

**MARIANA PRETTI NAKÁO**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREADORES  
DENTAIS DE USO PROFISSIONAL VARIANDO O MECANISMO DE  
ATIVAÇÃO, EM FIBROBLASTOS DE POLPA HUMANA**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de São José dos Campos,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de MESTRE, pelo Programa de  
Pós-Graduação em ODONTOLOGIA  
RESTAURADORA, Área Endodontia.**

**MARIANA PRETTI NAKÁO**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREADORES  
DENTAIS DE USO PROFISSIONAL VARIANDO O MECANISMO DE  
ATIVÇÃO, EM FIBROBLASTOS DE POLPA HUMANA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área Endodontia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Adj. MARCIA CARNEIRO VALERA

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Nakáo, Mariana Pretti

Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores dentais de uso profissional variando o mecanismo de ativação, em fibroblastos de polpa humana / Mariana Pretti Nakáo; orientador Marcia Carneiro Valera. \_ São José dos Campos, 2007.  
76p.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2007.

1. Endodontia – 2. Cultura de células – 3. Clareamento

## AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos,     /     /

Assinatura:

E-mail: marianapretti@yahoo.com.br

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nakáo MP.** Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores de uso profissional variando o mecanismo de ativação, sobre fibroblastos de polpa humana [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2007.

São José dos Campos, 15 de maio de 2007.

### Banca examinadora

1) Prof.(a).Dr.(a):

\_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof.(a).Dr.(a):

\_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof.(a).Dr.(a)

\_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho ao meu querido avô, que certamente está orgulhoso  
de mim, onde quer que ele esteja.

## **AGRADECIMENTOS**

Senhor, obrigada por me dar forças para chegar até aqui. Obrigada por sempre providenciar até aquilo que eu ainda não pedi. Obrigada por iluminar a minha vida, me mostrando o caminho a seguir. Mas principalmente, obrigada pela minha família, em especial meus pais, meu irmão, meu marido e minha filha, que são os maiores presentes que eu poderia receber.

Aos meus pais:

Se hoje estou colhendo os frutos, é porque vocês souberam plantar a semente e cuidar da muda. Aliás, vocês fizeram mais que isso, me ensinaram também a plantar minhas próprias sementes.

PAPAI e MAMÃE, é difícil expressar em palavras aquilo que passa pelo meu coração. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. E eu não digo isso pelo fato de serem meus progenitores, ou de me auxiliarem materialmente, embora isso também seja motivo de gratidão. Digo isso porque vocês são ao mesmo tempo o meu espelho e o meu apoio. O que eu tenho a dizer é que vocês são pais maravilhosos, e que agradeço a Deus todos os dias por ter nascido nesta família. Obrigada por serem meus pais. Eu amo muito vocês!

Ao meu marido, RODRIGO, obrigada por estar sempre ao meu lado e por me ajudar e apoiar em todos os momentos. Pela paciência de ficar tantos finais de semana sem mim, ou aguentando o meu cansaço e mau humor. Obrigada por ser um marido e pai maravilhoso. Mas, principalmente, obrigada pelo seu amor. Amo você!

À minha filhinha, PAULA, obrigada por existir. E obrigada por ser essa criatura tão carinhosa, abençoada e amada. Obrigada por ajudar e cuidar da mamãe. Por compreender as noites trabalhando e os dias de cansaço. Obrigada por me fazer rir e por me dar ânimo. Você é a razão do meu viver. Eu te amo, minha florzinha!

Ao meu irmão, SÉRGIO, obrigada pelas brincadeiras, carinhos e brigas. Obrigada por cuidar da sua sobrinha e da sua irmã também. E obrigada por dividir as tardes no computador comigo. Te amo irmão!

A toda a minha família obrigada pelo apoio e incentivo sempre. Vocês são muito amados por mim.

À minha orientadora:

MARCIA, você sempre foi pra mim um exemplo, uma mulher ao mesmo tempo forte e meiga, mãe não só do Emmanuel, mas um pouco mãe de cada um dos seus alunos. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de aprender um pouco mais com você, não só sobre odontologia, mas também sobre a vida. Espero ter sido uma orientada à altura. Obrigada.

Às “MENINAS DA ENDO”:

O que no começo era pura incerteza, medo e saudade acabou gerando uma bela amizade. Mais do que amigas, acho que formamos ao longo destes dois anos uma família, sempre cuidando umas das outras. Cada uma a seu modo, exercemos papéis importantes em diversos momentos no decorrer do curso. Alternávamos quem estava a ponto de desistir e quem estava lá para apoiar. Aprendi coisas muito importantes com todas vocês. Os almoços, os aniversários, os choros, as risadas, as caronas, a Vitória, os momentos difíceis. Foram tantas as coisas pelas quais passamos juntas que às vezes tenho dúvidas se tudo realmente aconteceu em menos de dois anos. Alessandra, Elaine, Giovana, Lecy, Lilian, Manuela, Selma e Paula (que chegou depois, mas conquistou seu espaço), sempre haverá um lugar reservado para vocês no meu coração. Espero que continuem a fazer parte também da minha vida.

Josi, obrigada pela amizade e por tantos favores. Embora você não seja uma das ‘meninas da endo’, o que eu escrevi para elas também serve para você.

Ique e Samira, embora não possam estar presentes, tenho certeza que estão torcendo por mim. Obrigada por tudo.

Agradeço ao professor Dr. Ivan, da disciplina de Bioestatística, pela ajuda na estatística, pela paciência e pelas balinhas.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos por continuar sendo a minha casa. Em especial à Disciplina de Endodontia, que me acolheu, e a todos os professores e funcionários do departamento.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial à professora Dra. Nadir, responsável pela disciplina de Bioquímica, agradeço pelo uso do laboratório e auxílio em algumas etapas da pesquisa.

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida, que viabilizou a realização deste trabalho (Processo nº 05/58617-7).

Agradeço à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por abrir as portas para a realização desta pesquisa. Em especial à professora Adj. Márcia Marques, da disciplina de Endodontia, que permitiu a utilização do Laboratório de Cultura de Células e me auxiliou durante toda a realização deste trabalho. À Daiane, aluna de mestrado da FOU SP, que acompanhou meus primeiros passos na cultura de células, agradeço pela disponibilidade, atenção e paciência. Muito Obrigada.

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....  | 11 |
| RESUMO.....  | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 13 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....   | 18 |
| 3 PROPOSIÇÃO.....  | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO.....   | 27 |
| 4.1 Cultivo das células.....   | 27 |
| 4.1.1 Descongelamento .....  | 28 |
| 4.1.2 Troca de meio.....   | 29 |
| 4.1.3 Subcultura.....  | 29 |
| 4.1.4 Contagem de células.....   | 31 |
| 4.2 Plaqueamento.....  | 33 |
| 4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular..... | 34 |
| 4.4 Divisão dos grupos experimentais.....                                  | 35 |
| 4.5 Condicionamento dos meios de cultivo.....                              | 35 |
| 4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular.....                    | 38 |
| 4.7 Quantificação do peróxido de hidrogênio.....                           | 39 |
| 4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio.....                          | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 4.7.2 Levantamento da curva padrão.....   | 43 |
| 4.7.3 Mensuração do peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais . | 47 |
| 5 RESULTADOS.....   | 48 |
| 5.1 Avaliação da inibição da atividade enzimática.....                            | 48 |
| 5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio.....                                  | 50 |
| 5.3 Análise estatística.....  | 50 |
| 5.3.1 Estatística descritiva.....   | 51 |
| 5.3.2 Teste de Dunnet.....  | 57 |
| 5.3.3 ANOVA.....  | 57 |
| 5.3.4 Teste de Tukey.....   | 58 |
| 6 DISCUSSÃO.....  | 61 |
| 7 CONCLUSÕES.....   | 69 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 70 |
| ANEXOS.....   | 75 |
| <i>ABSTRACT</i> .....   | 76 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PH= Peróxido de Hidrogênio

FP5= Fibroblastos de polpa de gérmen dental humano

DMEM= *Dubelcco's Modified Eagle Medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

LED= *Light Emissor Diode* (Diodo Emissor de Luz)

MTT= brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium

ANOVA= Análise de Variância

pH= potencial hidrogeniônico

IVPD= *In Vitro Pulpal Device* (câmara pulpar *in vitro*)

HO-1= *Human Heme Oxygenase-1* (Heme Oxigenase Humana)

PBS= *Phosphate Buffer Solution* (Solução Tampão Fosfato)

µl= microlitros

NADH= nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada

SDS= *Sodium Dodecyl Sulfate*

nm= nanômetros

p.a.= pró análise

SDS= *Sodium Dodecyl Sulfate*

M= Molar

N= Normal

M/l= Mols por litro

µg= microgramas

Fc= Fator de calibração

HP= *hydrogen peroxide*

Nakáo MP. Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores de uso profissional variando o mecanismo de ativação, sobre fibroblastos de polpa humana [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2007.

## RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (PH) liberado por dois géis clareadores, utilizados para a técnica de consultório, sobre cultura de fibroblastos de polpa humana (FP5). As células foram cultivadas em DMEM. Foram utilizadas células entre a quinta e décima passagens. Colocou-se sobre as células meios de cultura condicionados de acordo com os grupos de estudo (n=4): G1- PH 35% sem fotoativação; G2- PH 35% ativado por luz alógena; G3- PH 35% ativado por diodo emissor de luz (LED); G4- PH 38% sem fotoativação; G5- PH 38% ativado por luz alógena; G6- PH 38% ativado por LED. Uma curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida a partir de células que não receberam tratamento (controle). O ensaio com MTT ocorreu após 0, 24 e 48 horas, para avaliar a viabilidade e crescimento celular. Paralelamente, mediu-se colorimetricamente a quantidade de PH liberado nas condições experimentais, utilizando-se solução tampão de acetato no lugar do meio de cultura. Os dados foram analisados através do teste de Dunnet, ANOVA e teste de Tukey. Todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O PH 38% apresentou maior citotoxicidade e quantidade de peróxido de hidrogênio liberada que o PH 35% nas condições experimentais. A ativação por luz alógena ocasionou maior citotoxicidade e maior quantidade de PH liberado, e a ativação com LED foi estatisticamente semelhante à ausência de ativação. A avaliação após 48 horas apresentou diferença estatística das avaliações de 0 e 24 horas. Concluiu-se que: a citotoxicidade foi proporcional à concentração do agente clareador; a fotoativação com luz alógena aumentou a liberação de peróxido de hidrogênio, e o metabolismo celular foi menor imediatamente após o contato com o meio condicionado, aumentando após 24 e/ou 48 horas.

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

## 1 INTRODUÇÃO

O clareamento dental vem sendo utilizado como artifício para melhorar a estética do sorriso desde o fim do século XIX (Suliman et al.<sup>37</sup>, Dostalova et al.<sup>15</sup>). Mas foi na década de 80 que as técnicas para tornar os dentes mais claros se difundiram, tornando-o um dos procedimentos estéticos dentais mais populares (Papathanasiou et al.<sup>31</sup>). Cosmética e estética estão relacionadas com dentes brancos, sendo o clareamento dental uma importante alternativa para atingir tal objetivo (Sydney et al.<sup>40</sup>), já que o clareamento corrige ou melhora a cor dos dentes, com baixo custo (Dostalova et al.<sup>15</sup>).

O clareamento de dentes com vitalidade pulpar pode ser realizado em consultório ou ser administrado pelo próprio paciente (clareamento caseiro), ou ainda ser utilizado em associação, consultório e caseiro. Para isto, utilizam-se os peróxidos de carbamida ou hidrogênio em concentrações que variam de 10-37% e 3-38%, respectivamente (Valera et al.<sup>44</sup>).

Associado ao aumento da demanda de pacientes, ao grande número de produtos para clareamento que têm chegado ao mercado e aos sistemas clareadores de venda direta ao consumidor, facilmente adquiridos, verifica-se o aumento do uso do produto sem supervisão profissional. Ainda, o desejo de acelerar o processo de clareamento faz com que o paciente use maior quantidade do produto ou utilize-o por um período além do recomendado (Cooper et al.<sup>10</sup>), o que não gera resultados necessariamente melhores. Esta procura por resultados rápidos também se reflete no uso de altas concentrações de peróxido de

hidrogênio. De acordo com Auschill et al.<sup>3</sup>, a comparação entre clareamento caseiro com peróxido de carbamida 10%, tiras clareadoras de venda direta ao consumidor e clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio 38% mostrou resultados semelhantes, entretanto o número de sessões necessárias para atingir o resultado desejado variou. Virtualmente, os resultados obtidos com todas as técnicas de clareamento são semelhantes, já que o mecanismo de ação dos agentes clareadores é o mesmo, havendo, porém, influência da concentração do agente clareador e do tempo de exposição na eficácia do tratamento (Heymann<sup>23</sup>).

Apesar de serem os tecidos mais duros do corpo humano, esmalte e dentina são permeáveis ao peróxido de hidrogênio, que é capaz de atravessá-los e atingir o tecido pulpar (Benetti et al.<sup>5</sup>, Cooper et al.<sup>10</sup>, Gökay et al.<sup>20-21</sup>, Sulieman et al.<sup>38</sup>). Maiores concentrações de peróxido de hidrogênio causam maiores penetrações de peróxido no tecido pulpar, e essa penetração também depende do tempo de exposição (Benetti et al.<sup>5</sup>, Gökay et al.<sup>20-21</sup>). Tanto a técnica de clareamento de consultório quanto a caseira podem induzir a sensibilidade pós-operatória em um número significativo de pacientes, sendo este desconforto mais acentuado nas técnicas de consultório (Nathanson<sup>30</sup>). Essa reação pode ser reflexo do peróxido que penetrou para o interior da câmara pulpar, uma vez que o mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio e as causas da sensibilidade e efeitos da exposição prolongada ainda não são claros (Kugel e Ferreira<sup>27</sup>).

Existe ainda a possibilidade de realizar, nas técnicas de consultório, a ativação dos agentes clareadores por diferentes fontes de luz com o objetivo de reduzir o tempo clínico ou aumentar o efeito clareador. Para isto, utilizam-se a luz alógena, o diodo emissor de luz (LED), diferentes tipos de laser, plasma e infravermelho. A utilização de fontes de luz, especialmente do laser ou LED, é feita também com intenção de agregar valor ao tratamento realizado, como forma de

*marketing*. Entretanto, o uso de fontes de ativação do agente clareador pode levar a uma somatória de agressões aos tecidos, especialmente à polpa, uma vez que pode elevar a temperatura intrapulpar e propiciar maior penetração de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar (Dahl<sup>13</sup>).

