



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



Marlon Ferreira Dias

**Influência de um primer catalisador sobre a eficácia estética, cinética de
degradação e toxicidade de géis clareadores**

Araraquara

2022



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



Marlon Ferreira Dias

**Influência de um primer catalisador sobre a eficácia estética, cinética de
degradação e toxicidade de géis clareadores**

Dissertação apresentada ao programa de Odontologia – Área de Reabilitação Oral, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral.

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2022

D541i Dias, Marlon Ferreira
 Influência de um primer catalisador sobre a eficácia estética,
 cinética de degradação e toxicidade de géis clareadores / Marlon
 Ferreira Dias. -- Araraquara, 2022
 64 p.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
 Faculdade de Odontologia, Araraquara
 Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

 1. Clareamento Dental. 2. 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.

Marlon Ferreira Dias

**Influência de um primer catalisador sobre a eficácia estética, cinética de
degradação e toxicidade de géis clareadores**

Comissão julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – Área de Reabilitação
Oral**

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

2° Examinador: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge

3° Examinador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Cavalli Gobbo

Araraquara, 24 de Março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Marlon Ferreira Dias

NASCIMENTO	01/10/1997 – Recife Pernambuco
FILIAÇÃO	Marcos Antônio Domingos Dias Marli Ferreira da Cruz
2013-2014	Intercâmbio High-School pela Somerset Christian School (Kentucky, USA).
2015-2019	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Bolsa PIBIC (2018-2019). Presidente da Liga Acadêmica de Dentística (2019).
2021	Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade Odontologia de Araraquara (FOAr).
2020-2022	Mestrado em andamento em Odontologia – Área de Reabilitação Oral pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade Odontologia de Araraquara (FOAr). Bolsa CAPES (Programa de Excelência Acadêmica – Proex); Bolsa FAPESP #2020/08882-6.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	08
Artigos aceitos para publicação.....	02
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	20
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	42

Eventos

Participações em evento	23
Organização de evento	06

<u>Prêmios</u>	08
----------------------	----

Outras informações relevantes

Aprovação em 2º lugar no Exame de Seleção do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, curso de Mestrado, da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP.

Menção Honrosa pelo excelente desempenho escolar nos 3 anos do ensino médio pela Escola Técnica Estadual Professor Agamenon Magalhães (ETEPAM, Recife, Pernambuco)

Aprovação no Programa Ganhe o Mundo (PGM) do Governo do Estado de Pernambuco (PE), sendo contemplado com um Intercâmbio High School (USA) pelo excelente desempenho no ensino médio.

À minha mãe, Marli,

por todo o apoio, amor, carinho e cuidado durante minha vida pessoal e profissional. Mainha, a conclusão desta etapa da minha vida é resultado de todo o seu esforço, garra e determinação em me criar da melhor forma que a senhora poderia. Sem sombra de dúvidas, sem a senhora nada disso seria possível. Lembro de cada sacrifício feito por você e painho para permitir sempre que meu irmão e eu tivéssemos acesso a uma educação de qualidade mesmo sem tantos recursos financeiros. Sou e sempre serei eternamente grato por ter a senhora como Mãe e amiga. Te amo muito, Mainha! Sempre estarei ao seu lado.

Ao meu pai, Marcos,

por todo o apoio, amor, carinho e cuidado durante minha vida pessoal e profissional. Painho, o senhor sempre será exemplo de coragem, garra e força para mim. Agradeço por todo o suporte que o senhor me deu durante toda a minha vida. Por sempre querer o melhor para mim e para ico, nos dando educação, sabedoria e sempre nos ensinando a fazer o bem. O senhor foi essencial para que eu chegasse até aqui. Te amo, painho!

Ao meu irmão, Marcos (ico),

Ico, você sempre foi um exemplo pra mim em tudo. Lembro das vezes que pensei em desistir da graduação e você sempre me incentivou a dar meu máximo e conseguir uma vaga em uma universidade pública. Você me ajudou, e eu consegui! Foi assim em todos os desafios que tive na vida, você sempre confiou no meu potencial, muito obrigado pela força, Ico. Obrigado por todo companheirismo, amizade e união, tenho muito orgulho em ser seu irmão. Te amo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por ter aceitado me orientar e por me receber no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB). Professor, o senhor é um exemplo de pesquisador para mim, sempre honesto e comprometido em realizar pesquisas de qualidade e relevantes, o senhor é motivo de orgulho para todos da área da Odontologia. Obrigado por todo o apoio, dedicação e esforço dedicados nesse tempo que fui membro do LPEB. Sempre serei grato e orgulhoso por ter tido a honra em ter sido seu orientado. Obrigado, Professor.

À **Profª. Drª. Josimeri Hebling**, por toda a contribuição feita neste trabalho. Professora, não posso deixar de agradecer, também, por todo incentivo dado nas apresentações em congresso, por todas as mensagens de carinho recebidas por mim. Durante a pós-graduação, também tive a honra em ser seu aluno, o que me fez admirar ainda mais a senhora pela excelência do seu material didático e por toda a atenção, cuidado e maestria em ensinar. Aprendi muito com suas aulas e atividades passadas em aula. Muito obrigado por tudo, Professora. A senhora é um exemplo para mim.

À **Profª. Drª. Hilcia Mezzalira Teixeira** por ter despertado em mim o interesse em ingressar na pós-graduação, por todo o apoio durante a graduação nas monitorias de Dentística e Materiais Dentários e por toda confiança depositada em mim quando tentei a seleção de mestrado na UNESP-FOAr. Obrigado por tudo, Professora! sem o seu incentivo para que eu tentasse a seleção de Mestrado, eu não teria vivenciado tantas experiências aqui em Araraquara-SP, as quais me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. Serei sempre grato à senhora. Muito obrigado.

À **Profª. Drª. Renata Pedrosa Guimarães** por ter sido tão presente não só durante a minha graduação através monitorias, projetos de extensão, orientação de pesquisas, como também durante o Mestrado onde pude contribuir em trabalhos

acadêmicos mesmo a distância. Professora, muito obrigado pelos conselhos e oportunidades que a senhora me deu durante toda a minha jornada acadêmica, a senhora é um exemplo pra mim e sempre será lembrada com muito carinho e admiração.

À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso**, por todas as contribuições prestadas durante o desenvolvimento da minha pesquisa. Obrigado pela disponibilidade e conhecimento compartilhado.

À **Fernanda Ali Kitagawa**, pela amizade construída durante esse período do Mestrado. Fer, você foi uma pessoa essencial para que eu conseguisse levar o Mestrado de forma mais leve, obrigado por todas as risadas, viagens, saídas, conselhos, companheirismo e carinho. Obrigado por ter sido tão amiga nas horas mais difíceis, por ter estendido a mão quando precisei e por ter compartilhado momentos especiais que levarei comigo pra sempre. Amo você!

Aos meus amigos, **Daiviane Mota, Heloísa Tavares, Jefferson Miguel, José Monteiro, Yan Jacinto, Brenda Francisca, Bergson Carvalho, Amanda Cardona e Bianca Teles**, por ter me ajudado com palavras de apoio, incentivo e conselhos mesmo à distância. Muito obrigado pela disponibilidade quando precisei de vocês. Amo todos!

À **Beatriz Ribas e Beatriz Voss** por toda a convivência diária durante o Mestrado, dividir essa etapa da minha vida com vocês com certeza tornou tudo mais leve. Obrigado por todos os momentos bons e ruins, desabafos, apoio e companheirismo durante essa jornada. Carrego vocês no coração.

Aos **membros e amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, Igor Soares, Rafael Ribeiro, Caroline Anselmi, Isabela Souza, Maria Luísa, Uxua Zuta, Laís Cardoso, Taisa Pansani e Larissa Mioto. Muito obrigado por toda a disponibilidade e apoio durante todo o Mestrado. Admiro todos vocês, tenho certeza que serão pesquisadores de excelência.

Aos **amigos do Mestrado em Odontologia** da FOAr-UNESP, Amanda Ferro, Hamile Viotto, Nathália Fusco por todas as conversas e momentos alegres ao longo do Mestrado, tornando esse tempo mais leve e feliz. Obrigado pelo apoio e torcida sempre.

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/08882-6) pelo apoio financeiro voltado para realização dessa pesquisa.

DIAS MF. Influência de um primer catalisador sobre a eficácia estética, cinética de degradação e toxicidade de géis clareadores [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Alguns agentes catalisadores atuam diretamente na degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que pode favorecer o resultado estético e reduzir a citotoxicidade causada pelo clareamento dental de consultório (CDC). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia clareadora (EC), cinética de degradação (CD) e citotoxicidade trans-amelodentinária (CT) de géis clareadores com diferentes concentrações de H_2O_2 , aplicados sobre esmalte previamente revestido ou não com um primer polimérico contendo 10 mg/mL de óxido de manganês (PPC). Para isso, os seguintes grupos foram estabelecidos: G1: Sem tratamento (controle negativo); G2: PPC; G3: 10% H_2O_2 ; G4: PPC+10% H_2O_2 ; G5: 20% H_2O_2 ; G6: PPC+20% H_2O_2 ; G7: 35% H_2O_2 ; G8: PPC+35% H_2O_2 ; G9: 35% H_2O_2 comercial (clareamento convencional de consultório, controle positivo); G10: PPC+35% H_2O_2 comercial. Para determinar a EE (espectrofotômetro de reflexão-UV, sistema CIE $L^*a^*b^*$, ΔE_{00} e ΔWI), discos padronizados de esmalte/dentina (DE/D) foram manchados e as terapias clareadoras realizadas por 1 sessão de 45 minutos. Após esta etapa, foi avaliada a produção de radicais hidroxila (OH^* , sonda fluorescente HORAC). DE/D manchados também foram adaptados em câmaras pulpares artificiais e submetidos aos mesmos procedimentos clareadores. Então, os extratos (meio de cultura + componentes dos géis que se difundiram pelos DE/D) foram coletados e aplicados sobre células odontoblastóides MDPC-23, as quais foram avaliadas quanto a viabilidade (alamarBlue), estresse oxidativo (EOx, sonda carboxy- H_2DCFDA) e morfologia (MEV). O total de H_2O_2 difundido pelos discos também foi quantificado (violeta leuco-cristal/peroxidase). Os dados coletados foram submetidos aos testes Two-Way ANOVA, Tukey e t-student pareado, com nível de significância de 5%. Os maiores valores de ΔE_{00} e ΔWI foram observados em todos os grupos onde o PPC foi usado quando comparados aos grupos sem PPC ($p < 0,05$). Porém, a EC foi estatisticamente semelhante entre G4, G6, G7 e G9 ($p > 0,05$). A maior produção de radicais OH^* ocorreu em todos os grupos onde géis clareadores foram associados ao PPC (G4, G6, G8 e G10), em comparação aos seus respectivos grupos (G3, G5, G7 e G9; $p < 0,05$). PPC aplicado isoladamente sobre o esmalte (G2) não causou qualquer CT. Os maiores valores de viabilidade celular e menores índices de EOx ocorreram nos grupos G4, G6 e G8. Desse modo, conclui-se que a aplicação do gel clareador com 10% de H_2O_2 (G4) por 45 minutos sobre o esmalte recoberto com PPC, além de promover excelente resultado estético, tal como aquele alcançado com o CDC, também minimiza os efeitos citotóxicos causados por esta terapia profissional.

Palavras-Chave: Clareamento Dental. Toxicidade. Odontoblastos.

DIAS MF. Influence of a catalytic primer on the aesthetic effectiveness, degradation kinetics and toxicity of bleaching gels [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Some catalytic agents act directly on the degradation of hydrogen peroxide (H_2O_2), that may improve the aesthetic result and reduce the cytotoxicity caused by in-office tooth bleaching therapy (I-OTBT). Thus, the aim of this study was to assess the bleaching efficacy (BE), degradation kinetics (DK) and trans-amelodentinal cytotoxicity (TC) of bleaching gels with different concentrations of H_2O_2 , applied on enamel previously covered or not with a polymeric primer containing 10 mg/mL of manganese oxide (PPC). For this purpose, the following groups were set: G1: no treatment (negative control); G2: PPC; G3: 10% H_2O_2 ; G4: PPC+10% H_2O_2 ; G5: 20% H_2O_2 ; G6: PPC+20% H_2O_2 ; G7: 35% H_2O_2 ; G8: PPC+35% H_2O_2 ; G9: 35% H_2O_2 commercial (in-office tooth bleaching, positive control); G10: PPC+35% H_2O_2 commercial. To determine the AE (UV reflection spectrophotometer, CIE L * a * b * system, ΔE_{00} and ΔWI), standardized enamel/dentin discs (ED/D) were stained and then bleached for a session of 45 minutes. After this stage, the production of hydroxyl radicals (OH^\bullet , HORAC fluorescent probe) was evaluated. Stained ED/D were also adapted to artificial pulp chambers and the enamel treated or not according to the established groups. The extracts (culture medium + components of the gels that diffused through the ED/D) were collected and applied to odontoblast-like MDPC-23 cells, which were evaluated concerning their viability (alamarBlue), oxidative stress (EOx, carboxy-H2DCFDA probe) and morphology (SEM). The quantity of H_2O_2 diffused through the ED/D was also determined (leuco-crystal violet/peroxidase). The data were submitted to two-way ANOVA, Tukey test and t-student paired at a significance level of 5%. Groups in which enamel was covered with PPC before application of the bleaching gels exhibited higher ΔE_{00} and ΔWI in comparison with those groups in which PPC was not used ($p < 0.05$). However, G4, G6, G7, and G9 presented similar BE ($p > 0.05$). G4, G6, G8 and G10 showed the highest production of OH^\bullet in comparison with those groups in which PPC was not employed (G3, G5, G7, and G9; $p < 0.05$). PPC applied solely on enamel (G2) did not cause TC. The highest cell viability and lowest EOx occurred in G4, G6, and G8. Therefore, one can conclude that the application of a bleaching gel with 10% H_2O_2 for 45 minutes on enamel recovered with PPC (G4) achieves the BE similar to the I-OTBT, as well as reduces the cytotoxic effects caused by this professional therapy.

Keywords: Tooth bleaching. Toxicity. Odontoblasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	PROPOSIÇÃO	15
2.1	Objetivos Específicos.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4	MATERIAL E MÉTODO	22
4.1	Estudo 1: Avaliação da Eficácia Clareadora de Géis com Diferentes Concentrações de H₂O₂ Aplicados Sobre Esmalte Revestido ou Não com Um Primer Polimérico Contendo 10 Mg/mL de Mno (PPC), e Análise da Cinética de Degradação do H₂O₂.....	22
4.1.1	Formulação dos géis clareadores experimentais	22
4.1.2	Formulação do primer polimérico catalisador (PPC)	22
4.1.3	Obtenção dos discos de esmalte e dentina.....	23
4.1.4	Padronização da cor inicial dos discos	24
4.1.5	Avaliação da eficácia clareadora.....	25
4.1.6	Geração de OH[*] a partir da decomposição do H₂O₂ dos géis clareadores	28
4.2	Estudo 2: Avaliação da Citotoxicidade Trans-Amelodentinária das Novas Formulações para Clareamento Dental e da Quantidade de free- H₂O₂ Capaz de Alcançar o Espaço Pulpar	28
4.2.1	Cultura de células Odontoblastóides MDPC-23	28
4.2.2	Obtenção dos espécimes.....	29
4.2.3	Procedimento experimental	29
4.2.4	Citotoxicidade trans-amelodentinária (viabilidade celular; alamar Blue)	30
4.2.5	Quantificação de free-H₂O₂ presente nos extratos	30
4.2.6	Análise do estresse oxidativo (EOx) celular.....	31
4.2.7	Avaliação da morfologia das células MDPC-23 (MEV).....	31
4.3	Forma de Análise dos Resultados	32

5	RESULTADOS	33
5.1	Eficácia Clareadora	33
5.2	Geração de OH[•] a partir da Decomposição do H₂O₂ dos Géis Clareadores.....	36
5.3	Citotoxicidade Trans-amelodentinária.....	38
5.4	Quantidade de H₂O₂ nos Extratos e EOx Celular	39
5.5	Morfologia Celular (MEV)	41
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos procedimentos estéticos empregados na Odontologia, o clareamento dental destaca-se como uma terapia conservadora que atinge resultados satisfatórios em curtos intervalos de tempo¹. O efeito clareador obtido por este tipo de tratamento acontece como resultado da oxidação de componentes orgânicos coloridos (cromóforos) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e/ou outras formas reativas de oxigênio presentes nos géis². Assim, o clareamento dental de consultório, no qual são utilizados géis com elevadas concentrações de H_2O_2 , tornou-se uma excelente alternativa para profissionais e pacientes^{3,4}. No entanto, a principal desvantagem deste tipo de terapia profissional é a sensibilidade dentária (SD), a qual tem sido amplamente relatada pela maioria dos pacientes submetidos a este tipo de tratamento⁵⁻⁸.

