



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

PEDRO CAIO ALVES BARROS

**ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR DIFERENTES GÉIS
CLAREADORES DENTAIS**

2023

PEDRO CAIO ALVES BARROS

**ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO POR DIFERENTES GÉIS CLAREADORES DENTAIS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Dentística. Linha de pesquisa: Diagnóstico, prevenção e tratamento de alterações dos tecidos dentais.

Orientador: Prof. Assoc. Carlos Rocha Gomes Torres

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Barros, Pedro Caio Alves

Análise do perfil de liberação do princípio ativo peróxido de hidrogênio por diferentes géis clareadores dentais / Pedro Caio Alves Barros. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Carlos Rocha Gomes Torres.

1. Célula de Franz. 2. Clareamento dental. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Princípio ativo. I. Torres, Carlos Rocha Gomes, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A presente pesquisa propõe entender melhor os mecanismos de difusão do principal agente clareador empregado nos consultórios. A compreensão da cinética química e dos mecanismos de ação do peróxido de hidrogênio irá permitir a otimização de agentes clareadores potencializando sua eficácia e segurança, e diminuindo os efeitos adversos aos pacientes submetidos à essa modalidade de tratamento.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research proposes to better understand the diffusion mechanisms of the main bleaching agent used in dental offices. Understanding the chemical kinetics and mechanisms of action of hydrogen peroxide will allow the optimization of bleaching agents, enhancing their efficacy and safety, and reducing adverse effects for patients undergoing this treatment modality.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Carlos Rocha Gomes Torres (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa Dra. Natália Cortez Gutierrez

Universidade Braz Cubas (UBC)

Centro Universitário Braz Cubas

Campus de Mogi das Cruzes

Profa Dra. Alessandra Buhler Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 31 de julho de 2023.

DEDICATÓRIA

À Deus pelo dom da vida concedido, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meio a essa longa jornada terrena e por sempre estar junto nos momentos de maior dificuldade iluminando minhas decisões e escolhas.

Aos meus pais, **Alessandra Aparecida Alves Barros** e **Enos da Silva Barros**, por todo seu amor e dedicação, sempre acreditando em mim e nos meus sonhos, apoiando cada uma de minhas escolhas.

Às minhas avós **Ana Alves** e **Catarina Barros** pelo carinho e cuidado que sempre tiveram.

À minha querida amiga e eterna duplinha, **Ana Carolina Ferreira Bonafé**, e ao grande amigo, **Jefferson Pires da Silva Júnior**, por todo carinho e apoio incondicional, indispensáveis nos inúmeros desafios para a conclusão de mais essa etapa na minha vida.

Aos queridos alunos das Turmas 66 do curso Integral e T3 do curso Vespertino de Odontologia, por darem propósito à minha formação e a oportunidade de aprendermos e crescermos juntos em cada dia de nosso convívio.

Ao companheirinho Liu por seu amor sempre incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antônio Talge Carvalho.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, coordenado pelo Prof. Adj Alexandre Luiz Souto Borges.

Ao meu orientador, Prof. Assoc. Carlos Rocha Gomes Torres, pela dedicação do seu tempo e paciência ao longo desses 6 anos de trabalho, desde a graduação até o encerramento desse ciclo que foi o mestrado acadêmico.

À banca examinadora, Profa. Assoc. Alessandra Buhler Borges e Profa. Dra. Natália Cortez Gutierrez, por terem aceitado de maneira solícita o convite para minha defesa.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora - Dentística, Maria Filomena Rocha Lima Huhtala, Taciana Marco Ferraz Canepelle e César Rogério Pucci pelos ensinamentos e toda contribuição no meu aprendizado. Em especial aos professores Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves, por seu apoio incondicional ao longo de minha formação, servindo sempre como inspiração docente e de desenvolvimento pessoal; e Eduardo Bresciani, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado clínico e crescimento profissional, sem esquecer da humildade e empatia pelo próximo.

Às técnicas do Departamento de Odontologia Restauradora, Evelyn Requena e Josiana Maria, pela amizade, confiança e convívio diário, sempre dispostas a ajudar e a conversar sobre os mais diversos assuntos que tangenciam o curso de mestrado.

Às secretárias dos Departamentos de Odontologia Restauradora, e de Materiais Odontológicos e Prótese, respectivamente Liliane Franchitto e Juliane Damasceno, pela receptividade e boa vontade na resolução de problemas burocráticos e de aquisição de materiais de pesquisa.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Sandra Cordeiro, por sua ajuda em todas as etapas ao longo do curso, sempre se empenhando para solucionar dúvidas, atuando de modo a facilitar nossa jornada.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação da dentística, Jefferson Júnior, Maria Holanda, Roseli Freitas, Amanda Matuda, Sabrina Moecke, Taiana Paola Prado Wrzesinski, Gabriela Chagas, Victor Bottesini, Rafael Mendonça, Luís Felipe, Matheus

Costa, Marcella Batista, Juliana Benace, Letícia Nazario, Luana Souza, Ítalo Cardoso, Adrielle Andrade, Vanessa Faria e Ana Paula Mafetano. Agradeço imensamente pelo nosso intenso convívio diário, criando e fortalecendo laços, sempre estimulando uns aos outros nas dificuldades, compartilhando os bons momentos e confraternizando cada uma de nossas conquistas.

Aos meus amigos que também são minha família e como irmãos para mim. Ao Diogo Dias, Paulo Gabriel, Mateus Santos, Ana Bonafé, Brenda Soares, Maria Gabriela Martins, Gabriel Cirone, Beatriz Simões, Maiara Mello, Maria Júlia, Victor Brigatto, Keila Ferrari, Davi Sanches. Por sempre estarem presentes quando mais precisei, me apoiando em cada fase da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/02/2023 a 09/08/2023.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

"Quando você se dedica em voar mais alto, você terá que esperar que os tempos difíceis superem a diversão. Chega ao ponto em que você começa a acreditar que se não for difícil, se não for árduo, você não está dando tudo de si. No entanto, sem qualquer rima ou razão, de vez em quando, algo divertido simplesmente acontece. É essa diversão que continua nos movendo para frente." Tooru Oikawa

RESUMO

Barros PCA. Análise do perfil de liberação do princípio ativo peróxido de hidrogênio por diferentes géis clareadores dentais [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023

O objetivo desse estudo foi analisar o perfil de liberação do princípio ativo peróxido de hidrogênio por diferentes géis clareadores no decorrer do período de aplicação. Para tal diferentes géis clareadores à base de peróxido de hidrogênio para uso na técnica em consultório foram levados à câmara doadora de uma célula de difusão vertical (célula Franz). Foi empregado como meio de difusão uma membrana de éster de celulose com porosidade de 100-500 Daltons. A câmara receptora foi preenchida com água ultrapura. Os seguintes géis foram testados: Whiteness HP (FGM), Whiteness HP Blue (FGM), Whiteness HP Automix (FGM), Potenza Bianco (PHS do Brasil), Opalescence Boost (Ultradent), e Pola Office Plus (SDI); solução de peróxido 35% controle. O peróxido de hidrogênio liberado pelo gel se difundiu através da membrana e se misturou com a água na câmara receptora. Uma amostra de 40µl foi coletada da câmara receptora a cada 5 min, durante 45 minutos e foi repostado o mesmo volume de 40 µl em água ultrapura. A concentração de peróxido na amostra (mg/ml) foi determinada em triplicata a cada momento, utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas e reagente enzimático. A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Os dados de quantidade acumulada de peróxido foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA a 2 fatores (tipo de gel x tempo) e teste de Tukey. Para todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%. Diferenças significativas foram observadas para os fatores agente clareador ($p=0,0001$) e tempo ($p=0,0001$), assim como para a interação entre eles ($p=0,0001$). Os resultados do teste de Tukey para o fator agente clareador quanto à quantidade cumulativa de peróxido foram: WHPB-14,04(6,60)a, WHP-19,51(8,61)b, WHPA-23,20(10,48)c, POP-26,53(11,13)d, PB-28,29(10,99)de, OPB-31,03(11,81)e, Controle-79,12(32,27)f. Para o fator tempo, em minutos, os resultados foram: 5-9,64(6,70)a, 10-17,42(11,60)b, 15-24,03(16,86)c, 20-29,50(20,44)d, 25-33,93(23,00)e, 30-38,41(25,83)f, 35-41,52(27,32)fg, 40-44,11(28,47)gh, 45-46,50(29,72)h. Os resultados do teste ANOVA de medidas repetidas mostraram diferenças significativas ($p=0,00$) em relação a concentração inicial e final de peróxido para os fatores agente clareador, momento de leitura e para a interação entre eles. Agentes clareadores com maior concentração inicial de peróxido de hidrogênio apresentaram maior liberação cumulativa do ingrediente ativo; a liberação de peróxido de hidrogênio de diferentes géis clareadores ocorre de maneira gradual em relação ao tempo de aplicação, porém essa liberação não ocorre de maneira constante.

