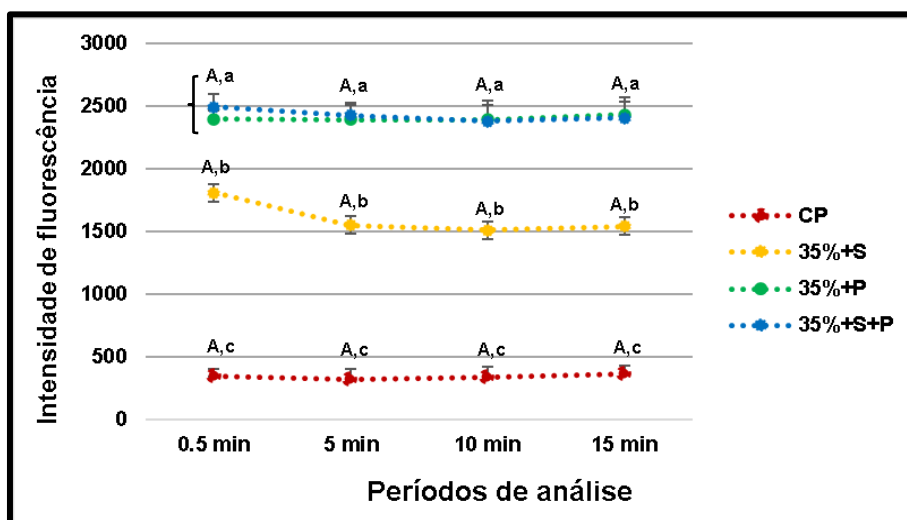
5 RESULTADOS

5.1 Etapa 1

5.1.1 Produção de radicais livres (RLs) e radical hidroxila (HO•)

De maneira geral, foi observado já no primeiro período de análise (0.5 min) que o PrP, associado ou não ao ScP, acelerou a degradação do H_2O_2 quando o gel clareador foi aplicado sobre os produtos (grupos 35%+P e 35%+S+P). Esse mesmo nível de degradação do H_2O_2 permaneceu até o período mais longo de avaliação (15 min). A aplicação do gel clareador apenas sobre o ScP (grupo 35%+S), também resultou em elevação do nível de fluorescência, caracterizando que a degradação de H_2O_2 aumentou em comparação ao grupo controle positivo (CP) ($p < 0,05$). Apesar de ambos os produtos poliméricos terem aumentado o nível de degradação do H_2O_2 , o PrP causou maior efeito sobre o H_2O_2 presente no gel clareador, do que o ScP (Figura 15) ($p < 0,05$).

Figura 15 - Análise de fluorescência da sonda carboxy- H_2DCFDA

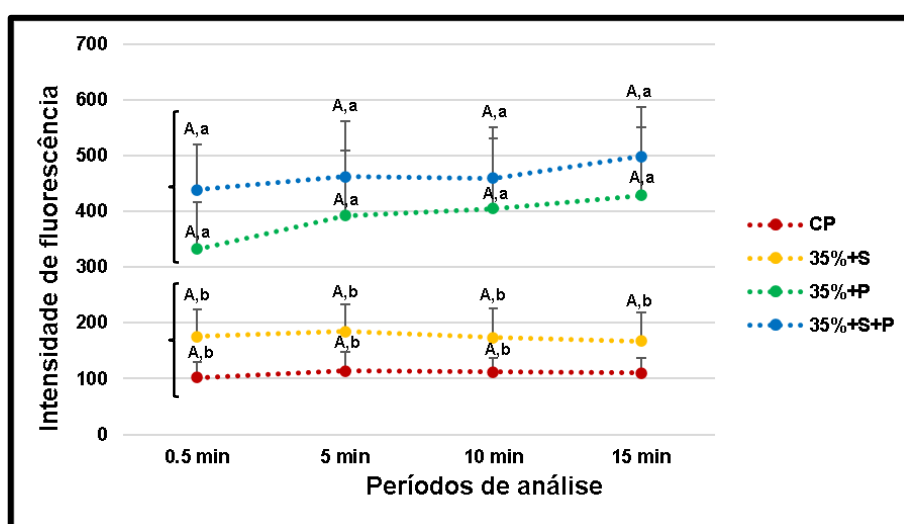


Normalizada pelo controle negativo em cada período de análise. Letras maiúsculas demonstram diferença estatística entre os períodos de análise para cada grupo, letras minúsculas demonstram diferença estatística entre os grupos experimentais. Chaves indicam o mesmo comportamento para os grupos selecionados ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Quanto ao potencial para formação de $\text{HO}^\bullet$, os materiais poliméricos usados em conjunto apresentaram o melhor resultado (grupo 35%+S+P) em todos os períodos de análise. Numa avaliação comparativa individual entre os bioprodutos, maior formação de $\text{HO}^\bullet$ aconteceu quando o gel clareador foi aplicado sobre o PrP (grupo 35%+P) ($p < 0,05$). Porém, quando comparado ao controle positivo (CP), o ScP também conseguiu aumentar significativamente a produção de $\text{HO}^\bullet$ a partir do H_2O_2 presente no gel clareador (Figura 16) ($p < 0,05$).

Figura 16 - Análise de fluorescência da sonda HORAC



Normalizada pelo controle negativo em cada período de análise. Letras maiúsculas demonstram diferença estatística entre os períodos de análise para cada grupo, letras minúsculas demonstram diferença estatística entre os grupos experimentais. Chaves indicam o mesmo comportamento para os grupos selecionados ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

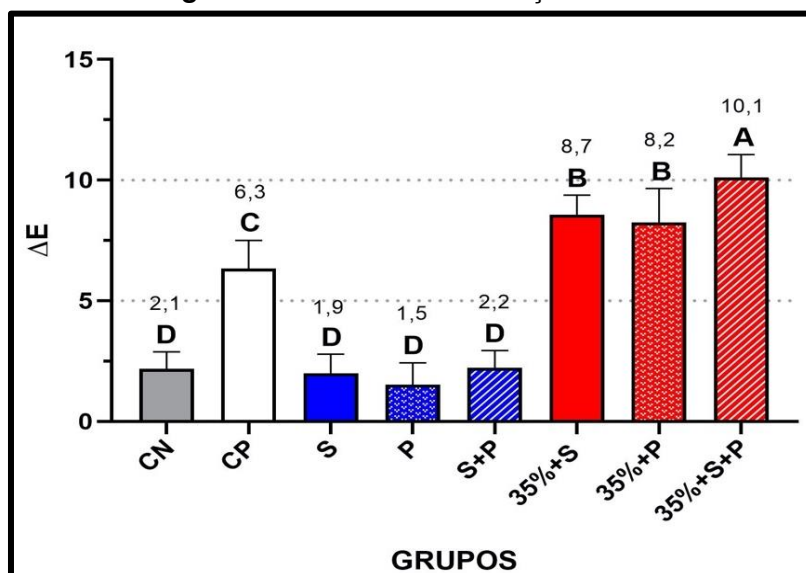
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Etapa 2

5.2.1 Alteração de cor

Os dados referentes às alterações cromáticas ocorridas nos discos de esmalte/dentina submetidos ao clareamento de consultório, associado ou não aos bioprodutos poliméricos, estão demonstrados na Figura 17. Os valores de ΔE aumentaram significativamente para todos os grupos clareados em comparação ao grupo CN (controle negativo), onde os discos de esmalte/dentina não foram submetidos a qualquer tratamento ($p < 0,05$). Maior alteração cromática aconteceu quando o gel clareador foi aplicado por 45 minutos sobre os produtos poliméricos que revestiam o esmalte dos discos (grupos 35%+S, 35%+P e 35%+S+P) em comparação ao grupo controle positivo (CP), onde o protocolo de clareamento tradicional de consultório foi realizado ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 35%+S e 35%+P ($p > 0,05$). Porém, a associação dos produtos poliméricos (35%+S+P) determinou a melhor alteração de cor em comparação a todos os demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 17 - Análise da alteração de cor