Já foi demonstrado que ao penetrar nos tecidos duros dos dentes, o H_2O_2 e seus derivados podem atingir rapidamente a câmara pulpar e causar a liberação de mediadores inflamatórios por células pulpares^{9,10}. A elevada concentração destas moléculas reativas tóxicas no espaço pulpar reduz a viabilidade celular¹¹⁻¹⁴ e causa estresse oxidativo associado a lesão da membrana citoplasmática das células^{12,13}. Alguns estudos realizados em dentes humanos demonstraram que géis clareadores com elevadas concentrações de H_2O_2 podem causar intenso dano pulpar, caracterizado por áreas de necrose da porção coronária e de inflamação no tecido adjacente¹⁵⁻¹⁷. Estes efeitos negativos decorrentes do clareamento dental de consultório poderiam explicar, pelo menos em parte, a SD pós-operatória relatada por pacientes submetidos a este tipo de procedimento^{16,18}.

De Oliveira Duque et al.¹³ (2017) relataram que a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 não reagido com cromóforos presentes nas estruturas dentárias (free- H_2O_2) pode ser influenciada pela concentração dessa molécula adicionada no produto, pela espessura do esmalte/dentina do dente a ser clareado, bem como pelo tempo de aplicação do gel clareador. A partir disso, muitos pesquisadores têm procurado desenvolver e avaliar novas estratégias que possam reduzir a concentração de free- H_2O_2 com o objetivo de direcionar protocolos inovadores de clareamento dental mais seguros e eficazes^{13,19,20}.

Dentre as espécies químicas geradas a partir do contato da molécula de H_2O_2 com o elemento dentário, o radical hidroxila (OH^*) é aquele que apresenta o maior

potencial de oxidação ($E^{\circ} = +2,8V$). Essa característica intrínseca do OH^{\bullet} faz com que ele consiga interagir e degradar rapidamente compostos orgânicos coloridos, os quais determinam a cor dos elementos dentários^{21,22}. Dentro desse contexto, estudos prévios demonstraram que a associação de agentes catalisadores ao gel clareador aumenta a decomposição do H_2O_2 , favorecendo a geração de OH^{\bullet} ^{11,23,24}. Assim, resultados estéticos interessantes passaram a ser obtidos^{11,23,25}, sendo que esta estratégia se tornou uma boa alternativa para otimizar a degradação do H_2O_2 e consequentemente diminuir a difusão de elevada concentração dessa molécula tóxica para o tecido pulpar.

Entre os diversos compostos químicos comumente avaliados e usados para realizar a catálise do H_2O_2 , o óxido de manganês (MnO) se destaca pela efetividade e reduzido custo²⁶. Levando em consideração o fato de que o MnO pode ser associado a terapias clareadoras de diversas formas, tornou-se interessante tentar incorporar este óxido metálico num primer. Esse bioproduto catalisador seria usado para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador. Para preparar esse primer, seria usado o hidroxipropil metilcelulose (HPMC), um polímero semi-sintético derivado da celulose, o qual é biodegradável, biocompatível e atóxico. Já foi demonstrado que o bioproduto preparado com HPMC é hidrófilo, e que ele tem sido amplamente empregado na indústria farmacêutica para liberação controlada de fármacos²⁷⁻²⁹.

Levando em consideração os dados científicos disponíveis na literatura com relação ao uso seguro do HPMC, bem como as diversas possibilidades de empregar o MnO como agente catalisador do H_2O_2 , o objetivo deste estudo foi desenvolver um primer polimérico catalisador (PPC) para ser usado no recobrimento do esmalte previamente à aplicação do gel clareador. Esse PPC poderá atuar como uma barreira protetora semi-permeável com potencial para reduzir a citotoxicidade trans-amelodentinária e aumentar a eficácia estética da terapia clareadora realizada no consultório.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste projeto foi avaliar se a aplicação de um primer polimérico contendo 10 mg/mL de MnO (PPC) sobre o esmalte, previamente à realização do clareamento dental, poderia influenciar a eficácia estética, cinética de degradação do H₂O₂ e os possíveis efeitos citotóxicos deste tipo de terapia profissional.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a influência de um PPC experimental sobre a quantidade de OH• gerado a partir da decomposição do H₂O₂, bem como determinar, por meio do sistema CIE L*a*b (espectrofotometria de reflexão UV – CIEDE 2000 (ΔE_{00}), índice de clareamento (ΔWI), índice de perceptibilidade e aceitabilidade [50%:50%]), a eficácia estética de géis clareadores contendo 10%, 20% e 35% de H₂O₂ aplicados sobre esmalte previamente recoberto ou não com um PPC;

Analisar os efeitos de um PPC experimental sobre quantidade de free- H₂O₂ capaz de alcançar o espaço pulpar, bem como determinar, em cultura de células odontoblastóides MDPC-23, a possível toxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H₂O₂, aplicados sobre esmalte previamente recoberto ou não com PPC.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O aumento da procura por procedimentos estéticos redirecionou a Odontologia para a busca de tratamentos cada vez mais eficazes e minimamente invasivos, sendo o clareamento dental destaque nessa área. A utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principal agente ativo dos géis clareadores, já foi relatada no tratamento de doenças periodontais^{30,31}. Porém, sua ação na alteração cromática de estruturas dentárias foi descrita apenas no final da década de 80. Haywood e Heymann³² (1989) foram os primeiros a relatar o uso de sistemas clareadores contendo 10% de peróxido de carbamida, marcando o início da discussão entre os profissionais acerca da utilização segura e eficaz desses agentes clareadores. A partir de relatos positivos quanto ao clareamento dentário com o uso de produtos com peróxido de carbamida, esses passaram a ser rapidamente comercializados (“over the counter”) em supermercados e farmácias nos Estados Unidos. Porém, com acesso às informações a respeito dos possíveis danos pulpares e outros efeitos adversos causados por componentes dos géis clareadores, a disponibilidade desses produtos para o público em geral passou a estar sujeita à legislação de cada país³³.

Uma das principais causas da insatisfação das pessoas com relação à estética de seu sorriso é o escurecimento dental³⁴. Esta alteração cromática pode ser causada por diversos fatores³⁵, sendo um deles a deposição de moléculas orgânicas coloridas, conhecidas como cromóforos, nos tecidos dentários³⁶. Esses pigmentos orgânicos têm estrutura molecular cíclica constituída por duplas ligações de carbono, o que causa maior absorção de luz e conseqüentemente resulta num aspecto mais escurecido ao dente. Oriundos de alimentos e bebidas ricas em corantes, esses cromóforos podem ser facilmente encontrados na dieta do indivíduo e são facilmente absorvidos pelos tecidos dentários³⁷. Uma vez que essas moléculas coloridas permanecem na superfície do esmalte dental, elas são classificadas como pigmentos “extrínsecos”, os quais podem ser removidos do tecido por meio de profilaxia profissional^{35,38,39}. Diferente deste tipo de manchamento superficial, os cromóforos que se depositam na dentina são aqueles que conseguem se difundir pelos espaços interprismáticos do esmalte, e assim são classificados como pigmentos “intrínsecos”⁴⁰. Esses podem ser removidos da dentina por meio de reações químicas catalíticas, sendo o H_2O_2 uma molécula reativa capaz de decompor os cromóforos intrínsecos e assim promover o clareamento dentário⁴¹. De maneira geral, sabe-se que a

degradação das duplas ligações da estrutura molecular dos cromóforos causada pelo H_2O_2 e/ou seus subprodutos, altera a conformação da molécula, tornando-a linear e com ligações simples. Esta alteração na organização espacial da molécula orgânica colorida presente na dentina tem como consequência uma menor absorção da luz visível pelo tecido, o que confere elemento dentário tratado um aspecto mais claro³⁹.

A partir dos importantes conhecimentos científicos adquiridos nas últimas décadas de pesquisa, os bons resultados estéticos associados ao baixo custo do clareamento dental, fez com que este tipo de tratamento aplicado em dentes vitais e não-vitais viesse ganhar, a cada dia, mais espaço na prática clínica^{42,43}. Assim, diferentes técnicas clareadoras foram estabelecidas, tais como o clareamento dental de consultório, clareamento caseiro supervisionado ou a combinação de ambos^{44,45}. Dentre as variadas técnicas clareadoras usadas atualmente, o clareamento dental de consultório se destacou, sendo que para realizar este protocolo são utilizados géis clareadores com concentrações de H_2O_2 que variam de 35 a 40%^{1,46}. Apesar do excelente resultado estético alcançado com essa técnica profissional, a utilização de altas concentrações de H_2O_2 passou a ser considerada como um dos principais responsáveis pela sensibilidade dentária (SD) pós-tratamento¹⁵. Diversos estudos clínicos já comprovaram a alta prevalência de SD logo após a realização do clareamento dental, sendo que esse efeito adverso pode afetar entre 47% e 100% dos pacientes submetidos ao procedimento estético^{3,4,8,47-49}. Embora o uso de agentes dessensibilizantes, como protocolo prévio ao clareamento dental, seja empregado com o objetivo de evitar a ocorrência da SD pós-terapia, ainda existem controvérsias em relação à eficácia desses produtos. Este tipo de terapia dessensibilizante pode ter um efeito positivo, ou não, a depender do tipo de protocolo realizado, composição dos géis clareadores e individualidade de cada paciente^{5,8,50-52,54,55}. Porém, é importante ressaltar que a utilização de agentes dessensibilizantes pós-clareamento dental pode reduzir a SD, porém não impede que componentes tóxicos dos géis se difundam pelo esmalte/dentina para causar danos ao tecido pulpar.

Diversas teorias têm sido propostas para explicar a SD causada pelo clareamento dental de consultório. Uma delas está associada a capacidade de difusão de elevadas concentrações de H_2O_2 pelo esmalte/dentina, o que causa danos oxidativos às células pulpares e aumento na expressão de mediadores pro-inflamatórios locais⁵⁵⁻⁵⁷. Devido ao baixo peso molecular do H_2O_2 , a difusão dessa molécula oxidativa tóxica pelos tecidos duros do dente é facilitada. Cooper⁵⁸ (1992)

demonstrou a presença de H_2O_2 no espaço pulpar apenas 15 minutos após aplicação do gel sobre o esmalte. De Oliveira Duque et al.¹³ (2017) mostraram que a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 residual, caracterizado pelos autores como moléculas que não interagem com os cromóforos (free- H_2O_2), é maior quanto menor a espessura de esmalte/dentina. Os autores também relataram que quanto mais delgado são esses tecidos duros do dente, mais intenso os danos causados por estas moléculas sobre células da polpa dentária.

O H_2O_2 é uma espécie reativa derivada do oxigênio (ERO) que sofre reação de oxirredução ao entrar em contato com o elemento dentário. Da decomposição do H_2O_2 , são originadas outras EROs ainda mais reativas e instáveis eletronicamente, tais como íon peri-hidroxila (HO_2^-), ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete ($O^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot})²². Apesar disso, uma grande quantidade de free- H_2O_2 ainda se mantém nos tecidos duros do dente e se desloca continuamente em direção ao espaço pulpar⁵⁹⁻⁶¹. Desta maneira, o longo tempo de vida do H_2O_2 faz com que o contínuo acúmulo dessa molécula tóxica no espaço pulpar cause, in vitro, importante redução na viabilidade celular¹¹⁻¹⁴, bem como intensa lesão na membrana de células pulpares^{12,13}. Esses dados laboratoriais corroboram com os resultados da primeira pesquisa in vivo que se tem conhecimento na literatura, onde os autores avaliaram e compararam microscopicamente a resposta de polpas de incisivos e pré-molares humanos íntegros submetidos ao clareamento convencional de consultório¹⁵. Nesse estudo, os dentes clareados foram extraídos e processados para análise microscópica da resposta pulpar ao procedimento estético. Enquanto os incisivos clareados apresentavam intenso dano pulpar, caracterizado pela formação de áreas de necrose da porção coronária e de inflamação no tecido adjacente, os pré-molares clareados exibiam polpa com características histológicas próximas da normalidade. Os pacientes submetidos ao clareamento de consultório relataram SD pós-tratamento apenas nos incisivos, os quais exibiam os danos pulpares mais extensos.

Dentre as espécies químicas geradas a partir do contato do H_2O_2 com o elemento dental, o OH^{\cdot} é aquela que apresenta o maior potencial de oxidação ($E_o = +2,8V$), e sendo assim, consegue oxidar rapidamente compostos orgânicos, tais como os cromóforos presentes na estrutura dental^{21,22}. Neste contexto, uma estratégia interessante para clarear os dentes em consultório seria tentar maximizar a geração de OH^{\cdot} ^{11,23,25}. Baseado no conceito dos processos oxidativos avançados (POAs), onde

agentes oxidantes capazes de promover intensa formação de OH^\bullet são usados para decompor estruturas orgânicas de difícil degradação⁶², surge a hipótese que este mesmo conceito possa ser empregado na Odontologia Estética para formular protocolos clareadores mais efetivos e seguros. Estes novos produtos poderiam limitar a ação do H_2O_2 apenas na região pigmentada do elemento dental (esmalte e dentina), prevenindo a indesejada difusão trans-amelodentinária de elevadas concentrações de free- H_2O_2 , o que tornaria esta terapia mais biocompatível e segura para os pacientes.

A concentração do H_2O_2 no gel utilizado no procedimento clareador, bem como o período de tempo de aplicação do produto sobre o elemento dental são fatores diretamente relacionados com a quantidade desta ERO que alcança o tecido pulpar⁵⁹. Com o intuito de otimizar a degradação do H_2O_2 e diminuir os efeitos adversos da terapia clareadora, tem sido proposto também, a fotoativação dos géis clareadores por meio do uso de fontes de luz específicas⁶³. Apesar de poder contribuir com a decomposição do H_2O_2 , o aquecimento dos tecidos dentários provocado pela fonte de luz deve ser levado em consideração, uma vez que o aumento da temperatura na polpa dental pode causar efeitos nocivos às células deste tecido conjuntivo especializado^{64,65,66}. Dentre as diferentes formas de fotoativação usadas na Odontologia, tais como àquelas onde são empregadas a luz halógena e laser^{67,68}, bem como o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica⁶⁹, o uso do LED violeta tem mostrado ser uma alternativa promissora. Estudos prévios demonstraram que o LED violeta pode minimizar os efeitos nocivos do clareamento dental de consultório realizado com géis contendo elevadas concentrações de H_2O_2 ⁷⁰⁻⁷². Isto porque a luz violeta com comprimento de onda em torno de 405- 410nm, quando aplicada sobre o dente, consegue penetrar o esmalte para desestabilizar e degradar moléculas coloridas do local por meio de um processo físico⁷³. Este método de fotocatalise é baseado na liberação de radicais hidroxila (OH^\bullet), onde ocorre a degradação do H_2O_2 de acordo com a equação: $\text{H}_2\text{O}_2 + 211 \text{ kJ/mol} \rightarrow 2\text{HO}^\bullet$. A velocidade da reação é aumentada em cerca de 2.2 vezes a cada elevação de 10°C na temperatura do gel clareador⁷⁴. Diversos estudos clínicos relataram os efeitos positivos do uso do LED violeta na terapia clareadora^{72,75,76}. Estudos laboratoriais⁷⁷⁻⁸⁰ e revisões sistemáticas^{51,74} também demonstraram que o LED violeta pode ser uma interessante alternativa para favorecer o clareamento dental realizado em consultório. Contudo, a fotocatalise do gel clareador ainda apresenta controvérsias, o que indica a necessidade

de realizar mais estudos a fim de elucidar a segurança e eficácia deste tipo de terapia. Num estudo in vivo recente realizado por Kury et al.⁷¹ (2020), foi avaliado a influência do LED violeta sobre a alteração cromática de dentes submetidos ao clareamento com géis contendo elevada concentração de H₂O₂. Os autores mostraram que a fotocatalise do gel clareador resultou em maior eficácia clareadora. No entanto, o uso do LED violeta intensificou a SD no primeiro intervalo e na última sessão do clareamento dental, o que poderia limitar o uso clínico deste protocolo. Alguns pesquisadores também relatam a possibilidade de realizar o clareamento dental por meio da aplicação isolada do LED violeta diretamente sobre o elemento dental (sem uso de géis). Porém, nesses estudos foi demonstrado que esse método de fotocatalise isolada dos cromóforos não foi capaz de atingir resultados estéticos tão eficazes quanto àqueles onde géis com alta concentração de H₂O₂ foram usados^{67,78,79}.