A ativação do agente clareador permite redução do tempo clínico quando comparado à ativação puramente química do material (Dostalova et al.<sup>15</sup>), porém, não há diferença significativa no resultado final do clareamento obtido, podendo ter um aumento dos efeitos deletérios (Wetter et al.<sup>45</sup>). A fotoativação do peróxido de hidrogênio por luz alógena não melhora o resultado final do clareamento, não havendo benefícios ao cirurgião-dentista e/ou ao paciente com o seu uso, de acordo com Papathanasiou et al.<sup>31</sup> e Sulieman et al.<sup>39</sup>. Entretanto, Tavares et al.<sup>41</sup> afirmam em seu estudo que o uso de luz melhora o efeito clareador, mas também recomendam cautela na utilização da fotoativação, assim como na escolha do agente clareador e fonte de luz empregada.

O calor aplicado durante a técnica de clareamento de dentes sem vitalidade pulpar em incisivos humanos aumenta trincas previamente presentes no esmalte e dentina (Sydney et al.<sup>40</sup>), e nos dentes com vitalidade pulpar ocorre aumento dos efeitos deletérios ao tecido (Zach e Cohen<sup>46</sup>). A utilização de fontes de luz para ativação do gel clareador potencializa a liberação do peróxido e pode gerar calor, aumentando os efeitos deletérios ao tecido pulpar (Papathanasiou et al.<sup>31</sup>). A associação de calor ao peróxido de hidrogênio causaria, em curto prazo, desde leve inflamação da polpa e hemorragia superficial (Robertson e Melfy.<sup>35</sup>) até alterações pulpares severas, incluindo obliteração de odontoblastos, hemorragia, inflamação e reabsorção interna da dentina (Nathason<sup>30</sup>).

Entretanto, pesquisas utilizando animais para avaliação dos efeitos dos clareadores nos tecidos vivos são de difícil execução por

implicações éticas e dificuldades técnicas na obtenção e manuseio dos mesmos.

Para avaliar os efeitos biológicos e materiais, o teste de citotoxicidade em cultura de células é uma alternativa viável comumente utilizado, fornecendo um rápido e consistente resultado em relação à atividade biológica do material testado (Azevedo et al.<sup>4</sup>, Cavalcanti et al.<sup>8</sup>, Costa<sup>11</sup>).

A cultura de células possibilita o das condições fisiológicas, pH, temperatura, osmolaridade, tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, e grupos com características homogêneas. Dessa forma, os resultados obtidos apresentam alta reprodutibilidade e credibilidade, uma vez que as variáveis são extremamente minimizadas. Outras vantagens são a menor necessidade de reagente, que é excretado em sua maior parte (90%) quando da realização de estudos em animais; possibilidade de maior precisão na concentração do produto a ser testado; e tempo efetivamente aplicado sobre as células, além da redução do uso de animais para testes (Freshney<sup>18</sup>).

Embora alguns autores afirmem que o clareamento dental é relativamente seguro e efetivo desde que seja supervisionado pelo cirurgião-dentista (Aren<sup>2</sup> e Daduon e Bartlett<sup>12</sup>), o peróxido de hidrogênio pode reagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, potencializando a ocorrência de danos celulares (Daduon e Bartlett<sup>12</sup>). Em células de linfoma de rato agentes clareadores contribuem para danos ao DNA, havendo maior efeito deletério quando o agente é mais concentrado (Ribeiro et al.<sup>34</sup>). Ainda, o peróxido de hidrogênio apresenta citotoxicidade sobre culturas de células de carcinoma mamário de ratos FM3A e fibroblastos Balb/c 3T3, alterando a viabilidade e crescimento celular.

O uso crescente e até indiscriminado do clareamento dental associado aos prováveis danos celulares e teciduais que podem ocorrer nos tecidos vivos após clareamento, levou-nos a realizar uma

revisão de literatura, seguido de um trabalho experimental com culturas de células a fim de compreender melhor estes efeitos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O clareamento dental foi aceito como tratamento de rotina nos consultórios odontológicos na década de 70 (Nathanson<sup>30</sup>). É considerado o tratamento mais conservador para dentes escurecidos quando comparado com restaurações em resina composta, facetas ou coroas (Deliperi et al.<sup>14</sup>). O clareamento teve ampla aceitação pelos pacientes e se difundiu pelos consultórios odontológicos, tornando-se uma das áreas da dentística restauradora e estética com maior crescimento.

Existe grande preocupação com os efeitos deletérios causados pelo clareamento sobre os tecidos bucais, em especial sobre o tecido pulpar. Isto tem sido tema de diversos estudos, com maior intensidade nos últimos anos em decorrência da popularidade deste tipo de tratamento.

O clareamento externo, realizado em dentes com vitalidade pulpar, pode causar danos à polpa devido à capacidade do peróxido de hidrogênio, presente nos agentes clareadores, penetrar nos tecidos duros dos dentes. Sulieman et al.<sup>38</sup>, demonstrou que o peróxido de hidrogênio 35% atravessa o esmalte clareando também a dentina previamente escurecida de forma uniforme.

Bowles e Ugwuneri<sup>6</sup>, utilizaram metodologia capaz de mensurar a quantidade de peróxido de hidrogênio que penetra para o interior da câmara pulpar, a partir de sua aplicação em diferentes concentrações e com uso de calor. Demonstraram haver penetração substancial de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar, e que esta

penetração foi maior quando se utiliza maior concentração de peróxido e fotoativação com aumento de temperatura. Buchalla e Attin<sup>7</sup>, afirmam que o calor é efetivo na potencialização do clareamento, entretanto propicia somatória de fatores irritantes, com maior penetração do peróxido e aumento da temperatura intrapulpar.

Cooper et al.<sup>10</sup>, verificaram que o peróxido de hidrogênio oriundo do peróxido de carbamida também é capaz de penetrar na câmara pulpar, entretanto em menor quantidade do que o peróxido de hidrogênio livre.

Em 2000, Gökai et al.<sup>20</sup> compararam a penetração para o interior da câmara pulpar do peróxido de hidrogênio 30% e peróxido de carbamida 35%, 15% e 10% em dentes com restaurações de resina composta, resina composta modificada por poliácido ou cimento ionômero de vidro modificado por resina. Verificou-se maior penetração de peróxido de hidrogênio para a câmara pulpar quando se utilizou maiores concentrações do agente clareador. A resina composta proporcionou menor penetração de peróxido enquanto que o cimento ionômero de vidro modificado por resina ocasionou a maior. Estes resultados foram semelhantes aos de Benetti et al.<sup>5</sup>, que utilizaram dentes bovinos hígidos ou restaurados com resina composta, aplicando peróxido de carbamida 10% ou 35%. Verificaram que maior concentração do agente clareador gera maior quantidade de peróxido de hidrogênio no interior da câmara pulpar, entretanto, a penetração foi maior em dentes restaurados com resina composta.

Gökai et al.<sup>21</sup> realizaram novo estudo comparando produtos de venda direta ao consumidor, sendo uma tira clareadora e três clareadores líquidos (*paint-on*). Verificaram que peróxido de hidrogênio oriundo dos quatro produtos testados chegou até o interior da câmara pulpar, sendo a maior quantidade encontrada no grupo em que foi aplicada a tira, seguido dos líquidos clareadores que mostraram penetração proporcional à concentração do produto.

Utilizando um dispositivo chamado câmara pulpar *in vitro*, Hanks et al.<sup>22</sup>, avaliaram a permeabilidade de discos de dentina de 0,5mm a peróxido de carbamida de 10%-15% e peróxido de hidrogênio 2-10%, aplicando o agente clareador sobre a dentina por uma ou seis horas. Concluíram que a quantidade de peróxido de hidrogênio que atravessa a dentina depende da concentração original no agente clareador e do tempo de aplicação, sendo maior conforme cada um destes fatores é aumentado.

O clareamento, em especial quando não realizado adequadamente pode causar injúrias aos tecidos bucais. Uma alta dosagem de peróxido de hidrogênio (de 30% a 35%) pode causar queimaduras no tecido gengival (Dahl<sup>13</sup>; Tredwin et al.<sup>42</sup>). Agentes clareadores mostraram-se tóxicos para fibroblastos de origem gengival, inibindo diversas funções celulares *in vitro* (Tripton et al.<sup>43</sup>).

Surge então a preocupação com os danos potenciais sobre o tecido e células da polpa, assim como demais tecidos bucais.

Nathanson<sup>30</sup>, afirma que tanto o clareamento de consultório quanto o caseiro são capazes de induzir desconforto pós-operatório em numero significativo de pacientes, que parece ser reduzido com a utilização de concentrações menores de peróxido e/ou tempo de aplicação reduzido. Em um estudo clínico, Jorgensen e Carrol<sup>25</sup>, encontraram sensibilidade pós-operatória em cerca de metade dos pacientes avaliados. Deliperi et al.<sup>14</sup>, também *in vivo*, testaram o clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio de alta concentração (35% e 37%) associado ao clareamento caseiro. Não houve diferença significativa no efeito clareador dos dois agentes de consultório nem relato de sensibilidade por nenhum dos indivíduos que receberam o tratamento, fato que foi atribuído ao período reduzido das sessões (10 minutos) e à ausência de fotoativação.

Quando realizado com cautela, o clareamento não causa danos irreversíveis, entretanto atenção especial deve ser dada quando há

presença de trincas, restaurações inadequadas, erosão cervical ou outros problemas que possam favorecer a penetração do clareador em menor tempo (Nathanson<sup>30</sup>).

Os materiais dentários, inclusive os agentes clareadores, deveriam ter como comportamento biológico ideal à ausência de efeitos colaterais, e tolerabilidade, quando colocados em contato com o organismo (Shmalz<sup>36</sup>). Para avaliar a compatibilidade dos agentes clareadores, existem diversos métodos empregados no estudo de biocompatibilidade de materiais. Na odontologia, conforme estabelecido pela *Fédération Dentaire Internationale*<sup>17</sup>, para análise dos materiais, eles devem ser submetidos primeiramente aos testes iniciais, seguidos pelos testes secundários e finalizados pelos de aplicação clínica. O cultivo celular se destaca como opção dentre os testes iniciais, devendo sempre simular as condições de uso no tecido de destino. Existe a possibilidade de realizar o estudo de citotoxicidade sobre diversas linhagens de células. Aren<sup>2</sup> e Hanks et al.<sup>22</sup> verificaram que o peróxido de hidrogênio apresenta citotoxicidade sobre fibroblastos de carcinoma mamário FM3 e em fibroblastos Balb/c 3T3, respectivamente. Entretanto, encontram-se na literatura estudos realizados com células de origem pulpar. Cavalcanti et al.<sup>8</sup> testou materiais clareadores sobre culturas de fibroblastos de polpa humana FP5. No primeiro estudo foi feita aplicação direta do agente clareador sobre a cultura de células. No segundo, foi utilizada uma câmara pulpar in vitro. No terceiro estudo foi utilizado um método descrito por Freshney<sup>18</sup>, que consiste no uso de meios condicionados durante a presa, polimerização ou contato com as substâncias testadas, que teria como maior vantagem a simulação da utilização clínica, uma vez que, na clínica, durante o clareamento, não há contato direto das células com o agente clareador e sim com os produtos liberados durante sua aplicação e fotoativação.

Os testes de citotoxicidade em cultura de células são capazes de fornecer rápido e consistente resultado com relação à

atividade biológica do material testado, determinando a necessidade de dar continuidade na avaliação do material nos demais níveis de pesquisa ou não, podendo reduzir inclusive a necessidade de testes em animais (Costa<sup>11</sup>).

Quando devidamente padronizados, os testes de citotoxicidade em cultura de células produzem resultados rápidos e bastante sensíveis, além de serem mais confiáveis que a análise *in vivo* devido à possibilidade de controlar a maior parte das variáveis que podem influenciar os resultados. Quando somado aos resultados de testes físicos e químicos este tipo de teste pode ser utilizado para estimar o comportamento de um novo material.

A citotoxicidade de diluições de peróxido de hidrogênio sobre cultura de fibroblastos (Balb/c 3T3), foi avaliada por Hanks et al.<sup>22</sup>, que observaram que a citotoxicidade era influenciada tanto pelo tempo de exposição quanto pela concentração do agente clareador. No mesmo estudo, utilizando-se um dispositivo IVPD (*in vitro pulpal device*), observou-se que em menos de 15 minutos o peróxido de hidrogênio dos diversos agentes clareadores utilizados foi capaz de atravessar a barreira dentinária e atingir níveis capazes de causar efeitos biológicos nocivos sobre as células em cultura.

Koulaouzidou et al.<sup>26</sup>, fizeram a análise de diferentes diluições de dois agentes clareadores (peróxido de uréia e peróxido de hidrogênio) sobre culturas de L929 e BHK21/C13 e verificou que ambos apresentaram citotoxicidade sobre fibroblastos, influenciada pela concentração do agente clareador e tempo de exposição.

Aren<sup>2</sup>, avaliou um gel clareador para técnica de consultório e um para clareamento caseiro sobre cultura de células (células de carcinoma mamário de ratas FM3A). Encontrou alteração na viabilidade e no crescimento celular e concluiu que ambos demonstraram citotoxicidade, mas que as técnicas de clareamento são razoáveis e

relativamente seguras e efetivas e devem ser aceitas como opção de tratamento desde que o paciente saiba dos riscos e benefícios.

Ribeiro et al.<sup>34</sup>, verificaram o dano genético induzido por agentes clareadores (Clarigel Gold, Whitespeed, White Excel 2, Magic Bleaching, Whiteness HP e Lase Peroxide) em células de linfoma de rato. Os resultados apontaram que todos os clareadores testados contribuíram para dano no DNA celular, sendo observada clara relação entre concentração do clareador e dano causado.

Estudando os efeitos do clareamento sobre a polpa de dentes com vitalidade pulpar, Robertson e Melfy<sup>35</sup>, aplicaram solução de peróxido de hidrogênio 35% e calor, associados ou isoladamente, sobre premolares com extração indicada por motivos ortodônticos. Após análise histológica verificou-se que havia inflamação superficial da polpa, com presença de linfócitos e neutrófilos, indicativos de resposta aguda, além de indícios de reação quimiotática. As reações foram classificadas como leves e possivelmente reversíveis e a conclusão foi que o peróxido de hidrogênio associado ao calor causa irritação do tecido pulpar. Anderson et al.<sup>1</sup>, também utilizaram premolares humanos com extração indicada por motivos ortodônticos, entretanto utilizou peróxido de carbamida 10%. Através da utilização de um marcador histoquímico para HO-1, enzima utilizada na defesa de estresse oxidativo, avaliou expressão desta enzima nas células. Os resultados indicaram que a polpa responde ao estresse oxidativo a nível molecular, o que pode representar um componente da reação de defesa inicial por células específicas em localização estratégica no tecido pulpar, precedendo a resposta inflamatória clássica. O mesmo produto foi testado por Fugaro et al.<sup>19</sup>, que aplicou o peróxido de carbamida 10% por diferentes períodos previamente à extração. A avaliação histológica levou à conclusão de que o clareamento com peróxido de carbamida 10% pode causar reações inflamatórias leves, reversíveis no período de duas semanas, e que esta modalidade de clareamento pode ser considerada segura para os tecidos pulpares.