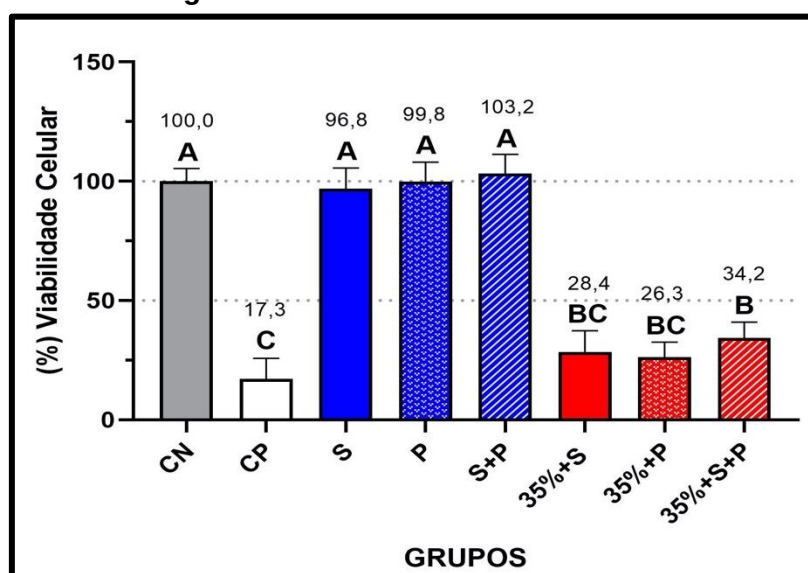
Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

A aplicação isolada ou em associação do ScP e PrP sobre o esmalte (grupos S, P e S+P) não reduziu a viabilidade das células MDPC-23, tal como observado no grupo CN (100% de viabilidade celular), onde nenhum tratamento foi realizado sobre os discos de esmalte/dentina ($p < 0,05$) (Figura 18). Porém, a aplicação do gel clareador com 35% de H_2O_2 por 45 minutos sobre os bioprodutos poliméricos (grupos 35%+S, 35%+P e 35%+S+P), causou queda significativa de aproximadamente 72%, 74% e 66% na viabilidade celular, respectivamente, em comparação ao grupo CN ($p < 0,05$). Redução de cerca de 83% na viabilidade das células foi observado no grupo CP, onde o gel clareador foi aplicado diretamente sobre o esmalte. Assim, foi possível estabelecer que, dentro das condições experimentais deste estudo, os produtos poliméricos não foram tóxicos para as células pulpares. Porém, os ScP (35%+S) e PrP (35%+P) aplicados isoladamente sobre o esmalte não preveniram a toxicidade causada pelo clareamento dental de consultório (CP, $p > 0,05$). Quando os produtos poliméricos foram associados (35%+S+P), redução significativa na citotoxicidade causada pelo gel clareador foi observado em comparação ao CP ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18 - Análise da citotoxicidade



Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

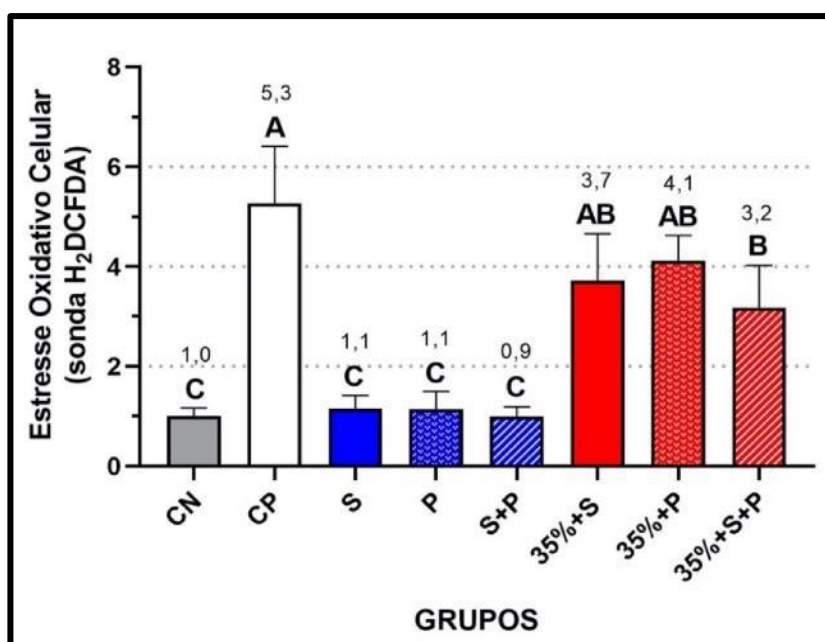
Fonte: Elaboração própria.

A morfologia das células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos para todos os grupos está demonstrada na Figura 19. Enquanto um grande número de células aderidas ao substrato de vidro foi observado no grupo CN (Figura 19-A/B), S (Figura 19-E/F), P (Figura 19-G/H) e S+P (Figura 19-I/J), apenas algumas células arredondadas e com poucos prolongamentos citoplasmáticos foram vistas no grupo CP (Figura 19-C/D). Alteração morfológica e redução no número de células MDPC-23 aderidas ao substrato também ocorreu nos grupos 35%+S (Figura 19-K/L), 35%+P (Figura 19-M/N), e 35%+S+P (Figura 19-O/P); porém estes eventos foram menos intensos neste último grupo, onde ambos os produtos poliméricos foram aplicados sobre o esmalte antes do gel clareador.

Aumento de 1000x e 4000x; A) **CN**: Células revestindo a lamínula de vidro (1000x); B) A seta amarela aponta o mesmo grupo celular destacado na figura A. Note que as células MDPC-23, as quais exibem amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos, estão próximas da confluência. Nas imagens A e B, pequenas áreas da lamínula de vidro (estrelas) sem presença de células podem ser observadas (4000x); **CP**: C) Amplas áreas da lamínula de vidro (estrelas) não estão recobertas por células. As setas vermelhas apontam para pequenos grupos celulares que permaneceram aderidos ao substrato (1000x); D) Detalhe de células MDPC-23, as quais se apresentam contraídas, com morfologia arredondada (seta vermelha) e com poucos prolongamentos citoplasmáticos curtos (setas verdes). Note a descontinuidade da membrana citoplasmática, o que caracteriza um tipo de lesão celular comumente causada por EROs (4000x); **S**: E/F; **P**: G/H; e **S+P**: I/J. Nesses três grupos, as imagens em menor aumento (1000x) mostram que o grande número de células MDPC-23 que permaneceu aderido ao substrato de vidro, exibe morfologia próxima da normalidade. As imagens em maior aumento (4000x) exibem células com amplo citoplasma. Note nas Figuras F, H e J que poucas áreas do substrato estão expostas (estrelas); **35%+S**: K/L e **G35%+P**: M/N - Esses dois grupos não diferiram quanto a resposta das células expostas aos extratos. Note que uma reduzida quantidade de nichos (setas) com poucas células MDPC-23 (1000x), as quais apresentam morfologia alterada (4000x), permaneceu aderida ao substrato; **35%+S+P**: O) Apesar de ter ocorrido redução no número de células aderidas à lamínula de vidro, é possível observar alguns nódulos celulares maiores do que àqueles presentes nas Figuras K e M (1000X); P) (4000X). Fonte: Elaboração própria.

Os dados de estresse oxidativo celular estão demonstrados na Figura 20. De maneira geral, o estresse oxidativo causado nas células pulpares pela aplicação individual sobre o esmalte de ScP ou PrP, bem como o uso associado desses produtos poliméricos (grupos S, P e S+P), não diferiu do grupo CN, onde nenhum tratamento foi realizado ($p < 0,05$). Por outro lado, a aplicação do gel clareador por 45 minutos sobre o ScP (grupo 35%+S) ou sobre o PrP (grupo 35%+P) aumentou o estresse oxidativo celular, o qual teve intensidade estatisticamente semelhante ao grupo CP ($P > 0,05$). Apesar de ter ocorrido estresse oxidativo celular quando ScP e PrP foram aplicados em conjunto sobre o esmalte antes do uso do gel clareador, esta resposta celular foi estatisticamente menor do que àquela observada no grupo CP ($p < 0,05$).