Amplificar a decomposição do H₂O₂, gerando maior liberação de radicais OH[•] e reduzindo a quantidade de free-H₂O₂ que se difunde pelo esmalte/dentina para atingir o tecido pulpar, é um desafio para otimizar o resultado estético e prevenir a SD causada pelo clareamento de consultório. De acordo com estudos prévios, resultados positivos em relação a eficácia clareadora e toxicidade de géis clareadores foram alcançados através do emprego da técnica da catálise do H₂O₂^{11,23,25}. A partir de então, terapias clareadoras têm sido propostas, tendo como base os conhecimentos prévios de POA, onde catalisadores químicos ou enzimáticos são usados^{14,20}. Em um estudo realizado por Ortecho-Zuta et al.¹⁴ (2019), foi avaliado o efeito da enzima peroxidase sobre a eficácia clareadora e citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel clareador com 35% de H₂O₂. Neste mesmo estudo, foi constatada uma aceleração e otimização do efeito do gel clareador, alcançando um aumento da eficácia clareadora e diminuição da toxicidade celular do produto. Soares et al.²⁰ (2019) demonstraram que a ativação química do gel clareador com catalisadores químicos ou enzimáticos, diminui a toxicidade celular e duplica o potencial clareador do tratamento realizado numa única sessão. Entretanto, uma importante desvantagem da catálise enzimática reside no fato de que as enzimas necessitam de um pH ideal e temperatura específica para que a velocidade das reações por elas catalisadas seja efetiva¹¹.

O uso de catalisadores químicos, como gluconato de manganês, cloreto de manganês e sulfato ferroso dispensam as exigências de pH e temperatura específicos para que o resultado estético do clareamento seja melhorado^{20,81}. Além disso, agentes catalisadores contendo manganês diminuíram significativamente a difusão de H₂O₂

através do esmalte/dentina, limitando o acúmulo desta molécula tóxica no espaço pulpar^{20,24,82}. Uma alternativa ainda pouco explorada e com potencial de sucesso clínico é a catálise química do H_2O_2 por meio do uso de óxido de manganês (MnO). Em abundância na natureza^{83,84,85}, a utilização do MnO como catalisador químico do H_2O_2 pode ser uma alternativa promissora para reduzir a toxicidade celular do produto, bem como favorecer o resultado estético do clareamento dental de consultório.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ESTUDO 1: Avaliação da Eficácia Clareadora de Géis com Diferentes Concentrações de H₂O₂ Aplicados Sobre Esmalte Revestido ou Não com Um Primer Polimérico Contendo 10 mg/mL de MnO (PPC), e Análise da Cinética de Degradação do H₂O₂.

4.1.1 Formulação dos géis clareadores experimentais

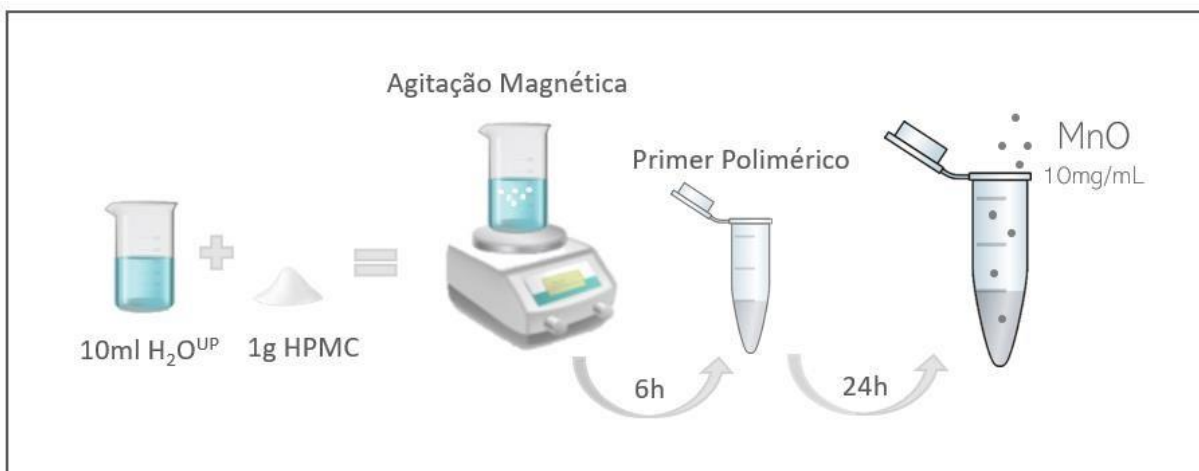
O espessante à base de carbopol (ácido poliacrílico Mv ~ 3.000,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi obtido por meio do preparo de uma solução a 1% (v/m) diluído em água ultra-pura (H₂O_{UP}; Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), com pH basificado (8,0). Após manter sob agitação magnética (Vortex Mixer VM300, Vixar; Plymouth, MN, EUA) por 8 h em temperatura ambiente (25°C), a solução foi estocada sob refrigeração (4°C) overnight. A fase líquida contendo 10% e 20% de H₂O₂ foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque contendo 35% deste ERO (Peróxido de Hidrogênio 35% P.A, Neon, Suzano, SP, Brasil) em H₂O_{UP}, imediatamente antes das análises. O espessante foi misturado com as soluções de H₂O₂ na proporção de 1:3.

4.1.2 Formulação do primer polimérico catalisador (PPC)

Foi preparado um PPC (Figura 1) resistente ao escoamento e capaz de formar uma película homogênea sobre o esmalte. Para isso, foi usado como polímero base o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC, Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, EUA). O pó de HPMC (1 g), na viscosidade de 100 mPa.s., foi diluído em H₂O_{UP} (10 mL) para obter uma solução a 10%. O preparo do gel foi realizado sob agitação magnética (Vortex Mixer VM300) em temperatura ambiente por 6 h, o qual foi posteriormente armazenado sob refrigeração (4°C) por 24h. O MnO (Sigma-Aldrich) foi incorporado (10 mg/mL) à solução de HPMC como agente catalisador com o objetivo final de obter o PPC. A concentração do agente catalisador foi determinada com base em resultados prévios ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa⁸⁶. Imediatamente após o gel clareador à base de 10%, 20% ou 35% de H₂O₂ ser manipulado, este foi aplicado sobre o PPC (1:1; v/v), o qual foi acondicionado em tubos de 1,5 mL (Corning, Oneonta, NY, EUA). A temperatura gerada pela catálise do H₂O₂, bem como o pH do produto foram avaliados imediatamente após o contato do gel clareador com o PPC,

e também a cada 5 min durante um período total de 45 min, por meio de um microeletrodo de bancada (HI-2221 Calibration Check pH/Bench Meter; Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, AD, Reino Unido).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da preparação do Primer Polimérico Catalisador (PPC)

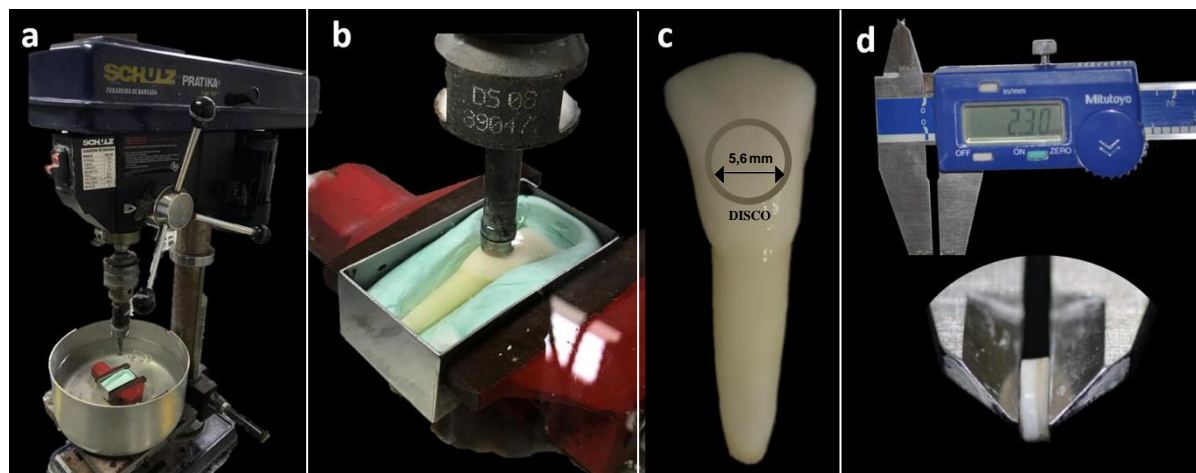


Fonte: Elaboração própria.

4.1.3 Obtenção dos discos de esmalte e dentina

Um total de 80 discos de esmalte/dentina, provenientes de incisivos bovinos íntegros (mantidos em solução de Timol a 0,1% - Sigma-Aldrich Corp., até o momento da pesquisa), foram obtidos do terço médio da superfície vestibular dos dentes (Figura 2). Para isso, foi usado uma broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada em furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schültz, Joinville, SC, Brasil). Todo procedimento realizado para obtenção dos discos de esmalte/dentina, aconteceu em baixa velocidade e com os dentes imersos em água destilada na temperatura de 4°C. Assim, imediatamente após obter discos com diâmetro padronizado de 5,6 mm, estes tiveram a superfície dentinária regularizada por meio de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint- Gobam Abrasivos Ltda, Jundiaí, SP, Brasil), com movimentos giratórios manuais para cada granulação. Ao final, os discos de esmalte/dentina apresentaram espessura padronizada de 2,3 mm, a qual foi determinada por meio do uso de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil)¹³. Todos os discos obtidos foram acondicionados em tubos Falcon de 50 mL contendo solução de Timol a 0,1% até a realização da etapa de padronização da cor inicial dos discos, a qual está detalhadamente descrita mais adiante.

Figura 2 – Imagens ilustrativas da sequência de procedimentos empregados para obter os discos de esmalte/dentina usados neste estudo



a) Furadeira de bancada preparada para obter o disco de dentina; b) Broca diamantada do tipo trefina posicionada no terço médio da superfície vestibular do incisivo bovino; c) Visão do corte realizado para obter o disco de dentina com 5,6 mm de diâmetro; d) Paquímetro digital, o qual foi usado para medir e padronizar a espessura dos discos de esmalte/dentina em 2,3 mm.

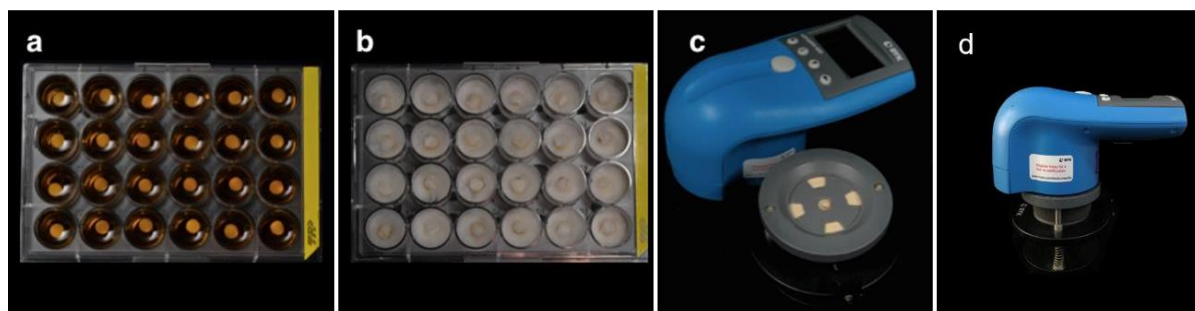
Fonte: Elaboração própria.

4.1.4 Padronização da cor inicial dos discos

Os discos foram submetidos a uma leitura inicial de coloração (baseline), seguido de um protocolo de manchamento pré- estabelecido na literatura com o objetivo de padronizar a cor inicial dos dentes em todos os grupos experimentais^{13,87}. Inicialmente, a superfície de dentina foi tratada com EDTA 0,5 M por 30 segundos para remoção da smear layer. Então, os discos foram individualmente posicionados em placas esterilizadas de 24 compartimentos, sendo que cada compartimento continha 1 mL da solução de chá-preto (Leão Jr S. A., Fazenda Rio Grande, PR, Brasil), a qual foi preparada por meio da filtração de 3,2 g de chá em 100 mL de água fervente durante 5 min. Após manter os discos imersos no chá por 24 h em estufa à 37°C, foi realizada a profilaxia na superfície de esmalte com solução de pedra-pomes (SS White, São Cristóvão, RJ, Brasil) e água para remoção dos pigmentos superficiais. Na sequência, com objetivo de eliminar pigmentos que não foram completamente absorvidos pela dentina, os discos foram novamente colocados, de maneira individual, em placas esterilizadas de 24 compartimentos, sendo que cada compartimento continha 1 mL de água destilada esterilizada. Após estocar as placas com os discos em estufa à 37°C por 24 h, algodão embebido em água deionizada foi posicionado sobre a dentina, sendo que o esmalte foi mantido em contato com algodão embebido

em solução tipo saliva (fosfato de potássio monobásico 3,9%; cloreto de cálcio 3,6%; cloreto de sódio 2%; cloreto de potássio 2%; cloreto de magnésio 3,7%; phenochem 0,2%; gel de natrosol 10%; água destilada qsp). Este procedimento foi realizado por 72 h para manter e padronizar a hidratação dos discos. Finalmente, o espectrofotômetro de reflexão UV (Espectrofotômetro de Reflexão ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha) foi posicionado sobre o espécime de forma padronizada com o auxílio de um suporte para a obtenção do valor de ΔE , de acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$. Discos com valores de L^* , a^* e b^* similares foram selecionados e distribuídos nos grupos experimentais de acordo com o valor total de ΔE (Figura 3). Todas as leituras dos discos foram realizadas em um mesmo ambiente, com luminosidade padronizada, no mesmo período do dia, e por um único pesquisador com vestimenta padrão na cor branca.

Figura 3 – Imagens ilustrativas do protocolo de manchamento dos discos de esmalte/dentina



a) Os discos foram individualmente imersos em 1 mL da solução de chá-preto; b) Organização dos discos em placas de 24 compartimentos de maneira que a superfície de dentina permanecesse em contato com algodão embebido em água e a superfície de esmalte ficasse em contato com uma solução tipo saliva; c) Posicionamento dos discos em matriz de silicone para leitura da alteração cromática; d) Análise de cor sendo realizada com espectrofotômetro.

Fonte: Elaboração própria.