A utilização de ativação do processo de clareamento, ou uso de luz como forma de agregar valor ao tratamento, tem sido adotada com grande frequência. De acordo com Christensen<sup>9</sup>, a utilização de luz durante o clareamento tem sido principalmente uma ferramenta de *marketing*. A utilização de certos tipos de luz é capaz de ocasionar fotólise do agente clareador, aumentando seu potencial clareador. Entretanto somente luz de alta frequência é capaz de fornecer a energia necessária para que esta reação ocorra, sendo praticamente impossível implementar seu uso na cavidade oral (Buchalla e Attin<sup>7</sup>). Virtualmente, os resultados obtidos com todas as técnicas de clareamento são semelhantes, já que o mecanismo de ação dos agentes clareadores é o mesmo, havendo, porém, influência da concentração do agente clareador e do tempo de exposição na eficácia do tratamento (Suliman et al.<sup>37</sup>, Heymann<sup>23</sup>, Joiner<sup>24</sup>). Ao avaliar a capacidade de clareamento *in vitro* de concentrações de peróxido de hidrogênio entre 5% a 35%, Suliman et al.<sup>37</sup>, utilizando escala Vita, verificaram que, embora tenha sido necessário maior número de sessões para concentrações mais baixas, todas as concentrações de peróxido de hidrogênio testadas foram capazes de clarear os espécimes de C4 para B1.

O mecanismo de ação dos fotoativadores como o laser, fontes de luz e de calor associados ao clareamento mostram-se limitados sob o ponto de vista científico (Buchalla e Attin<sup>7</sup>).

Luk et al.<sup>28</sup>, avaliaram o efeito clareador e as mudanças de temperatura no dente induzidos por 25 diferentes combinações de agentes clareadores e tipo de luz utilizada na fotoativação, concluindo que a eficiência do clareamento e aumento da temperatura foi influenciada significativamente pela interação entre tipo de luz e agente clareador.

Em seu estudo, Tavares et al.<sup>41</sup>, concluíram que o uso de luz (short-arc gas plasma) associado ao gel clareador produziu maior clareamento que peróxido de hidrogênio ou luz isoladamente, atingindo-se alto nível de clareamento com sessão única. Utilizando-se

concentração relativamente baixa de peróxido de hidrogênio (15%) acelerado por luz, verificou-se persistência dos resultados por no mínimo seis meses. Resultado oposto foi encontrado por Papathanasiou et al.<sup>31</sup>, que não verificou haver diferença no clareamento com peróxido de hidrogênio 35% utilizando-se ou não fotoativação por luz alógena após sessão única. Afirmaram ainda que a adição de luz não aumentou o efeito do clareamento.

A eficácia da realização ou não de fotoativação em estudos clínicos é limitada e conflitante (Joiner<sup>24</sup>). A utilização de luz na ativação do agente clareador deve ser criteriosa, considerando os riscos potenciais ocasionados por esta modalidade de clareamento (Luk et al.<sup>28</sup>, Buchalla e Attin<sup>7</sup>). A avaliação de outros efeitos adversos do clareamento dental, além da sensibilidade, ainda não foi realizada em larga escala, deixando uma grande lacuna neste tópico (Dahl<sup>13</sup>, Tredwin et al.<sup>42</sup>), sendo necessária ainda mais cautela na indicação deste tratamento. Os trabalhos apresentados nesta revisão mostram que ainda há dúvidas quanto à utilização dos agentes clareadores, especialmente seus efeitos biológicos. Portanto, este estudo propõe avaliar este efeito utilizando-se o teste de citotoxicidade.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este estudo tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de dois agentes clareadores de consultório (peróxido de hidrogênio 35% e 38%) sobre cultura de fibroblastos cultivados a partir de polpa humana, bem como se os efeitos sobre as células sofrem alteração com o uso ou não de fotoativação por LED ou luz alógena.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

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

### **4.1 Cultivo das células**

Foram utilizados fibroblastos de linhagem estabelecida a partir de polpa dentária humana (FP5), oriundos do banco de células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Sigma, Estados Unidos) e foram semeadas em frascos para cultura de células. Após a subconfluência da camada de células, elas foram destacadas com auxílio de solução de tripsina 0,25% diluída em solução salina de tampão de fosfato (PBS), a fim de reduzir a toxicidade da tripsina e facilitar sua ação removendo cálcio das células. Em seguida, foram semeadas em novo frasco. Após as passagens necessárias, as células foram semeadas em placas com 96 poços, onde estas células receberam posteriormente os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios

condicionados foram realizadas seguindo os protocolos estabelecidos a seguir.

#### 4.1.1 Descongelamento

A sala de cultura de células foi preparada: limpou-se todas as superfícies com álcool 70°; o motor e lâmpada UV da capela de fluxo laminar foram ligados por 15 minutos e as pipetas e frascos a serem utilizados foram separados. O meio de cultura foi colocado em banho-maria até que atingisse 37°C. Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar, com o motor ligado. Em um frasco pequeno para cultura de células foram pipetados 5ml de meio de cultura utilizando-se pipetador automático. Em um tubo de ensaio de 15ml foram colocados 5ml de meio de cultura. Foi selecionado no livro de registros do banco de células o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio que continham as células desejadas, FP5. Três tubos criogênicos foram removidos do nitrogênio e um a um os frascos foram sendo descongelados (Figura 1). Para isso, o tubo foi agitado em banho-maria, tendo-se o cuidado de não mergulhar todo o frasco na água para evitar contaminação. Quando o líquido do tubo descongelou, foi rapidamente removido e colocado no tubo de ensaio já com meio de cultura. O tubo de ensaio foi levado à centrífuga por cinco minutos a 1000rpm. Ao retirar-se o tubo de ensaio da centrífuga foi possível observar a formação de um precipitado de células no fundo do frasco, o *pelet*. O meio de cultura sobrenadante foi removido, com cuidado para que o *pelet* não fosse aspirado. As células foram ressuspendidas em 1ml de meio fresco, e colocadas no frasco para cultura de células preparado previamente. Observou-se no microscópio de luz invertida a presença das células e colocou-se o frasco em estufa atmosférica úmida a 37°C com tensão de CO<sub>2</sub> a 5%.

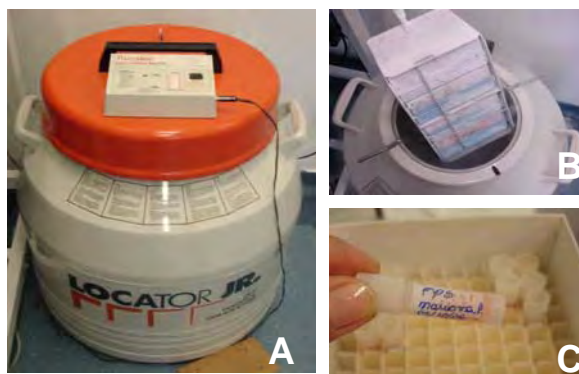


FIGURA 1 – Remoção das células do tambor de nitrogênio: (A) Tambor de nitrogênio; (B) Remoção do puxador com as caixas; (C) Tubo criogênico contendo as células.

#### 4.1.2 Troca de meio

A cada 48h o meio de cultura foi trocado. Para a troca, a sala foi preparada e os materiais separados. O meio de cultura e o PBS foram colocados em banho-maria até atingir 37°C (Figura 2A). As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com PBS, a fim de remover células mortas. Novo meio de cultura foi colocado sobre as células e o frasco foi colocado novamente na estufa.

#### 4.1.3 Subcultura

Quando as células cresceram a ponto de ocupar todo o fundo do frasco foi necessário fazer subcultura, passando as células de um frasco para dois outros, ou do menor para o maior (Figura 2B). Cada vez que este procedimento é realizado, corresponde a uma passagem das células. As células a serem utilizadas nos testes devem ser aquelas que se encontram entre a quinta e décima passagens, o que foi respeitado neste estudo.

Para realizar a subcultura, a sala foi preparada e os materiais separados. O meio de cultura, PBS e solução de tripsina foram colocados em banho-maria até 37°C, as células foram removidas da estufa e levadas à capela de fluxo laminar. Uma parte do meio de cultura

do frasco de células foi reservada. O restante foi aspirado e as células foram lavadas com solução de PBS, removendo as células mortas. Em seguida a solução de PBS foi aspirada e 2ml de solução de tripsina foram colocados sobre as células. Aguardou-se um minuto com o frasco na estufa e, após dar ligeiras batidinhas no fundo do frasco (Figura 2B), verificou-se no microscópio se as células já estavam destacadas. Estando as células prontas, o meio de cultura reservado foi colocado sobre elas com intuito de neutralizar a tripsina. Todo o conteúdo do frasco foi colocado em tubo de ensaio e levado à centrífuga por 5 minutos a 1000rpm. Após a centrifugação, obteve-se um depósito de células no fundo do frasco, o *pelet*, e um líquido composto pela mistura de solução de tripsina e meio de cultura. O sobrenadante foi aspirado, sempre se tomando cuidado para não aspirar o *pelet*. As células foram então ressuspendidas em 1ml de meio fresco e após bem homogêneo, a suspensão foi dividida em dois frascos de mesmo tamanho, ou colocada em um frasco maior. Verificou-se ao microscópio de luz invertida a presença das células e levou-se o frasco à estufa até a próxima troca de meio.

Este procedimento foi repetido diversas vezes até que as células atingissem a quinta passagem e estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e plaqueamento.

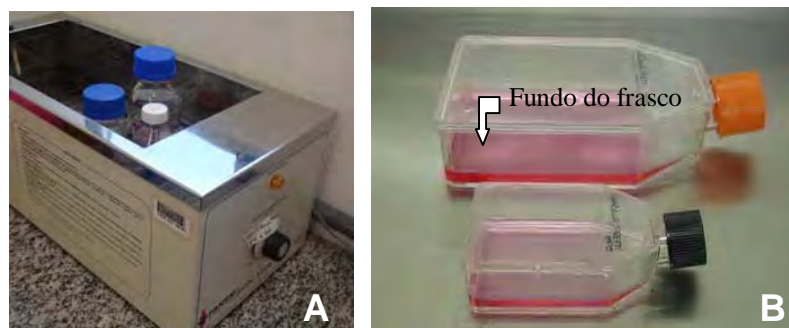


FIGURA 2 – (A) Tripsina, PBS e meio de cultura em banho-maria; (B) Dois tamanhos de frasco para cultura de células utilizados (25ml e 100ml).

#### 4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento, a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada um dos poços das placas a serem utilizadas nos testes.

Para a contagem de células utilizou-se a câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de vidro com sulcos na lateral, sendo observados em cada uma de suas metades nove quadriláteros formando um quadrado maior. Sobre esta câmara, no momento de sua utilização foi colocada uma lamínula para que o líquido penetrasse por capilaridade entre a lâmina e a lamínula, formando uma fina camada, possibilitando a contagem das células.

Foram seguidos os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*. Para ressuspender as células foi utilizado 1ml de solução PBS. Em um tubo *ependorf* foi colocado 0,1ml da suspensão de células obtida, 0,1ml de solução PBS e 0,8ml de corante azul de tripan. Com um conta gotas foi retirada uma pequena quantidade da solução do *ependorf* e uma gota foi colocada de cada lado da câmara de Neubauer com a lamínula já posicionada (Figura 3A). A câmara foi levada ao microscópio de luz invertida e as células presentes no quadrilátero central de cada um dos lados foram contadas com auxílio de um contador (Figura 3B). As células coradas em azul foram excluídas, uma vez que o azul de tripan cora apenas as células mortas.

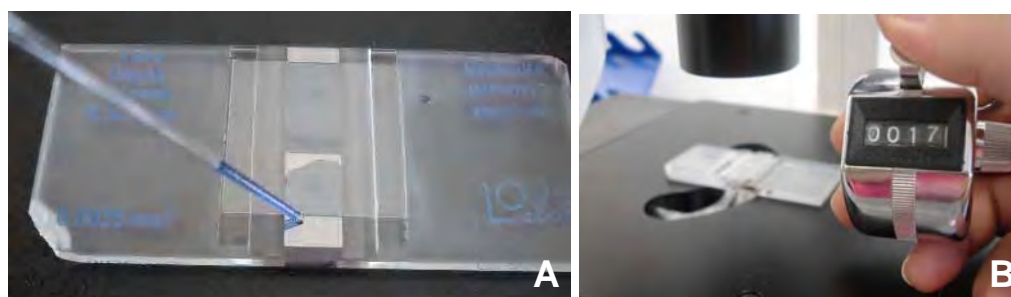


FIGURA 3 – Contagem celular: (A) Gota com células coradas sobre câmara de Neubauer; (B) Câmara no microscópio de luz invertida e contador auxiliando a contagem.

Na contagem de células no momento imediatamente anterior ao plaqueamento, foram encontradas 16 células em um dos quadriláteros centrais e 19 células no outro. Para obtenção da quantidade de células foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^5 = n^\circ \text{ células/ml}$$

Onde C é a média das células viáveis encontradas nos quadriláteros centrais

Assim:

$$\frac{16+19}{2} \times 10^5 = 17,5 \times 10^5 = \mathbf{175 \times 10^4}$$

Portanto a quantidade de células contida em 1ml da suspensão em solução PBS foi  $175 \times 10^4$ . Como 0,1ml foi removido do tubo para a realização da contagem, através de regra de três simples foi possível encontrar a quantidade de células presente nos 0,9ml de suspensão remanescentes:

$$\begin{array}{r} 175 \times 10^4 \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1\text{ml} \\ N \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0,9\text{ml} \end{array}$$

Então,  **$N=157,5 \times 10^4$**  células.

As células foram levadas novamente à centrífuga a 1000rpm por 5min e ressuspendidas em 1ml de meio fresco.

## 4.2 Plaqueamento

Foram utilizadas 3 placas de 96 poços, sendo uma para cada período de avaliação e 28 poços no total. Em cada placa, os poços a serem utilizados foram identificados para que cada coluna correspondesse a um grupo experimental ou ao grupo controle (Figura 4).