Figura 20 - Análise de estresse oxidativo



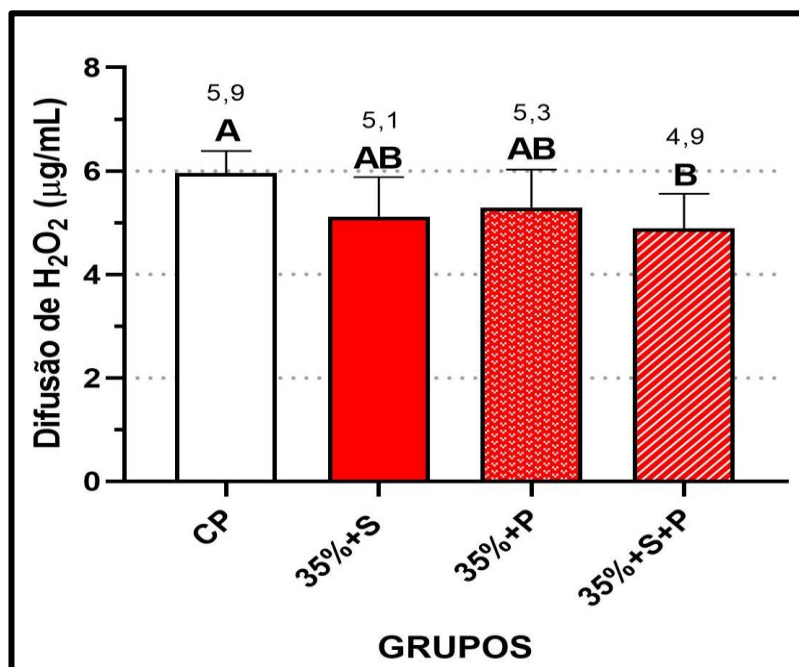
Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.3 Quantificação da difusão trans-amelodentinária de H_2O_2

Os dados de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 , quando da aplicação individual ou associada de ScP e PrP sobre o esmalte previamente ao uso do gel clareador, estão demonstrados na Figura 21. Desde que não se esperava ocorrer difusão de H_2O_2 nos grupos CN, S, P, S+P, os quais foram avaliados nos testes anteriormente executados nesse estudo, esses foram excluídos da presente análise. A maior difusão de H_2O_2 ocorreu no grupo CP, onde foi simulada a condição convencional de realização do clareamento de consultório. Porém, resultado de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 semelhante ao grupo CP foi observado quando ScP (grupo 35%+S) ou PrP (grupo 35%+P) foram individualmente usados para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador ($p>0,05$). A aplicação associada de ScP e PrP (grupo 35%+S+P) resultou na menor difusão de H_2O_2 pelos discos de esmalte/dentina, cuja intensidade foi estatisticamente inferior ao grupo CP ($p<0,05$).

Figura 21 - Análise de quantificação da difusão de H_2O_2



Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p<0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

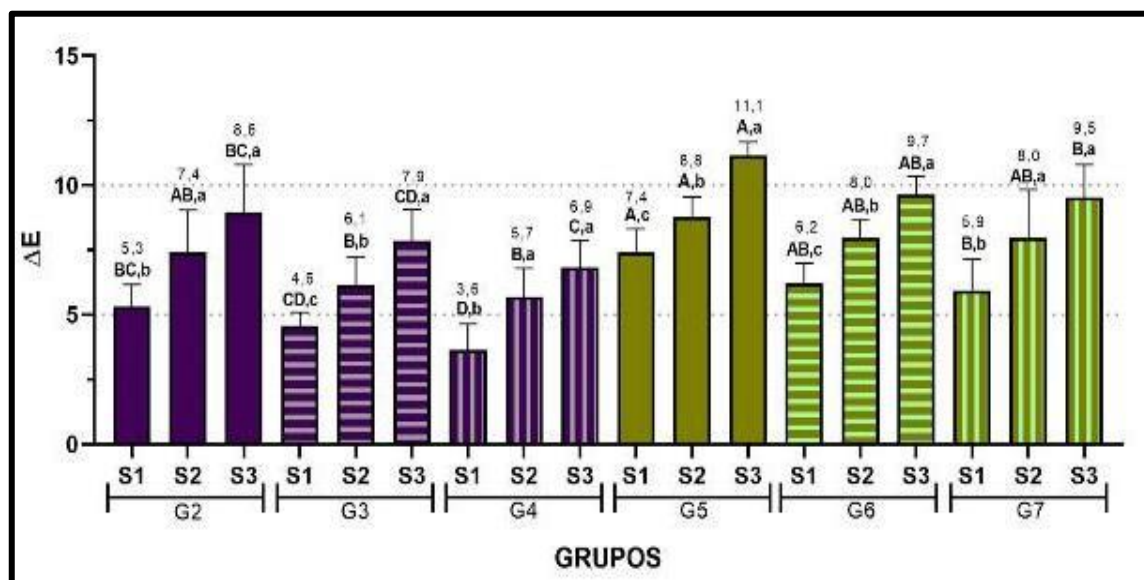
5.3 Etapa 3

5.3.1 Alteração de cor

Os dados referentes a alteração de cor, obtidos quando o gel clareador foi aplicado por diferentes períodos sobre o esmalte (grupos G2: 45 min; G3: 30 min; e G4: 15 min) ou sobre os produtos poliméricos usados para revestir previamente o esmalte (grupos G5, G6 e G7), estão apresentados na Figura 22. Os protocolos aqui avaliados foram aplicados por 3 vezes (S1, S2 e S3), simulando a realização de 3 sessões clínicas de clareamento (Figura 22).

De maneira geral, apesar da diminuição do tempo de aplicação do gel clareador com 35% de H_2O_2 diretamente sobre o esmalte (G2, G3 e G4) demonstrar tendência em prejudicar o resultado estético final dos protocolos avaliados, não foi observado diferença estatística entre os grupos, principalmente após a 2ª e 3ª sessões ($p>0,05$). A aplicação de ScP e PrP em associação com o gel clareador por 45 minutos (G5 - S3) determinou a melhor alteração de cor após a terceira sessão de clareamento em comparação aos demais grupos ($p<0,05$). Porém, foi interessante observar que após a terceira sessão de clareamento, realizada por 15 minutos e associando os produtos poliméricos com o gel clareador (G7 - S3), a alteração de cor alcançado foi semelhante àquele obtido pelo clareamento convencional (45 min) de consultório realizado por 3 sessões (G2 - S3) ($p>0,05$).

Figura 22 - Análise da alteração de cor



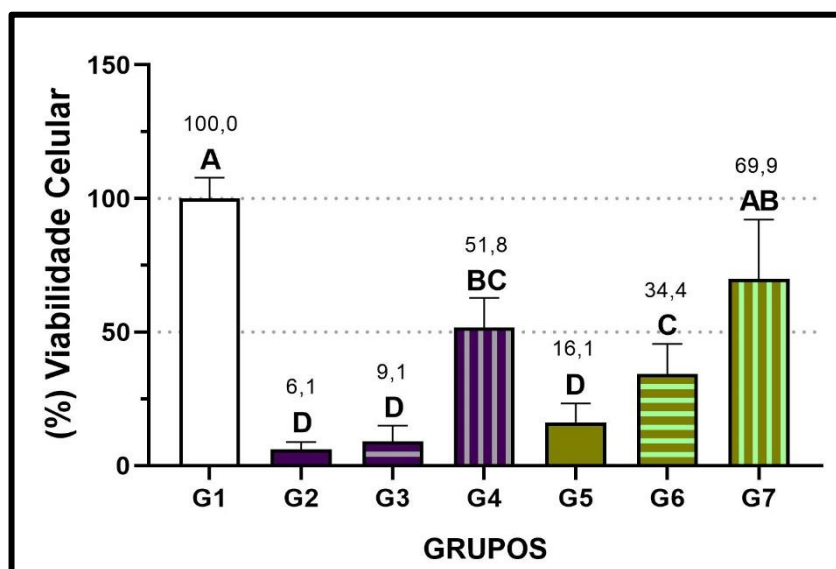
Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras maiúscula permitem comparação entre os grupos dentro de cada sessão de clareamento. Letras minúsculas permitem comparação entre as sessões clareadoras para cada grupo (n=8; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

Os dados de viabilidade celular, os quais refletem de maneira inversa a intensidade dos efeitos citotóxicos causados pelos tratamentos avaliados nesta etapa do estudo, estão demonstrados na Figura 23. A aplicação por 15 minutos do gel clareador sobre os bioprodutos poliméricos (ScP e PrP) que revestiam o esmalte dos discos de esmalte/dentina (G7), resultou em limitado efeito citotóxico trans-amelodentinário, o qual não diferiu do grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado e assim as células exibiam 100% de viabilidade. A maior redução de viabilidade celular ocorreu nos grupos G2 e G5, onde o gel clareador foi aplicado por 45 minutos sobre o esmalte previamente revestido ou não com os produtos poliméricos aplicados isoladamente. Os resultados desses grupos não diferiram entre si e nem com o grupo G3, quando o gel clareador foi aplicado diretamente sobre o esmalte por 30 minutos ($p>0,05$). Apesar do revestimento do esmalte com ScP e PrP não ter prevenido os efeitos citotóxicos da aplicação por 15 minutos do gel clareador, a viabilidade celular foi estatisticamente reduzida quando o grupo G4 foi comparado ao grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado ($p<0,05$).