4.1.5 Avaliação da eficácia clareadora (EC)

Todos os grupos estabelecidos para este estudo ($n=8$), bem como os protocolos de tratamento definidos para cada um deles, estão demonstrados na Figura 4. No grupo controle negativo, nenhum tratamento foi realizado sobre o esmalte, o que permitiu manter a cor original do disco manchado artificialmente com chá-preto. No grupo controle positivo, um gel comercial contendo 35% de H_2O_2 (Whiteness HP, FGM,

Joinville, SC, Brasil) foi aplicado por 45 minutos diretamente sobre o esmalte dentário, sendo esse protocolo equivalente a primeira sessão do clareamento convencional de consultório. Nos grupos experimentais, géis clareadores com diferentes concentrações H₂O₂, os quais foram preparados em laboratório, foram aplicados por 45 minutos sobre esmalte previamente revestido ou não com PPC. Para aplicação de 10 µL do PPC sobre o esmalte, foi utilizada uma micropipeta para líquidos viscosos e corrosivos (Microman M50; Gilson Inc, Middleton, WI, EUA). Com auxílio da ponteira, o PPC foi espalhado sobre o substrato, de tal forma que uma delgada e homogênea película do bioproduto viesse recobrir todo o esmalte. Então, nos grupos G4, G6, G8 e G10, os géis clareadores foram imediatamente aplicados sobre o PPC.

Figura 4 – Relação entre grupos experimentais e controles estabelecidos de acordo com o gel clareador aplicado ou não sobre os discos e com o recobrimento ou não do esmalte com o PPC

GRUPOS	GEL CLAREADOR	PPC*
G1 (controle negativo)	-	AUSENTE
G2 (PPC)	-	PRESENTE
G3	10% H ₂ O ₂	AUSENTE
G4	10% H ₂ O ₂	PRESENTE
G5	20% H ₂ O ₂	AUSENTE
G6	20% H ₂ O ₂	PRESENTE
G7	35% H ₂ O ₂	AUSENTE
G8	35% H ₂ O ₂	PRESENTE
G9 (controle positivo)	35% H ₂ O ₂ comercial	AUSENTE
G10	35% H ₂ O ₂ comercial	PRESENTE

*PPC: Primer Polimérico Catalisador.

Fonte: Elaboração própria.

Todos os géis clareadores foram manipulados imediatamente antes de sua aplicação sobre o esmalte revestido ou não com o PPC. No protocolo tradicional de clareamento dental de consultório, um total de 3 sessões de 45 min são comumente realizadas. Assim, também foi analisado, no presente estudo, o efeito clareador alcançado após 3 aplicações de 45 min do gel clareador sobre o esmalte revestido ou não com PPC, com intervalo de 72 h entre cada sessão. Para evitar que a desidratação das amostras viesse interferir nos resultados de alteração cromática dos

discos, no intervalo de tempo entre as 3 sessões clareadoras, a superfície dentinária dos espécimes foi mantida úmida por meio do uso de algodão embebido com água deionizada, sendo que o esmalte foi mantido em contato com algodão embebido em solução tipo saliva (fosfato de potássio monobásico 3,9%; cloreto de cálcio 3,6%; cloreto de sódio 2%; cloreto de potássio 2%; cloreto de magnésio 3,7%; phenochem 0,2%; gel de natrosol 10%; água destilada qsp). Para realização da leitura de cor dos discos de esmalte/dentina, estes foram posicionados em uma matriz de silicone branco, de forma que apenas a superfície do esmalte permaneceu exposta. A seguir, o espectrofotômetro foi posicionado sobre o disco de forma padronizada e os valores de $L^*a^*b^*$ foram obtidos antes (baseline) e 72 h após cada sessão de clareamento. Para análise da alteração de cor (CIEDE 2000, ΔE_{00}), foi usado o protocolo previamente descrito por Paravina et al. (2015)⁸⁸. Esse protocolo permite uma análise mais acurada de cor, visto que nesta fórmula foram adicionadas 5 correções ausentes na equação anterior do sistema CIE $L^*a^*b^*$: termo de rotação de matiz (R_T), compensação para cores neutras (L^*C^*h), luminosidade (SL), croma (SC) e matiz (SH). O índice de clareamento (ΔWI) foi avaliado tal como recomendado por Pérez et al. (2016)⁸⁹, sendo que esta análise determina a eficácia estética alcançada pós procedimento clareador, onde os maiores valores de ΔWI são relacionados a protocolos clareadores mais eficazes. Para isso, as seguintes equações foram empregadas:

$$1) \sqrt{\left(\frac{\Delta}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta}{k_c S_c}\right)^2 + \left(\frac{\Delta}{H'}\right)^2 + R_T \frac{\Delta C'}{\Delta H'}}$$

$$2) \quad WI = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^*$$

$$3) \quad \Delta WI = WI - WI_{baseline}$$

Os parâmetros de cor (ΔE_{00} e ΔWI) obtidos para os grupos controles e experimentais foram analisados estatisticamente (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey). Os valores dos limiares de perceptibilidade (PT) e aceitabilidade (AT) foram adotados como 50:50%, ΔE_{00} foram 0,8 (PT) e 2,7 (AT) e ΔWI foram 0,72 (PT) e 2,60 (AT)⁹⁰.

4.1.6 Geração de OH• a partir da decomposição do H₂O₂ dos géis clareadores

Para determinar o potencial do PPC em decompor H₂O₂ e gerar OH•, o qual apresenta tempo de vida mais curto e maior ação catalítica sobre compostos orgânicos, foi realizada a análise da presença de OH• nos géis clareadores (n=8), tal como descrito por Ortecho-Zuta et al.¹⁴ (2019). Para isso, uma alíquota de 20 µL dos géis clareadores de cada concentração, associado ou não ao PPC, foi incubada em temperatura ambiente pelos períodos de 0, 5, 10 e 15 min em contato com 140 µL da sonda fluorescente do kit OxiSelect™ Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (HORAC) Activity Assay (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA), a qual é oxidada na presença de OH•. Desta forma, a presença de OH• causou redução de fluorescência, sendo este efeito monitorado a 480 nm excitação e 530 nm emissão (Synergy H1, Biotek, Winooski, VT, EUA). A produção de OH• foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{Produção de OH}^\bullet = \frac{\text{Emissão de fluorescência no grupo controle negativo (100\%)}}{\text{Emissão de fluorescência no grupo experimental}}$$

4.2 ESTUDO 2: Avaliação da Citotoxicidade Trans-Amelodentinária das Novas Formulações para Clareamento Dental e da Quantidade de free-H₂O₂ Capaz de Alcançar o Espaço Pulpar.

4.2.1 Cultura de células odontoblastóides MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas de acrílico esterilizadas de 75 cm² (KASVI Imp.) com 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 de penicilina e estreptomicina, respectivamente, bem como 2 mmol/L de glutamina (GIBCO). As garrafas com as células foram mantidas em incubadora, com atmosfera umedecida à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Fisher Scientific, RCO3000T-5-VBC, Asheville, NC, EUA). Passagens foram realizadas até obter um padrão de 80% de confluência para realização dos testes de citotoxicidade propostos neste estudo.

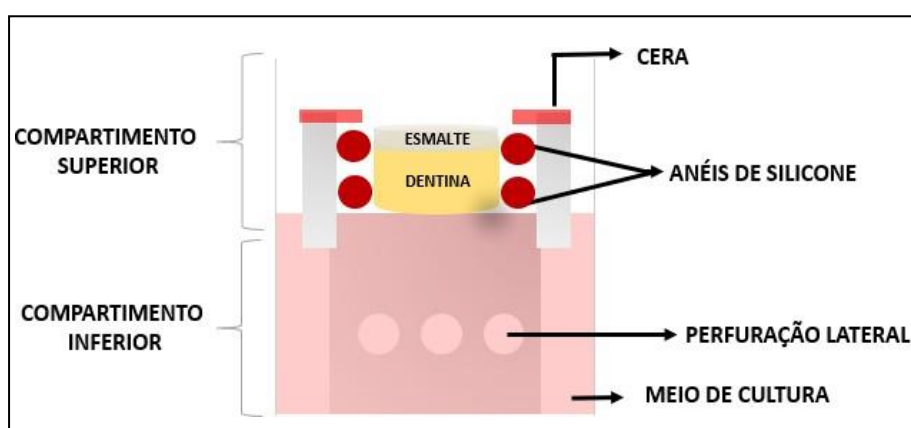
4.2.2 Obtenção dos espécimes

Um total de 80 discos de esmalte/dentina bovinos, distribuídos em 10 grupos (n=8), foram obtidos tal como descrito em detalhe no Estudo 1. Estes discos, os quais tiveram espessura padronizada em 2,3 mm, de tal forma a simular incisivos inferiores humanos¹³, foram submetidos ao protocolo de manchamento também previamente descrito.

4.2.3 Procedimento experimental

Os discos foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) por meio de dois anéis de silicone, os quais foram selados em sua periferia com cera utilidade (Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com o objetivo de prevenir qualquer extravasamento de componentes do gel clareador para o espaço pulpar¹³. Após serem esterilizados em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil), os conjuntos discos/CPAs foram individualmente posicionados em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil). Em cada compartimento foi aplicado 1 mL de meio de cultura, o qual permaneceu em contato com a dentina (voltada para baixo), sendo que o esmalte (voltado para cima) foi mantido exposto para receber os tratamentos (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática do posicionamento individual de um conjunto disco/CPA no compartimento de uma placa de acrílico esterilizada



Fonte: Elaboração própria.

Imediatamente após a realização da primeira sessão do clareamento dental, os extratos (DMEM + componentes dos géis clareadores que se difundiram pelos discos

de esmalte/dentina) foram coletados, homogeneizados e então aplicados por 1 h sobre células MDPC-23 previamente cultivadas em placas esterilizadas de 24 e 96 poços, tal como descrito a seguir.

4.2.4 Citotoxicidade trans-amelodentinária (CT - viabilidade celular; alamarBlue)

A intensidade dos efeitos citotóxicos estabelecida nesse estudo está inversamente relacionada com o valor de viabilidade obtido das células MDPC-23 expostas aos extratos e submetidas ao protocolo de alamarBlue (n=8). Para realizar esta análise, alíquotas de 100 µL de cada extrato foram aplicadas sobre as células previamente cultivadas (10.000 células/compartimentos) em placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (Kasvi Imp.). Após incubar as células MDPC-23 por 1 h em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células foram novamente incubadas por 4 horas em contato com uma solução composta por 90 µL de DMEM e 10 µL da solução de alamarBlue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). As placas foram colocadas em incubadora por 4 hs a 37°C e 5% CO₂, possibilitando a penetração do corante através da membrana citoplasmática das células previamente expostas aos extratos. Após este período, a solução foi coletada e transferida para outra placa de 96 compartimentos, sendo a fluorescência mensurada a 540 nm excitação e 590 de emissão em espectrofotômetro (Synergy H1)⁹¹. O valor médio de fluorescência do grupo CN no período de 4 horas foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo este o parâmetro usado como base para determinar os valores de viabilidade das células nos demais grupos⁹¹.

4.2.5 Quantificação de free-H₂O₂ presente nos extratos

Alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo (n=8) foram transferidas para tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo 900 µL de solução tampão acetato (2 mol/L, pH 4,5), o qual permite a estabilização do H₂O₂. Em seguida, 500 µL desta solução foram transferidos para novos tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados por 5 seg, sendo em seguida adicionado 50 µL de solução de 1 mg/mL da enzima horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). Este método é baseado na reação do H₂O₂ com o corante violeta leucocristal, catalisado pela enzima horseradish

peroxidase⁹². A variação de coloração dessa mistura é relacionada à quantidade de H₂O₂ presente no extrato. A absorvância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Synergy H1) com comprimento de onda de 596 nm. A curva padrão de quantidades conhecidas de H₂O₂ foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em µg de H₂O₂ por mL de extrato¹¹.

4.2.6 Análise do estresse oxidativo (EOx) celular

Essa análise foi realizada por meio da estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células (n=8) imediatamente após o clareamento. Para isto, células MDPC-23 previamente cultivadas em compartimentos de placas de 96 compartimentos (KASVI Imp.) foram expostas por 30 min à sonda carboxy-H2DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 10 µg/mL. Esta sonda é permeável à membrana celular e fluoresce quando em contato com EROs. Na sequência, alíquotas de 100 µL dos extratos de cada grupo foram aplicadas por 1 h sobre essas células e a intensidade de fluorescência delas foi avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1). Os dados foram normalizados pelo grupo controle negativo, obtendo-se assim a variação da intensidade de fluorescência para cada grupo desta etapa do projeto¹⁴.

4.2.7 Avaliação da morfologia das células MDPC-23 (MEV)

Para esta análise, as células foram semeadas sobre lamínulas de vidro redondas esterilizadas (13 mm de diâmetro, KASVI Imp.), as quais foram individualmente posicionadas no fundo de compartimentos de placas de acrílico de 24 compartimentos (KASVI Imp.) (n=4). Então, os mesmos procedimentos clareadores descritos anteriormente foram realizados. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por 60 min em 1 mL de glutaraldeído 2,5% (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Posteriormente, as lamínulas de vidro com as células foram lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 min cada lavagem) e pós-fixadas com 200 µL de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich) a 1% por 60 min. Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens com 1 mL de PBS por 5 min cada. Após os procedimentos de fixação, as células foram desidratadas por meio de trocas seriadas ascendentes (30 min cada) de 1mL das soluções de etanol à 30%, 50% e 70%, 95% (2x) e 100% (2x). Em seguida,

foram realizadas três lavagens (20 min cada) das células com 200 µL de 1,1,1,3,3,3,-hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich). Por fim, as lamínulas com as células aderidas sobre elas foram posicionadas sobre stubs metálicos, fixadas com fita adesiva de carbono (3M Company, Saint Paul, Minnesota, EUA) e mantidas em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil) durante 72 h. Então, foi realizada a metalização com ouro (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil), o que permitiu a análise das células em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6610; JEOL Ltda, Akishima, Tokio, Japão)¹⁴.

4.3 Forma de Análise dos Resultados

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade, ao teste de Levene para avaliação da homocedasticidade seguidos pela análise de variâncias a dois critérios (Two-Way ANOVA) complementado pelo pós-teste de Tukey. Para a análise da geração de OH• em diferentes períodos de tempo, foi realizado o teste de t-student pareado. Para todas as análises foi empregado um nível de significância de 5%.

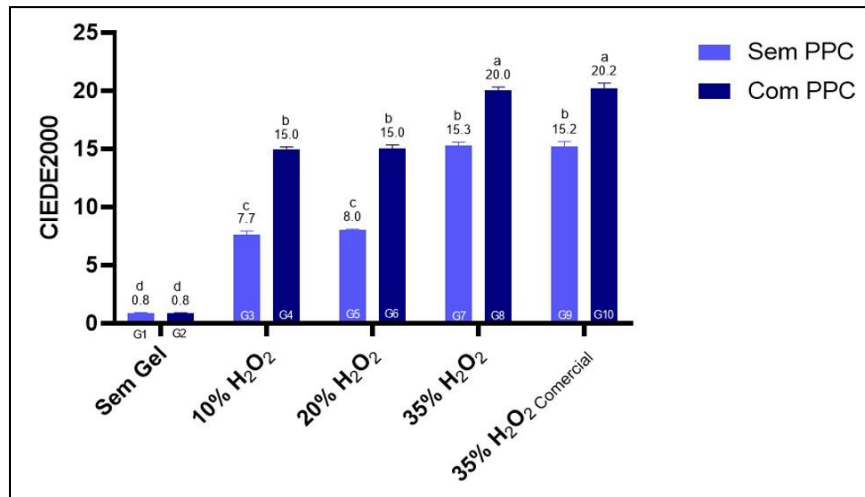
5 RESULTADOS

5.1 Eficácia Clareadora (EC)

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 6 e 7, os valores de ΔE_{00} aumentaram significativamente após a 1ª e 3ª sessões de clareamento para os grupos onde géis clareadores foram usados em associação ao PPC (G4, G6, G8 e G10) ou isoladamente (G3, G5, G7 e G9) em comparação a G1 e G2 ($p < 0,05$). Para os grupos onde os géis foram aplicados diretamente sobre o esmalte (G3, G5, G7 e G9), apenas após 3 sessões de clareamento dental ocorreu aumento significativo no valor de ΔE_{00} de acordo com a elevação da concentração de H_2O_2 no gel clareador (Figura 7; $p < 0,05$). Valor de ΔE_{00} semelhante foi observado entre G3 e G5 após a 1ª sessão clareadora, onde géis com 10% e 20% de H_2O_2 foram usados, respectivamente ($p > 0,05$). Tanto na 1ª quanto na 3ª sessão, G4, G6, G8 e G10 (uso de PPC) resultaram em maior alteração de cor em comparação a seus grupos correspondentes G3, G5, G7 e G9 (não uso de PPC), respectivamente (Figuras 6 e 7; $p < 0,05$).