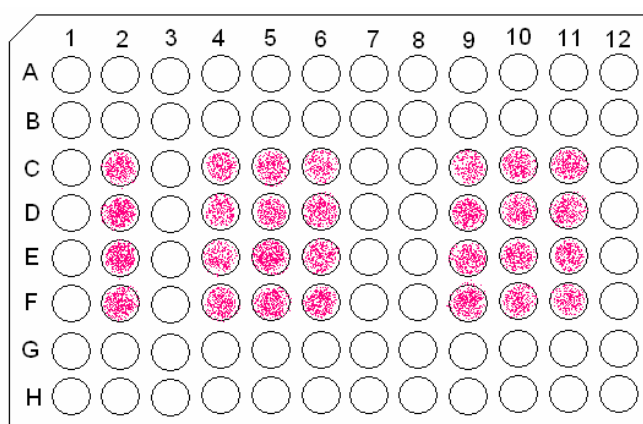


FIGURA 4 – Esquema da placa com os poços a serem utilizados marcados

Antes da colocação das células, adicionou-se 100µl de meio fresco em cada poço. Para a colocação das células, realizou-se um cálculo a fim de que a quantidade fosse  $10^3$  células por poço. Desta forma, a partir da contagem, foi possível obter 1ml de meio contendo  $157,5 \times 10^4$  células. Para preencher os 84 poços obteve-se 8,4ml de meio contendo  $8,4 \times 10^4$  células, que corresponde a  $10^3$  células em cada 100µl, quantidade a ser colocada em cada poço. Para saber o volume de suspensão contendo a quantidade de células a ser utilizada foi realizado o seguinte cálculo:

$$\begin{array}{l}
 1000\mu\text{l} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 157,5 \times 10^4 \\
 X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 8,4 \times 10^4
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 X = 8,4 \times 10^4 \times 1000 / 157,5 \times 10^4 \\
 \mathbf{X = 53,33\mu\text{l}}
 \end{array}$$

Foram removidos 53,33 $\mu$ l da suspensão de células, obtida na contagem, e diluídos em 8,347ml de meio. Dessa nova suspensão, 100 $\mu$ l foram colocados em cada um dos poços previamente marcados (Figura 5).

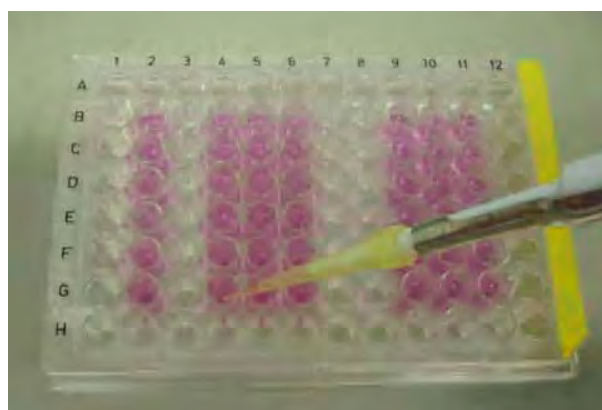


FIGURA 5 – Colocação das células nos poços da placa

As três placas foram então levadas à estufa a 37°C com umidade controlada e tensão de CO<sub>2</sub> de 5%, onde permaneceram por 24 horas, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado.

### **4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular**

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular corresponde ao metabolismo celular de células que não receberam nenhum tipo de tratamento. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT, nos períodos zero, 24h e 48h. Para cada período foram avaliados quatro espécimes.

Os resultados obtidos foram inseridos numa curva que serviu de parâmetro para a comparação com os resultados obtidos nos grupos experimentais.

#### 4.4 Divisão dos grupos experimentais

Foram testados os peróxidos de hidrogênio 35% (Whiteness HP, FGM) e 38% (Opalescence Xtra Boost, Ultradent), utilizados para clareamento de consultório. Também foi avaliado cada um destes peróxidos associados a fotoativação com luz alógena (fotopolimerizador de luz alógena Curing Light 2500- 3M, 670mW/cm<sup>2</sup>) ou diodos emissores de luz (LED) (Ultraled - Dabi-Atlante, 130mW/cm<sup>2</sup>) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Divisão dos grupos experimentais

| <b>Grupo Experimental</b> | <b>N</b> | <b>Agente de condicionamento do meio</b> | <b>Fotoativação</b> |
|---------------------------|----------|--|---------------------|
| G1                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 35%               | Sem fotoativação    |
| G2                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 35%               | Luz Alógena         |
| G3                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 35%               | LED                 |
| G4                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 38%               | Sem fotoativação    |
| G5                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 38%               | Luz Alógena         |
| G6                        | 18       | Peróxido de hidrogênio 38%               | LED                 |

Cada grupo foi avaliado em períodos de 0, 24 e 48h, utilizando-se o ensaio com MTT, conforme descrito para curva padrão de viabilidade e crescimento celular. Para cada período foram coletados seis espécimes de cada um dos grupos.

#### 4.5 Condicionamento do meio de cultivo e exposição das células

O meio de cultivo contém todas as substâncias liberadas durante o contato com o agente clareador evitando o contato direto entre as células e o material a ser testado (Freshney<sup>18</sup>).

Os agentes clareadores utilizados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e colocados em placas de petri pequena. Em cada placa foi colocado 0,4g de agente clareador e em seguida 2ml de meio de cultura fresco (Figura 6A e 6B), mantendo a proporção preconizada pela *American Society for Testing Materials* (Cavalcanti et al.<sup>8</sup>). Este método, descrito por Freshney<sup>18</sup>, e empregado por Cavalcanti et al.<sup>8</sup>, simula a situação de contato com camadas mais profundas dos tecidos, onde não há contato direto entre as células e o material e sim com os produtos liberados por estes. Para o grupo controle foi colocado apenas meio fresco. Nos grupos correspondentes foi realizada a fotoativação por LED (G3 e G6) ou luz alógena (G2 e G5) durante trinta segundos. O meio foi mantido em contato com o agente clareador por trinta minutos, simulando o tempo de uma sessão de clareamento de consultório, em estufa atmosférica úmida a 37°C com tensão de CO<sub>2</sub> de 5%. Os meios de cultura já condicionados foram removidos do contato com o agente clareador e 100µl foram colocados sobre os poços correspondentes a cada grupo experimental (Figura 6C), onde permaneceram por trinta minutos. Após este período, o meio condicionado foi substituído por meio fresco e as análises pelo ensaio com MTT foram realizadas nos períodos previstos.



FIGURA 6 – Condicionamento do meio de cultura: (A) Pesagem do agente clareador; (B) Colocação do meio de cultura sobre o clareador; (C) Colocação do meio condicionado sobre as células.

#### 4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular

A avaliação da viabilidade celular foi feita através da coloração pelo MTT, que é reduzido pelas células vivas, adquirindo coloração azul.

A avaliação foi realizada pela mensuração da atividade mitocondrial celular utilizando-se o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídios, através da atividade da succinil desidrogenase. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT. As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT. A figura 7 representa a reação química ocorrida durante esse processo. A quantificação da inibição enzimática é realizada espectrofotometricamente.

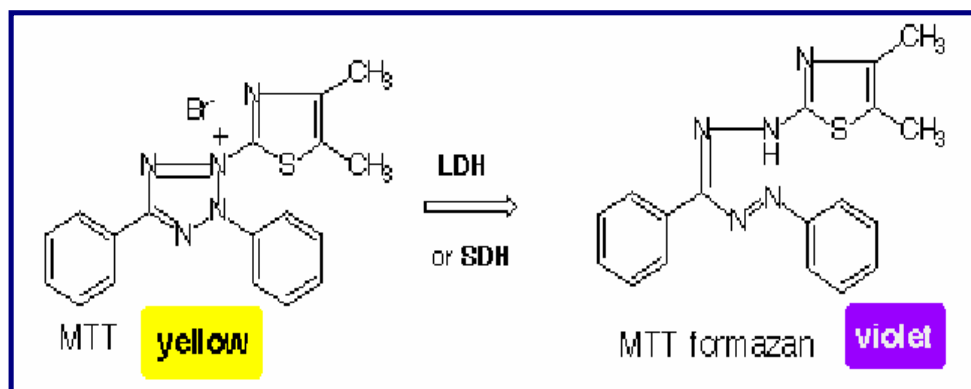


FIGURA 7 – Reação química ocorrida na redução do MTT

Assim, foi possível mensurar indiretamente a quantidade de células vivas.

O ensaio com MTT iniciou-se com o preparo do reagente A, diluindo-se 0,05g de MTT (Figura 8A) em 10ml de solução PBS. Esta solução é sensível à luz e por isso foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultura que estava sobre os poços da placa a ser testada foi substituído por 100µl de meio fresco, que também foi colocado em uma coluna que não continha células, que corresponde ao *blank* e serve para calibrar a leitora. Em cada um dos poços foi adicionado 10µl do reagente A (Figura 8B). A placa foi então envolvida com papel alumínio (Figura 8C) e levada à estufa onde permaneceu por quatro horas. Durante este período foi preparado o reagente B, diluindo-se 1g de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Figura 8D) em 10ml de ácido clorídrico. Foram colocados 100 µl de reagente B em cada um dos poços (Figura 8E). A placa foi novamente embrulhada e levada à estufa, onde permaneceu por mais quatro horas. Ao término deste período o conteúdo dos poços utilizados foi agitado e a placa levada à leitora previamente programada de acordo com a disposição dos poços utilizados (Figura 8 F,G e H). A quantidade de MTT reduzido foi medida através de espectrofotômetro leitor de microplacas (Biotrak II Plate Reader; Amersham Biosciences - England) em comprimento de onda de 570nm e comparada aos valores

obtidos para a curva padrão de viabilidade e crescimento celular. As células foram avaliadas em períodos de 0, 24h e 48h.

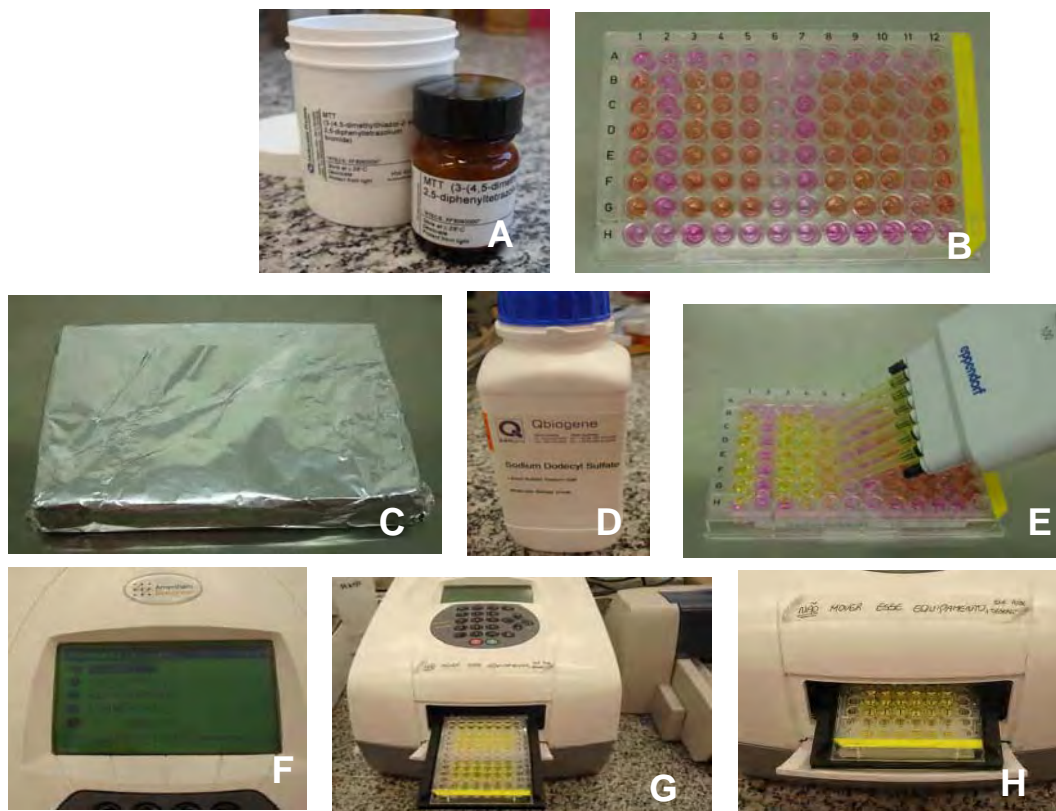


FIGURA 8 – Ensaio com MTT: (A) MTT - princípio ativo do reagente A; (B) Placa após colocação do reagente A; (C) Placa protegida da luz com papel alumínio; (D) SDS – Sodium Dodecyl Sulfate – princípio ativo do reagente B; (E) reagente B sendo aplicado; (F, G e H) Leitora de microplacas (espectrofotômetro).

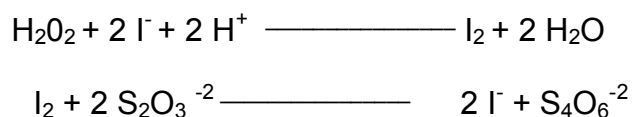
#### 4.7 Quantificação do peróxido de hidrogênio liberado

O condicionamento do meio de cultura ocasionou liberação de peróxido de hidrogênio a partir do gel clareador. Portanto, foi importante saber o quanto de peróxido foi efetivamente liberado no meio a fim de relacionar este dado com o dano celular causado.

Para tornar possível esta etapa foi necessário conhecer a real concentração da solução de estoque de peróxido de hidrogênio, através da padronização do peróxido, para a obtenção de soluções de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio que foram utilizadas para o levantamento da curva padrão, que serviu como referência para quantificar a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada nas condições experimentais.

#### 4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio

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



##### 4.7.1.1 Preparo das soluções

Para a realização da padronização foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de iodeto de potássio

Foram dissolvidos 16,6g de iodeto de potássio (KI – Merck, Alemanha) p.a. em 100ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de 1,0M;

- Solução padrão de tiosulfato de sódio

Foram pesados 24,82g de tiosulfato de sódio pentahidratado p.a. ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – Carlo Erba, Itália) e dissolvidos em

1000ml de água deionizada para a obtenção da solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1N;

– Solução de amido

Foram dissolvidos 0,5g de amido solúvel p.a. (Synth – Labsynth Ltda.) em 100ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de amido a 5,0g/l. A solução foi fervida durante cinco minutos e após seu resfriamento, foi filtrada com algodão;

– Mistura ácida

Em um Becker submetido a banho de gelo, foram dissolvidos 0,09g de molibdato de amônio tetra hidratado p.a.  $[(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$  – B.Herzog, Brasil] em 375,0ml de água deionizada. O molibdato de amônio serviu como catalisador da reação. Em seguida, foram vagarosamente acrescentados 160ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  – Cinética Química Ltda. - Brasil). A mistura ácida foi essencial para que ocorresse a reação e, portanto, liberação de iodo;

– Solução da amostra de peróxido de hidrogênio

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

#### 4.7.1.2 Titulação

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

A solução do *erlenmeyer* foi titulada com a solução de tiosulfato de sódio, adicionando gotas da solução de amido próximo ao

ponto de viragem, até se obter uma solução incolor. A quantidade de solução de tiosulfato utilizada na titulação foi inserida no Quadro 2.