Figura 23 - Análise da citotoxicidade celular

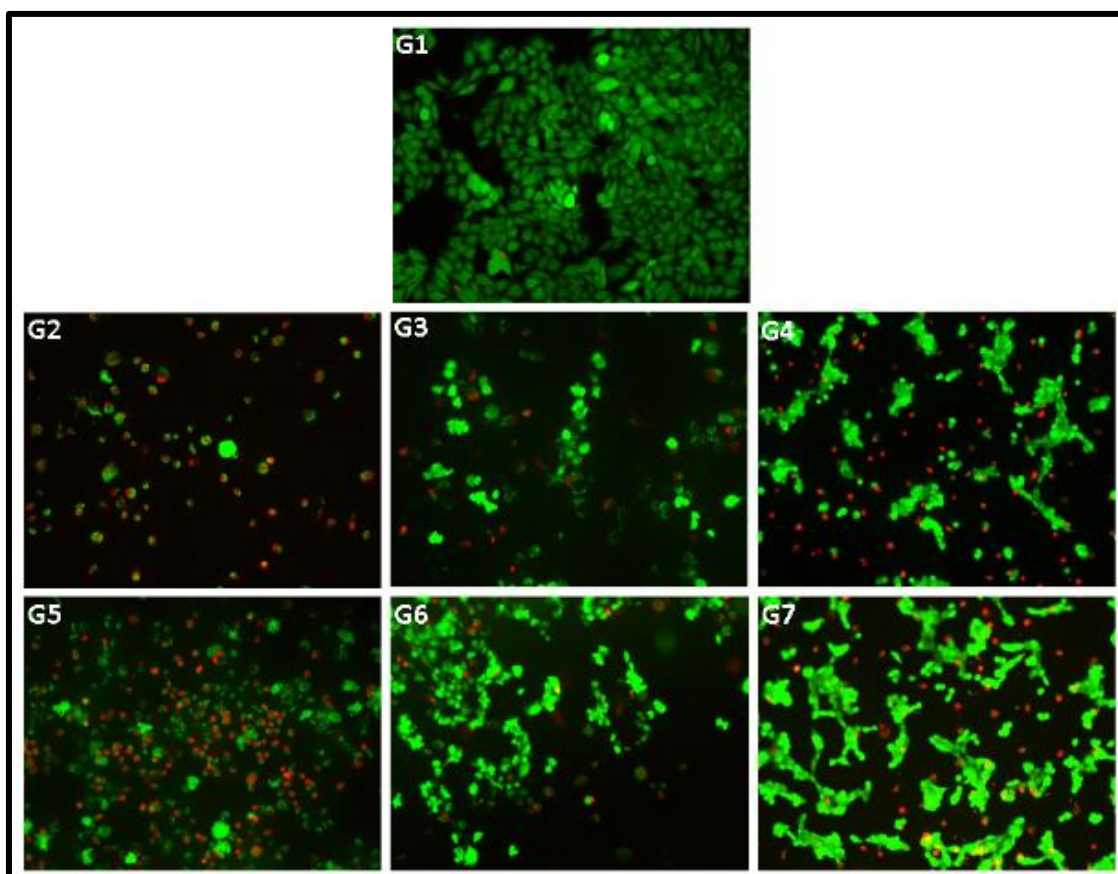


Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p<0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

As fotomicrografias obtidas pelo ensaio de live/dead para todos os grupos estão apresentadas na Figura 24. De maneira geral, células MDPC-23 lesadas, as quais aparecem marcadas positivamente com EthD-1 (vermelho) são observadas em todos os grupos onde foi realizado o clareamento (G2, G3, G4, G5, G6 e G7). Células viáveis marcadas apenas com Calcein AM (verde) são vistas no grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado. Quando o esmalte foi recoberto com ScP e PrP e o gel clareador aplicado por 15 minutos (G7) um maior número de células marcadas com Calcein AM se manteve aderido ao substrato, apesar de células lesadas marcadas positivamente com EthD-1 também tenham sido observadas nesse grupo. O menor número de células sobre o substrato, cuja marcação principal era com EthD-1, ocorreu no grupo G2, onde o gel clareador com 35% de H₂O₂ foi aplicado por 45 minutos (3x15 min) sobre o esmalte dentário.

Figura 24 - Imagens representativas do ensaio de live/dead para cada grupo (10x)

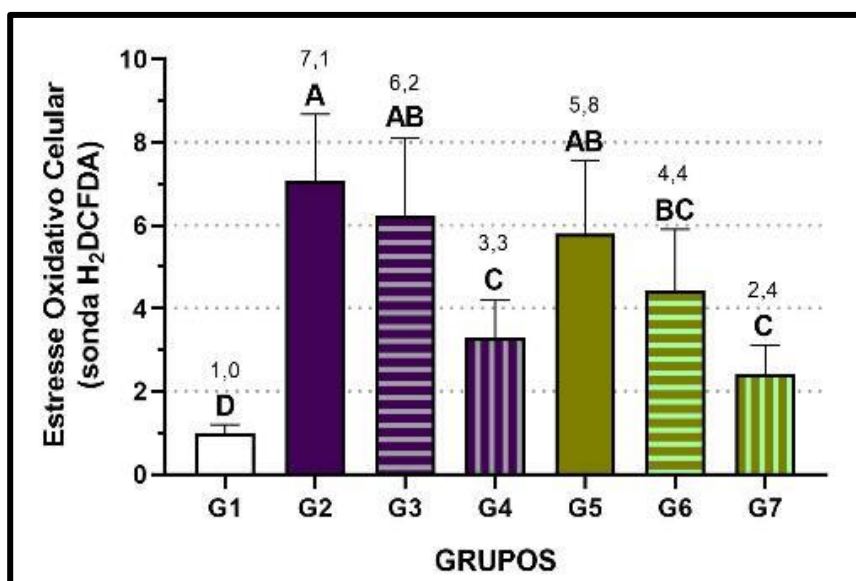


Marcação positiva para Calcein AM (verde), demonstra células com atividade de esterase citoplasmáticas, sendo que marcação positiva para Eth-1 (vermelho), demonstra células com lesão de membrana.

Fonte: Elaboração própria.

Os dados de estresse oxidativo celular, ocorrido em todos os grupos onde os protocolos de clareamento dental foram realizados por tempos diferentes, estão apresentados na Figura 25. De maneira geral, independente do revestimento ou não do esmalte com os bioprodutos poliméricos, a diminuição do tempo de aplicação do gel clareador determinou uma tendência de redução no estresse oxidativo causado pelo procedimento estético sobre as células pulpares em cultura. O menor índice de estresse oxidativo celular foi observado nos grupos G4 e G7, onde o gel clareador foi aplicado por 15 minutos diretamente sobre o esmalte ou sobre este tecido mineralizado previamente revestido com os produtos poliméricos, respectivamente. Apesar destes dois grupos não diferirem estatisticamente entre si ($p>0,05$), ambos foram superiores ao grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado sobre os discos de esmalte/dentina ($p<0,05$).