Palavras-chave: Célula de Franz; clareamento dental; peróxido de hidrogênio; princípio ativo.

ABSTRACT

Barros PCA. Analysis of the release profile of the active ingredient hydrogen peroxide by different tooth whitening gels [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023

The aim of this study was to analyze the release profile of the active ingredient hydrogen peroxide by different bleaching gels over the course of the application period. For this purpose, different bleaching gels based on hydrogen peroxide for use in the in-office technique were taken to the donor chamber of a vertical diffusion cell (Franz cell). A cellulose ester membrane with a porosity of 100-500 Daltons was used as diffusion medium. The receiving chamber was filled with ultrapure water. The following gels were tested: Whiteness HP (FGM), Whiteness HP Blue (FGM), Whiteness HP Automix (FGM), Potenza Bianco (PHS do Brasil), Opalescence Boost (Ultradent), and Pola Office Plus (SDI); 35% peroxide control solution. The hydrogen peroxide released by the gel diffused through the membrane and mixed with the water in the receiving chamber. A 40µl sample was collected from the receiving chamber every 5 min for 45 minutes and the same volume of 40 µl was replaced in ultrapure water. The peroxide concentration in the sample (mg/ml) was determined in triplicate at each time point, using a microplate reader spectrophotometer and enzymatic reagent. Data normality and homoscedasticity were evaluated using the Shapiro-Wilk and Levene tests. Accumulated amount of peroxide data was submitted to 2-way ANOVA test of variance (type of gel x time) and Tukey's test. For all analyses, a significance level of 5% was adopted. Significant differences were observed for the factors bleaching agent ($p=0.0001$) and time ($p=0.0001$), as well as for the interaction between them ($p=0.0001$). The results of the Tukey test for the bleaching agent factor regarding the cumulative amount of peroxide were: WHPB-14.04(6.60)a, WHP-19.51(8.61)b, WHPA-23.20(10.48)c, POP-26.53(11.13)d, PB-28.29(10.99)de, OPB-31.03(11.81)e, Control-79.12(32.27) f. For the time factor, in minutes, the results were: 5-9.64(6.70)a, 10-17.42(11.60)b, 15-24.03(16.86)c, 20-29.50(20.44)d, 25-33.93(23.00)e, 30-38.41(25.83)f, 35-41.52(27.32)fg, 40-44, 11(28.47)gh, 45-46.50(29.72)h. The results of the repeated measures ANOVA test showed significant differences ($p=0.00$) in relation to the initial and final peroxide concentration for the factors bleaching agent, reading time and the interaction between them. Bleaching agents with a higher initial concentration of hydrogen peroxide showed a greater cumulative release of the active ingredient; The release of hydrogen peroxide from different whitening gels occurs gradually in relation to the application time, but this release does not occur constantly.

Keywords: Franz cell; dental bleaching; hydrogen peroxide; active ingredient.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Processo de Titulação	36
Figura 2 – Componentes da Célula de difusão de Franz	38
Figura 3 –Coleta das amostras de cada gel clareador.....	42
Figura 4 – Leitura das amostras por espectrofotometria	44
Figura 5 – Médias de quantidade cumulativa de peróxido para todos os grupos nos diferentes intervalos de tempo	48
Figura 6 – Médias de concentração de peróxido de hidrogênio nos agentes clareadores, no início e no final do procedimento	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Delineamento experimental.....	34
4.1.1 Unidade experimental.....	34
4.1.2 Fatores em estudo	34
4.1.3 Variáveis de respostas	34
4.2 Avaliação inicial da concentração de peróxido no gel clareador	35
4.3 Preparo da célula de difusão de Franz.....	37
4.4 Divisão dos grupos experimentais.....	38
4.5 Análise da liberação do princípio ativo pelos géis	41
4.6 Mensuração da concentração final de peróxido no gel.....	42
4.7 Mensuração da concentração de peróxido nas amostras coletadas	43
4.8 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A busca pela beleza e estética é um aspecto comum da cultura humana, sendo a aparência do sorriso um aspecto chave nesse contexto. Isso explica por que o clareamento dentário é uma das modalidades de tratamento odontológico que tem sido cada vez mais procurada no dia a dia dos consultórios. Ter dentes brancos é considerada uma característica atraente e desejável, podendo ter impactos positivos na autoestima, autoconfiança e bem-estar emocional de uma pessoa (Guth, Bacon, 2010.; Kovacevic Pavicic et al., 2020., 2019.). O clareamento dentário é uma técnica utilizada para modificar a cor dos dentes, reduzindo ou eliminando manchas e descolorações (van der Geld et al., 2007; Lecocq, Truong Tan Trung, 2014.). Ele pode ser realizado pela técnica caseira supervisionada ou em consultório.

O peróxido de hidrogênio é o princípio ativo mais comumente empregado na formulação dos agentes clareadores disponíveis comercialmente para a técnica em consultório. (Marshall et al., 1995; Duque et al., 2014.). Em virtude do pequeno tamanho de sua molécula, é capaz de penetrar nos espaços intercristalinos do esmalte, atingir a dentina e eventualmente podendo alcançar o tecido pulpar (Ying et al., 2004.). Ao entrar em contato com a estrutura dentária se decompõe e resulta na formação de espécie reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres. Esses radicais são capazes de promover a oxidação e quebra dos grupamentos cromóforos das moléculas que conferem cor aos dentes, tornando os tecidos mais claros (Bach et al., 1996.; Kawamoto, Tsujimoto, 2004.; Kwon, Wertz, 2015.; McEvoy, 1989.; Rodríguez-Martínez et al., 2019.; Watts, Addy, 2001.). Embora o efeito clareador seja desejável, a ação dos radicais livres sobre o tecido pulpar pode causar irritação e inflamação, ainda que de baixa intensidade e curta duração (Fugaro et al., 2004.). O agente clareador também pode afetar a estrutura cristalina do esmalte dental, resultando em desmineralização que promove queda de dureza e aumento de rugosidade superficial (Cvikl et al., 2016; Magalhães et al., 2012.).

Para que possa ser aplicado sobre os dentes, os agentes clareadores são disponibilizados na forma de gel. Isso é importante para evitar que o material escorra ou se espalhe para outras áreas da boca e promova irritações dos tecidos moles, garantindo que fique em contato com os dentes por tempo suficiente para obter o

resultado desejado (Allen, Zanowiak, 2014; Alqahtani, 2014.). A consistência de gel é obtida pela adição de agentes espessantes às soluções de peróxido. Estes podem ser orgânicos e inorgânicos, sendo os mais comuns as moléculas de polímero aniônico sintético com alto peso molecular, derivados do ácido acrílico, como os carbômeros. Quando o pH do meio em que se encontram as cadeias poliméricas é neutralizado, elas se expandem e se entrelaçam, imobilizando os solventes, como a água e o próprio peróxido de hidrogênio, mantendo-os presos dentro de um labirinto tridimensional. Além dos polímeros, são ainda bastante utilizados espessantes inorgânicos como a sílica. Trata-se de diminutas partículas de dióxido de silício sem carga elétrica, mas que se atraem por meio de forças de Van de Waals, formando cadeias em forma de corrente que se entrelaçam e imobilizam os solventes, resultando na consistência de gel. Embora os mecanismos de espessamento variem muito entre os diferentes tipos de espessantes, eles têm em comum o fato de imobilizarem os solventes para promoverem a viscosidade característica de um gel.

Ao se aplicar o gel clareador sobre os dentes, o princípio ativo, que é o peróxido de hidrogênio, precisa deixar a rede formada pelo espessante e se difundir para o interior do esmalte. Ou seja, além de proporcionar a viscosidade necessária para a manipulação clínica, o gel precisa liberar o agente ativo de forma satisfatória e em uma velocidade adequada. Pesquisas recentes mostraram que mesmo ao se utilizar géis contendo concentrações iguais de peróxido, efeitos clareadores diferentes foram observados (Alqahtani et al., 2020; Borges et al., 2015.) . Além do pH do gel, outros fatores que influenciaram esse efeito foi o tipo de espessante e a viscosidade do gel (Torres et al., 2022.). Géis mais viscosos tendem a produzir um efeito clareador menor (Kwon et al., 2018.). A hipótese levantada é que de alguma forma o princípio ativo, embora presente, fique retido dentro do gel, deixando de penetrar no tecido alvo (Torres et al., 2022.).