QUADRO 2 – Volumes de tiosulfato de sódio 0,1N gastos na titulação da amostra de peróxido de hidrogênio

| <b>Amostra</b> | <b>Volume de tiosulfato (ml)</b> |
|----------------|----------------------------------|
| A1             | 23,2ml                           |
| A2             | 23,1ml                           |
| A3             | 23,2ml                           |
| <b>Média</b>   | <b>23,167ml</b>                  |

Paralelamente, duas provas em branco foram realizadas, nas mesmas condições da amostra, porém isentas da solução de peróxido de hidrogênio (Quadro 3).

QUADRO 3 – Volumes de tiosulfato de sódio 0,1N gastos na titulação do branco

| <b>Amostra</b> | <b>Volume de tiosulfato (ml)</b> |
|----------------|----------------------------------|
| B1             | 0,45                             |
| B2             | 0,4                              |
| <b>Média</b>   | <b>0,425</b>                     |

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

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

Sendo: A = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra; B = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco; C = concentração da solução de peróxido de hidrogênio; V = volume da amostra de peróxido de hidrogênio pipetada para diluição, em ml.

Assim:

$$C = \frac{(23,167 - 0,425) \times 85,04}{5} = 386,796\text{ml}$$

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

#### 4.7.2 Levantamento da curva padrão

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

##### 4.7.2.1 Preparo das soluções

- Solução de corante violeta leucocrystal

Foram pesados 30,0mg do corante violeta leucocrystal (leuco crystal violet 219215 – Aldrich, Estados Unidos) e dissolvidos em 60,0ml de solução de ácido clorídrico (HCl 0,5% v/v – Merck, Brasil), obtendo-se uma solução de 0,5mg/ml;

- Solução tampão de acetato

- a) preparo da solução de acetato de sódio 2,0M/l

68,05g de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – Ecibra, Brasil) foram dissolvidos em 250,0ml de água deionizada;

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

18,595ml de ácido acético glacial concentrado p.a. ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  – Merck, Alemanha) foram diluídos em 250,0ml de água deionizada;

- c) preparo do tampão acetato

O tampão acetato foi obtido pela mistura de volumes iguais de acetato de sódio 2,0M/l e ácido acético 2,0M/l, ajustando-se o pH

em 4,5 em pHâmetro calibrado (HANNA – modelo HI9224) com ácido acético glacial concentrado p.a.

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

Foram pesados 10,0mg de peroxidase (peroxidase from horseradish P6782 – Sigma, Estados Unidos) e dissolvidos em 10,0ml de água deionizada, obtendo-se uma solução enzimática de 1,0mg/ml.

- Soluções padrão de peróxido de hidrogênio

As soluções padrão de peróxido de hidrogênio foram obtidas empregando a fórmula da diluição:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Sendo:  $C_i$  = concentração inicial;  $V_i$  = volume inicial;  $C_f$  = concentração final;  $V_f$  = volume final

Foram pipetados 1,293ml da solução concentrada de peróxido de hidrogênio de 386,796g/l ( $H_2O_2$  a 35% v/v, Asepticper – Solvay, Peróxidos do Brasil Ltda.) para a curva padrão, que posteriormente, foi diluída a 100ml de solução de tampão acetato, obtendo-se uma solução contendo 5000 $\mu$ g/ml de peróxido de hidrogênio. A seguir, 1ml desta solução foi pipetada e novamente diluída a 100ml com tampão de acetato, resultando em uma solução de 50 $\mu$ g/ml de peróxido de hidrogênio. Esta solução serviu de base para que novas diluições fossem realizadas, a fim de obter-se amostras contendo 0,25/0,5/0,75/1,0/1,25/1,5/1,75/2,0 $\mu$ g de peróxido de hidrogênio, de acordo com o Quadro 4.

QUADRO 4 – Diluições realizadas para obtenção de amostras contendo de 0,25 a 2,0 $\mu$ g de peróxido de hidrogênio.

| Amostras                                   | Solução Padrão | Solução tampão |
|--|----------------|----------------|
| 2,00 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 40 $\mu$ l     | 60 $\mu$ l     |
| 1,75 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 35 $\mu$ l     | 65 $\mu$ l     |
| 1,50 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 30 $\mu$ l     | 70 $\mu$ l     |
| 1,25 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 25 $\mu$ l     | 75 $\mu$ l     |
| 1,00 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 20 $\mu$ l     | 80 $\mu$ l     |
| 0,75 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 15 $\mu$ l     | 85 $\mu$ l     |
| 0,50 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 $\mu$ l     | 90 $\mu$ l     |
| 0,25 $\mu$ g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 05 $\mu$ l     | 95 $\mu$ l     |

#### 4.7.2.2 Leitura em espectrofotômetro

Cada concentração de peróxido de hidrogênio foi feita em triplicata, totalizando 24 tubos de ensaio. Em cada tubo foram introduzidos 2750 $\mu$ l de água deionizada, 100 $\mu$ l de solução de corante violeta leucocristal, 100 $\mu$ l de solução padrão de peróxido de hidrogênio e 50 $\mu$ l de solução de peroxidase. Para as diferentes concentrações de peróxido foram obtidas diferentes graduações de azul.

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

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

Os valores das concentrações das soluções padrão utilizadas e de absorbância relativas às concentrações foram submetidos a uma regressão linear dos pontos encontrados, representados por uma reta, representado na Figura 9.

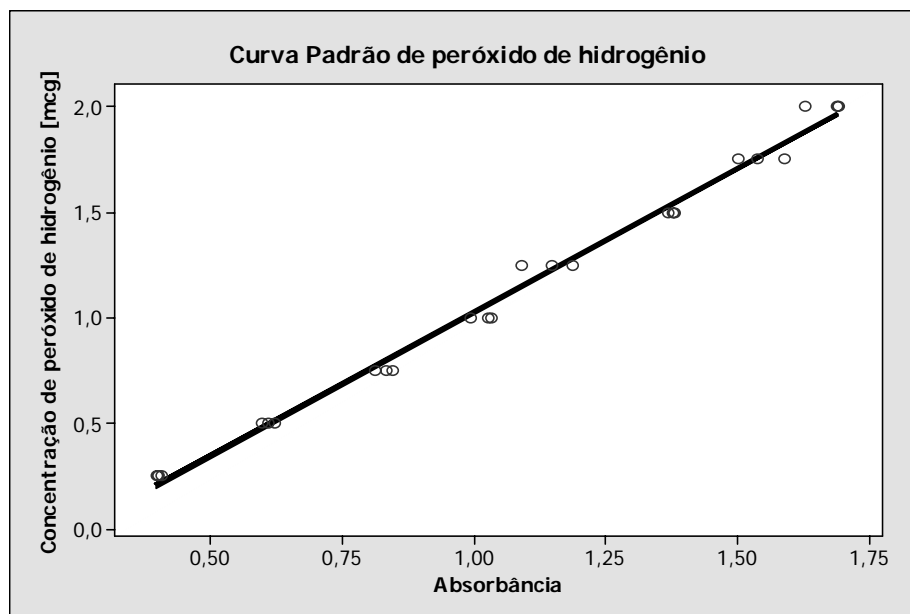


FIGURA 9 – Representação gráfica dos valores de absorbância para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio

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

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

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

$$F_c = 0,9822$$

O fator de calibração foi utilizado para fazer a transformação dos resultados em microgramas de peróxido de hidrogênio.

#### 4.7.3 Mensuração do peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais

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

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

Foram pesados 0,4g de cada um dos agentes clareadores em placas de petri. Foram preparadas três placas para cada agente clareador. Sobre o gel foram adicionados 2ml de solução tampão de acetato. Os grupos correspondentes receberam fotoativação por LED ou luz alógena, assim como no condicionamento do meio de cultura. As seis placas foram levadas à estufa a 37°C, onde permaneceram por trinta minutos. Em seguida, 100µl de cada placa foram removidos e colocados em um tubo de ensaio. Este procedimento foi realizado três vezes para cada situação experimental, totalizando 18 tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 2750µl de água deionizada, 100µl de solução de corante violeta leucocristal e 50µl de solução de peroxidase. Da solução obtida, 2ml foram removidos, colocados em uma cubeta e levados para leitura em espectrofotômetro a 596nm. A partir do fator de calibração obtido com o levantamento da curva padrão foi possível quantificar o peróxido liberado no meio durante o condicionamento em µg de peróxido.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da inibição da atividade enzimática

Os resultados obtidos a partir da leitura em espectrofotômetro correspondem indiretamente ao metabolismo das células, pois representam a inibição da atividade da succinil desidrognase ocasionada pelo peróxido de hidrogênio. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da inibição da atividade enzimática do grupo controle, que correspondem à curva padrão de viabilidade e crescimento celular.

TABELA 1 – Valores de inibição da atividade enzimática para o grupo controle

| <b>Controle</b> |            |            |
|-----------------|------------|------------|
| <b>0h</b>       | <b>24h</b> | <b>48h</b> |
| 0,055           | 0,062      | 0,098      |
| 0,034           | 0,067      | 0,111      |
| 0,031           | 0,056      | 0,128      |
| 0,035           | 0,033      | 0,085      |

Nas Tabelas 2, 3 e 4 estão apresentados os valores de inibição da atividade enzimática obtidos, divididos por tempo decorrido desde o contato das células com o meio de cultura condicionado até o momento da avaliação.

TABELA 2 – Valores de inibição da atividade enzimática obtidos na avaliação imediata

| <b>Grupo</b> | <b>Condição Experimental</b> | <b>Valores de inibição da atividade enzimática</b> |       |       |       |
|--------------|------------------------------|--|-------|-------|-------|
| <b>G1</b>    | PH 35% sem fotoativação      | 0,007  | 0,004 | 0,015 | 0,006 |
| <b>G2</b>    | PH 35%+luz alógena           | 0,003  | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>G3</b>    | PH 35%+LED                   | 0,000  | 0,000 | 0,006 | 0,009 |
| <b>G4</b>    | PH 38% sem fotoativação      | 0,000  | 0,000 | 0,000 | 0,010 |
| <b>G5</b>    | PH 38%+luz alógena           | 0,000  | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>G6</b>    | PH 38%+LED                   | 0,000  | 0,000 | 0,003 | 0,000 |

PH = Peróxido de Hidrogênio

TABELA 3 – Valores de inibição da atividade enzimática obtidos na avaliação após 24h

| <b>Grupo</b> | <b>Condição Experimental</b> | <b>Valores de inibição da atividade enzimática</b> |       |       |       |
|--------------|------------------------------|--|-------|-------|-------|
| <b>G1</b>    | PH 35% sem fotoativação      | 0,006  | 0,000 | 0,001 | 0,014 |
| <b>G2</b>    | PH 35%+luz alógena           | 0,002  | 0,000 | 0,000 | 0,010 |
| <b>G3</b>    | PH 35%+LED                   | 0,003  | 0,012 | 0,016 | 0,021 |
| <b>G4</b>    | PH 38% sem fotoativação      | 0,009  | 0,000 | 0,014 | 0,000 |
| <b>G5</b>    | PH 38%+luz alógena           | 0,010  | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>G6</b>    | PH 38%+LED                   | 0,010  | 0,000 | 0,000 | 0,009 |

PH = Peróxido de Hidrogênio

TABELA 4 – Valores de inibição da atividade enzimática obtidos na avaliação após 48h

| <b>Grupo</b> | <b>Condição Experimental</b> | <b>Valores de inibição da atividade enzimática</b> |       |       |       |
|--------------|------------------------------|--|-------|-------|-------|
| <b>G1</b>    | PH 35% sem fotoativação      | 0,016  | 0,020 | 0,025 | 0,018 |
| <b>G2</b>    | PH 35%+luz alógena           | 0,007  | 0,009 | 0,011 | 0,010 |
| <b>G3</b>    | PH 35%+LED                   | 0,012  | 0,014 | 0,009 | 0,008 |
| <b>G4</b>    | PH 38% sem fotoativação      | 0,018  | 0,001 | 0,007 | 0,010 |
| <b>G5</b>    | PH 38%+luz alógena           | 0,009  | 0,006 | 0,002 | 0,000 |
| <b>G6</b>    | PH 38%+LED                   | 0,010  | 0,001 | 0,003 | 0,017 |

PH = Peróxido de Hidrogênio

## 5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio

A partir do fator de calibração previamente calculado, foi possível calcular a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada na simulação das condições experimentais realizadas, apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 – Quantidades de peróxido de hidrogênio, em µg, liberada na simulação das condições experimentais

| <b>Grupo</b>            | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>MÉDIA</b>    |
|-------------------------|----------|----------|----------|-----------------|
| PH 35% sem fotoativação | 1,136405 | 1,171765 | 1,14721  | <b>1,151793</b> |
| PH 35%+luz alógena      | 1,461514 | 1,475264 | 1,471336 | <b>1,469371</b> |
| PH 35%+LED              | 1,282753 | 1,289629 | 1,253287 | <b>1,275223</b> |
| PH 38% sem fotoativação | 1,201231 | 1,222839 | 1,177658 | <b>1,200576</b> |
| PH 38%+luz alógena      | 1,568573 | 1,593128 | 1,527321 | <b>1,563008</b> |
| PH 38%+LED              | 1,463478 | 1,469371 | 1,430083 | <b>1,454311</b> |

PH=Peróxido de hidrogênio

## 5.3 Análise Estatística

As variáveis experimentais para avaliação do metabolismo celular foram: o agente clareador (peróxido de hidrogênio 35% e peróxido de hidrogênio 38%), a fotoativação (sem fotoativação, fotoativação com luz alógena ou com LED) e o tempo até a avaliação (imediate, 24h e 48h). Assim, o resultado foi um experimento seguindo um esquema fatorial do tipo 2 x 3 x 3, resultando em 18 condições experimentais sob quatro repetições.

As variáveis experimentais para a mensuração do peróxido de hidrogênio foram o agente clareador e a fotoativação, resultando num esquema 2 x 3, com seis condições experimentais sob três repetições.

A variável resposta foi o metabolismo celular mensurado indiretamente através do ensaio com MTT ou a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada, medida em microgramas.

Os 72 dados obtidos (18 condições experimentais multiplicadas por quatro repetições) para o metabolismo celular e 18 (seis condições experimentais multiplicadas por três repetições) para a quantificação do peróxido de hidrogênio foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTICA for Windows, version 5.5 (StatSoft Inc, Tulsa, USA, 2000).

### 5.3.1 Estatística descritiva

#### 5.3.1.1 Estatística descritiva para metabolismo celular

A Figura 10 apresenta o Bloxplot comparando graficamente os resultados de inibição da atividade enzimática obtidos em cada uma das condições experimentais, que corresponde indiretamente ao metabolismo celular.