Em G4 e G6, onde os géis com baixas concentrações de H_2O_2 foram aplicados sobre o esmalte recoberto com PPC, a alteração cromática foi estatisticamente semelhante ao protocolo tradicional de clareamento (G9) ($p > 0,05$). Além disso, todos os grupos clareados apresentaram valores de perceptibilidade e aceitabilidade maiores que os limiares, exibindo significativa alteração cromática de acordo com os critérios estabelecidos.

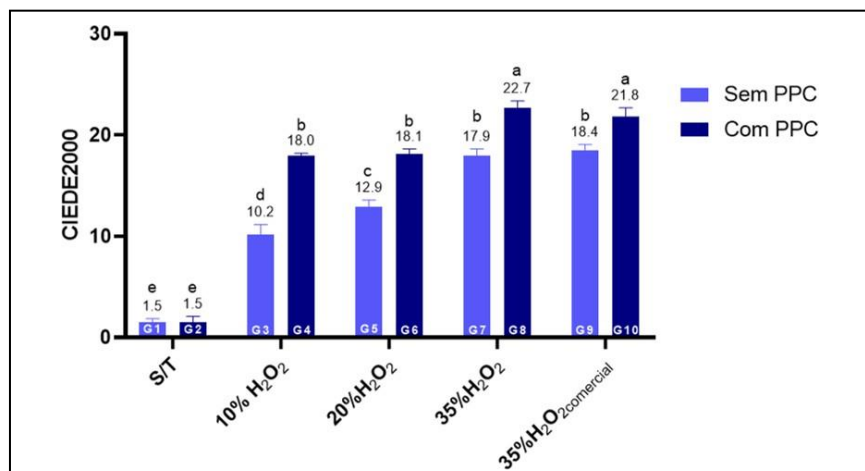
Figura 6 - Valores de ΔE_{00} obtidos após a 1ª sessão de clareamento (45 min) para cada grupo nas diferentes concentrações de H_2O_2 , associado ou não ao uso do PPC



Números são valores médios do CIEDE 2000 (ΔE_{00}) correspondente a cada concentração de H_2O_2 utilizada. Letras distintas demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Valores de ΔE_{00} obtidos após 3 sessões de clareamento (3 x de 45 min) para cada grupo nas diferentes concentrações de H_2O_2 , associado ou não ao uso do PPC

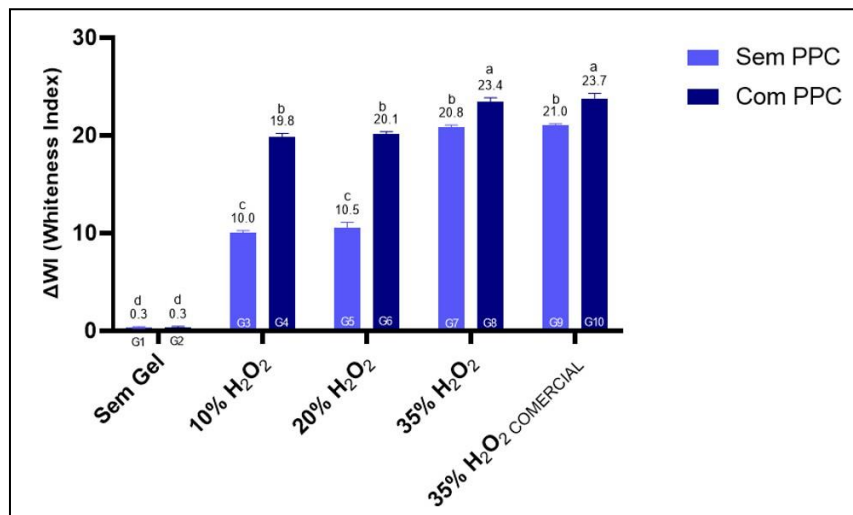


Números são valores médios do CIEDE 2000 (ΔE_{00}) correspondente a cada concentração de H_2O_2 utilizada. Letras distintas demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Os dados de EC apresentados nas Figuras 8 e 9 demonstram o aumento significativo nos valores de ΔWI após a 1ª e 3ª sessões de clareamento para os grupos G4, G6, G8 e 10 em comparação aos grupos G3, G5, G7 e G9 ($p < 0,05$). Foi observado, que o efeito clareador alcançado nos grupos G4 (PPC+10% H_2O_2) e G6 (PPC+20% H_2O_2) foi estatisticamente similar aos grupos G7 e G9, onde géis clareadores com 35% de H_2O_2 foram aplicados diretamente sobre o esmalte ($p > 0,05$). Esses resultados demonstram que o revestimento do esmalte com um primer polimérico contendo o agente catalisador MnO potencializa a alteração de cor dos tecidos dentários causada por géis contendo baixas concentrações de H_2O_2 (G4 e G6), sendo o resultado estético final semelhante àquele observado para o clareamento convencional de consultório (G9; $p > 0,05$).

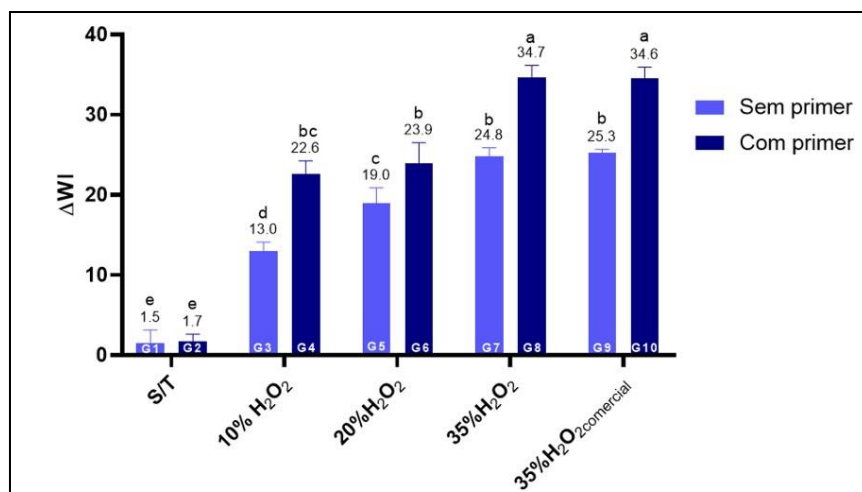
Figura 8 – Valores de ΔWI obtidos após a 1ª sessão de clareamento (45 min) para todos os grupos, de acordo com as diferentes concentrações de H_2O_2 nos géis, os quais foram aplicados sobre esmalte recoberto ou não com PPC



Números são valores médios de ΔWI correspondente a cada concentração de H_2O_2 utilizada. Letras distintas demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Valores de ΔWI obtidos após 3 sessões de clareamento (3 x de 45 min) para todos os grupos, de acordo com as diferentes concentrações de H_2O_2 nos géis, os quais foram aplicados sobre esmalte recoberto ou não com PPC



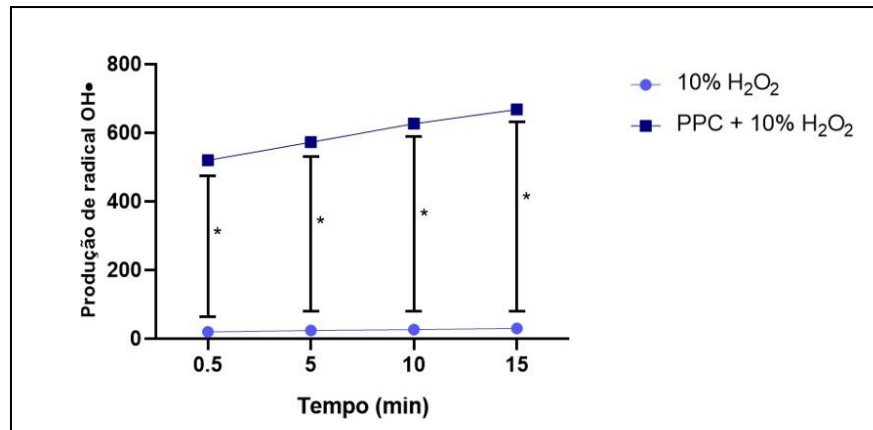
Números são valores médios de ΔWI correspondente a cada concentração de H_2O_2 utilizada. Letras distintas demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Geração de OH^* a partir da decomposição do H_2O_2 dos géis clareadores

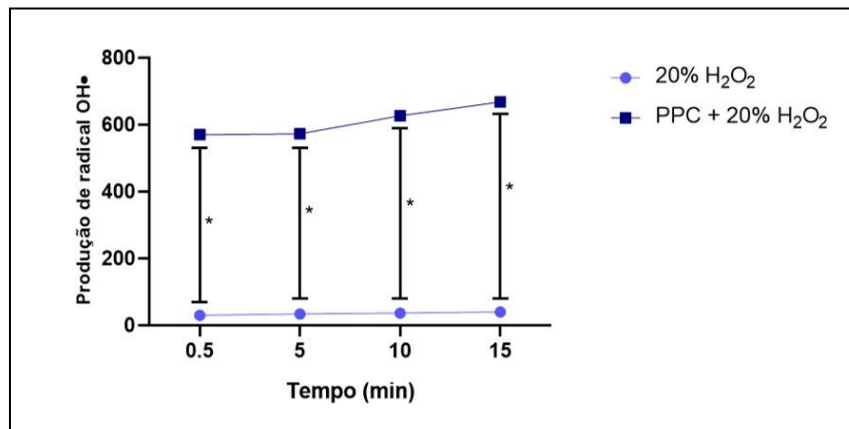
De acordo com os dados obtidos nesta etapa do estudo, foi possível observar a ocorrência de significativo aumento na produção de OH^* em todos os grupos onde o PPC foi usado para revestir o esmalte (G4, G6, G8 e G10) em comparação aos demais grupos, nos quais não se empregou o PCC (G3, G5, G7 e G9) ($p < 0,05$) (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Figura 10 – Cinética de geração de OH^\bullet ao longo do período de 15 minutos para o produto contendo 10% de H_2O_2 na presença ou ausência do PPC



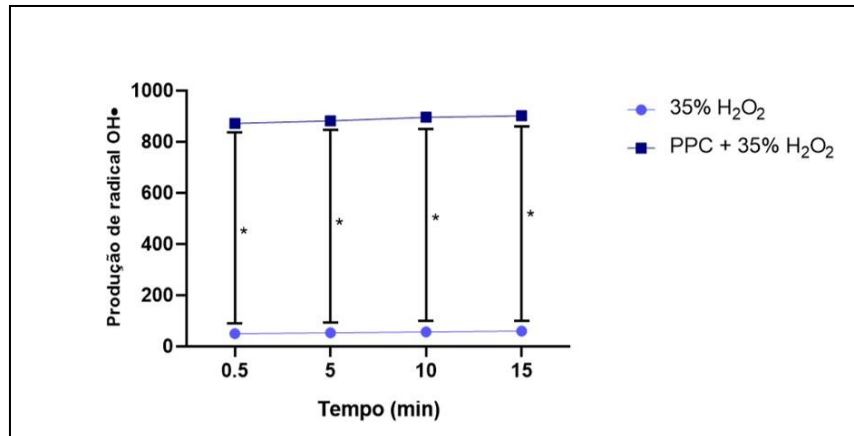
Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 – Cinética de liberação de OH^\bullet ao longo do período de 15 min para o produto contendo 20% de H_2O_2 na presença ou ausência do PPC



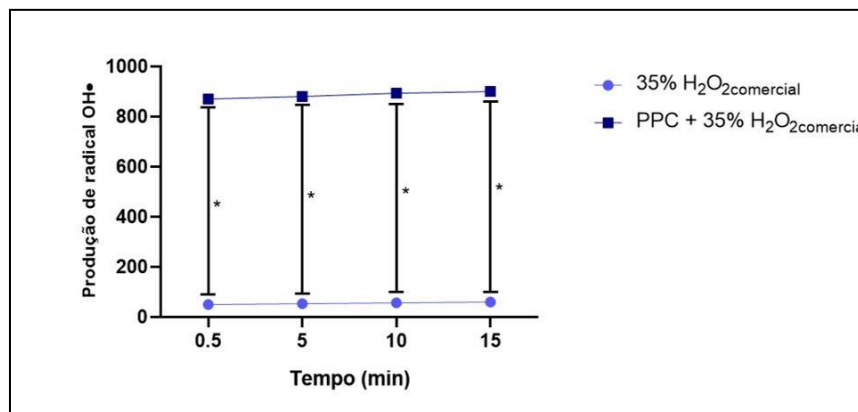
Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Cinética de liberação de OH^\bullet ao longo do período de 15 min para o produto contendo 35% de H_2O_2 na presença ou ausência do PPC



Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 – Dados de cinética de liberação de OH^\bullet obtidos ao longo do período de 15 min para o produto comercial contendo 35% de H_2O_2 na presença ou ausência do PPC



Números representam valores médios de fluorescência da sonda HORAC em relação ao controle negativo em cada período de análise.

* demonstra diferença estatisticamente significante entre os grupos dentro de cada período de análise (Teste-t Student pareado; $p < 0,05$).

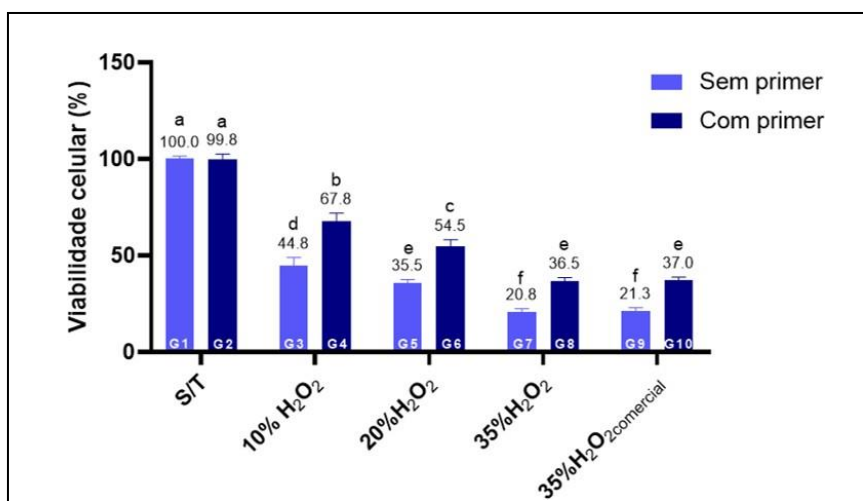
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Citotoxicidade trans-amelodentinária (CT)

Tal como observado na Figura 14, após realizar a 1ª sessão de clareamento, redução significativa da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos clareados (G3 a G10) em comparação a G1 e G2 ($p < 0,05$). Nos grupos G4, G6, G8 e G10, os valores de viabilidade celular, os quais estão inversamente relacionados com o nível de citotoxicidade trans-amelodentinária das estratégias clareadoras avaliadas nesse

estudo, foram superiores àqueles obtidos nos grupos G3, G5, G7 e G9 ($p < 0,05$). Quando comparado ao grupo G1 (controle sem tratamento), a viabilidade das células MDPC-23 reduziu em torno de 55,2% e 64,5% para os grupos G3 (10% H_2O_2) e G5 (20% H_2O_2), respectivamente. Tanto em G7 (35% H_2O_2) quanto em G9 (35% $H_2O_{2\text{comercial}}$), essa redução foi de 79,2%. Nos grupos G4 (PPC+10% H_2O_2), G6 (PPC+20% H_2O_2), G8 (PPC+35% H_2O_2) e G10 (PPC+35% $H_2O_{2\text{comercial}}$), a redução da viabilidade celular foi de aproximadamente 32,2%; 45,5%; 63,5% e 63,5%, respectivamente. De maneira geral, foi possível determinar que o uso do PPC para revestir o esmalte (G4, G6, G8 e G10) reduziu significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária dos géis clareadores sobre as células MDPC-23 ($p < 0,05$). O menor efeito tóxico foi observado no grupo G4 (PPC+10% H_2O_2) em comparação a todos os demais grupos clareados ($p < 0,05$).