A quantificação da liberação do princípio ativo é tida como essencial na avaliação da efetividade e controle de qualidade de produtos para aplicação tópica na indústria farmacêutica, como cremes, pomadas e géis, quer seja na pele ou mucosa. A metodologia mais comumente empregada nesse processo utiliza um dispositivo denominado “célula de difusão vertical” ou “célula Franz” (Bolla et al., 2020; Das et al., 2013; Fang et al., 2003; Hamed et al., 2018; Hussain Shah et al., 2013; Javaid et al.,

2008; M. Jelvehgari et al., 2006; el Laithy, El-Shaboury, 2002; Ruiz Martinez et al., 2007; Salamanca et al., 2018^a, 2018b; Singh et al., 2013; Tas et al., 2003.).

Contudo, em odontologia, são muito raras as análises dessa propriedade quando se analisa a efetividade dos agentes clareadores. Até onde foi possível verificar da literatura publicada, somente dois estudos do mesmo grupo de pesquisadores realizou essa análise para géis experimentais (Kaewpinta et al., 2018a., 2018b.). Eles demonstraram que certas formulações apresentavam uma liberação do peróxido mais rápida do que outras, estando essa velocidade diretamente relacionada ao efeito clareador observado. Contudo, pouco se sabe quanto à velocidade da liberação do princípio ativo para os géis comercialmente disponíveis.

Além do espessante, os géis clareadores também possuem outros ingredientes, como substâncias alcalinas para ajuste de pH, corantes, surfactantes, umectantes, dentre outros, que podem interferir na liberação dos princípios ativos. Porém, o efeito de cada substância na liberação dos princípios ativos também é desconhecido. Além disso, ao se adquirir um produto, a formulação exata não é declarada, sendo um segredo da indústria.

Dessa maneira, compreender a dinâmica de liberação do princípio ativo dos géis clareadores pode ajudar a compreender os efeitos observados, além de contribuir para uma análise da previsibilidade de ação do produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Por se tratar de uma metodologia com raro uso na odontologia, mas com grande potencial de estudo, a revisão de literatura focou na validação do método da célula de difusão no meio farmacêutico e sua importância no controle de qualidade e efetividade no desenvolvimento de formulações experimentais na forma de géis.

Fang et al. (2002) avaliaram a absorção percutânea do flurbiprofeno a partir de hidrogéis, que são formulações de liberação controlada de fármacos, e os efeitos de vários aditivos como os potencializadores e retardadores, adicionados a formulações de medicamentos tópicos para melhorar sua eficácia. Foram preparados hidrogéis contendo os aditivos, ureia, ácido láctico, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido salicílico, e alguns polímeros. Foram realizados testes para determinar a taxa de absorção do flurbiprofeno em cada formulação e comparando com a absorção do ingrediente ativo a partir de uma formulação padrão sem aditivos. Os experimentos de permeação cutânea in vitro foram realizados utilizando uma célula de difusão de Franz. Pele de rato foi utilizada como barreira de difusão e montada na câmara receptora com o lado da camada córnea voltado para cima no compartimento doador. O meio doador continha 1 g de veículo contendo flurbiprofeno, enquanto o meio receptor era um tampão citrato/fosfato de Ph 7,4. A área de difusão disponível entre as células foi de 0,785 cm². A taxa de agitação e temperatura foram mantidas em 600 rpm e 37°C, respectivamente. Em intervalos apropriados, foram retiradas alíquotas de 300 ml do meio receptor e imediatamente substituídas por um volume igual de tampão fresco. A quantidade de flurbiprofeno foi determinada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). No final do experimento de permeação cutânea in vitro (12 h), a quantidade de flurbiprofeno retida na pele foi determinada. A pele foi lavada 10 vezes com um pano de algodão imerso em metanol. Uma amostra da pele foi pesada, cortada com tesoura, posicionada em um homogeneizador de vidro contendo 1 ml de metanol e triturada por 5 min com um agitador elétrico. A solução resultante foi centrifugada por 10 min a 7000 rpm, e o sobrenadante foi analisado por CLAE. O método analítico para a determinação do flurbiprofeno utilizou um sistema

de CLAE, com uma bomba Hitachi L-7110, um processador de amostras Hitachi L-7200 e um detector UV Hitachi L-7400. Foi utilizado uma coluna C18 com 25 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno (LichroCart 250-4, Merck). A fase móvel consistiu em uma fase aquosa a 40% ajustada para Ph 2,6 com ácido acético e acetonitrila a 60% em um fluxo de 1 ml/min. O comprimento de onda do detector UV foi definido em 245 nm. Os resultados mostraram que a adição de ureia, ácido láctico e DMSO aumentou significativamente a absorção percutânea do flurbiprofeno, enquanto a adição de ácido salicílico e certos polímeros reduziu a absorção. Esses aditivos podem alterar a estrutura da pele, facilitando ou dificultando a absorção do fármaco. Os autores concluíram que o uso de potencializadores ou retardadores pode ser uma estratégia eficaz para modular a permeação cutânea de fármacos e melhorar sua eficácia terapêutica.

Tas et al. (2003) avaliaram a absorção percutânea in vitro e in vivo do maleato de clorfeniramina (CPM) em diferentes formulações de hidrogel. Foram utilizadas diferentes concentrações de polímeros, incluindo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose sódica (NaCMC) e metilcelulose (MC) nas formulações, que foram avaliadas quanto à estabilidade física e química, viscosidade, pH e liberação in vitro com CPM. Para preparar as formulações de gel, o derivado de celulose hidrofílico foi colocado em um béquer e umedecido com água por 24 horas. Em seguida o CPM e o timerosal foram dissolvidos em água e adicionados lentamente à base de gel umedecida e misturados bem. As formulações de gel foram armazenadas em recipientes de vidro bem fechados a 25°C e no escuro por seis meses, sendo avaliadas quanto à estabilidade física e química, viscosidade e pH bimensalmente. A liberação in vitro do CPM foi medida através de uma membrana de diálise de acetato de celulose empregando células de difusão Franz. O receptor continha solução tampão fosfato salino a pH 6,0 e era agitado e a temperatura controlada a 37°C durante os experimentos. Uma quantidade de 1g de cada formulação de gel foi colocada na barreira de difusão no compartimento do doador e amostras foram retiradas em intervalos de tempo apropriados e substituídas por solução fresca. As amostras foram analisadas espectrofotometricamente para determinar a concentração de CPM em cada amostra. Foi calculada a taxa de fluxo do composto através da membrana, que foi chamada de "fluxo em estacionário" (Jss). Também foi calculado o coeficiente de permeabilidade da membrana (Kp) utilizando a equação Kp

= $J_{ss}/(c_v * A)$, onde c_v é a concentração total do composto no gel e A é a área da membrana. Por fim, os dados obtidos foram submetidos a testes estatísticos (ANOVA e Kruskal Wallis) para avaliar se havia diferenças significativas entre as amostras testadas. O tempo total de estudo foi de 4 horas. A formulação de gel que apresentou a melhor liberação de drogas através da membrana de celulose foi estudada com diferentes barreiras de difusão, incluindo membrana de poliuretano e pele de rato e de humano, para avaliar sua permeação in vivo. Os resultados do estudo de estabilidade não mostraram alterações físicas macroscópicas nos géis durante o armazenamento, e os valores de viscosidade, pH e teor de droga das formulações permaneceram estáveis após 6 meses. Os estudos de liberação in vitro mostraram que a liberação da substância ativa diminuiu com o aumento da concentração do polímero devido ao aumento da microviscosidade do gel e ao aumento da densidade da estrutura da cadeia na microestrutura dos géis. Os valores do coeficiente de permeabilidade também foram menores para a formulação com alta concentração de polímero. A viscosidade dos hidrogéis desempenha um papel importante no controle da liberação do fármaco se a difusão do fármaco através da matriz polimérica for uma etapa determinante da velocidade. A característica de liberação do fármaco de todas as formulações foi diferente quando comparadas entre si. As formulações de NaCMC apresentaram menor liberação de substância ativa quando comparadas com os demais derivados de celulose. Os estudos de permeação com pele de rato excisada e pele humana mostraram que a permeação de CPM de membranas naturais foi menor do que aquelas observadas com membranas artificiais. Os autores concluíram que a absorção percutânea do CPM através da pele parece ser alcançável por meio da aplicação tópica com bases em gel de derivados de celulose. Assim, alguns efeitos colaterais, especialmente observados no uso de aplicações orais, podem ser facilmente eliminados e a concentração terapêutica desejada no local de aplicação pode ser alcançada. O tipo e a concentração do polímero na formulação têm um efeito final na permeação do CPM. Ao trabalhar com o mesmo polímero em diferentes derivados de viscosidade, o uso de baixa concentração de polímero, apesar de seu valor de viscosidade mais alto, proporciona o perfil máximo de liberação do medicamento. Não foi encontrada correlação entre a transferência através de membranas sintéticas e naturais. As membranas sintéticas podem ser usadas para avaliar o desempenho do produto em garantia de qualidade, mas fornecem pouca

indicação de seu desempenho in vivo.