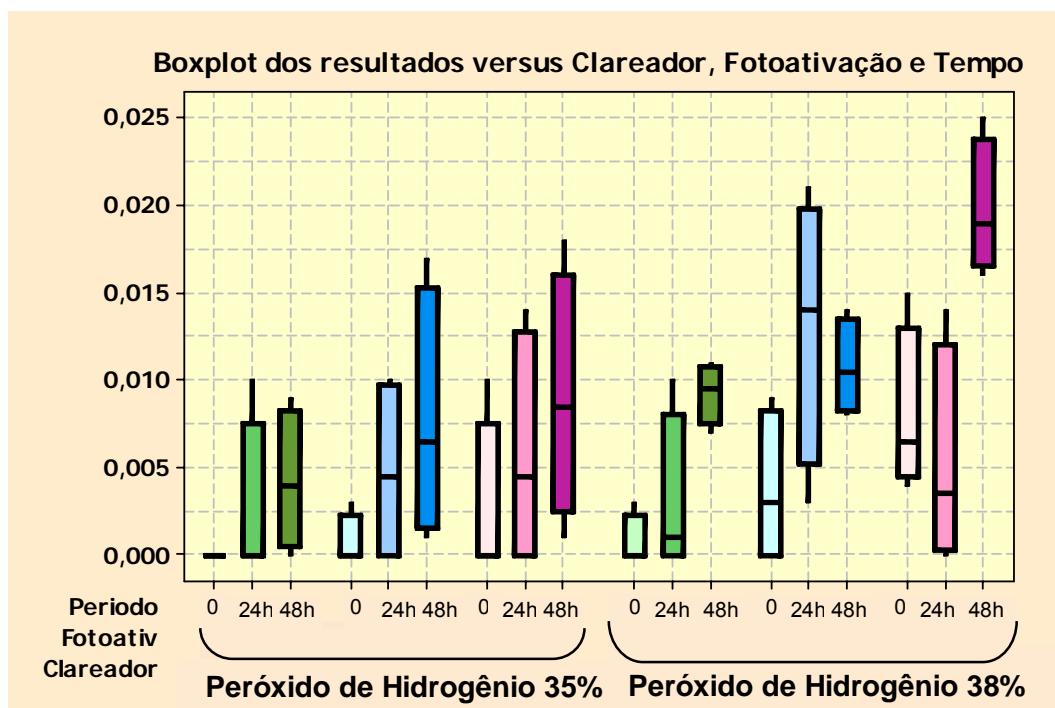


FIGURA 10 – Representação gráfica dos resultados para cada uma das condições experimentais.

As Tabelas 6, 7 e 8 mostram o resultado da análise estatística descritiva para os diferentes tempos de avaliação.

TABELA 6 – Estatística descritiva dos valores de metabolismo celular obtido na avaliação imediata

| Grupo           | Condição experimental | N | Média   | Desvio Padrão | Mediana |
|-----------------|-----------------------|---|---------|---------------|---------|
| <b>Controle</b> | Sem tratamento        | 4 | 0,03875 | 0,01097       | 0,03450 |
| <b>G1</b>       | PH 35% sem foto       | 4 | 0,00800 | 0,00483       | 0,00650 |
| <b>G2</b>       | PH 35% + luz alógena  | 4 | 0,00075 | 0,00150       | 0,00000 |
| <b>G3</b>       | PH 35% + LED          | 4 | 0,00375 | 0,00450       | 0,00300 |
| <b>G4</b>       | PH 38% sem foto       | 4 | 0,00250 | 0,00500       | 0,00000 |
| <b>G5</b>       | PH 38% + luz alógena  | 4 | 0,00000 | 0,00000       | 0,00000 |
| <b>G6</b>       | PH 38% + LED          | 4 | 0,00075 | 0,00150       | 0,00000 |

PH = Peróxido de Hidrogênio

TABELA 7 – Estatística descritiva dos valores de inibição da atividade enzimática obtido após 24h

| <b>Grupo</b>    | <b>Condição experimental</b> | <b>N</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>Mediana</b> |
|-----------------|------------------------------|----------|--------------|----------------------|----------------|
| <b>Controle</b> | Sem tratamento               | 4        | 0,05450      | 0,01502              | 0,05900        |
| <b>G1</b>       | PH 35% sem foto              | 4        | 0,00525      | 0,00640              | 0,00350        |
| <b>G2</b>       | PH 35% + luz alógena         | 4        | 0,00300      | 0,00476              | 0,00100        |
| <b>G3</b>       | PH 35% + LED                 | 4        | 0,01300      | 0,00762              | 0,01400        |
| <b>G4</b>       | PH 38% sem foto              | 4        | 0,00575      | 0,00695              | 0,00450        |
| <b>G5</b>       | PH 38% + luz alógena         | 4        | 0,00250      | 0,00500              | 0,00000        |
| <b>G6</b>       | PH 38% + LED                 | 4        | 0,00475      | 0,00550              | 0,00450        |

PH = Peróxido de Hidrogênio

TABELA 8 – Estatística descritiva dos valores de inibição da atividade enzimática obtido após 48h

| <b>Grupo</b>    | <b>Condição experimental</b> | <b>N</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>Mediana</b> |
|-----------------|------------------------------|----------|--------------|----------------------|----------------|
| <b>Controle</b> | Sem tratamento               | 4        | 0,10550      | 0,01838              | 0,10450        |
| <b>G1</b>       | PH 35% sem foto              | 4        | 0,01975      | 0,00386              | 0,01900        |
| <b>G2</b>       | PH 35% + luz alógena         | 4        | 0,00925      | 0,00171              | 0,00950        |
| <b>G3</b>       | PH 35% + LED                 | 4        | 0,01075      | 0,00275              | 0,01050        |
| <b>G4</b>       | PH 38% sem foto              | 4        | 0,00900      | 0,00707              | 0,00850        |
| <b>G5</b>       | PH 38% + luz alógena         | 4        | 0,00425      | 0,00403              | 0,00400        |
| <b>G6</b>       | PH 38% + LED                 | 4        | 0,00775      | 0,00727              | 0,00650        |

PH = Peróxido de Hidrogênio

A Tabela 9 apresenta a média da inibição da atividade enzimática para cada grupo nos diferentes tempos de avaliação, comparando-se ao controle (curva padrão de viabilidade e crescimento).

TABELA 9 – Valores referentes às médias da inibição da atividade enzimática nos diferentes tempos de avaliação (continua).

| GRUPOS          | Condição experimental   | 0h      | 24h     | 48h     |
|-----------------|-------------------------|---------|---------|---------|
| <b>Controle</b> | Sem tratamento          | 0,04050 | 0,05517 | 0,11217 |
| <b>G1</b>       | PH 35% sem fotoativação | 0,00800 | 0,00525 | 0,01975 |
| <b>G2</b>       | PH 35%+luz alógena      | 0,00075 | 0,00300 | 0,00925 |
| <b>G3</b>       | PH 35%+LED              | 0,00375 | 0,01300 | 0,01075 |
| <b>G4</b>       | PH 38% sem fotoativação | 0,00250 | 0,00575 | 0,00900 |
| <b>G5</b>       | PH 38%+luz alógena      | 0,00000 | 0,00250 | 0,00425 |
| <b>G6</b>       | PH 38%+LED              | 0,00075 | 0,00475 | 0,00775 |

PH=Peróxido de Hidrogênio

As Figuras 11, 12 e 13 ilustram a média da inibição da atividade enzimática de todos os grupos avaliados, do Whiteness HP e Opalescence Xtra Boost, respectivamente.

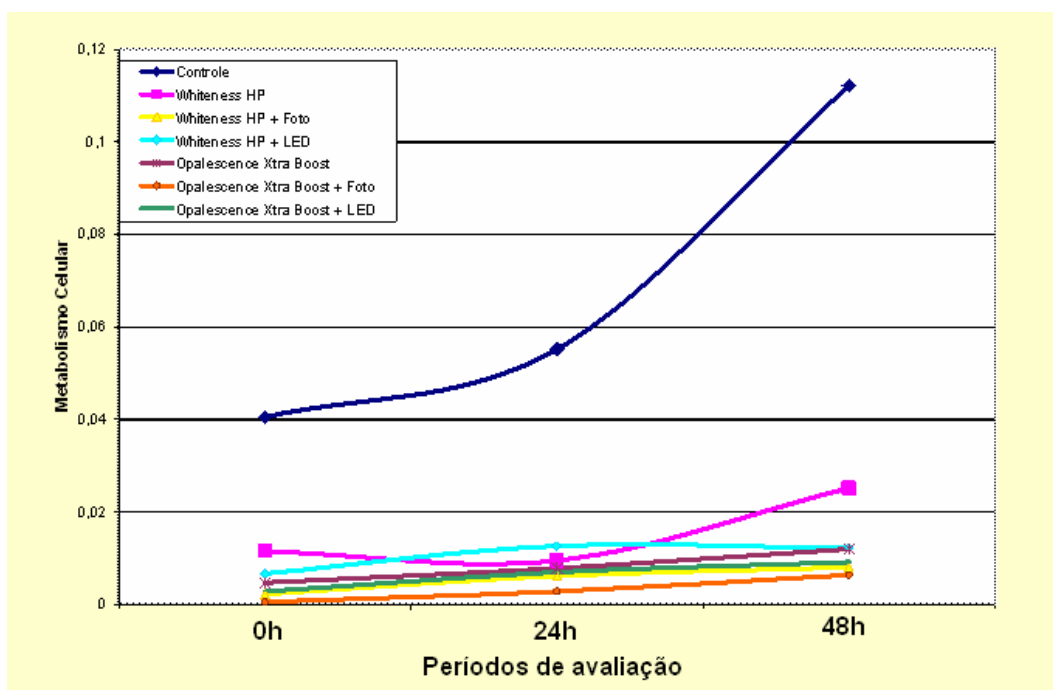


FIGURA 11 – Gráfico das médias da inibição da atividade enzimática obtido, comparados com a curva padrão de viabilidade e crescimento celular (controle)

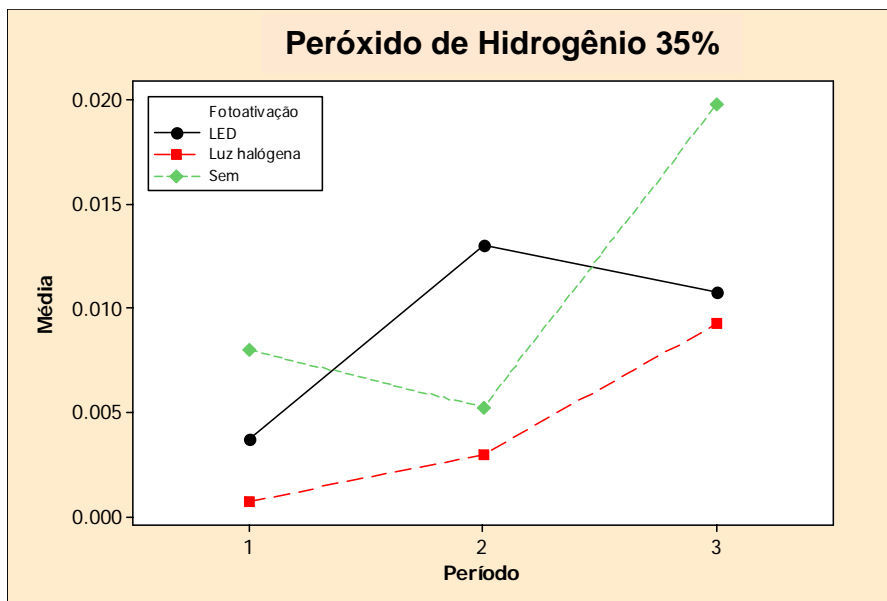


FIGURA 12 – Gráfico das médias da inibição da atividade enzimática para o peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP)

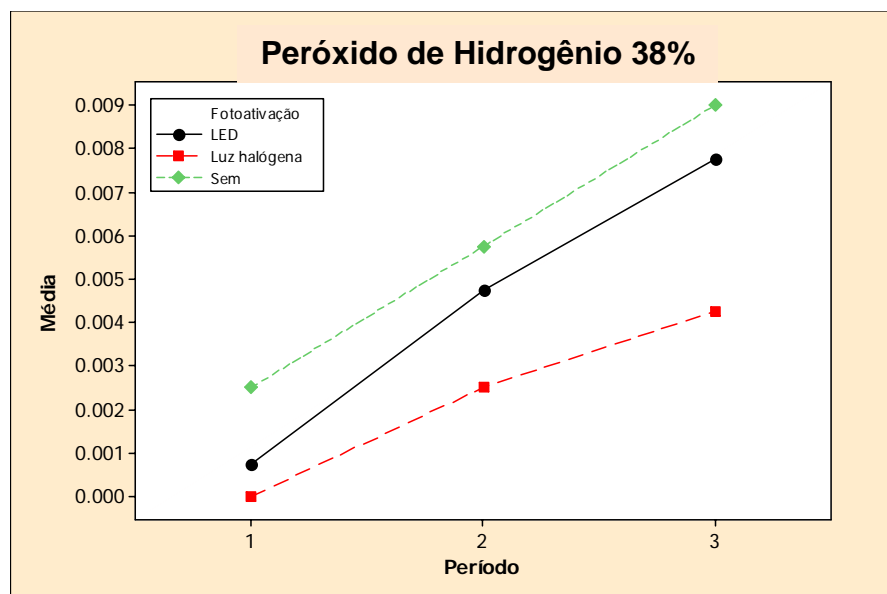


FIGURA 13 – Gráfico das médias da inibição da atividade enzimática para o peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost).

### 5.3.1.2 Estatística descritiva para quantidade de peróxido de hidrogênio

A Tabela 10 apresenta a estatística descritiva dos valores encontrados para a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada na solução tampão de acetato em cada uma das condições experimentais.

TABELA 10 - Estatística descritiva da quantidade de peróxido de hidrogênio

| Grupo | Condição experimental | N | Média   | Desvio Padrão | Mediana |
|-------|-----------------------|---|---------|---------------|---------|
| G1    | PH 35% sem foto       | 3 | 1.15179 | 0.01812       | 1.14721 |
| G2    | PH 35% + luz alógena  | 3 | 1.46937 | 0.00708       | 1.47134 |
| G3    | PH 35% + LED          | 3 | 1.27522 | 0.01931       | 1.28275 |
| G4    | PH 38% sem foto       | 3 | 1.20058 | 0.02260       | 1.20123 |
| G5    | PH 38% + luz alógena  | 3 | 1.56301 | 0.03325       | 1.56857 |
| G6    | PH 38% + LED          | 3 | 1.45431 | 0.02119       | 1.46348 |

PH=Peróxido de Hidrogênio

A figura 14 representa graficamente as quantidades de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.