Figura 25 - Análise de estresse oxidativo

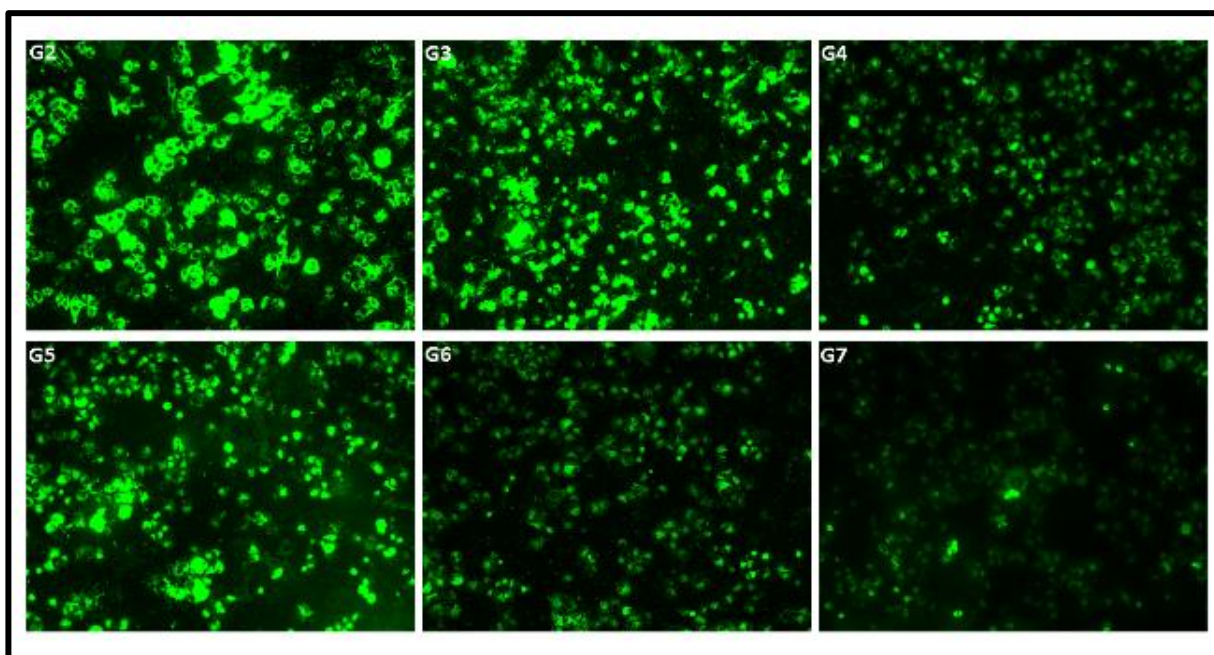


Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p<0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

As fotomicrografias que demonstram a intensidade do estresse oxidativo celular, determinado pela marcação das células com a sonda carboxy-H₂DCFDA, estão apresentadas na Figura 26. No grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado, as células MDPC-23 não apresentam marcação para estresse oxidativo. Desta maneira, a imagem representativa deste grupo controle não foi incluída no conjunto de fotomicrografias que compõem a Figura 26. Enquanto o maior nível de estresse oxidativo foi observado nas células pulpares expostas aos extratos obtidos após aplicação do gel clareador por 45 minutos diretamente sobre o esmalte (G2), o menor estresse celular ocorreu no grupo G7, quando o gel foi aplicado por 15 minutos sobre os bioprodutos poliméricos que revestiam o esmalte.

Figura 26 - Intensidade de estresse oxidativo



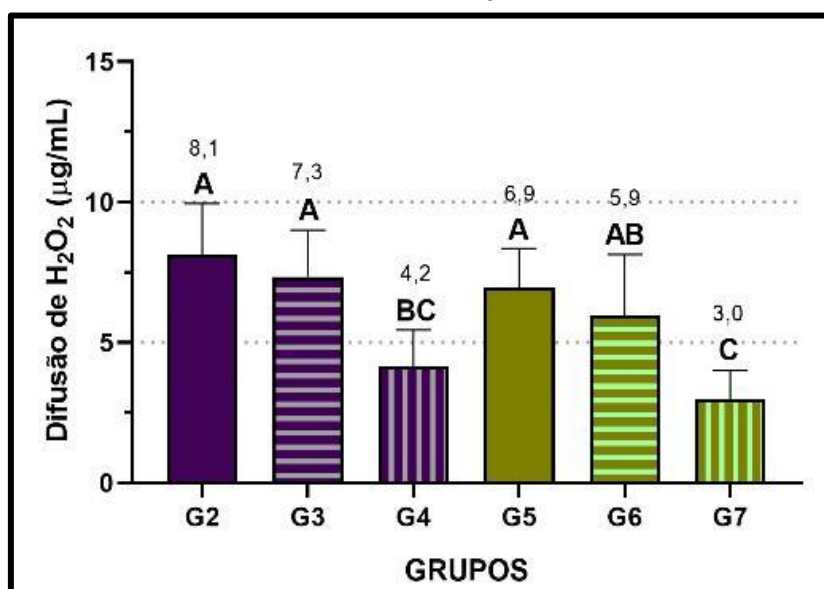
Imagens obtidas por microscópio de fluorescência de células MDPC-23 marcadas com sonda carboxy-H₂DCFDA (10x).

Fonte: Elaboração própria.

5.3.3 Quantificação da difusão trans-amelodentinária de H₂O₂

Os dados referentes a quantidade de H₂O₂ liberado do gel clareador e que conseguiu se difundir pelos discos de esmalte/dentina para alcançar o espaço pulpar das CPAs estão demonstrados na Figura 27. Desde que no grupo G1 não foi realizado qualquer tratamento sobre o esmalte, não era de se esperar a presença de H₂O₂ no extrato. Assim, o dado referente a este grupo foi excluído. A maior difusão de H₂O₂ aconteceu nos grupos G2 e G3, onde o gel clareador foi aplicado por 45 e 30 minutos, respectivamente, sobre o esmalte. De maneira geral, a diminuição do tempo de aplicação do gel clareador sobre o esmalte resultou em tendência de queda na quantidade de H₂O₂ capaz de se difundir pelos discos de esmalte/dentina, independente do uso ou não dos bioprodutos poliméricos. A menor difusão de H₂O₂ ocorreu no grupo G7, onde o gel clareador foi aplicado por 15 minutos sobre o ScP e PrP que revestiam o esmalte. Porém, não foi observado diferença estatística entre esse grupo G7 e G4, onde os produtos poliméricos não foram aplicados sobre o esmalte antes do uso do gel clareador ($p < 0,05$).

Figura 27 - Análise de quantificação da difusão de H₂O₂



Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Diversas metodologias in vitro têm sido empregadas para avaliar a difusão de componentes liberados de materiais odontológicos através dos tecidos mineralizados dos dentes, os quais podem causar efeitos citotóxicos indiretos para células pulpares. Especificamente para analisar os eventos causados por diferentes terapias clareadoras ou mesmo pela variação na quantidade de H_2O_2 nos géis clareadores e seu tempo de aplicação sobre o esmalte dentário, pesquisadores têm empregado dentes humanos extraídos^{37,96,97} ou então discos de esmalte/dentina bovinos^{1,14,98}. Cada metodologia usada tem seus pontos positivos e negativos.

Sabe-se que durante o envelhecimento ocorre um processo fisiológico caracterizado pela deposição de matriz de dentina secundária pelos odontoblastos, o que consequentemente reduz o volume da câmara pulpar e aumenta a espessura do tecido dentinário na região coronária e radicular^{94,99,100}. Murray et al.¹⁰¹ demonstraram que a espessura de dentina coronária aumenta cerca de 6,5 μm ao ano. Consequentemente, quanto maior a espessura de dentina, menor a translucidez dos dentes e também maior a possibilidade de acúmulo de moléculas orgânicas coloridas (cromóforos) neste tecido, fatores que contribuem para o escurecimento do elemento dental com o passar do tempo. Assim, desde que a espessura e pigmentação dos dentes pode influenciar a difusão de H_2O_2 pelos tecidos dentários e consequentemente os efeitos citotóxicos de terapias clareadoras^{1,6,57}, a difícil padronização de dentes humanos para uso em pesquisas in vitro e in vivo podem comprometer os resultados e serem importantes pontos de crítica, além da questão ética envolvida nesse tipo de estudo. Por outro lado, o uso de discos de esmalte/dentina obtidos de dentes de animais, tal como de bovinos, além de não envolver questões éticas (ANEXO A), permite a obtenção de um grande número de espécimes, os quais podem ser padronizados quanto a idade, coloração, diâmetro e espessura^{1,102,103}.

Os discos de esmalte/dentina podem ser usados para análise de alteração cromática após serem submetidos aos tratamentos clareadores propostos nos estudos⁷⁴ e ao mesmo tempo aos testes biológicos relacionados com a análise de difusão trans-amelodentinária de componentes liberados pelos produtos^{1,21}. Desta maneira, discos de esmalte/dentina padronizados permitem a análise comparativa

segura do resultado estético das terapias clareadoras experimentais, bem como seus efeitos sobre a morfologia, viabilidade e estresse oxidativo celular, além de outros testes laboratoriais complementares importantes^{10,12,21}. Por outro lado, o uso de discos obtidos de dentes bovinos pode ser criticado pelas possíveis variações estruturais e de composição em relação aos dentes humanos¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Dentro deste contexto, pesquisas comparativas foram realizadas para analisar a possível semelhança entre a dentina e esmalte de dentes humanos e bovinos¹⁰⁷⁻¹¹¹. Os autores demonstraram características morfológicas, histológicas e de radiodensidade semelhantes entre dentes humanos e bovinos, o que indicou que os dentes desses animais podem ser usados em estudos laboratoriais para simular dentes humanos. Desta forma, diversas pesquisas realizadas na última década, as quais tem como objetivo avaliar e relacionar a alteração de cor e os efeitos citotóxicos de terapias clareadoras, têm usado com sucesso discos de esmalte/dentina^{20,21,98,112}. Considerando os benefícios e as possíveis críticas que ainda geram controvérsia quanto ao uso de dentes de animais e humanos para realização de pesquisas com materiais dentários, no presente estudo foi utilizado discos de esmalte/dentina obtidos de dentes incisivos bovinos, os quais foram padronizados, tal como relatado em outros estudos, quanto ao diâmetro (5,6 mm) e espessura (2,3 mm)^{1,5}.