Jelvehgari et al. (2005) avaliaram o desenvolvimento de um sistema de liberação em microesponja para o peróxido de benzoíla (BPO) com micropartículas de etil-celulose; seu preparo; caracterização e liberação do princípio ativo comparado às formulações com a benzoíla pura. Foram utilizados vários materiais, como BPO, álcool polivinílico, diclorometano, acetona, metanol, benzofenona, parafina líquida, trietanolamina, ácido esteárico, etilcelulose e membranas. O estudo envolveu a otimização do tamanho de partícula em relação a distribuição de tamanho e liberação de drogas das micropartículas. Foram utilizadas diferentes proporções em peso de fármaco para etilcelulose para avaliar o efeito da relação fármaco:polímero nas características físicas das micropartículas. Eles também usaram porosimetria de intrusão de mercúrio para determinar o volume e o tamanho dos poros das micropartículas. Para realizar o experimento de liberação do princípio ativo do peróxido de benzoíla em diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%), os pesquisadores usaram células de difusão Franz, que permite medir a quantidade de medicamento que passa através de uma membrana para uma solução receptora. Para simular as condições do corpo humano, a solução receptora era uma mistura de acetona e água, mantida a uma temperatura constante de 37°C e agitada a 700 rotações por minuto. O uso da mistura de acetona e água foi necessário porque o peróxido de benzoíla tem baixa solubilidade em água e solução salina. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo regulares para medir a quantidade de peróxido de benzoíla liberado de cada formulação. As amostras foram analisadas usando HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) para quantificar a quantidade de peróxido de benzoíla presente em cada amostra. Cada teste foi realizado três vezes para garantir resultados confiáveis, e a média das três observações foi relatada. Foi feita a comparação da liberação de peróxido de benzoíla de cada formulação de creme para determinar qual concentração era a mais eficaz para liberação controlada do medicamento. Os resultados mostraram que a relação entre a proporção de droga e polímero utilizada na produção de microesponjas pode afetar significativamente o rendimento de produção, eficiência de carga de droga e tamanho médio de partícula. Foi observado que a produção de rendimento aumentou com o aumento da proporção de droga para polímero, mas não houve um aumento significativo quando a proporção foi aumentada de 11:1 para 13:1. Além disso, a eficiência de carga de droga foi maior

em formulações com proporções mais elevadas de droga para polímero, e a média do tamanho de partícula diminuiu à medida que a proporção de droga para polímero aumentou. Também foi observado que a taxa de agitação durante a produção das microesponjas afetou a eficiência de carga de droga, o rendimento de produção e o tamanho das partículas. Um aumento na taxa de agitação resultou em uma diminuição do tamanho médio da partícula, mas também reduziu o rendimento de produção. Foi necessário encontrar uma taxa de agitação adequada para otimizar o tamanho e a distribuição das partículas e a liberação subsequente da droga das microesponjas. A liberação do BPO foi constante ao longo do tempo, independentemente da concentração de BPO na formulação do creme. O efeito da razão de droga:polímero na liberação do BPO das microesponjas mostraram que, em geral, uma maior concentração de BPO levou a uma maior liberação do princípio ativo das microesponjas. No entanto, a relação não foi linear, e os resultados mostraram que outras variáveis, como o diâmetro dos poros nas microesponjas, também afetaram a liberação do BPO. Os resultados também permitiram verificar que a liberação do BPO foi mais rápida na primeira hora e, em seguida, diminuiu. Isso ocorreu porque uma porção do BPO não estava encapsulada nas microesponjas e foi liberada mais rapidamente. Os autores concluíram que um sistema de liberação controlada de peróxido de benzoíla (BPO) pode reduzir a absorção percutânea e irritação cutânea do fármaco sem comprometer sua eficácia antimicrobiana intrafollicular; e que a liberação controlada de BPO também evita a acumulação excessiva do agente ativo na epiderme, aumentando a segurança das formulações tópicas contendo BPO.

Martinez et al. (2006) visaram identificar um gel com propriedades organolépticas e reológicas adequadas (espalhabilidade, textura e viscosidade) para administração tópica, projetado para permitir a liberação rápida do princípio ativo. Foi testada uma formulação de lipogel contendo meloxicam, um anti-inflamatório não-esteroidal, para uso tópico. A metodologia utilizada envolveu a adição de surfactante e etilcelulose à fase oleosa, que foi aquecida até 100°C e agitada constantemente até a mistura ficar homogênea. Em seguida, o processo de aquecimento foi interrompido e a mistura foi agitada continuamente até atingir a temperatura ambiente. Depois disso, houve um período de 48 horas de repouso para permitir que a estrutura reticular do lipogel se estabilizasse. Para a adição do meloxicam, foi criado um sistema de suspensão gel utilizando o Carbopol, que permitiu incorporar o meloxicam em solução.

A análise reológica foi realizada em diferentes temperaturas usando um reômetro de cisalhamento controlado por estresse. Os testes reológicos incluíram viscosimetria, medidas oscilatórias em modo de varredura de estresse e de frequência, além de ensaios de fluência-recuperação. O objetivo era avaliar a estabilidade, consistência e outras propriedades organolépticas das diferentes formulações. Para testar a liberação do fármaco meloxicam de diferentes formulações tópicas foram utilizadas células de difusão Franz, que consistem em duas câmaras separadas por uma membrana artificial que simulava a pele. Foram utilizados dois tipos de membranas artificiais, ambas hidrófilas: uma de ésteres mistos de celulose com porosidade de $0,45\mu\text{m}$ e outra de polifluoreto de difenila com porosidade de $0,45\mu\text{m}$. As membranas foram mantidas imersas em uma solução tampão fosfato (PBS) com pH 5,5 por 24 horas antes de serem montadas na célula de difusão. A solução de meloxicam foi preparada dissolvendo o fármaco em PBS com pH 5,6 a uma concentração de $500\mu\text{g/ml}$. Um volume de 1,5 ml dessa solução foi adicionado na câmara doadora sendo a superfície da membrana artificial coberta com a solução. A câmara receptora continha 17 ml de PBS livre de bolhas de ar. A célula de difusão foi mantida a uma temperatura constante de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob agitação magnética contínua. A quantidade de meloxicam liberada através da membrana foi medida por espectrofotometria UV em $\lambda = 362 \text{ nm}$. A liberação de meloxicam foi medida em diferentes momentos, até 6 horas após a aplicação da formulação na célula de difusão. O estudo também investigou a influência da natureza e das características reológicas das formulações tópicas na liberação do meloxicam em diferentes viscosidades macroscópicas. Para isso, a formulação foi espalhada uniformemente na membrana artificial da câmara doadora e a câmara receptora continha PBS com pH 5,5, agitada continuamente para garantir que a “sink condition” fosse mantida. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados e analisadas por espectrofotometria UV em $\lambda = 362 \text{ nm}$. Os resultados mostraram que a membrana à base de celulose permitia uma resistência mínima à liberação de drogas e era hidrofílica e, portanto, a escolheram para ensaios subsequentes. Os pesquisadores usaram a equação de Higuchi para analisar os dados de liberação de drogas e descobriram que a raiz quadrada dos gráficos de tempo para liberação de drogas de ambas as membranas eram semelhantes. Os pesquisadores também testaram diferentes formulações de gel, incluindo lipogel e Carbopol, e descobriram que os dados experimentais se ajustam

bem ao modelo de Higuchi. Eles observaram que a natureza lipófila do lipogel 2 facilitou a liberação do fármaco e resultou em maior concentração de meloxicam liberado em comparação com outras formulações. O Lipogel 1 teve uma taxa de liberação ligeiramente mais lenta que o Lipogel 2, mas ainda teve uma alta taxa de liberação percentual. Os pesquisadores observaram que a viscosidade das formulações afetou as taxas de liberação da droga, com menor viscosidade levando a uma maior constante de taxa de Higuchi. Eles também observaram que a afinidade físico-química entre o veículo e o fármaco afetou as taxas de liberação do fármaco, com a formulação de Carbopol apresentando menor concentração de meloxicam liberado em comparação com as formulações de lipogel. Os autores concluíram que o lipogel 2 é adequado para administração tópica por sua compatibilidade com a camada mais externa da pele, tendo a textura e a consistência corretas e possuindo certas propriedades físicas (como plasticidade) que o tornam eficaz. Embora o lipogel 2 fosse altamente viscoso (espesso), ele liberou o meloxicam mais prontamente do que o lipogel 1. Géis feitos com Carbopol podem não ser tão eficazes na entrega de meloxicam, porque a natureza hidrófila do Carbopol impede a liberação do ingrediente ativo.