Figura 14 – Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio padrão da viabilidade das células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos de cada grupo controle e experimental



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey, $p < 0,05$).

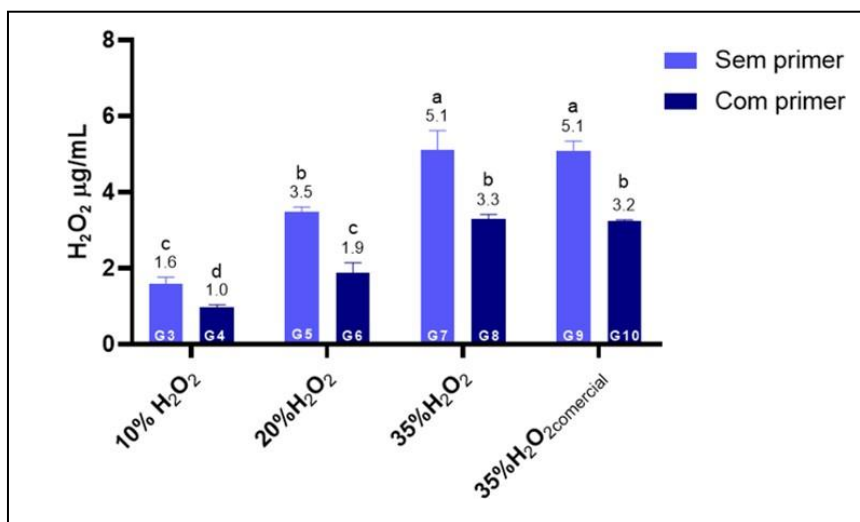
Fonte: Elaboração própria.

5.4 Quantidade de H_2O_2 nos extratos e EOX celular

A Figura 15 demonstra claramente que, ao final da 1ª sessão de clareamento, houve redução significativa na difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 nos grupos onde o PPC foi usado para revestir o esmalte antes da aplicação dos géis clareadores (G4, G6, G8 e G10), quando comparados aos seus correspondentes, nos quais o PPC não foi empregado (G3, G5, G7 e G9) ($p < 0,05$). Dentre todos os grupos avaliados nesse

estudo, o grupo G4 (PPC+10% H_2O_2) foi aquele que apresentou extratos com a menor concentração de H_2O_2 ($p < 0,05$).

Figura 15 – Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio padrão da quantidade de H_2O_2 nos extratos obtidos dos grupos onde as estratégias clareadoras foram aplicadas

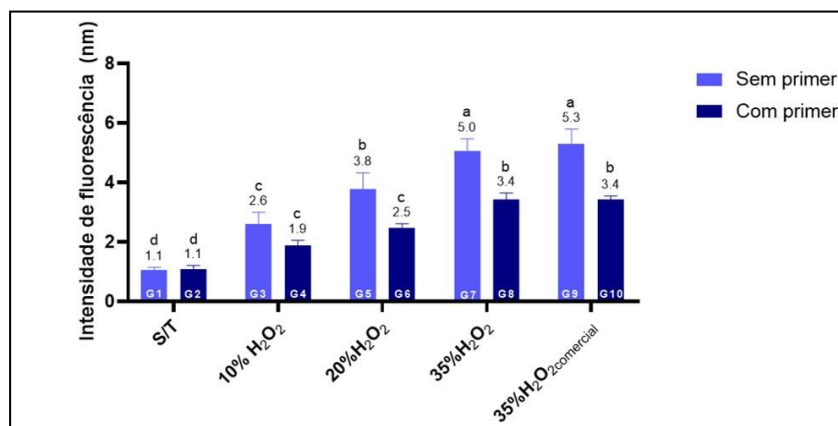


Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey. $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A quantificação de radicais livres (sonda carboxy- H_2DCFDA) também foi realizada para determinar o estresse oxidativo celular (EOx). Os resultados dessa análise, os quais estão apresentados na Figura 16, demonstraram que em todos os grupos onde o PPC foi usado para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador (G4, G6, G8 e G10), ocorreu menor valor de EOx em comparação aos seus correspondentes sem PPC (G3, G5, G7 e G9) ($p < 0,05$). Apesar da tendência geral do uso do PPC reduzir, após a 1ª sessão de clareamento, o EOx causado pelos protocolos avaliados nesse estudo, não foi observado diferença significativa entre os grupos G3 (10% H_2O_2) e G4 (PPC+10% H_2O_2) ($p > 0,05$).

Figura 16 – Gráfico de barras com valores médios (números) e desvio padrão da emissão de fluorescência (sonda carboxy-H2DCFDA) pelas células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos em todos os grupos



Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA a dois critérios; teste de Tukey; $p < 0,05$).

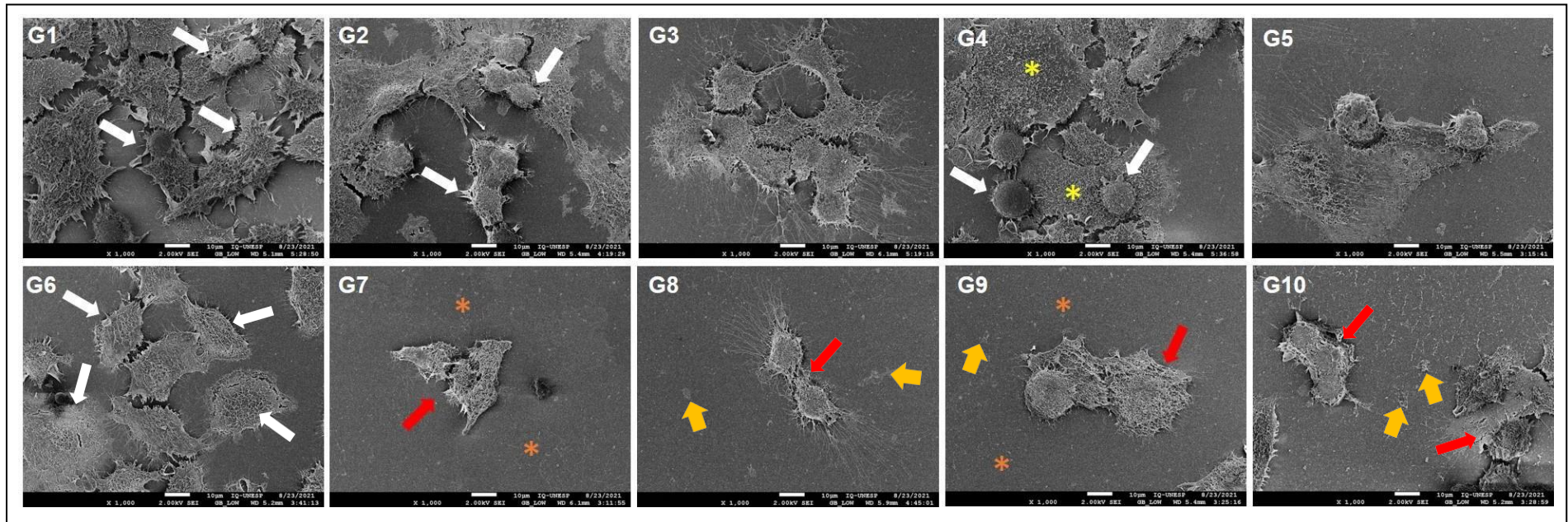
Fonte: Elaboração Própria

5.5 Morfologia celular (MEV)

A figura 17 é composta por fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, as quais são representativas da morfologia das células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos após a 1ª sessão do clareamento dental, para todos os grupos desse estudo. Nos grupos G1 (controle sem tratamento) e G2 (aplicação isolada do PPC), um grande número de células MDPC-23 expostas aos extratos se mantiveram aderidas ao substrato de vidro. Essas células exibiam amplo citoplasma do qual originava numerosos prolongamentos citoplasmáticos longos e finos, os quais pareciam manter as células em posição. Porém, a análise das imagens permitiu determinar a ocorrência de importantes alterações morfológicas e redução do número de células aderidas às lamínulas de vidro em todos os grupos clareados (G3 a G10), quando comparados aos grupos G1 e G2. As principais alterações morfológicas observadas foram caracterizadas pela redução no tamanho das células, as quais passaram a apresentar forma arredondada. Grande parte dessas células contraídas tiveram redução ou mesmo perda dos prolongamentos citoplasmáticos, sendo que em casos extremos as células acabaram se deslocando do substrato de vidro. Por outro lado, foi possível observar que essas alterações celulares foram menos acentuadas nos grupos onde os géis clareadores foram aplicados sobre esmalte previamente recoberto com o PPC (G4, G6, G8 e G10). Esse efeito positivo quando usado o PPC

foi ainda mais significativo para os géis clareadores com menor concentração de H_2O_2 (G4 – PPC+10% H_2O_2 e G6 – PPC+20% H_2O_2) quando comparado ao controle positivo (G9), onde um gel comercial com 35% de H_2O_2 foi aplicado diretamente sobre o esmalte, tal como recomendado para o clareamento convencional de consultório.

Figura 17 – Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais e controles (MEV, magnificação original x1000)



G1 (Controle Negativo), G2 (PPC): Muitas células MDPC-23 com amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos recobrem grande área da lamínula de vidro. Algumas células em mitose também são observadas (setas brancas). G3 (10% H_2O_2): Redução do número de células quando comparado a G1 (controle negativo). G4 (PPC+10% H_2O_2): Grande quantidade de células com amplo citoplasma (asteriscos) permanecem aderidas na lamínula. Apenas poucas células contraídas, com morfologia arredondada e praticamente sem prolongamentos citoplasmáticos (setas brancas) também são observadas na imagem. G5 (20% H_2O_2): Nota-se poucas células MDPC-23 com intensa alteração morfológica aderidas ao substrato. G6 (PPC+20% H_2O_2): Um maior número de células com amplo citoplasma (setas brancas) permaneceu aderida à lamínula de vidro quando comparado a G5, onde o gel clareador foi aplicado diretamente sobre o esmalte. G7 (35% H_2O_2), G8 (PPC+35% H_2O_2), G9 (35% H_2O_2 comercial), G10 (PPC+35% H_2O_2): Nesses grupos, onde um gel experimental e um gel comercial, ambos com 35% de H_2O_2 , foram aplicados sobre esmalte recoberto ou não com PPC, foi observado uma notável redução no número de células MDPC-23, o que fez com que amplas áreas do substrato de vidro fossem expostas (asteriscos). Restos de células mortas e que se descolaram do substrato ainda são vistos aderido no vidro (setas amarelas). As poucas células observadas nessas imagens exibem graves alterações morfológicas, desde contração e redução de tamanho, até graves rupturas de membrana (setas vermelhas).

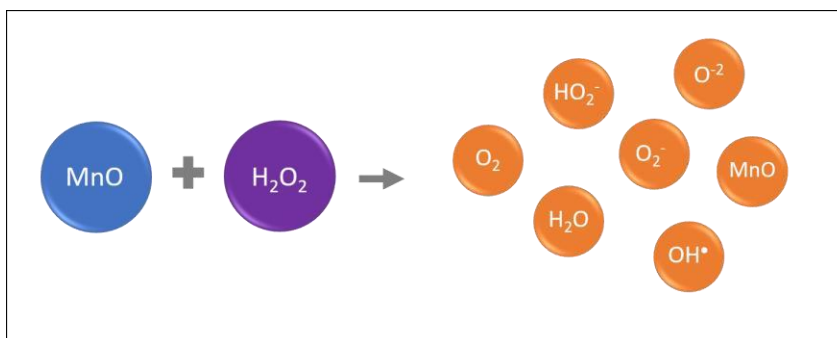
Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Efeito citotóxico intenso, causado pela alta concentração de H_2O_2 presente nos géis clareadores utilizados no clareamento dental de consultório, tem sido comumente relatado em pesquisas *in vivo* e *in vitro*^{15,20,93-95}. A gravidade desse efeito adverso parece estar diretamente relacionada com a quantidade de H_2O_2 capaz de se difundir pelo esmalte e dentina^{56,96}. Diversos pesquisadores mostraram que, uma vez em contato com as células pulpares, essas moléculas tóxicas causam, *in vitro*, grave lesão de membrana, redução na viabilidade e alteração na morfologia celular^{11-13,87}. Em estudos *in vivo*, o excesso de H_2O_2 na câmara pulpar resulta em intenso dano para a polpa, caracterizado por áreas de necrose na sua porção coronária e inflamação na região radicular^{15,16,59}. Desta forma, estabelecer estratégias clareadoras que apresentem eficácia estética, tal como àquela já alcançada com o tratamento convencional de consultório, porém sem causar danos para o tecido pulpar, é um desafio para pesquisadores que buscam por procedimentos clínicos seguros para os pacientes. No presente estudo, com o objetivo de prevenir, ou pelo menos minimizar os efeitos adversos causados pela terapia clareadora convencional de consultório, foi desenvolvido um primer polimérico catalisador (PPC), indicado para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador. Além de atuar como uma barreira física semi-permeável, a presença de um agente catalisador (MnO) no biopolímero, faria com que a degradação do H_2O_2 viesse gerar EROs mais potentes e de menor tempo de meia vida. Consequentemente, essas novas moléculas favoreceriam a alteração cromática dos dentes, sendo que a limitada quantidade de H_2O_2 capaz de alcançar a polpa não seria suficiente para causar graves efeitos tóxicos sobre as células locais.

A adição de agentes catalisadores em protocolos de clareamento dental convencionalmente empregados em consultório, onde são usados géis com elevada concentração de H_2O_2 , representa uma estratégia promissora no sentido de otimizar esta terapia estética^{14,94}. A utilização de catalisadores químicos derivados do manganês vem sendo relatada na literatura por diversos pesquisadores^{20,24,82}. Já foi demonstrado que catalisadores derivados do manganês participam do processo de catálise do H_2O_2 , promovendo sua degradação e gerando outras espécies reativas mais potentes²⁰. Essa ação do Óxido de Manganês (MnO) ocorre devido a fase mineral da molécula, a qual consegue catalisar o H_2O_2 por meio de uma reação do tipo Fenton, o que pode explicar, pelo menos em parte, a elevada produção de EROs³⁵ (Figura

18).

Figura 18 – Processo de decomposição do H_2O_2 mediado pelo MnO 

Fonte: Elaboração própria.

A interação do H_2O_2 com metais de transição, como o MnO , alcança resultados clareadores positivos devido à interferência dessas substâncias na energia de ativação do H_2O_2 na reação de dissociação⁹⁷. No presente estudo, os ensaios de cinética de degradação do gel clareador associado ao PPC demonstraram claramente o aumento da composição do H_2O_2 , tendo como consequência a elevação na geração de radicais OH^\bullet . Esses dados estão supostamente ligados aos altos valores de alteração cromática observados em todos os grupos onde o PPC foi usado para revestir o esmalte antes da aplicação dos géis clareadores (G4, G6, G8 e G10). Segundo Batista et al.⁸¹ (2011), a incorporação de um agente químico derivado do manganês em um gel clareador com 10% de peróxido de carbamida aumenta a eficácia clareadora do produto após 7 dias de tratamento. Os autores relataram que essa melhora estética pode ser resultado da formação de radicais com alto poder oxidativo, a partir da catálise do H_2O_2 mediada pelo manganês. Assim, as novas moléculas reativas geradas pela ação catalítica do manganês parecem ter favorecido a degradação dos cromóforos presentes no dente, o que conseqüentemente aumentou sua alteração cromática. Além disso, ao contrário de outros ativadores químicos, a catálise do H_2O_2 pelo manganês não gera subprodutos com potencial para comprometer o resultado clareador, tal como previamente demonstrado por Torres et al.⁸² (2010), os quais usaram catalisadores químicos derivados do ferro.