Desde que se sabe que a quantidade de pigmentos presentes nos dentes pode interferir na difusão de H_2O_2 pelo esmalte e dentina^{57,113}, os discos obtidos no presente estudo foram submetidos a um protocolo de manchamento em solução de chá-preto, o qual também foi usado em pesquisas anteriores^{57,113,114}. Com os discos de esmalte/dentina manchados e padronizados quanto ao diâmetro e espessura, na presente pesquisa o valor de ΔE de cada espécime foi determinado pelo sistema CIE $L^*a^*b^*$, com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação de 45/0°⁵. Este procedimento foi realizado devido ao fato de que variações na intensidade de pigmentação podem ocorrer entre os espécimes. Assim, os discos de esmalte/dentina com valores de L^* , a^* e b^* estatisticamente similares foram selecionados e distribuídos nos grupos experimentais e controles de acordo com o valor total de ΔE ^{5,21,46,57}. Com os grupos apresentando discos de esmalte/dentina padronizados quanto ao diâmetro, espessura e coloração, foi possível realizar e comparar, com segurança, as terapias clareadoras propostas nesse estudo.

Para a análise de citotoxicidade, os discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), as quais têm sido usadas há mais de uma década para realizar este tipo de teste indireto com o objetivo de simular, em laboratório, situações *in vivo*¹¹⁵. O uso deste protocolo, onde disco de esmalte/dentina é montado em CPA, possibilita a aplicação do gel clareador sobre a superfície do esmalte e a posterior quantificação do H_2O_2 capaz de se difundir pelos discos para alcançar o meio de cultura presente no espaço pulpar da CPA^{12,112}. Essa metodologia permitiu que os extratos (meio de cultura em contato com a dentina dos discos + componentes do gel clareador aplicado sobre o esmalte e que se difundiram pelo disco para alcançar o meio de cultura) obtidos no presente estudo fossem coletados e aplicados sobre células pulpares em cultura. A partir de então, foi possível determinar, para todos os grupos estabelecidos, a quantidade de H_2O_2 presente nos extratos e realizar, com segurança, todas as análises biológicas que caracterizaram a intensidade dos danos que essa molécula tóxica causou nas células. É importante ressaltar que o uso de CPAs em estudos de citotoxicidade pode fornecer resultados relevantes e reproduzíveis, pois este tipo de protocolo *in vitro*, o qual consegue mimetizar situações clínicas, permite standardizar os grupos e assim pode evitar a ocorrência de vieses metodológicos importantes^{21,94,95}.

Para tornar os dados mais significativos do ponto de vista clínico e atender aos objetivos específicos de cada estudo, células odontoblastóides, células mesenquimais indiferenciadas obtidas da polpa de dentes permanentes e decíduos ou até mesmo culturas primárias desses dentes (pool de células pulpares), tem sido usadas^{46,12,21}. Na presente pesquisa, a cultura imortalizada de células odontoblastóides MDPC-23 foi empregada para avaliação biológica dos protocolos de clareamento propostos, tal como realizado em estudos anteriores^{5,13,20}. Esse tipo celular foi selecionado para simular as condições fisiológicas e morfológicas dos dentes de mamíferos, onde odontoblastos se organizam em monocamada para revestir internamente a dentina^{116,117}. Assim, em decorrência de sua localização na polpa, os odontoblastos são as primeiras células dentro do amplo sistema pulpar, a entrarem em contato com componentes de materiais dentários capazes de se difundir através do esmalte e dentina^{94,95}. Consequentemente, o uso de discos de esmalte/dentina padronizados para avaliar e comparar novas terapias clareadoras e/ou diferentes propriedades de géis clareadores, sendo esses discos adaptados em

CPAs e os efeitos tóxicos trans-amelodentinário determinados sobre células pulpares, caracteriza um protocolo in vitro interessante e que pode fornecer dados científicos relevantes para a área do conhecimento^{10,94,95}. Seguindo esse raciocínio, essa metodologia, a qual está bem estabelecida e aceita na literatura, e é de domínio técnico dos pesquisadores envolvidos neste estudo, foi usada para avaliar os protocolos de clareamento inovadores menos tóxicos e que pudessem determinar resultados estéticos interessantes num tempo mais curto do que àquele empregado atualmente nos consultórios.

Antes de iniciar os testes de alteração cromática e de citotoxicidade, os quais são indispensáveis para analisar a influência dos novos bioprodutos poliméricos (um scaffold polimérico de nanofibras e um primer polimérico catalisador) quando aplicados sobre o esmalte dentário antes da realização do clareamento de consultório, algumas avaliações preliminares foram realizadas. Primeiramente, duas concentrações de uma solução estoque do policaprolactona (PCL, 12,5% e 15% m/v) foram eletrofiadas por diferentes períodos (30, 45 e 60 min) com objetivo de obter de scaffolds poliméricos de nanofibras (ScPs) que se adequassem a proposta de uso em conjunto com um gel clareador contendo elevada concentração de H₂O₂. A técnica de electrospinning é uma das mais amplamente utilizadas para produzir biomateriais com potencial para mimetizar a nano-morfologia estrutural⁸⁸. A avaliação da alteração de cor e morfologia dos ScPs determinou que a solução de 12,5% de PCL, eletrofiada por 45 minutos, apresentou os melhores resultados, sendo essa selecionada para os ensaios seguintes propostos neste estudo. Quanto ao primer polimérico catalisador (PrP), este foi preparado usando o hidroxipropil metilcelulose (HPMC) como polímero base, ao qual foi adicionada a enzima horseradish peroxidase (HRP). O PrP obtido foi avaliado quanto ao pH e temperatura imediatamente após sua preparação, e nos 15 minutos seguintes. O pH de cerca de 7,4, bem como a temperatura de aproximadamente 26,8°C se mantiveram estáveis durante os períodos de análise propostos. A temperatura foi avaliada devido ao fato de que uma possível reação exotérmica resultante da preparação do PrP pode gerar um aquecimento no dente, o qual, dependendo da intensidade, pode causar danos irreversíveis para as células pulpares^{118,119}. Num estudo in vivo clássico, o qual foi realizado em dentes de primatas, os autores demonstraram que uma temperatura superior à 42,6°C na polpa causa morte de odontoblastos¹²⁰.