Javaid et al. (2009) avaliaram a liberação *in vitro* do diclofenaco sódico a partir de diferentes formulações de gel, incluindo gel de álcool isopropílico, gel de microemulsão, hidrogel e gel hidroalcolico. Foi projetado um tipo de célula de difusão que simulava algumas partes da célula de Franz. A célula foi formada por um tubo de vidro com 2,9 cm de diâmetro e 10 cm de altura, que foi utilizado como célula doadora. Uma membrana semipermeável de celofane com peso molecular de corte de 25.000 foi cortada com um diâmetro adequado para a célula. A seguir ela foi submetida a um processo de lavagem e imersão em solução tampão fosfato pH 7,4 durante a noite para prepará-la para o experimento. A membrana foi então colocada no final liso da célula doadora para a colocação da amostra de gel. A célula doadora foi suspensa em um béquer de 250 ml contendo 100 ml de solução tampão fosfato pH 7,4 (célula receptora). A membrana da célula doadora foi mantida imersa a uma profundidade de 1 cm abaixo da superfície da solução tampão mantida a 37 °C e agitada por um agitador magnético a 50 rpm durante todo o estudo de liberação. A liberação do diclofenaco sódico foi avaliada ao longo do tempo, com amostras de 3 ml retiradas do béquer em diferentes intervalos de tempo (0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas) e

substituídas imediatamente por uma solução tampão fresca. A última amostra foi retirada após 24 horas. A quantidade de diclofenaco sódico liberada em cada amostra foi medida por espectrofotometria a 285 nm, usando um padrão de referência de diclofenaco sódico para criar uma curva padrão de absorbância. As várias formulações de gel foram preparadas e avaliadas utilizando este método, e os resultados foram comparados para determinar a eficácia da formulação em termos de liberação de diclofenaco sódico. As formulações iniciais continham uma mistura de ingredientes, incluindo glicerina, NaCMC, acácia, PEG 600, PEG 3350, metilparabeno e DS, mas apresentaram baixa liberação do fármaco (cerca de 10%) em 24 horas. Portanto, mudanças foram feitas na composição para incluir ingredientes que forneceriam propriedades hidrófilas e amolecimento da consistência à temperatura corporal. Foram testados diferentes tipos de gel com diferentes ingredientes e concentrações, e verificou-se que a liberação do fármaco era maior em formulações que continham emulsificantes, solubilizantes e/ou solventes (IPA, ME, HDA) em comparação com aquelas sem esses aditivos (HD). A formulação de HDA mostrou a maior liberação de Diclofenaco (90% em 6 horas) devido à presença de etanol. Os autores concluíram que o etanol diminuiu a alta viscosidade de Carbopol e, portanto, melhorou a liberação do fármaco e penetração do gel na pele, e que o uso de membranas pré-tratadas com surfactantes aniônicos (SLS) também ajudou a melhorar a liberação do fármaco em algumas formulações.

Ng et al.(2010), avaliaram a influência de um protocolo de validação no uso de células de difusão de Franz em relação ao seu desempenho e eficiência na obtenção de dados. Foram utilizados o Ibuprofeno, como modelo de fármaco e membranas sintéticas. Os parâmetros investigados incluíram condições de agitação, química da membrana, efeitos da temperatura e a frequência de amostragem. Foram utilizadas 27 células de difusão jaquetadas montadas em um dispositivo e colocadas sobre 4 agitadores magnéticos com aquecimento. O suprimento de água de cada conjunto de células foi conectado a um banho de água controlado termostaticamente. A Área de Difusão Efetiva (ADE) foi calculada para as câmaras doadoras e receptoras de cada célula usando a fórmula πr^2 , sendo r o raio interno da câmara doadora, mas a média dos raios interno e externo da câmara receptora. Células com ADE similares nas duas câmaras foram pareadas na validação dos testes de difusão. Para verificar e eficiência de agitação foram conduzidos experimentos diferentes. A influência da

velocidade de agitação no tempo de mistura e homogeneização foi avaliada utilizando uma barra de agitação magnética com a dimensão 12x4.5 mm, 10 mg de permanganato de potássio como soluto e água destilada à temperatura ambiente como solvente. O mesmo teste foi repetido, porém com barras magnéticas com tamanhos diferentes (Tipo I – 10x3 mm, Tipo II – 12x4.5 mm, Tipo III – 12x6 mm) nas condições de sem agitação e agitação de baixa, média e alta velocidade. O estudo de caracterização da membrana foi avaliado em relação à quantidade de glicerol presente nas referidas membranas e em sua adequada remoção por procedimento simples de lavagem. A quantificação de glicerol antes e depois da lavagem foi feita utilizando coloração ácido periódico + reativo de Schiff (PAS). Cada amostra de membrana (n=3) foi lavada por imersão em 5 ml de água destilada em um frasco que foi tampado e agitado por pelo menos 12 h à 37° C. Todas as amostras foram então testadas para o glicerol adicionando 0.2 ml de reagente ácido periódico recém-preparado no frasco e incubado por 37° C por 120 minutos. Para validar o procedimento de lavagem, as membranas foram enxaguadas com água destilada após a retirada do frasco e submetidas novamente a todo processo de lavagem. A permeação transmembrana do gel de Ibufrofeno 5% foi medida antes e após a validação com estudos de transporte ao longo de 7h (n=6). A membrana de celulose foi hidratada por 24h antes dos ensaios e montada entre os compartimentos da câmara doadora e receptora e 0,8-1,2 g de gel foi colocado na superfície da membrana do lado doador. Todas as aberturas da célula de Franz, incluindo a interface doadora-receptora foram vedados com Parafilm para impedir a evaporação. A câmara receptora foi agitada em alta velocidade utilizando agitador com aquecimento (37° C) e barra de agitação magnética. Volumes das amostras (1-2 ml) foram coletados para análise e o volume repostado na mesma temperatura para que se mantivesse a “sink condition” (condições ideais de dissolução que validem pro in vivo o que se testou no in vitro). Intervalos de amostragem variaram entre 5 e 30 min. Bolhas de ar que aparecessem na membrana foram removidas inclinando cuidadosamente a célula de Franz por seu braço lateral. O perfil de permeação foi obtido plotando-se o tempo contra a quantidade cumulativa da droga permeada. O estudo foi repetido utilizando-se soluções saturadas de ibuprofeno ao invés de géis comerciais e verificado quanto a influência da amostragem na manutenção da “sink condition”. Toda a análise estatística foi feita utilizando o teste ANOVA. A homogeneização se mostrou mais

eficiente quando sob agitação utilizou-se a barra Tipo II (12x4.5 mm), em alta velocidade (200 rotações por minuto) e sem a formação de vórtex. A impureza da membrana (glicerol) foi completamente removida seguindo-se o procedimento de enxague e repouso em água por mais de 24 horas. A “sink condition” foi mantida quando o volume da câmara doadora foi mantido em 0.1 e 1ml (concentração do ibuprofeno menor que 0.218%). A taxa de amostragem na câmara receptora não influenciou na permeação do ibuprofeno. Quando o protocolo de validação e metodologia foram utilizados nos estudos de permeação, houve redução na variabilidade dos dados de permeação de 25.7% para 5.3% (n=6). Os autores concluíram que a variabilidade dos ensaios in vitro não é puramente consequência na variabilidade da barreira biológica dos tecidos e que a validação da metodologia e o treino do operador podem melhorar a reprodução desse tipo de estudo.