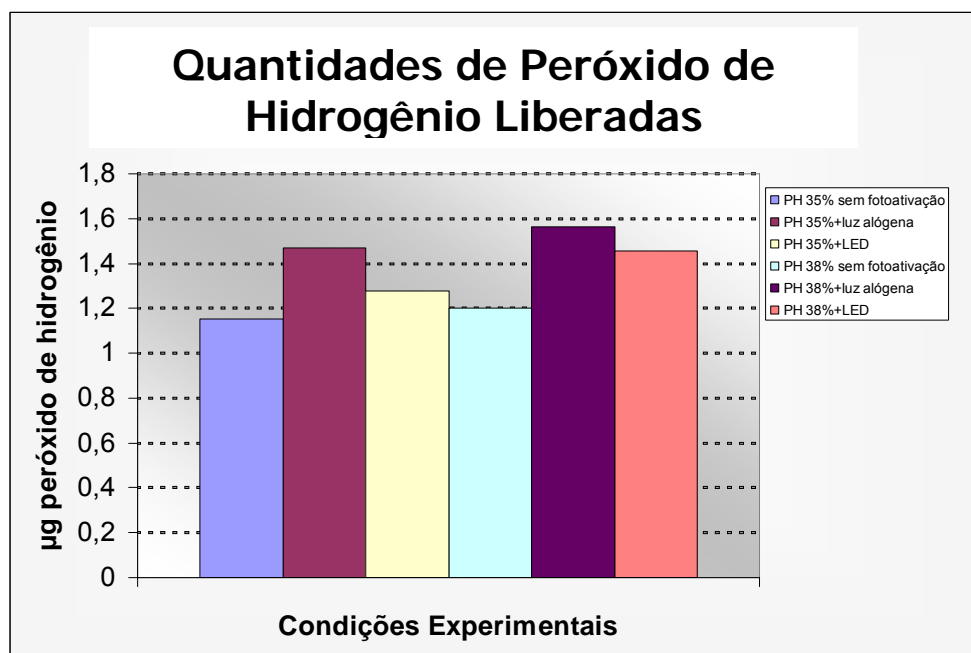


FIGURA 14 – Gráfico de barras ilustrando a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais

### 5.3.2 Teste de Dunnet

#### 5.3.2.1 Teste de Dunnet para a inibição da atividade enzimática celular

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

### 5.3.3 ANOVA

#### 5.3.3.1 ANOVA para a inibição da atividade enzimática

A Tabela 11 apresenta o resultado da análise estatística ANOVA realizada para as três variáveis de estudo.

TABELA 11 - ANOVA para os valores de inibição da atividade enzimática celular

| Efeito                       | gl | SQ      | QM        | F     | P       |
|------------------------------|----|---------|-----------|-------|---------|
| Clareador                    | 1  | 0,00029 | 2.920E-04 | 11,87 | 0.0011* |
| Fotoativação                 | 2  | 0,00032 | 1.624E-04 | 6,60  | 0.0027* |
| Tempo                        | 2  | 0,00068 | 3.411E-04 | 13,87 | 0,0001* |
| Clareador x Fotoativação     | 2  | 0,00003 | 1.739E-05 | 0,71  | 0,4977  |
| Clareador x Tempo            | 2  | 0,00004 | 2.239E-05 | 0,91  | 0,4085  |
| Tempo x Fotoativação         | 4  | 0,00016 | 4.108E-05 | 1,67  | 0,1704  |
| Clareador x Fotoativ x Tempo | 4  | 0,00014 | 3.608E-0  | 1,47  | 0,2251  |
| Resíduo                      | 54 | 0,00133 | 2.460E-05 |       |         |
| Total                        | 71 | 0,00302 |           |       |         |

\* $p < 0,05$

Através da Tabela 11 é possível observar que há diferença estatisticamente significativa nas variáveis clareador, fotoativação e tempo isoladamente. Entretanto, não houve efeito de interação entre os três fatores em estudo. Isso indica que o

relacionamento entre duas das variáveis é o mesmo independentemente da variação da terceira. Por exemplo: a relação entre clareador e fotoativação é a mesma em qualquer período de avaliação.

Como a variável agente clareador apresenta apenas dois fatores (peróxido de hidrogênio 35% e 38%), conclui-se que há diferença entre eles. Para as variáveis fotoativação e tempo foi necessário aplicar o teste de Tukey.

### 5.3.3.2 ANOVA para a quantidade de peróxido de hidrogênio

A Tabela 12 apresenta o resultado da análise estatística ANOVA realizada para a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada na solução tampão de acetato em cada uma das condições experimentais.

TABELA 12 - ANOVA para as quantidades de peróxido de hidrogênio

| <b>Efeito</b>        | <b>GI</b> | <b>SQ</b> | <b>QM</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Ativação             | 2         | 0.348194  | 0.174097  | 370.88   | 0.000*   |
| Clareador            | 1         | 0.051684  | 0.051684  | 110.10   | 0.000*   |
| Ativação x Clareador | 2         | 0.013146  | 0.006573  | 14.00    | 0.001*   |
| Erro                 | 12        | 0.005633  | 0.000469  |          |          |
| Total                | 17        | 0.418657  |           |          |          |

\*p<0,05

Analisando a Tabela 12 verifica-se que tanto o agente clareador quanto a fotoativação apresentaram diferenças estatisticamente significativas, havendo interação entre as variáveis. Para detectar grupos semelhantes foi aplicado o teste de Tukey.

### 5.3.4 Teste de Tukey

O teste de Tukey foi aplicado a fim de verificar quais fatores dentro de cada variável apresentavam diferença entre si. Letras iguais representam grupos sem diferença estatisticamente significativas.

#### 5.3.4.1 Teste de Tukey para a inibição da atividade enzimática celular

Os grupos que receberam fotoativação por luz alógena (G2 e G5) apresentaram diferença estatística significativa dos grupos que não receberam fotoativação (G1 e G4) e dos que receberam fotoativação por LED (G3 e G6), conforme pode ser observado na Tabela 13.

TABELA 13 – Teste de Tukey para a variável Fotoativação

| Fotoativação    | Grupos Homogêneos |
|-----------------|-------------------|
| Sem Luz Alógena | A                 |
| LED             | B                 |
|                 | A                 |

Quando feita análise dos diversos períodos de avaliação é possível observar que não houve diferença estatística significativa entre a avaliação imediata e a após 24h, mas que ambas apresentaram diferença quando comparadas com a avaliação após 48h (Tabela 14).

TABELA 14 – Teste de Tukey para a variável tempo

| Tempo    | Grupos Homogêneos |
|----------|-------------------|
| Imediato | A                 |
| 24h      | A                 |
| 48h      | B                 |

#### 5.3.4.2 Quantidade de peróxido de hidrogênio

A aplicação do teste de Tukey mostrou que o grupo do peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) e fotoativação com luz alógena e o grupo do peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) fotoativado por LED não apresentaram diferença estatisticamente significativa. As demais condições experimentais apresentaram diferenças entre si, conforme apresentado na Tabela 15.

TABELA 15 – Teste de Tukey para as quantidades de peróxido de hidrogênio liberadas.

| Grupos                  | Grupos Homogêneos |
|-------------------------|-------------------|
| PH 35% sem fotoativação | A                 |
| PH 35%+luz alógena      | B                 |
| PH 35%+LED              | C                 |
| PH 38% sem fotoativação | D                 |
| PH 38%+luz alógena      | E                 |
| PH 38%+LED              | B                 |

PH=Peróxido de Hidrogênio

## 6 DISCUSSÃO

A utilização de agentes clareadores em dentes com vitalidade pulpar leva à penetração de peróxido de hidrogênio, que libera radicais oxidativos, no esmalte e dentina, atingindo a polpa. Estes radicais por sua vez agem no tecido pulpar com efeitos diretos sobre fibroblastos presentes. Desta forma, cultura de células obtidas a partir de polpa humana podem ter relação com efeitos ocorridos no tecido pulpar *in vivo*. No presente estudo, ao utilizar peróxido de hidrogênio 35% e 38%, verificou-se que tanto a viabilidade imediata quanto o crescimento celular foram afetados, sendo que o peróxido de maior concentração apresentou-se mais citotóxico.

Este trabalho utilizou experimento *in vitro*, sobre um modelo de cultivo celular, que constitui um teste inicial para a avaliação de materiais empregados na odontologia. Diferentes tipos de células podem ser utilizados para este tipo de análise, e estas células podem ser provenientes de linhagens imortalizadas ou linhagens primárias, principalmente fibroblastos da gengiva, mucosa ou polpa (Freshney<sup>18</sup>, Schmalz<sup>36</sup>). Optou-se pelo uso de células de linhagem primária, obtidas a partir de polpa humana, pelo fato destas células possuírem potencial metabólico específico mais próximo das condições *in vivo* (Freshney<sup>18</sup>, Koulaouzidou et al.<sup>26</sup>, Schmalz<sup>36</sup>).

A análise da citotoxicidade empregada foi escolhida por possibilitar controle das variáveis e quantificação precisa dos resultados, o que nem sempre é viável num modelo *in vivo*. Este tipo de teste foi

utilizado por outros autores que obtiveram resultados bastante coerentes ao testar diferentes tipos de agentes clareadores (Aren<sup>2</sup>, Hanks et al.<sup>22</sup>).

Para os testes de citotoxicidade são encontrados diferentes formas de contato dos agentes clareadores sobre células. Hanks et al.<sup>22</sup>, Ribeiro et al.<sup>34</sup>, realizaram diluições do peróxido de hidrogênio para aplicar sobre as células, testando a citotoxicidade e a genotoxicidade, respectivamente. Aren<sup>2</sup>, condicionou o meio de cultura com o agente clareador antes da aplicação sobre as células, assemelhando-se mais à utilização clínica. Desta forma, para o presente estudo optou-se também pelo condicionamento do meio de cultura. Este método permite que as substâncias liberadas durante a aplicação e fotoativação sejam concentradas no meio de cultivo, sem que ocorra contato direto das células com o agente clareador (Freshney<sup>18</sup>, Cavalcanti et al.<sup>8</sup>).

Esta metodologia é bastante adequada para o teste de agentes clareadores, por se aproximar da forma como a substância é utilizada clinicamente (Aren<sup>2</sup>, Azevedo et al.<sup>4</sup>, Cavalcanti et al.<sup>8</sup>, Schmalz<sup>36</sup>), já que estes produtos não entram em contato direto com as células pulpares durante o clareamento. Assim, o condicionamento do meio de cultura nos possibilita mimetizar a situação clínica deste tratamento.

Para analisar a viabilidade e crescimento celular podem ser utilizadas várias metodologias, sendo o método de exclusão pela coloração com azul de Tripán e o ensaio com MTT os mais simples e mais difundidos. A exclusão pela coloração com azul de Tripán identifica e exclui as células mortas e é um método utilizado para testes em culturas de células por diferentes autores (Aren<sup>2</sup>, Azevedo et al.<sup>4</sup>, Cavalcanti et al.<sup>8</sup>, Koulaouzidou et al.<sup>26</sup>). Embora seja um método já consagrado e válido, o azul de Tripán só consegue penetrar no interior das células que já se apresentam com a membrana rompida, podendo não excluir algumas células mortas. Além disso, não apresenta sensibilidade para

identificar alterações no metabolismo celular. O ensaio com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídios, através da atividade da succinil desidrogenase. Permite mensuração da atividade mitocondrial celular através da redução do MTT (Freshney<sup>18</sup>). Este ensaio, utilizado por Hanks et al.<sup>22</sup>, foi escolhido para realizar o presente estudo por oferecer resultados mais precisos, sendo sensível a pequenas alterações no metabolismo celular.

A sensibilidade pulpar, efeito indesejado freqüentemente encontrado na prática clínica (Tredwin et al.<sup>42</sup>, Dahl<sup>13</sup>), tem sido relacionada com a concentração e tempo de utilização do agente clareador (Nathanson<sup>30</sup>). Diversos autores demonstraram que o peróxido de hidrogênio dos agentes clareadores é capaz de atravessar os tecidos duros dos dentes (Benetti et al.<sup>5</sup>, Bowles e Ugwaneri<sup>6</sup>, Cooper et al.<sup>10</sup> Hanks et al.<sup>22</sup>, Gökay et al.<sup>20-21</sup>, Pretti et al.<sup>32-33</sup>) e que maiores concentrações ocasionavam maior penetração (Gökay et al.<sup>21</sup>, Cooper et al.<sup>10</sup>, Hanks et al.<sup>22</sup>, Bowles e Ugwaneri<sup>6</sup>). Dessa forma pode-se explicar a relação entre sensibilidade e concentração do agente clareador. No presente estudo foram utilizadas altas concentrações de peróxido de hidrogênio (35% e 38%), a fim de avaliar as conseqüências de sua utilização sobre as células em cultura.

Verificou-se que na cultura celular sem aplicação do agente clareador (grupo controle) os valores do metabolismo celular foram significativamente maiores do que nos grupos em que foram utilizados os agentes clareadores, para todos os tempos de avaliação. Verificou-se ainda que o peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) levou a maiores alterações no metabolismo celular do que o peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP). A maior citotoxicidade do peróxido de hidrogênio 38% era esperada, pois um agente clareador de maior concentração libera maior quantidade de peróxido de hidrogênio (Pretti et al.<sup>32-33</sup>), conforme se verificou a partir da quantificação do peróxido de

hidrogênio nas situações experimentais, apresentando efeitos deletérios proporcionais.

Os resultados também mostraram que a alteração no metabolismo celular foi maior nos períodos iniciais, imediatamente após a aplicação do meio condicionado, reduzindo nas avaliações após 24 e 48 horas. Exceção foram a avaliação após 24 horas do peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) sem fotoativação, que teve valores menores do que na avaliação imediata, e o peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) ativado por LED, que apresentou redução entre as análises de 24 e 48 horas. Esta alteração pode ser devido a possível diferença no número de células nos poços, embora as etapas de contagem e plaqueamento tenham sido realizadas criteriosamente, ou então devido a alterações genéticas, que no primeiro momento aumentaram o metabolismo celular, mas em períodos de observação maiores levariam à morte celular. O aumento, na maioria dos grupos, do valor obtido para o metabolismo celular após 24 horas e 48 horas, indica o crescimento das células e que imediatamente após a utilização dos agentes clareadores ocorre uma diminuição no metabolismo celular, mas com o passar do tempo existe uma recuperação das células, que se mantiveram viáveis, retornando à normalidade.

O maior valor de metabolismo celular dos grupos experimentais, que aparece na avaliação após 48 horas no grupo que recebeu peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) (0,01975), não chega à metade do valor apresentado pelo grupo controle na avaliação imediata (0,04050). Estes resultados condizem com aqueles encontrados por Aren<sup>2</sup> e Hanks et al.<sup>22</sup>. Os autores encontraram redução na viabilidade e crescimento celular após exposição a agentes clareadores, utilizando metodologias diferentes e confirmaram o efeito citotóxico dos agentes clareadores. Mesmo após a recuperação celular (48 horas) a viabilidade celular é bem inferior quando comparada às células que não receberam agente clareador. Tentando extrapolar estes resultados para a clínica,

pode-se dizer que embora alguns autores, ao realizar análise histopatológica, afirmem que os danos teciduais após clareamento sejam reversíveis (Anderson et al.<sup>1</sup>, Fugaro et al.<sup>19</sup> e Robertson e Melfy<sup>35</sup>), ocorre muita destruição celular com conseqüências no mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar. Esta hipótese foi comprovada por Miranda<sup>29</sup>, que verificou em dentes de cães submetidos ao clareamento, ocorrência de necrose de coagulação em alguns espécimes, após 30 dias, e fibrosamento pulpar em todas as polpas 60 dias após o clareamento.