Para realizar a presente pesquisa, estudos pilotos foram conduzidos na tentativa de obter diferentes formulações do PrP, sendo que em alguns produtos experimentais a reação exotérmica foi intensa, inclusive com ruptura da tampa do eppendorf. A estabilidade do pH do PrP durante sua aplicação sobre o esmalte e posterior contato com o gel clareador é importante, pois foi demonstrado na literatura que produtos clareadores com pH baixo causam danos à estrutura do esmalte, desmineralizando e aumentando a porosidade deste tecido, o que também favorecer a difusão do H_2O_2 para a polpa^{37,121,122}. A alcalinidade dos agentes clareadores atuais parece acelerar a reação do H_2O_2 quando esses entram em contato com o substrato orgânico, sendo que esta reação se torna mais rápida quando o pH variava entre 8,0 e 9,0^{120,123-125}. Assim, é possível sugerir que a alteração de cor satisfatório é diretamente proporcional ao pH do meio e do gel clareador. Então, após obter os produtos poliméricos (ScP e PrP) com propriedades que atendiam os requisitos para serem usados em conjunto com um gel clareador contendo elevada concentração de peróxido de hidrogênio (35% H_2O_2), a participação desses bioprodutos na cinética de degradação do H_2O_2 e a consequente geração de radicais-livres (RLs) e radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), foi avaliada. Para esse teste, os produtos poliméricos foram usados isoladamente para revestir o esmalte dos discos de esmalte/dentina antes da aplicação do gel clareador (35%+S ou 35%+P) ou foram testados em combinação (35%+S+P). O emprego das sondas carboxy- H_2DCFDA e HORAC determinou que a maior formação de RLs e $\text{HO}^\bullet$ aconteceu nos grupos 35%+P e 35%+S+P (Figuras 15 e 16). Esse resultado sugere que o PrP tem maior influência na cinética de degradação do H_2O_2 presente no gel clareador do que o ScP. Sabe-se que o H_2O_2 interage com compostos orgânicos, gerando outras moléculas altamente reativas^{58,126}. Assim, espera-se que os compostos orgânicos presentes nos polímeros PCL e HPMC, os quais foram usados para preparar ScP e PrP, respectivamente, tenham participado timidamente da degradação do H_2O_2 quando o gel clareador foi aplicado sobre eles. Porém, a enzima HRP, adicionada ao primer com o objetivo principal de catalisar o H_2O_2 e assim gerar outras moléculas com menor tempo de meia-vida e maior potencial oxidativo²⁷ parece ter sido o principal agente responsável pelos melhores resultados obtidos para o PrP em comparação ao ScP. Em estudo anterior, a constante produção de RLs e $\text{HO}^\bullet$ ocorreu quando HRP foi adicionada a um gel clareador de consultório, evidenciando que essa enzima tem papel fundamental na decomposição de H_2O_2 ⁵.

Acredita-se que o aumento da reatividade do H_2O_2 com componentes orgânicos do substrato dental possa limitar a difusão trans-amelodentinária desta molécula tóxica^{22,59}. No entanto, alguns estudos demonstraram que, independentemente do mecanismo de degradação do H_2O_2 , géis clareadores com elevadas concentrações desta EROs resulta em grande quantidade de H_2O_2 residual, a qual permanece livre (free- H_2O_2) nos tecidos duros dos dentes e com potencial para se difundir para causar toxicidade para células pulpares^{5,20,21}. Algumas enzimas, tal como a HRP, têm sido avaliadas como agentes catalisadores em géis clareadores^{5,21-23}, cujos objetivos são obter bons resultados estéticos em curto período de tempo e reduzir os danos pulpares comumente observados quando géis com elevada concentração de H_2O_2 são usados em terapias realizadas em consultório. Foi interessante observar na presente pesquisa, que as melhores alterações de cor ocorreram nos grupos 35%+S, 35%+P e 35%+S+P, onde o valor de ΔE aumentou significativamente em comparação ao grupo controle positivo (CP). A associação dos bioprodutos poliméricos (grupo 35%+S+P) determinou a melhor alteração de cor em comparação a todos os demais grupos (Figura 17). Essa importante alteração de cor pode ter sido causada pela intensa formação de $\text{HO}^\bullet$, a qual foi observada no grupo 35%+S+P em todos os períodos de análise (Figura 16). A formação de $\text{HO}^\bullet$ é desejada durante o clareamento, visto que essa EROs apresenta potencial oxidativo ($E^\circ = +2,8\text{V}$) superior ao H_2O_2 e reduzido tempo de meia-vida (10^{-9} segundos)^{27,52}. Assim, além da geração de $\text{HO}^\bullet$ possibilitar a ocorrência de maior oxidação de cromóforos orgânicos presentes dos dentes, esta molécula tende a se degradar rapidamente, prevenindo sua chegada no espaço pulpar¹⁰. Travassos et al.²² relataram aumento de 42% na eficácia clareadora quando a enzima peroxidase foi incorporada num gel com 35% de H_2O_2 . Maior alteração cromática também foi observado por Gopinath et al.²³ quando os autores realizaram clareamento dental com géis contendo catalase/peroxidase. Num estudo recente, Soares et al.²¹ demonstraram que um gel clareador com 35% de H_2O_2 ativado com HRP, aumentou em até 2 vezes a eficácia clareadora em comparação com um gel sem agente catalizador. Esses dados científicos, os quais corroboram em parte com os resultados da presente pesquisa, indicam que a catálise enzimática do H_2O_2 , gerando RLs e $\text{HO}^\bullet$ com elevado potencial oxidativo, intensifica a alteração cromática dos tecidos dentários (esmalte e dentina), favorecendo a alteração de cor do clareamento de consultório.

Do ponto de vista biológico, foi detectado que os grupos S, P e S+P não reduziram a viabilidade das células MDPC-23, tal como ocorreu no grupo CN (sem tratamento), determinando que os bioprodutos poliméricos não são citotóxicos (Figura 18). Quando o gel clareador foi aplicado sobre o ScP (grupo 35%+S) ou PrP (grupo 35%+P) usados isoladamente, a toxicidade do tratamento clareador não foi totalmente prevenida. Porém, quando os bioprodutos poliméricos foram combinados (grupo 35%+S+P), os efeitos nocivos desta terapia diminuíram significativamente e a intensidade do estresse oxidativo celular foi reduzido em aproximadamente 40%. Esses dados podem ser comprovados pela avaliação microscópica da morfologia das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro (Figura 19). Nos grupos CN, S, P e S+P, onde não foi realizado tratamento clareador, um grande número de células com morfologia poligonal e prolongamentos citoplasmáticos, foi observado sobre o substrato, o que confirmou que o ScP e PrP não são tóxicos para as células pulpares. Por outro lado, o intenso efeito citotóxico causado pelo protocolo tradicional de consultório (grupo CP) foi visualmente caracterizado pelo reduzido número de células MDPC-23 que permaneceu aderido nas lamínulas de vidro, o que indica a notável ocorrência de lesão e morte celular. As poucas células observadas neste grupo CP apresentavam contração do citoesqueleto, o que fazia com que elas exibissem tamanho reduzido e forma arredondada, bem como perda de seus prolongamentos citoplasmáticos (Figura 19). Porém, notável alteração morfológica e reduzido número de células aderidas ao substrato também ocorreu nos grupos 35%+S, 35%+P e 35%+S+P. Apenas esse último grupo, onde ambos produtos poliméricos (ScP e PrP) foram aplicados em associação sobre o esmalte antes do gel clareador, os efeitos negativos sobre as células pulpares foram menos intensos. Esse resultado talvez possa ser explicado, pelo menos em parte, pelo menor estresse oxidativo trans-amelodentinário observado nas células MDPC-23 quando ScP e PrP foram aplicados em conjunto sobre o esmalte, tal como demonstrado na Figura 20.

Apesar dos promissores resultados obtidos neste estudo quando os bioprodutos poliméricos foram usados para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador por 45 minutos, a difusão de trans-amelodentinária de H_2O_2 ainda permaneceu elevada, o que resultou em importante estresse oxidativo e consequentemente elevado efeito tóxico para as células da polpa. Efeitos citotóxicos sobre células com fenótipo de odontoblastos, também foram observados em estudos

prévios, quando os autores adicionaram catalisadores diretamente num gel clareador com 35% de H_2O_2 e aplicaram o produto sobre discos de esmalte/dentina^{5,20,21}. Diante do fato que mesmo no grupo 35%+S+P a viabilidade celular foi reduzida em aproximadamente 66%, foi proposto, neste estudo, a execução de uma terceira e última etapa, onde esse grupo, o qual caracterizou a estratégia mais promissora alcançada até aquele momento, seria estudada em tempos mais curtos. Assim, análises de alteração de cor, citotoxicidade em modelos de câmara pulpar artificial e quantificação de H_2O_2 difundido pelos discos de esmalte/dentina, foram realizadas após os períodos de 30 minutos (2x15 min) e 15 minutos de aplicação da estratégia clareadora. É importante ressaltar que os protocolos referentes ao grupo 35%+S+P, aplicados nos diferentes períodos propostos neste momento, foram avaliados em 3 sessões consecutivas (S1, S2 e S3; Figura 22). Essa metodologia favoreceu a obtenção de dados científicos mais amplos, favorecendo uma análise comparativa mais segura e linear entre os grupos após os diferentes tempos de tratamento.