Biswarup et al. (2013) avaliaram o desenvolvimento de novos géis tópicos contendo 4% de lidocaína HCl usando goma de cajueiro e Carbopol 940. Os materiais utilizados neste estudo foram lidocaína HCl, Carbopol 940, mentol, goma de caju, metil parabeno e glicerina. Os géis de lidocaína HCl a 4% foram preparados com diferentes concentrações dos materiais, e o pH e a viscosidade foram medidos. A estabilidade dos géis foi avaliada pelo método de ciclagem de congelamento e descongelamento. No estudo de permeação cutânea in vitro, tanto os géis tópicos preparados de lidocaína HCl a 4% quanto os géis tópicos de lidocaína HCl comercializados a 4% foram testados usando célula de difusão de Franz. Pele suína extirpada foi previamente preparada e utilizada como membrana de filtro, tendo sido montada entre os compartimentos da célula de difusão com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e fixada na posição. Tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, foi usado como meio receptor e uma pequena concentração de azida sódica (0,0025%, p/v) foi adicionada para prevenir o crescimento microbiano. Todo o arranjo foi colocado sobre agitador magnético, e a temperatura foi mantida a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Um volume de 5 ml da formulação apropriada foram aplicados na superfície da pele. Um mililitro foi coletado do compartimento receptor em intervalos predeterminados durante o período de estudo e substituído pela mesma quantidade de tampão fresco. A quantidade de droga permeada foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS a 274 nm. A análise dos dados de permeação da pele foi feita calculando os fluxos de permeação para cada gel. A quantidade de lidocaína HCl de vários géis tópicos que

permeou a pele suína foi plotada em função do tempo. Os dados in vitro foram analisados usando diferentes modelos matemáticos, incluindo equações de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Os resultados mostraram que todas as formulações preparadas apresentaram pH próximo ao da pele, fator importante para evitar irritações. Além disso, as formulações apresentaram viscosidade adequada para aplicação tópica. Quanto à permeação da lidocaína, as formulações preparadas mostraram uma permeação sustentada ao longo de 7 horas, e a adição de mentol como agente permeabilizante aumentou a permeação da lidocaína. Os resultados também indicaram que todas as formulações avaliadas seguiram o modelo de Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação da lidocaína. A liberação da lidocaína das formulações é controlada principalmente pelo inchaço e relaxamento dos polímeros hidrofílicos usados na formulação. Os autores concluíram que o fluxo de permeação aumentou com a quantidade de Carbopol 940 no gel, e a adição de 0,01% de mentol aumentou ainda mais o fluxo de permeação, sendo que o maior fluxo ($1568,15 \pm 14,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) foi observado com a adição de 0,01% de mentol, que foi superior ao do gel tópico de lidocaína HCl 4% comercializado ($1355,41 \pm 10,92 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

Shah et al. (2013) descreveram o desenvolvimento de uma nova formulação tópica de diclofenaco dietilamina (DDA) contendo propileno glicol (PG) e óleo de terebintina (TO) como intensificadores de permeação. Foram utilizados propilenoglicol, etanol, acetato de sódio, álcool isopropílico, Carbopol 980, -carragenina, óleo de upentina e diclofenaco dietilamina. As formulações das loções foram preparadas misturando os ingredientes e a análise por HPLC foi usada para quantificar a quantidade de diclofenaco dietilamina. O pH e a viscosidade das formulações de loção foram medidos e a espalhabilidade foi determinada. A loção formulada foi avaliada quanto à homogeneidade por um exame a olho nu. A loção também foi submetida a testes de estabilidade acelerada. Foram realizados experimentos de permeação usando células de Franz, e pele de coelhos machos brancos da Nova Zelândia e, também, membranas de polidimetilsiloxano como barreiras de difusão. Graxa de silicone foi utilizada para criar uma boa vedação entre os dois compartimentos da célula de difusão. Um volume de 1 ml de cada formulação de loção foi depositado na célula doadora enquanto o compartimento do receptor foi preenchido com PBS mantido em pH 7,4, que é próximo ao pH do sangue. As células

de difusão foram colocadas em um leito e imerso em banho-maria em água a 37,5°C para manter uma temperatura de 32°C na superfície da membrana. Em intervalos de tempo programados, uma alíquota de 0,5 ml do fluido receptor foi retirada pelo braço doador da célula de difusão, sendo ela reabastecida com 0,5 ml de PBS fresco. As alíquotas retiradas foram analisadas imediatamente por HPLC para quantificação de DDA. A “sink condition” foi mantida. Posteriormente foram feitas a caracterização in vivo e o teste de perceptibilidade sensorial. Os resultados mostraram que o aumento do teor de propilenoglicol e óleo de terebentina nas loções reduziram a viscosidade e a espalhabilidade das formulações. Além disso, todas as loções foram consideradas estáveis durante os seis meses de teste de estabilidade acelerado. Os estudos in vitro de permeação através da pele e de uma membrana de polidimetilsiloxano mostraram que a loção contendo o dióxido de diclofenaco (DDA) teve uma maior permeação do fármaco em comparação com a loção sem DDA, e que a permeação aumentou com o aumento do teor de propilenoglicol e óleo de terebentina. Estudos in vivo em ratos mostraram que todas as loções contendo DDA tiveram um efeito anti-inflamatório significativo, e que a loção com a maior permeação de DDA também teve o maior efeito anti-nociceptivo. As loções não causaram irritação cutânea e foram bem avaliadas pelos voluntários em termos de facilidade de aplicação, sensação na pele e suavidade. Os autores concluíram que PG e TO melhoraram efetivamente a permeabilidade do DDA. Para todas as formulações estudadas, o melhor desempenho de permeação efetiva foi alcançado quando as maiores concentrações de PG e TO foram usadas na formulação.

Singh et al. (2013) desenvolveram e avaliaram formulações de gel contendo Diclofenaco de Sódio usando goma de guar sozinha e em combinação com diferentes agentes espessantes ou gelificantes: Carbopol 934 P, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), gelatina, alginato de sódio, carboximetilcelulose sódica (CMC) e sua comparação com formulação em gel de uso comercial. Os géis foram testados para várias propriedades físicas, incluindo cor, homogeneidade, consistência, espalhabilidade e separação de fases. Os géis foram preparados dissolvendo diclofenaco sódico em álcool isopropílico e adicionando uma quantidade especificada de propilenoglicol. Vários agentes gelificantes e suas combinações foram então adicionados à água destilada contendo metabissulfito de sódio como antioxidante. As soluções resultantes foram bem misturadas e o peso final foi ajustado para 100g. Os

géis foram deixados em equilíbrio por pelo menos 24 horas à temperatura ambiente antes de realizar as medições reológicas. As propriedades físicas dos géis foram avaliadas visualmente quanto à cor, homogeneidade, consistência, espalhabilidade e separação de fases. O pH de cada gel foi medido usando um medidor de pH que foi calibrado antes de cada uso com soluções tampão padrão. A viscosidade foi medida usando um viscosímetro Brookfield. Estudos de conteúdo de droga foram conduzidos para assegurar a formulação uniforme do gel. O teor de fármaco dos géis foi determinado pela dissolução de uma quantidade de gel pesada com precisão em cerca de 100 ml de tampão de fosfato de pH 6,8. Essas soluções foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos e diluições apropriadas foram feitas com a mesma solução tampão. As soluções resultantes foram então filtradas através de filtros de membrana de 0,45 mm antes de submeter a solução à análise espectrofotométrica para aceclofenaco a 276 nm. O conteúdo da droga foi determinado a partir da curva padrão do diclofenaco sódico. Experimentos de liberação in vitro foram realizados utilizando células de difusão de Franz de diferentes formulações. Uma quantidade exata de formulações (1,0 g) foi espalhada em uma membrana posicionada entre as câmaras doadora e receptora com uma área de difusão disponível. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 6,8 e agitado continuamente com uma pequena barra magnética a uma velocidade de 50 rpm durante os experimentos para garantir a homogeneidade e mantido a $37,2 \pm 0,5$ °C. As amostras foram retiradas em vários intervalos de tempo e substituídas pelo mesmo volume. A “sink condition” foi atendida em todos os casos. As amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 276 nm. O estudo de estabilidade para avaliar as formulações foi conduzido por 3 meses. Os valores de pH de todas as formulações mostraram-se aceitáveis para evitar o risco de irritação após a aplicação na pele. A espalhabilidade da formulação F9, que continha carbopol e goma guar como agentes gelificantes na proporção de 3:1, foi superior ao gel comercializado. A consistência das formulações de gel desenvolvidas foi melhor do que o gel comercializado. Os estudos de estabilidade mostraram que o aspecto era límpido, não sendo observada variação significativa de pH. Verificou-se que a formulação número F9 era mais estável do que a formulação comercializada F10. O estudo in vitro da liberação do fármaco mostrou que a % de liberação encontrada foi de 84,67 na formulação F9, enquanto a formulação comercializada F10 apresentou uma liberação de 90,06%. A

formulação contendo carbopol com HPMC apresentou melhor liberação de 95,77 %. A viscosidade é uma propriedade física importante das formulações tópicas que afeta a taxa de liberação do fármaco; em geral, um aumento nos veículos de viscosidade causaria uma estrutura mais rígida com conseqüente diminuição da taxa de liberação do fármaco. Os autores concluíram a formulação F9, que continha Carbopol e Goma Guar na proporção de 3:1, apresentou melhor espalhabilidade e consistência em relação ao diclofenaco sódico gel comercializado. A formulação também apresentou boa homogeneidade, estabilidade e bom estudo de liberação do fármaco. Além disso, os autores descobriram que uma combinação de agentes gelificantes, especificamente Carbopol 934 e goma guar na proporção de 3:1, pode ser usada para várias formulações tópicas de gel para aplicação externa. No geral, o estudo sugere que as formulações desenvolvidas têm potencial para serem utilizadas como alternativas à formulação em gel comercializadas.