No presente estudo, para proceder as análises de cor inicial e a possível alteração cromática dos discos de esmalte/dentina após os diversos protocolos clareadores, foi utilizado um espectrofotômetro de reflexão UV. Esta metodologia, a

qual também foi empregada em diversos estudos prévios^{14,20,94}, diminui a subjetividade da análise realizada pelo avaliador⁹⁸, permitindo obter resultados mais precisos⁹⁹. Lançando mão desse protocolo laboratorial, foi possível realizar, na presente pesquisa, as análises de ΔE_{00} e ΔWI em todos os discos de esmalte/dentina, o que possibilitou determinar o resultado estético com maior segurança em comparação ao sistema CIELAB⁹⁰. Isto porque, além do ΔE_{00} permitir uma avaliação mais acurada da alteração cromática, devido à implementação de outras percepções da cor, a obtenção de altos valores do índice de clareamento (ΔWI) se correlaciona com protocolos de clareamento mais eficientes⁸⁹. Baseado nos dados obtidos na presente pesquisa, após a 1° e 3° sessões de clareamento, foi possível estabelecer que a eficácia clareadora (ΔE_{00}), bem como os valores de índice de clareamento (ΔWI) dos espécimes de todos os grupos onde o esmalte foi tratado com o PPC antes da aplicação do gel clareador (G4, G6, G8 e G10) foram estatisticamente superiores aos demais grupos onde o PPC não foi utilizado (G3, G5, G7 e G9). É importante destacar também, o resultado promissor obtido com relação ao índice de clareamento observado no grupo G4, no qual um gel com apenas 10% de H_2O_2 foi aplicado sobre o esmalte previamente tratado com o PPC. Neste grupo, em especial, a alteração cromática dos discos de esmalte/dentina foi similar àquela observada quando do uso de um gel com 35% de H_2O_2 (G7 e G9).

Apesar do excelente resultado estético obtido após 3 sessões de terapia clareadora, os dados de citotoxicidade foram determinados nesse estudo após uma única sessão. Isso aconteceu devido a limitação que a metodologia impõe quando se trabalha com moléculas reativas que se decompõem com o tempo. Assim, utilizar uma somatória de extratos obtidos após 3 sessões de clareamento realizadas com 72 h de intervalo entre elas, determinaria um erro grave. Desde que o H_2O_2 se degrada em poucas horas, os dados de citotoxicidade obtidos após 3 sessões iriam subestimar os reais efeitos das estratégias clareadoras avaliadas nesse estudo para todos os grupos onde os géis foram usados em associação ou não com o PPC. Considerando essa limitação metodológica, a análise da eficácia clareadora alcançada após 3 sessões de clareamento foi incluída no presente estudo apenas com o objetivo de acompanhar o possível efeito positivo contínuo da associação entre PPC e géis clareadores. Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar que o revestimento do esmalte com o PPC potencializa a ação clareadora dos géis de acordo com a repetição das sessões

clareadoras. Todavia, outros estudos seriam necessários para determinar se o aumento no número de sessões de clareamento também resultaria em maior citotoxicidade para as células pulpares.

É interessante destacar que os grupos G7 e G9 foram àqueles que apresentaram os maiores valores de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 em comparação aos grupos G3 e G5, onde géis com menores concentrações de H_2O_2 foram aplicados diretamente sobre o esmalte. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, onde os pesquisadores demonstraram que a difusão de H_2O_2 está diretamente relacionada com a concentração desta molécula presente no gel clareador^{13,100}. Por outro lado, o tratamento do esmalte com PPC antes da aplicação dos géis clareadores (G4, G6, G8 e G10), reduziu significativamente a difusão de H_2O_2 em comparação aos respectivos grupos, nos quais o PPC não foi usado (G3, G5, G7 e G9). O valor de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 observado no grupo G4 (PPC+10% H_2O_2) foi cerca de 5,1x menor em comparação aos grupos G7 e G9 (35% H_2O_2). Assim, foi possível estabelecer que o notável efeito protetor do primer se deve, pelo menos em parte, à presença do óxido de manganês na sua composição. Isso porque esse catalisador químico tem elevada capacidade de decompor o H_2O_2 , o que faz com que uma quantidade limitada desta molécula tóxica penetre o esmalte e alcance o permeável substrato dentinário subjacente. Desta forma, após interagir com os pigmentos orgânicos coloridos da dentina, uma reduzida concentração de free- H_2O_2 conseguiria alcançar a câmara pulpar¹⁰¹. Os resultados obtidos na presente pesquisa confirmam os interessantes dados científicos apresentados em estudos prévios, onde os autores observaram aumento da eficácia estética associado a redução na difusão de H_2O_2 quando catalisadores químicos à base de manganês foram adicionados em géis clareadores de consultório^{24,82}.

Em situações clínicas, sabe-se que componentes químicos liberados de materiais dentários e que se difundem através da dentina podem alcançar o tecido pulpar em quantidade suficiente para causar graves lesões teciduais^{102,103}. O primeiro grupo de células da polpa a entrar em contato com moléculas difundidas pela dentina é o de odontoblastos. Isso porque essas células pós-mitóticas originadas da crista neural se organizam, durante a odontogênese, em monocamada para revestir internamente toda dentina coronária e radicular¹⁰³. Dentro deste contexto, o odontoblasto passou a ser considerado a célula pulpar mais adequada para avaliar a

possível citocompatibilidade de materiais dentários e seus componentes lixiviados¹⁰². Porém, sabe-se que os odontoblastos, tal como os neurônios, são células especializadas terminais, e sendo assim, não se proliferam ou fazem mitose, o que limita o estabelecimento de culturas primárias de odontoblastos em laboratório¹⁰⁴. Para superar esta situação, pesquisadores passaram a desenvolver culturas imortalizadas de células com fenótipo de odontoblastos, as quais passaram a ser denominadas de células odontoblastóides¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A cultura imortalizada de células MDPC-23 foi inicialmente estabelecida por Hanks et al.¹⁰⁵ (1998), quando os autores demonstraram que estas células expressam sialoproteína (DSP) e fosforina (DPP) da dentina, apresentam atividade de fosfatase alcalina, bem como se organizam em nódulos epitelióides e exibem prolongamentos citoplasmáticos originados de seu citoplasma. Considerando estes fatos, células MDPC-23 foram usadas no presente estudo in vitro para avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de novas estratégias para obter protocolos de clareamento dental de consultório eficazes e mais seguros para aplicação clínica. Estas células também foram utilizadas para esta mesma finalidade em estudos laboratoriais anteriores de clareamento dental^{11-14,20,55,87,94}, bem como em pesquisas de citotoxicidade trans-dentinária de produtos e materiais dentários resinosos indicados para restauração adesiva de cavidades¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Os dados de viabilidade das células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos dos géis clareadores, os quais foram aplicados sobre o esmalte previamente tratado ou não com PPC, foram obtidos por meio do teste de alamarBlue. Este protocolo laboratorial, o qual reflete, de maneira indireta, o grau de citotoxicidade dos materiais dentários, tem sido amplamente utilizado há muitos anos devido a sua elevada sensibilidade^{12,94,112,113}. De maneira geral, foi observado na presente pesquisa que a viabilidade das células do grupo G4 (PPC+10%H₂O₂), após realizar 1 sessão de clareamento, foi cerca de 3,3 x maior em relação ao grupo G9 (p<0,05), o qual representou o tratamento clareador convencional realizado em consultório. Os grupos G8 e G10, onde o PPC foi usado em associação com os géis experimental e comercial com 35%H₂O₂, apresentaram viabilidade celular estatisticamente superior aos grupos G7 e G9 (p<0,05). Além disso, a utilização isolada do PPC sobre o esmalte (G2) não influenciou a viabilidade das células MDPC-23, tal como observado no grupo G1 (controle negativo; p<0,05). Diante disso, o PPC surge como um possível passo clínico a ser incorporado nos protocolos de clareamento dental de consultório com o objetivo de reduzir os danos celulares causados pela elevada concentração de free-H₂O₂ que

atinge a câmara pulpar. Soares et al.²⁰ (2019) avaliaram a eficácia clareadora e citotoxicidade trans-amelodentinária quando do uso de diferentes catalisadores químicos, incluindo substâncias derivadas do manganês. Os autores confirmaram o potencial desses ativadores químicos não apenas de otimizar o resultado estético, mas também de reduzir a toxicidade celular comumente causada pela aplicação de géis clareadores com elevadas concentrações de H₂O₂ diretamente sobre o esmalte.

Os efeitos biológicos positivos alcançados com a utilização do PPC também foram perceptíveis na análise de estresse oxidativo realizado nas células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos para cada grupo estabelecido neste estudo. Após 1 sessão de clareamento dental, foi possível observar redução de 27%, 34%, 32%, 36% no estresse oxidativo das células pertencentes aos grupos G4, G6, G8 e G10 (PPC foi usado), em comparação aos seus correspondentes G3, G5, G7 e G9, respectivamente (PPC não foi usado). Este resultado foi ainda mais expressivo para G4 (PPC+10%H₂O₂) em comparação aos grupos G7 (35%H₂O₂) e G9 (35%H₂O₂comercial), quando foi determinado redução de 62% e 64% no EOx, respectivamente. Apesar da menor tendência de estresse oxidativo ter ocorrido no grupo G4, este dano celular não diferiu estatisticamente daquele observado em G6 (PPC+20%H₂O₂), indicando que a diminuição da concentração de H₂O₂ no gel clareador também pode ser uma alternativa interessante para reduzir a citotoxicidade da terapia clareadora de consultório. Entretanto, estudos prévios demonstraram que a redução da quantidade de H₂O₂ nos géis clareadores afetou a eficácia clareadora do tratamento^{56,114}. Na presente pesquisa, foi observado que a aplicação do gel clareador com 20% de H₂O₂ sobre o esmalte previamente tratado com PPC (G6), apresentou valores de ΔE_{00} e ΔWI semelhante aos grupos G7 (35%H₂O₂) e G9 (35%H₂O₂comercial), tal como ocorreu para G4. Porém, o efeito citotóxico trans-amelodentinário em G6 foi estatisticamente superior àquele determinado para o grupo G4. Considerando esses interessantes dados e associando-os ao fato de que a alteração cromática observada em G4 foi estatisticamente semelhante a G8 e G10 ($p > 0,05$), é possível sugerir que o revestimento do esmalte com o PPC antes da aplicação do gel com 10% de H₂O₂ pode caracterizar uma estratégia clareadora de consultório mais biocompatível com o complexo dentina-polpa.

Todos os testes realizados para avaliar a resposta de células pulpares, difusão de free-H₂O₂ e alteração cromática, frente ao uso de agentes clareadores com diferentes concentrações de H₂O₂ e aplicados em associação ou não ao PPC, usaram

discos de esmalte/dentina bovinos, os quais foram adaptados em câmara pulpares artificiais (CPAs). O emprego de discos de esmalte/dentina obtidos de dentes bovinos íntegros tem sido amplamente relatado em diversos estudos para análise do efeito estético e trans-amelodentinário de variados protocolos de clareamento dental^{11-14,61,87,94,96}. O uso de amostras de dentes bovinos se deve à dificuldade na obtenção de dentes humanos que atendam aos parâmetros do estudo, bem como às questões éticas envolvidas no uso de dentes humanos^{115,116}. Porém, diversos estudos demonstraram similaridade quanto as características químicas e morfológicas dos dentes bovinos em comparação aos dentes humanos, o que torna seguro e confiável os dados de pesquisas realizadas em dentes bovinos^{117,118}. Já foi demonstrado que a espessura do esmalte/dentina tem relação indireta com a quantidade de H₂O₂ que se difunde por esses tecidos duros do dente e conseqüentemente com a intensidade do efeito citotóxico trans-amelodentinário¹³. Num estudo clínico com avaliação microscópica do complexo dentina-polpa de dentes humanos submetidos ao clareamento de consultório, de Souza Costa et al.¹⁵ (2010) demonstraram a ocorrência de danos irreversíveis na polpa de incisivos inferiores, sendo que apenas discretas alterações teciduais aconteceram em pré-molares. Assim, dentes com reduzida espessura de esmalte e dentina caracterizam um grande desafio contra os efeitos agressivos de agentes clareadores com elevada concentração de H₂O₂. Conseqüentemente, com o objetivo de simular uma condição clínica desafiadora, em todas as etapas deste estudo laboratorial foram utilizados discos bovinos com espessura padronizada em 2,3 mm, tal como ocorre nos incisivos inferiores humanos¹³. Mais recentemente, diversos pesquisadores também passaram a utilizar discos de esmalte/dentina bovino com espessura de 2,3 mm para avaliar os efeitos de variados protocolos de clareamento comumente utilizados em clínica, bem como novas estratégias para obter procedimentos clareadores eficazes e seguros para os pacientes^{14,20,87,94}.

De maneira geral, a completa execução deste estudo permitiu demonstrar que a utilização de um primer polimérico contendo 10mg/mL de MnO como agente catalisador do H₂O₂, pode ser uma alternativa promissora para reduzir os danos pulpares causados por géis clareadores de consultório. Independente da concentração de H₂O₂ presente no gel clareador, a estratégia de catalisar essa molécula com MnO foi capaz de potencializar a alteração cromática dos tecidos dentários logo após a primeira sessão clareadora de 45 minutos. Foi interessante

observar também, que o resultado estético obtido após catálise do gel com 10% de H₂O₂ foi semelhante àquele alcançado com clareamento dental convencionalmente usado em consultório. Para essa terapia profissional, a difusão trans-amelodentinária de H₂O₂ foi cerca de 5 x maior do que àquela observada para o gel clareador com 10% de H₂O₂ associado ao biopolímero. Conseqüentemente, os efeitos citotóxicos causados pelo clareamento de consultório, representado nesse estudo pelo grupo G9, foram significativamente superiores ao observado para o grupo G4 (PPC+10%H₂O₂).

Apesar dos relevantes dados científicos obtidos nesse estudo laboratorial, algumas importantes limitações devem ser consideradas nesse momento. Uma delas se refere ao uso de discos de esmalte/dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais para simular, in vitro, condições fisiológicas de dentes vitais expostos a distintos tratamentos. Sabe-se que resultados obtidos por meio do emprego deste tipo de pesquisa laboratorial não devem ser diretamente extrapolados para situações clínicas^{102,103}. Isso porque, diferente do que acontece em estudos in vitro, dentes vitais exibem no interior de seus túbulos dentinários, diversas proteínas, entre elas o colágeno, bem como prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos¹¹⁹, os quais dificultam a difusão de componentes tóxicos liberados pelos materiais dentários até o tecido pulpar. Além dessas estruturas, a exsudação do fluido dentinário rico em proteínas de baixo peso molecular que acontece em dentes vitais, também pode impedir, ou pelo menos reduzir, a chegada na polpa de componentes lixiviados dos materiais dentários^{120,121}. Assim, futuros estudos clínicos são necessários para confirmar os excelentes resultados obtidos nessa pesquisa laboratorial, de tal forma que a estratégia de catálise do gel clareador possa ser clinicamente usada na busca de estabelecer protocolos de clareamento mais rápidos e seguros para os pacientes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada no presente estudo, foi possível concluir que o tratamento do esmalte com um primer polimérico catalisador (PPC) antes da aplicação, por 45 minutos, de géis clareadores com diferentes concentrações de H_2O_2 , otimiza a eficácia estética e reduz a difusão trans-amelodentinária desta molécula tóxica, o que limita os danos causados sobre as células odontoblastóides MDPC-23.