Comparando-se o LED, a luz alógena e a ausência de fotoativação, verificou-se que os piores resultados foram nos grupos fotoativados por luz alógena, seguidos pelos que receberam fotoativação por LED e sem fotoativação. As médias do metabolismo celular mostram que o uso de peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) com luz alógena propiciou a maior quantidade de peróxido de hidrogênio liberada e zerou o metabolismo celular na avaliação imediata, indicando citotoxicidade aguda. Ainda nesta avaliação, o grupo que recebeu peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) com fotoativação por luz alógena apresentou a mesma média obtida para o grupo do peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) com LED (0,00075). Este valor é considerado muito baixo e indica citotoxicidade imediata. Também na mensuração do peróxido de hidrogênio liberado na solução tampão de acetato, as quantidades liberadas com uso de peróxido de hidrogênio 35% ativado por luz alógena e peróxido de hidrogênio 38% ativado por LED não apresentaram diferença estatística.

Ao comparar-se a quantidade de peróxido liberado diretamente na solução tampão de acetato com os valores de metabolismo celular imediato, verifica-se que quanto maior a quantidade de peróxido liberado (Tabela 5), maior a redução no metabolismo celular (Tabela 4).

Na avaliação após 24 horas, os valores obtidos para peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) e peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) foram semelhantes quando não houve fotoativação (0,00525 e 0,00575, respectivamente) e quando houve fotoativação por luz alógena (0,00300 para peróxido de hidrogênio 35% e 0,00250 para peróxido de hidrogênio 38%). Provavelmente, o período de 24 horas, por ser intermediário, não reflete a consequência da ação do peróxido, ou seja, imediatamente o metabolismo cai, podendo chegar a zero, e após 48 horas as condições do metabolismo celular estão mais definidas.

Ao analisar os resultados após 48 horas, verifica-se que o grupo que foi tratado com peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP) associado à luz alógena apresentou o mesmo resultado que o peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Xtra Boost) sem fotoativação. Este resultado mostra que a luz alógena aumenta os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio, podendo levar a danos celulares semelhantes àqueles obtidos com peróxido mais concentrado sem fotoativação. É provável que a ativação com luz alógena provoque maior liberação de radicais oxidativos quando comparado a outras fontes de ativação. Neste estudo avaliou-se a citotoxicidade com meio já condicionado. *In vivo* o dano celular provocado pela fotoativação pode ser ainda maior, uma vez que se soma à maior liberação do peróxido, proporcionada pela fonte de ativação, com o aumento da temperatura ocorrida com a fotoativação. Portanto, este procedimento *in vivo* pode levar a danos celulares irreversíveis.

A fotoativação é utilizada durante o clareamento dental de consultório com o intuito de reduzir o tempo clínico, melhorar o resultado final e, principalmente, como forma de *marketing*. Várias fontes de luz são utilizadas para esta finalidade. Entretanto, as fontes de ativação mais comumente utilizadas no clareamento de consultório são o LED e a luz alógena, motivo da escolha destas fontes no presente estudo.

Verificou-se que a utilização de fotoativação por LED não representou diferença significativa com relação ao grupo que não foi fotoativado. De acordo com Buchalla e Attin<sup>7</sup>, os tipos de luz utilizados na prática clínica não possuem capacidade de ativar o agente clareador por fotólise, mas são capazes de acelerar o processo de clareamento principalmente pelo aumento de temperatura. O LED propicia o menor aumento de temperatura comparado ao laser de Diodo, luz alógena convencional e de alta intensidade (Eldeniz et al.<sup>16</sup>). Portanto, o LED propicia menor ativação do agente clareador do que a luz alógena, assemelhando-se ao grupo sem fotoativação. Analisando a penetração do peróxido de hidrogênio 35% para o interior da câmara pulpar com diferentes fontes de ativação, Pretti et al.<sup>33</sup> averiguaram que os grupos que receberam ativação por LED ou que não receberam ativação não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo que recebeu ativação pelo laser Nd-YAG. A quantidade de peróxido que penetrou na cavidade pulpar indica que o LED propiciou quantidade de peróxido de hidrogênio livre semelhante à obtida sem fotoativação. Assim, os resultados encontrados no presente estudo estão coerentes com os trabalhos apresentados na literatura.

Os grupos ativados por luz alógena apresentaram viabilidade e crescimento celular significativamente menor, indicando aumento da citotoxicidade quando da realização de fotoativação com este tipo de luz. Ao analisar a penetração de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar com ou sem fotoativação com luz alógena sobre um mesmo gel clareador (peróxido de hidrogênio 35%), Valera\* verificou maior penetração de peróxido para o interior da câmara pulpar nos dentes que receberam fotoativação do que naqueles que não receberam ( $0,2748 \pm 0,2413$  e  $0,2483 \pm 0,2008$   $\mu\text{g}$  de peróxido de hidrogênio, respectivamente), indicando que o uso de luz pode influenciar na quantidade de peróxido que atinge a câmara pulpar. Se uma maior quantidade de peróxido de hidrogênio foi capaz de penetrar na câmara

\* Valera MC. "Análise da penetração de agentes clareadores para o interior da câmara pulpar, utilizando a técnica de clareamento vital e não vital", processo FAPESP nº 02/12604-3, 2003.

pulpar, maior quantidade de peróxido de hidrogênio é também liberada no meio de cultura durante a fotoativação, causando maiores danos sobre as células.

Verificou-se que o clareamento dental tem se mostrado como importante ferramenta na melhora da estética do sorriso. Portanto, a fim de que sejam obtidos os melhores resultados com menor dano possível, deve-se avaliar criteriosamente as indicações, tipo de tratamento, levando em consideração possíveis riscos, principalmente para os tecidos vivos. Os resultados encontrados neste e em outros estudos indicam que o peróxido de hidrogênio apresenta efeitos deletérios, em especial quando do uso de luz alógena como fonte de fotoativação. Como o resultado estético do clareamento é semelhante para diferentes técnicas e agentes clareadores (Sulieman et al.<sup>37</sup>, Heymann<sup>23</sup> e Joiner<sup>24</sup>), ao escolher a técnica e o agente clareador a ser utilizado a deve-se optar por aqueles que propiciem bons resultados com dano mínimo. Além disso, outros estudos são necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio nas células e tecidos, assim como seus efeitos deletérios no organismo.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos dentro das condições experimentais deste estudo, pode-se concluir que:

- a) a citotoxicidade e a liberação do peróxido de hidrogênio foram proporcionais à concentração do mesmo (38% mais citotóxico que 35%);
- b) a fotoativação com luz alógena aumentou significativamente a liberação e a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio;
- c) o metabolismo celular foi menor imediatamente após o contato com o meio condicionado, com aumento do metabolismo após 24 e/ou 48 horas;
- d) uma vez que em todas as condições experimentais os produtos liberados a partir dos géis clareadores foram citotóxicos, a escolha do tratamento clareador, bem como da técnica de clareamento devem ser realizadas com cuidado e critério a fim de evitar danos aos tecidos vivos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. Anderson DG, Chiego DJ, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod.* 1999 Apr., 25(4):247-50.
2. Aren G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintess Int.* 2003 May, 34(5):361-5.
3. Ausschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Scullan A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent.* 2005 Mar.-Apr., 30(2):156-63.
4. Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates use as retrograde filling material: an *in vitro* analysis. *Pesq Odontol Bras.* 2003 Apr.-June, 17(2):113-8
5. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004 Feb., 37(2):120-4.
6. Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987 Aug., 13(8):375-7
7. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser. *Dent Mat.* 2006, article in press: 11 páginas.
8. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005 Aug., 38(8 ):505-9.

\* De acordo com o estilo Vancouver International Committee of Medical journal Editors

9. Christensen GJ. Bleaching teeth – Which way is best? *J Est Restor Dent.* 2003, 15(3):137-9
10. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992 July, 18(7):315-7.
11. Costa CAS, Teste de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. *Metodologia científica – ensino e pesquisa em odontologia.* 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001. Cap.9, p146-160.
12. Daduon MP, Bartlett DW Safety issues when using carbamide peroxide to bleach vital teeth – a review of the literature. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2003 Mar., 11(1):9-13.
13. Dahl JE. Tooth Bleaching – A critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4):292-304.
14. Deliperi S, Bardwell DN, Papathanasiou A. Clinical evaluation of a combined in-office and take-home bleaching system. *JADA.* 2004 May, 135 (5):628-34.
15. Dostalova T, Jelinkova H, Housova D, Sulc J, Nemecek M, Miyagi M, et al. Diode laser-activated bleaching. *Braz Dent J.* 2004, 15 (special issue):Si 3- Si 8.
16. Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Feb., 72(2):254-9.
17. Federation Dentaire International. Recommended standard for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30(2):140-88.
18. Freshney RI *Culture of Animal Cells – A manual of basic technique.* 4<sup>th</sup> ed. Indianapolis: Wiley Liss; 2000.
19. Fugaro JO, Nordahl I; Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Operat Dent.* 2004 July-Aug.; 29(4):363-68

20. Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000 Feb., 26(2):92-4.
21. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. *In vitro* peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005 Aug., 38():516-20
22. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J Dent Res.* 1993 May, 72(5):931-8.
23. Heymann HO. Tooth whitening: facts and fallacies. *Br Dent J.* 2005, 198(8):514.
24. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dent.* 2006 Aug., 34(1):412-19.
25. Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *JADA.* 2002 Aug, 133 (8):1076-82
26. Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dental Traumatol.* 1998 Feb., 14(1):21-5.
27. Kugel G, Ferreira S. The art and science of tooth whitening. *J Mass Dent Soc.* 2005, 53(4):34-7.
28. Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J Am Dent Assoc.* 2004 Feb., 135(2):194-201, quiz 228-9.
29. Miranda CB. Resposta pulpar de dentes de cães submetidos ao tratamento clareador [tese]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Odontologia; 2005.
30. Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *JADA.* 1997 Apr, 128(suppl):41-4 S.

31. Papathanasiou A, Kastali S, Perry RD, Kugel G. Clinical evaluation of a 35% hydrogen peroxide in-office whitening system. *Compend Contin Educ Dent*. 2002 Apr., 23(4):335-46.
32. Pretti M, Valera MC, Mancini MN, Benetti AR, Miranda CB. Penetração de peroxide de hidrogênio na câmara pulpar após clareamento com agentes de consultório fotoativado ou não [resumo]. *Braz Oral Res*. 2004 Sep, 18(Supplement):91.
33. Pretti M, Valera MC, Araújo MAM, Camargo SEA, Cardoso PE, Kojiman AN. Penetração de peróxido de hidrogênio 35% na câmara pulpar de dentes bovinos, utilizando ativação por LED ou laser Nd:YAG [resumo]. *Braz Oral Res*. 2005 Sep, 19(Supplement):49.
34. Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by using single cell gel (comet) assay. *J Oral Rehabil*. 2005 Oct., 32(10):766-71.
35. Robertson WD, Melfy RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod*. 1980 July, 6(7):645-9.
36. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J dent*. 1994, 22(Suppl.2):S6-S11.
37. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees J. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: a *in vitro* study. *J Dent*. 2004 May, 32(4):295-9.
38. Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study *in vitro*. *J Dent*. 2005 Jan., 33(1):33-40.
39. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intrapulpal temperature rises during tooth bleaching: an *in vitro* study. *Brit Den J*. 2005 July, 199(1):37-40.
40. Sydney GB, Barletta FB, Sydney RB. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod*. 1980 July, 6(7):645-9.

41. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, Goodson JM. Light augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc.* 2003 Feb., 134(2):167-75.
42. Tredwin CJ, Naik S; Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Brit Dent J.* 2006 Apr., 200(7):371-6.
43. Tripton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1995 Jan., 66(1):7-13.
44. Valera MC; Kubo CH; Assis NMP. Clareamento e microabrasão dental. In: Araújo MAM, Pagani C, Valera MC, Rodrigues JR, di Nicoló R. (Org.). *Estética para o clínico geral.* 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas 2005, 113-78.
45. Wetter NU, Walverde DA, Kato IT, Eduardo CP. Bleaching efficacy of whitening agents activated by xenon lamp and 960-nm diode radiation. *Photomed Laser Surg.* 2004 Dec., 22(6):489-493.
46. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.* 1965 Apr, 19(4):515-30

## ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia – Unesp.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / suely@fosjc.unesp.br

---

 **CERTIFICADO**  
**Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **038/2007-PH/CEP**, sobre **“Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores de consultório variando o mecanismo de ativação”**, sob a responsabilidade de **MARCIA CARNEIRO VALERA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de abril de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
**Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC**

NAKÁO MP. **In office bleaching agents' cytotoxicity evaluation, using two different activation mechanisms, on pulp fibroblasts.** 2007. 74f. Dissertação (mestrado em Odontologia Restauradora-Área Endodontia). Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José dos Campos.

### ABSTRACT

*The propose of this study was to evaluate hydrogen peroxide (HP) cytotoxicity, from two in office bleaching agents, on human pulp fibroblasts (FP5) culture. The cells were cultured in DMEM. Only cells between fifth and tenth passages were used. Each well of culture plate, corresponding to experimental groups, received conditioned middle according to the experimental groups: G1- HP 35% without light activation; G2- HP 35% activated by halogen light; G3- HP 35% activated by LED; G4- HP 38% without light activation; G5- HP 38% activated by halogen light; G6- HP 38% activated by LED. Viability and growth standard curve was obtained from an untreated group and was used as control. MTT assay was performed in four wells for each group, in periods of 0, 24 or 48 hours, to measure cells viability and growth. Hydrogen peroxide leased in experimental conditions was also measured, using acetate buffer instead culture middle. Results were analyzed by Dunnet test, variance analysis and Tukey test. All experimental groups showed difference from control. The cytotoxicity and quantity of hydrogen peroxide was higher with 38% hydrogen peroxide (Opalescence Xtra Boost) than with 35% hydrogen peroxide (Whiteness HP). Activation by halogen light caused smaller cell growth and viability but higher hydrogen peroxide amount, and LED was statically similar to the group without activation. 48 hours evaluation was different then 0 and 24 hour evaluations. Conclusions: cytotoxicity was proportional to quantity of hydrogen peroxide leased; halogen light activation increased the leased hydrogen peroxide, and cell viability was lower immediately after contact with conditioned middle, increasing after 24 and/or 48 hours.*

**KEYWORDS:** dental bleaching, hydrogen peroxide, cell culture, cytotoxicity