Kaewpinta et al. (2018) avaliou o uso do arroz branco como um componente principal na formulação de um gel clareador dental e seu efeito na liberação do princípio ativo Peróxido de Carbamida (PC). Foi preparado um gel base de arroz por hidratação, adicionando pó de arroz modificado em água destilada aquecida. Eles então incorporaram o PC nesses géis de arroz para criar formulações com diferentes concentrações (10%, 20% e 35%). Os géis foram testados para verificar se houve separação ou precipitação da droga durante um período de 5 meses. Também foram feitas medições da viscosidade e comportamento reológico dos géis, bem como testes de aderência e liberação do princípio ativo in vitro. Para a liberação in vitro do fármaco pelo gel foi utilizada uma bolsa de diálise com peso molecular cut-off de 12.000 Daltons e preenchida com 1g do gel. A bolsa foi colocada em 50mL de saliva artificial como meio de liberação, com temperatura mantida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e velocidade de agitação de 100 rpm. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo específicos (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) sendo que o mesmo volume de meio fresco foi adicionado a cada momento para substituir as amostras coletadas. Para determinar a quantidade de droga liberada do gel, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de fase reversa e detecção UV em 225 nm. Foi injetado 1.000 μl de amostras misturadas com 1.000 μl de 0,1M TPP (um composto químico) no HPLC e medido o tempo de retenção da droga na coluna. A vazão foi ajustada para 1,0 ml/min e a curva de calibração foi elaborada com solução de PC (droga) a 50-200

µg/ml, com resposta linear obtida com coeficiente de correlação de 0,9997. Além disso, o estudo testou a eficácia de branqueamento dos dentes usando géis de arroz com peróxido de carbamida como agente clareador. Os resultados mostraram que os géis de arroz foram eficazes na liberação do PC e no clareamento de dentes extraídos. Além disso, os géis de arroz modificados quimicamente apresentaram melhores propriedades reológicas e adesivas em comparação com os géis de arroz não modificados. O gel de arroz modificado com o arroz Saohai (SH) mostrou melhor capacidade de adesão e maior viscosidade do que o gel de arroz modificado com o arroz Jasmine (JM). Os resultados para liberação do princípio ativo pelo gel mostraram que todos os géis de arroz com PC liberaram o fármaco mais rapidamente do que os géis comerciais (Controle Positivo) à base de Peróxido de Carbamida (CP-PC). Entre os géis de arroz com PC, o 35CP-JM mostrou a maior quantidade de liberação de fármaco. Isso sugere que os géis de arroz com CP podem ser uma opção eficaz para a administração de PC devido à sua capacidade de liberar o fármaco mais rapidamente do que o CP-PC. Os autores concluíram que os géis de arroz desenvolvidos contendo têm uma textura homogênea e eficácia no clareamento dental. A variedade de arroz desempenha um papel nas características e propriedades dos géis derivados.

Kaewpinta et al. (2018)^b avaliaram a eficácia do clareamento dental de géis de arroz pigmentados contendo Peróxido de Carbamida (PC). Foram utilizados dois tipos de arroz pigmentados da Tailândia: Homnil (HN) e Doisket (DS). Em seguida, eles prepararam bases de gel de arroz aquecendo o arroz modificado em água destilada a 90°C por 1 hora com agitação suave. O PC foi gradualmente incorporado nas bases de gel preparadas para obter concentrações finais de 10%. Os géis de arroz resultantes foram armazenados a 4 °C até o uso. As propriedades adesivas dos géis de arroz foram avaliadas medindo o tempo necessário para que os géis se soltassem da membrana mucosa intestinal porcina. A liberação *in vitro* do PC dos géis de arroz foi analisada usando uma bolsa de diálise com peso molecular de corte de 12.000 Daltons. A bolsa de diálise foi ativada primeiro por imersão em água destilada e aquecimento, em seguida a amostra de gel foi colocada dentro da bolsa sem bolhas de ar. A bolsa foi então imersa em 50 ml de saliva artificial a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação constante, e as amostras foram coletadas em intervalos de tempo específicos. A quantidade de PC liberada foi medida usando cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC). As condições de HPLC foram as seguintes: uma coluna de fase reversa foi usada como fase estacionária, a detecção UV foi a 225 nm e a fase móvel consistiu de acetonitrila e gradiente de água com uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min. O volume de injeção foi de 10 µl e a temperatura de operação foi de $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Uma curva de calibração foi preparada usando solução PC em uma faixa de concentração de 50-200 µg/ml. A curva padrão forneceu uma resposta linear com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9997. Os resultados mostraram que a propriedade adesiva dos géis foi ligeiramente diminuída depois que o PC foi inserido na formulação. Isso pode ser devido à interação entre o PC e a matriz polimérica, que afeta as propriedades físicas do gel. O estudo de liberação de drogas in vitro mostrou que gel contendo DS teve a liberação de drogas mais rápida, seguido pelo gel de HN e o controle. As quantidades da droga liberada de DS e HN após 60 min foram $98,71 \pm 2,11\%$ e $89,48 \pm 2,52\%$, respectivamente. Isso pode ser devido à diferente composição dos géis, que afeta a taxa de liberação do fármaco. Após a incorporação do PC, o pH dos géis de arroz diminuiu. Os autores concluíram que os géis de arroz pigmentados carregados com PC têm potencial como agente de clareamento dental. Eles são biocompatíveis, fáceis de preparar e apresentam boa estabilidade. Além disso, a eficácia dos géis de arroz foi fortemente dependente do tempo de exposição. Para o regime de 1 hora, o gel DS foi mais eficaz, enquanto no regime de tempo de 4h e 8h o gel HN foi mais promissor.

Salamanca et al. (2018) avaliaram e compararam a liberação de Cetoprofeno (KTP), em duas diferentes formulações – gel e suspensão convencional, utilizando célula de difusão de Franz e através de dois tipos de membranas de diálise diferentes (celulose regenerada e membrana Strat-MTM). A permeação cutânea foi avaliada em células Franz verticais independentes durante 24 horas, e os dados foram analisados comparando a eficiência de liberação das diferentes formulações. Os materiais utilizados incluíram azul de metileno (AM), HCl, NaOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl, cloreto de cálcio e alginato de sódio, bem como as membranas de celulose e Strat-MTM. A água ultrapura foi obtida a partir do sistema de purificação Ellix Essential Millipore. As soluções-tampão foram preparadas com HCl/NaOH e $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ para atingir pH 5,6 e 7,4, respectivamente. A força iônica foi ajustada para 0,15 M utilizando KCl, seguindo as metodologias descritas na Farmacopeia dos Estados Unidos. As formulações semissólidas de KTP foram preparadas com 2,5% de KTP em

água ultrapura, glicerina e alginato de sódio. Para a formulação do gel, cloreto de cálcio foi adicionado para induzir a reticulação entre as cadeias poliméricas. A caracterização das formulações foi realizada a 37°C, incluindo medições de pH, condutividade e viscosidade. A permeação foi avaliada medindo o fluxo de massa (J) em relação ao tempo em diferentes intervalos de tempo de 24 horas usando as células Franz independentes e membranas de diálise diferentes. A quantificação do KTP nas amostras foi realizada por espectrofotometria UV-visível. A quantificação da concentração de KTP demonstrou que a metodologia adotada teve alta repetibilidade, com coeficientes de variação abaixo de 5%, e a metodologia se ajusta ao modelo linear de Beer-Lambert. Os resultados também mostraram que a formulação em gel apresentou maior estabilidade elétrica devido ao maior valor de potencial zeta, enquanto a formulação em suspensão apresentou menor viscosidade devido à ausência de sal de cálcio. Os perfis de permeação mostraram uma dependência acentuada do tipo de matriz de dosagem usada, pH do meio e tipo de membrana usada na célula de Franz. O tipo de matriz é importante no caso da forma farmacêutica em suspensão, que não possui a mesma estrutura protetora contra o pH da formulação em gel. Assim, a suspensão não é um veículo de encapsulamento para o KTP, e a permeação do fármaco depende das propriedades físico-químicas da molécula, pois a mudança de pH do meio acceptor na célula de Franz afetou a maior taxa de permeação do KTP. Quando as suspensões foram avaliadas em membranas Strat-M, a permeação foi muito baixa sob valores de pH de 5,6 e 7,4. Os resultados mostram que o experimento da célula de Franz pode ser aplicado à comparação de duas formas farmacêuticas semissólidas para KTP na fase de pré-formulação como prova de conceito da alegação de permeação de membrana em formulações tópicas. Os autores concluíram que o uso de células de Franz representa um método confiável e reprodutível para estudos de permeação, o que pode fornecer informações valiosas sobre o desempenho de produtos farmacêuticos semissólidos para administração tópica ou transdérmica.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi analisar, por espectrofotometria, o perfil de liberação do princípio ativo peróxido de hidrogênio por diferentes géis clareadores disponíveis no mercado no decorrer do período de aplicação de 45 minutos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Unidade experimental

Amostras de géis clareadores à base de peróxido de hidrogênio indicados para a técnica em consultório.