REFERÊNCIAS*

1. Moghadam FV, Majidinia S, Chasteen J, Ghavamnasiri M. The degree of color change, rebound effect and sensitivity of bleached teeth associated with at-home and power bleaching techniques: a randomized clinical trial. *Eur J Dent.* 2013; 7(4): 405-11.
2. 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–e33.
3. Basting RT, Amaral FL, França FM, Flório FM. Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents. *Oper Dent.* 2012; 37(5): 464-73.
4. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2012; 25(4): 199-204.
5. 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.
6. Martins I, Onofre S, Franco N, Martins LM, Montenegro A, Arana-Gordillo LA et al. Effectiveness of in-office hydrogen peroxide with two different protocols: a two-center randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2018; 43(4): 353-61.
7. Mounika A, Mandava J, Roopesh B, Karri G. Clinical evaluation of color change and tooth sensitivity with in-office and home bleaching treatments. *Indian J Dent Res.* 2018; 29(4): 423-7.
8. Martini EC, Parreiras SO, Szesz AL, Coppla FM, Loguercio AD, Reis A. Bleaching-induced tooth sensitivity with application of a desensitizing gel before and after in-office bleaching: a triple-blind randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(1): 385-94.
9. Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO et al. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod.* 2008; 34(8): 983-9.

* 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>

10. Benetti F, Briso ALF, de Araújo Lopes JM, Carminatti M, Conti LC, Gallinari MO et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45-cells in the pulp of bleached teeth. *Int Endod J.* 2019; 52(12): 1723-1737
11. de Oliveira 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; 18(6): 1631-7.
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. 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.
14. 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.
15. de Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 59-64.
16. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, 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.
17. 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.
18. Markowitz K. Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74(5): 835-40.
19. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human pulpal responses to peroxides. In: Perdigão J. *Tooth Whitening — An evidence-based perspective.* Springer. 2016.
20. Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Zuta UO, Basso FG 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.
21. 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.

22. Carey CM. Tooth whitening: What we now know. *J Evid Based Dent Pr.* 2014; 14: 70-6.
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. Torres CR, Souza CS, Borges AB, Huhtala MF, Caneppele TM. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues *in vitro*. *Sci World J.* 2013; 2013: 193241.
25. Al-Omiri MK, Al Nazeh AA, Kielbassa AM, Lynch E. Randomized controlled clinical trial on bleaching sensitivity and whitening efficacy of hydrogen peroxide versus combinations of hydrogen peroxide and ozone. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 2407.
26. Sun B, Guan X, Fang J, Tratnyek PG. Activation of manganese oxidants with bisulfite for enhanced oxidation of organic contaminants: the involvement of Mn (III). *Environ Sci Technol.* 2015; 49(20): 12414-21.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Martin JH, Bishop JG, Guentherman RH, Dorman HL. Cellular response of gingiva to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. *J Periodontol.* 1968; 39: 208-10.
31. Rees TD, Orth CF. Oral ulcerations with use of hydrogen peroxide. *J Periodontol.* 1986; 57: 689-2.
32. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989; 20(3): 173-6.
33. Demarco FF, Meireles SS, Masott AS. Over-the-counter whitening agents: A concise review. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 64-70.
34. Maghaireh GA, Alzraikat H, Taha NA. Satisfaction with dental appearance and attitude toward improving dental esthetics among patients attending a dental teaching center. *J Contemp Dent Pract.* 2016; 17: 16-21.

35. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: A review of the literature. *Braz Dent J.* 2001; 190(6): 309-16.
36. Alkahtani R, Stone S, German M, Waterhouse P. A review on dental whitening. *J Dent.* 2020; 100: 103423.
37. Alqahtani MQ. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dent J.* 2014; 26(2): 33-46.
38. Joiner A, Jones NM, Raven SJ. Investigation of factors Influencing stain formation utilizing an in-situ model. *Adv Dent. Res.* 1995; 9(4): 471-6.
39. Li Y. Stain removal and whitening by baking soda dentifrice: A review of literature. *J Am Dent Assoc.* 2017; 148(11S): S20-S26.
40. Kwon SR, Wertz PW, Li Y, Chan DC. Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin: confocal laser microscopy observation. *Int J Cosmet Sci.* 2012; 34(1) :97-101.
41. Kwon SR, Wertz PW. Review of the mechanism of tooth whitening. *J Esthet Restor Dent.* 2015; 27(5): 240-57.
42. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33(9): 1074-7.
43. Pinto MM, Goncalves ML, Mota AC, Deana AM, Olivian SR, Bortoletto C et al. Controlled clinical trial addressing teeth whitening with hydrogen peroxide in adolescents: a 12- month follow-up. *Clinics.* 2017; 72(3): 161-70.
44. American Dental Association (ADA). Tooth whitening/bleaching: Treatment considerations for dentists and their patients. Chicago: ADA Council on ScientificAffairs. 2009.
45. Dawson PF, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy and sensitivity of home vs combined whitening. *Oper Dent.* 2011; 36(5): 460-6.
46. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa CA. Tooth whitening: Complications from the use of peroxides. Switzerland: Springer. 2016; 45-79.
47. Amengual J, Forner L. Dentine hypersensitivity in dental bleaching: case report. *Minerva Stomatol.* 2009; 58(4): 181-5.
48. Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent.* 2013; 41(4): 363-9.

49. 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.
50. Pintado-Palomino K, Peitl Filho O, Zanotto ED, Tirapelli C. A clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. *J Dent.* 2015; 43(9): 1099-105.
51. Maran BM, Vochikovski L, de Andrade Hortkoff DR, Stanislawczuk R, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity with a desensitizing-containing at-home bleaching gel-a randomized triple-blind clinical trial. *J Dent.* 2018; 72: 64-70.
52. Rezende M, da Silva KL, Miguel TC, Farago PV, Loguercio AD, Martins LD et al. Prior application of 10% potassium nitrate to reduce postbleaching sensitivity: A randomized triple-blind clinical trial. *J Evid Based Dent Pract.* 2020; 20(2): 101406.
53. Silva LMAV, Cintra LTA, Gallinari MO, Benetti F, Rahal V, Ervolino E et al. Influence of pain-relieving therapies on inflammation and the expression of proinflammatory neuropeptides after dental bleaching treatment. *Restor Dent Endod.* 2020; 45(2): e20.
54. Parreiras SO, Favoreto MW, Lenz RE, Serra ME, Borges CPF, Loguercio AD et al. Effect of prior application of desensitizing agent on the teeth submitted to in-office bleaching. *Braz. Dent. J.* 2020; 31(3): 236-43.
55. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(8): 1901-09.
56. 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; 42:185-98.
57. 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.
58. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992; 18(7): 315-7.
59. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Gallinari MO et al. Penetration capacity, color alteration and biological response of two in-office bleaching protocols. *Braz Dent J.* 2016; 27(2): 169-75.
60. Abbasi M, Pordel E, Chiniforush N, Firuzjaee SG, Omrani LR. Hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber during conventional in-office bleaching and diode laser-assisted bleaching with three different wavelengths. *Laser Ther.* 2019; 28(4): 285-90.

61. Barbosa JG, Benetti F, de Oliveira Gallinari M, 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 Investig*. 2020; 24(3): 1299-309.
62. Guan R, Yuan X, Wu Z, Jiang L, Li Y, Zeng G. Principle and application of hydrogen peroxide based advanced oxidation processes in activated sludge treatment: a review. *Chem Eng J*. 2018; 339: 519-530.
63. Baroudi K, Hassan NA. The effect of light-activation sources on tooth bleaching. *Niger Med J*. 2014; 55(5): 363-8.
64. Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J Am Dent Assoc*. 2004; 135: 194-201.
65. Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 72: 254-9.
66. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: An in vitro study. *Braz Dent J*. 2005; 199: 37-40.
67. Gonçalves RS, Costa CA, Soares DG, dos Santos PH, Cintra LT, Briso AL. Effect of different light sources and enamel preconditioning on color change, H₂O₂ penetration, and cytotoxicity in bleached teeth. *Oper Dent*. 2016; 41(1): 83- 92.
68. Parlar Oz O, Demirkol N. Effectiveness of in-office bleaching treatment with different activation techniques on tooth color changes and sensitivity: A randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2021; 34(1): 23-30.
69. Nam SH, Choi BBR, Kim GC. The whitening effect and histological safety of nonthermal atmospheric plasma Inducing tooth bleaching. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(9): 4714.
70. Lago ADN, Ferreira WDR, Furtado GS. Dental bleaching with the use of violet light only: Reality or Future? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 17: 124-126.
71. Kury M, Resende BA, Silva DP, Wada EE, Antonialli FM, Giannini M et al. Clinical application of violet LED in-office bleaching with or without traditional systems: case series. *Oral Health Dent Stud*. 2019; 2(1): 1.
72. Kury M, Wada EE, Silva DP, 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.
73. Zanin F. Recent advances in dental bleaching with laser and LEDs. *Photomed Laser Surg*. 2016; 34(4): 135-6.
74. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser-a systematic review. *Dent Mater*. 2007; 23(5): 586-96.

75. Rastelli ANS, Dias HB, Carrera ET, de Barros ACP, Dos Santos DDL, Panhóca VH et al. Violet LED with low concentration carbamide peroxide for dental bleaching: a case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 23: 270-2.
76. Gallinari MO, Cintra LTA, Souza MBA, Barboza ACS, Esteves LMB, Fagundes TC et al. Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: a case series with split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27: 59-65.
77. 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.
78. Daltro TWS, Almeida SAG, Dias MF, Lins-Filho PC, Silva CHV, Guimarães RP. The influence of violet LED light on tooth bleaching protocols: in vitro study of bleaching effectiveness. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2020; 32: 102052.
79. Barboza ACS, Dos Santos PH, do Vale LR, de Oliveira Gallinari M, Assmann A, Vidal CMP et al. Dental bleaching with violet LED: effects on dentin color change, resin-dentin bond strength, hybrid layer nanohardness and dentinal collagen biostability. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2021; 33: 102141.
80. 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.
81. Batista G, Barcellos D, Torres C, Goto E, Pucci C, Borges AB. The influence of chemical activation on tooth bleaching using 10% carbamide peroxide. *Oper Dent.* 2011; 36(2): 162-8.
82. 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.
83. Vandieken V, Pester M, Finke N, Hyun JH, Friedrich MW, Loy A et al. Three manganese oxide rich marine sediments harbor similar communities of acetate-oxidizing manganese reducing bacteria. *ISME J.* 2012; 6(11): 2078-90.
84. Najafpour MM, Abbasi Isaloo M. The mechanism of water oxidation catalyzed by nanolayered manganese oxides: new insights. *J Photochem Photobiol B.* 2015; 152(Pt A): 133-8.
85. Johnson JE, Savalia P, Davis R, Kocar BD, Webb SM, Nealson KH, Fischer WW. Real-time manganese phase dynamics during biological and abiotic manganese oxide reduction. *Environ Sci Technol.* 2016; 50(8): 4248-58.

86. Ribeiro RAO. Eficácia clareadora, citotoxicidade trans-amelodentinária e cinética de degradação de géis clareadores contendo óxido de manganês [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2020.
87. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso A, 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.
88. Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ, Bona AD, Igiel C, Linninger M et al. Color difference thresholds in dentistry. *J Esthet Restor Dent*. 2015; 27(Suppl 1): S1-9.
89. Pérez Mdel M, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD et al. Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dent Mater*. 2016; 32(3): 461-7.
90. Paravina RD, Pérez MM, Ghinea R. Acceptability and perceptibility thresholds in dentistry: A comprehensive review of clinical and research applications. *J Esthet Restor Dent*. 2019; 31(2): 103-12.
91. Leite MLAS, de Souza Costa CA, Duarte RM, Andrade AKM, Soares DG. Bond strength and cytotoxicity of a universal adhesive according to the hybridization strategies to dentin. *Braz Dent J*. 2018; 29(1) :68-75.
92. 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.
93. Llana C, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Martínez CM, Moraleta JM et al. Comparison of diffusion, cytotoxicity and tissue inflammatory reactions of four commercial bleaching products against human dental pulp stem cells. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 7743.
94. Ortecho-Zuta U, De Oliveira Duque CC, Oliveira Ribeiro RA, Leite ML, Soares DG, Hebling J et al. Polymeric biomaterials maintained the esthetic efficacy and reduced the cytotoxicity of in-office dental bleaching. *J Esthet Restor Dent*. 2021; 33(8): 1139-49.
95. Felipe Akabane ST, Danelon M, Nunes GP, Gruba AS, de Souza Costa CA, 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.
96. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 116-25.
97. Travassos AC, Torres CR, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010; 35: 8.

98. Derdilopoulou FV, Zantner C, Neumann K, Kielbassa AM. Evaluation of visual and spectrophotometric shade analyses: a clinical comparison of 3758 teeth. *Int J Prosthodont.* 2007; 20: 414-6.
99. Paul S, Peter A, Pietrobon N, Hammerle CH. Visual and spectrophotometric shade analysis of human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81: 578-82.
100. 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.
101. Yao S, Yuan S, Xu J, Wang Y, Luo J, Hu S. A hydrogen peroxide sensor based on colloidal MnO₂/Na-montmorillonite. *Appl Clay Sci.* 2006; 33: 35-42.
102. 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.
103. de Souza Costa CA. Biological aspects of dental material. *J Adhes Dent.* 2020; 22: 540-4.
104. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1): 51-68.
105. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(Suppl 1): 260-6.
106. Ching HS, Luddin N, Rahman IA, Ponnuraj KT. Expression of odontogenic and osteogenic markers in DPSCs and SHED: A Review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017; 12(1): 71-9.
107. Baldi3n PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol.* 2018; 2018: 6853189.
108. de Souza Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent.* 2003; 28(4): 365-70.
109. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Al3cio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
110. Leite ML, Soares DG, de Oliveira Duque CC, Bordini EAF, Anovazzi G, Basso FG et al. Positive influence of simvastatin used as adjuvant agent for cavity lining. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(9): 3457-3469.

111. Zimmer R, Leite ML, de Souza Costa CA, Hebling J, Anovazzi G, Klein-Junior CA et al. 2021. "Effect of time and temperature of air jet on the mechanical and biological behavior of a universal adhesive system". *Oper Dent*. Ahead of print, Accepted Manuscript. <https://doi.org/10.2341/20-038-L>.
112. Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol*. 1993; 3(3): 473-6.
113. de Fries R, Mitsuhashi M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal*. 1995; 9(2): 89-95.
114. Estay J, Angel P, Bersezio C, Tonetto M, Jorquera G, Peña M et al. The change of teeth color, whiteness variations and its psychosocial and self-perception effects when using low vs. high concentration bleaching gels: a one-year follow-up. *BMC Oral Health*. 2020; 20: 255.
115. Horsophonphong S, Sercia A, França CM, Tahayeri A, Reddy AP, Wilmarth PA et al. Equivalence of human and bovine dentin matrix molecules for dental pulp regeneration: proteomic analysis and biological function. *Arch Oral Biol*. 2020; 119: 104888.
116. Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of de-mineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(3): 841-9.
117. 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.
118. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(5): 768-75.
119. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, composition and mineralization. *Front Biosci*. 2011; 3: 711-35.
120. da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(7): 1559-66.
121. D'Alpino PHP, Moura GEDD, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD et al. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dent Mater*. 2017; 33(12): 1402-15.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Journal of Esthetic and Restorative Dentistry
Research Article

A new approach for professional dental bleaching using a polymeric catalyst primer

Submission Status Under Review
Manuscript ID JERD--03-22-040
Submitted On 26 March 2022 by Carlos Costa
Submission Started 25 March 2022 by Carlos Costa

This submission is under consideration and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from ScholarOne.

[View Submission Overview](#)

ANEXO B – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

**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, 18 de janeiro de 2022.

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

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 05 de abril de 2022.

Marlon Ferreira Dias