De maneira geral, a alteração de cor nos discos de esmalte/dentina, a qual caracterizou o resultado estético alcançado para todos os grupos estudados, apresentou tendência a aumentar com o número de sessões realizadas. Os grupos G5, G6 e G7, onde o gel clareador foi aplicado por 45, 30 e 15 minutos, respectivamente, sobre os discos recobertos com ScP e PrP, apresentaram as melhores alteração de cor quando comparados a G2, onde o clareamento convencional de consultório foi realizado. Nesses grupos G5, G6 e G7, os valores de delta E foram aproximadamente 40%, 17% e 11% superiores ao G2, respectivamente (Figura 22). Este efeito pode estar associado principalmente ao ciclo catalítico do H_2O_2 mediado pela enzima HRP, o que resulta na formação de diversos radicais livres de elevado efeito oxidante^{81,82}, capazes de fragmentar as cadeias orgânicas longas dos cromóforos presentes nos dentes⁵⁷. Desse modo, o gel clareador com HRP conseguiu promover clareamento da estrutura dental acima do obtido com o gel tradicional. A redução no tempo de aplicação do gel clareador com 35% de H_2O_2 diretamente sobre o esmalte afetou negativamente a eficácia estética, tal como observado nos grupos G3 (2x15 min) e G4 (15 min). de Oliveira Duque et al.¹ também relataram a ocorrência desse padrão de alteração cromática, a qual está diretamente relacionada com o tempo dispendido para realizar o clareamento de consultório. Como esperado, a maior alteração cromática observada na presente pesquisa ocorreu em

G5, quando o gel clareador foi aplicado por 45 minutos sobre o esmalte previamente revestido com ScP e PrP. No entanto, a redução do tempo de aplicação do gel para 15 minutos (grupo G7) resultou em alteração cromática estatisticamente semelhante ao que se conseguiu com o clareamento convencional de consultório (G2) para todas as sessões realizadas. Num trabalho de pesquisa recente, Ortecho-Zuta et al.⁵ demonstraram que um gel clareador com 35% H₂O₂, ao qual foi adicionado 10 mg/mL de HRP aumentou em aproximadamente 24% a eficácia estética após a 1ª sessão clareadora (45 min), sendo que os valores de delta E foram aumentando significativamente até a 5ª sessão. Assim, a degradação do H₂O₂ realizada por meio de agentes catalizadores e o aumento do tempo de aplicação do gel clareador sobre o esmalte, têm papel fundamental na alteração cromática dos dentes, o que favorece a alteração de cor ^{10,20}.

Com relação à análise dos efeitos citotóxicos, a aplicação do gel clareador por 45 minutos sobre o esmalte, revestido (G5) ou não (G2) com ScP e PrP, causou significativa redução na viabilidade das células pulpares MDPC-23 quando comparado com o grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado (100% de viabilidade celular). Diversos estudos anteriores demonstraram que as estratégias de reduzir a concentração de H₂O₂ no gel clareador (17,5%), bem como o tempo de aplicação do gel de consultório sobre o esmalte (5 min) não causou significativo efeito citotóxico trans-amelodentinário^{10,11,13}. Porém, apesar desse resultado biológico positivo, os autores relataram que a eficácia estética alcançada era insatisfatória. Por outro lado, foi demonstrado na presente pesquisa que a aplicação do gel clareador com 35% de H₂O₂ por apenas 15 minutos, porém sobre o esmalte previamente revestido com os bioprodutos poliméricos (G7), resultou em limitado efeito citotóxico, o qual não diferiu estatisticamente do grupo G1 (Figura 23). Assim, além de causar uma ótima alteração de cor, semelhante àquele obtido pelo clareamento convencional de consultório, a aplicação do gel com 35% de H₂O₂ por 15 minutos sobre o esmalte previamente recoberto com ScP e PrP (G7) não causou significativa toxicidade sobre as células pulpares MDPC-23. Esse importante resultado de viabilidade celular foi corroborado pelo ensaio de live/dead (Figura 24), onde foi observado que entre todos os grupos onde foi realizado o clareamento, o G7 foi àquele que exibiu o maior número de células marcadas com Calcein AM (verde). Por outro lado, o maior número de células MDPC-23 marcadas positivamente com a sonda EthD-1 (vermelho), a qual se liga ao DNA

das células com a membrana rompida, foi observado em G2. Esse interessante resultado demonstra, tal como relatado em outros estudos^{5,57}, que ao entrar em contato com células, o H_2O_2 causa peroxidação lipídica das membranas devido a sua concentração e seu potencial oxidativo superar a atividade antioxidante intrínseca das células^{127,128}. A elevada concentração de free- H_2O_2 liberado do gel clareador de consultório usado na presente pesquisa e que conseguiu se difundir pelo esmalte e dentina para alcançar o espaço pulpar, também foi demonstrado por outros pesquisadores^{1,13,12,57}. Nesses estudos prévios, assim como na presente pesquisa, foi comprovado, através do emprego da sonda carboxy- H_2DCFDA (Figuras 25 e 26), que as células expostas aos extratos obtidos dos grupos G2, G3, G4, G5, G6 e G7 estavam em condição de estresse oxidativo. Enquanto os maiores níveis de estresse oxidativo celular ocorreram nos períodos mais longos (45 e 30 min) de aplicação do gel clareador sobre o esmalte (G2, G3, G5 e G6), os menores valores foram observados nos grupos G4 e G7 (15 min), onde também foi detectado a menor quantidade de free- H_2O_2 nos extratos (Figura 27). Apesar de G4 e G7 não diferirem estatisticamente, este último grupo apresentou tendência a exibir sempre os melhores resultados estéticos e causar os menores danos celulares. Num estudo desenvolvido por Soares et al.¹¹, foi relatado que a aplicação por 15 minutos de um gel clareador com 35% de H_2O_2 sobre o esmalte, resultou na penetração de cerca de 4,8 $\mu\text{g/mL}$ dessa molécula na câmara pulpar. Os autores demonstraram que essa concentração de H_2O_2 não foi suficiente para causar significativa redução no metabolismo de células pulpares em cultura. Na presente pesquisa, o mesmo procedimento clareador, porém com o gel aplicado sobre o esmalte previamente recoberto com ScP e PrP (G7), causou acúmulo de 3 $\mu\text{g/mL}$ de H_2O_2 na câmara pulpar. Assim, essa baixa concentração de H_2O_2 no extrato resultou em discreta redução da viabilidade celular, a qual não diferiu do grupo G1, onde nenhum tratamento foi realizado.

Já está bem estabelecido na literatura que em condições in vivo, particularmente em dentes vitais de mamíferos, existe a pressão de exsudação do fluído dentinário, sendo que no interior dos túbulos deste tecido mineralizado permeável são encontrados prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, colágeno e outras estruturas¹¹⁶, os quais podem interferir na difusão de componentes liberados de materiais odontológicos⁹⁴. Além de uma matriz extracelular complexa, a polpa vital também apresenta diferentes tipos celulares, bem como uma ampla rede

vascular e nervosa, o que faz com que este tecido possa responder às agressões e traumas por meio de inflamação e deposição de matriz mineralizada^{116,117}. Essa estrutura definida e organizada do tecido conjuntivo pulpar lhe confere um elevado potencial intrínseco de regeneração, o que não acontece em situações laboratoriais onde apenas células em cultura são expostas à diferentes tipos de agressões⁹⁴. Dessa maneira, pesquisas in vitro apresentam certas limitações, as quais fazem com que resultados obtidos deste tipo específico de estudo não possam ser diretamente extrapolados para situações clínicas^{94,95}. Porém, os resultados obtidos nesta pesquisa in vitro são originais e promissores, sendo que poderão auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e estratégias de clareamento dental inovadoras, os quais certamente contribuirão para o avanço no campo da Odontologia Estética.

7 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A

Comprovante do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOAr/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

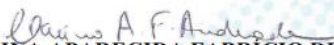


FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Declaração

De acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), RESOLUÇÃO NORMATIVA N 30, DE 2 DE FEVEREIRO DE 2016, que baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA, seção VI -RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES, item 6.1.10, quando o material não for oriundo de uma atividade de ensino ou de pesquisa científica, por exemplo, cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo, a responsabilidade para atender a necessidade de obtenção e manutenção da documentação que evidencie a origem do material de forma inequívoca é do responsável pela atividade, compartilhada por sua equipe, nunca da CEUA institucional. Assim sendo, de acordo com a legislação vigente no Brasil, os projetos de pesquisa que venham a utilizar dentes, ossos e/ou outras partes de bovinos oriundos de abate do animal como rotina da atividade de frigoríficos, não necessitam de análise e avaliação pela CEUA Institucional.

Araraquara, 03 de março de 2021.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 01/06/2023

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 01 de junho de 2021.

Uxua Ortecho Zuta