4.1.2 Fatores em estudo

Géis clareadores em 7 níveis:

- Whiteness HP – peróxido de hidrogênio a 35%;
- Whiteness HP Automixx – peróxido de hidrogênio a 35%;
- Whiteness HP Blue – peróxido de hidrogênio a 35%;
- Potenza Bianco – peróxido de hidrogênio a 38%;
- Opalescence Boost – peróxido de hidrogênio a 40%;
- Pola Office Plus – peróxido de hidrogênio a 37,5%;
- Solução de peróxido de hidrogênio 35% sem adição de espessantes (Controle positivo).

Tempo de aplicação: 45 minutos

4.1.3 Variável de resposta

- Perfil de liberação de peróxido de hidrogênio no decorrer do tempo de aplicação de 45 minutos;
- Concentração inicial e após o período de aplicação;
- Quantidade cumulativa de peróxido.

4.2 Avaliação inicial da concentração de peróxido no gel clareador para verificar a concentração/disponibilidade inicial do peróxido de hidrogênio

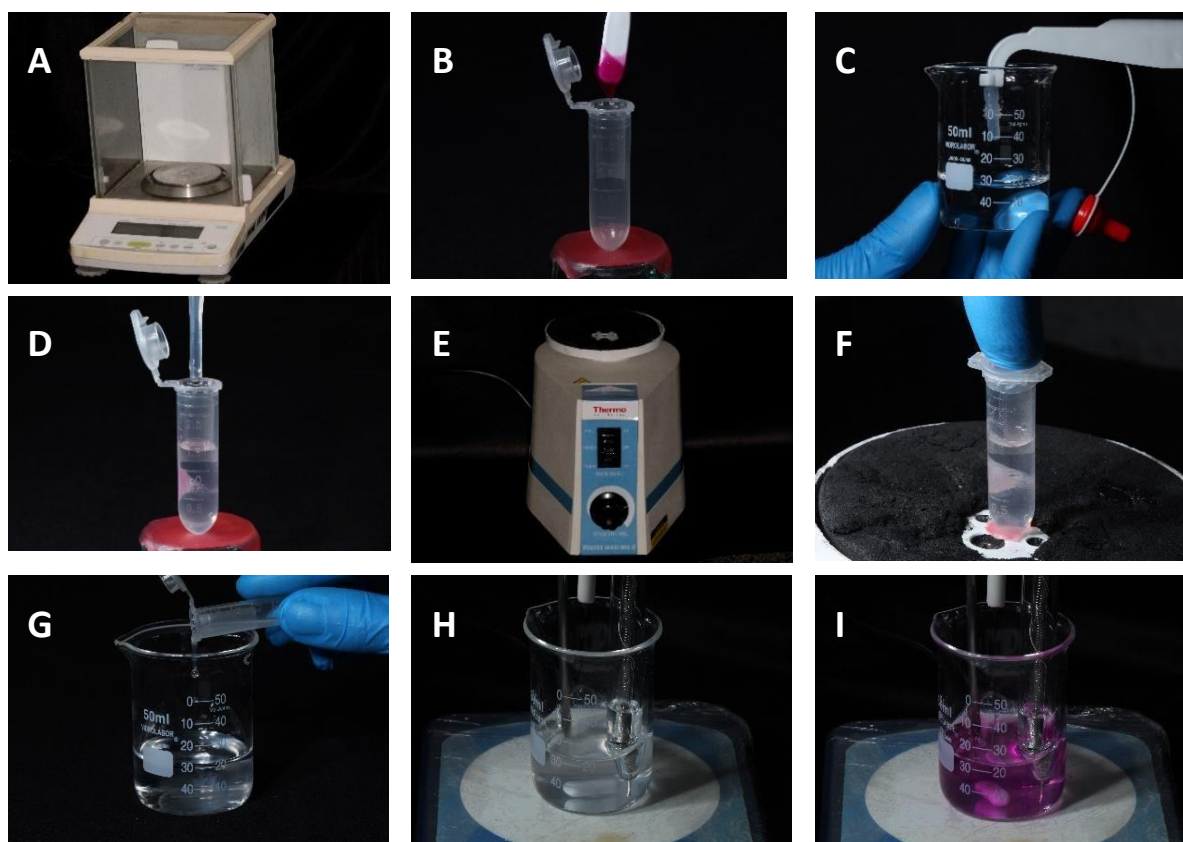
Para a mensuração do teor de peróxido, um pote Becker de 10 ml contendo um microtubo tipo Eppendorf foi inicialmente posicionado em uma balança analítica de precisão modelo ATX 224 (Shimadzu, Kyoto,^aKyoto, Japão) (Figura 1A) . Em sequência a balança foi realizada a tara para que o peso do Becker fosse desprezado. Uma massa aproximada de aproximadamente 0,1g do gel clareador a ser analisada foi coletada e transferida para o interior do microtubo usando uma espátula (Figura 1B). O valor exato da massa considerando quatro casas decimais foi registrado.

Em um pote Becker de 50 ml foi acrescentado 20 ml de uma solução de ácido sulfúrico a 1M utilizando um dispensador (Figura 1C). Em seguida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 1ml do ácido no Becker foi transferida para o tubo Eppendorf, o que corresponde a aproximadamente metade do seu volume, encobrando a amostra de gel coletada (Figura 1D). O frasco foi então fechado e feita a agitação do mesmo utilizando um misturador tipo Vortex (Maxi Mix II, modelo M37615, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) durante 15 s (Figuras 1E e 1F). O tubo foi aberto e o conteúdo transferido de volta ao Becker contendo o ácido (Figura 1G). Na sequência 1ml do líquido presente no Becker foi novamente levado ao tubo, para coleta de algum resíduo. O tubo foi agitado e o conteúdo devolvido. Esse procedimento foi repetido uma terceira vez. Uma barra magnética foi colocada no Becker e este foi posicionado sobre um agitador magnético (Figura 1H). A titulação foi realizada de forma automática empregando um titulador automático potenciométrico modelo HI902C1-02 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA), por meio da injeção da solução de permanganato de potássio a 0,1N, que foi previamente padronizada utilizando a solução de oxalato de sódio a 0,67% (p/v) (padrão primário). O ponto final foi determinado de forma potenciométrica utilizando-se um eletrodo Redox (HI 3131B, Hanna Instruments,

Woonsocket, RI, EUA) acoplado ao titulador, no momento em que se observasse que a solução adquire a coloração rósea (Figura 11). O método de permanganometria se baseia na reação mostrada na fórmula a seguir:



Figura 1– Processo de Titulação



Legenda: A) Balança analítica; B) Colocação de amostra do gel clareador no tubo tipo Eppendorf; C) Colocação de ácido sulfúrico (20ml) no Becker; D) Colocação de ácido sulfúrico com pipeta pasteur; E) Agitador tipo Vórtex; F) Agitação da amostra; G) Colocação do gel no frasco Béquer; H) Béquer com a barra magnética e sobre o agitador magnético, antes de iniciar a titulação; I) Ponto final de saturação do processo de titulação.

Fonte: Elaborado pelo autor

A concentração de peróxido (p/p) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$C = V \times 1,701 \times Fc \times 100/ m$$

Onde:

C = concentração (p/p) de peróxido de hidrogênio;

V = volume de permanganato de potássio 0,1N gasto na titulação, em mililitros;

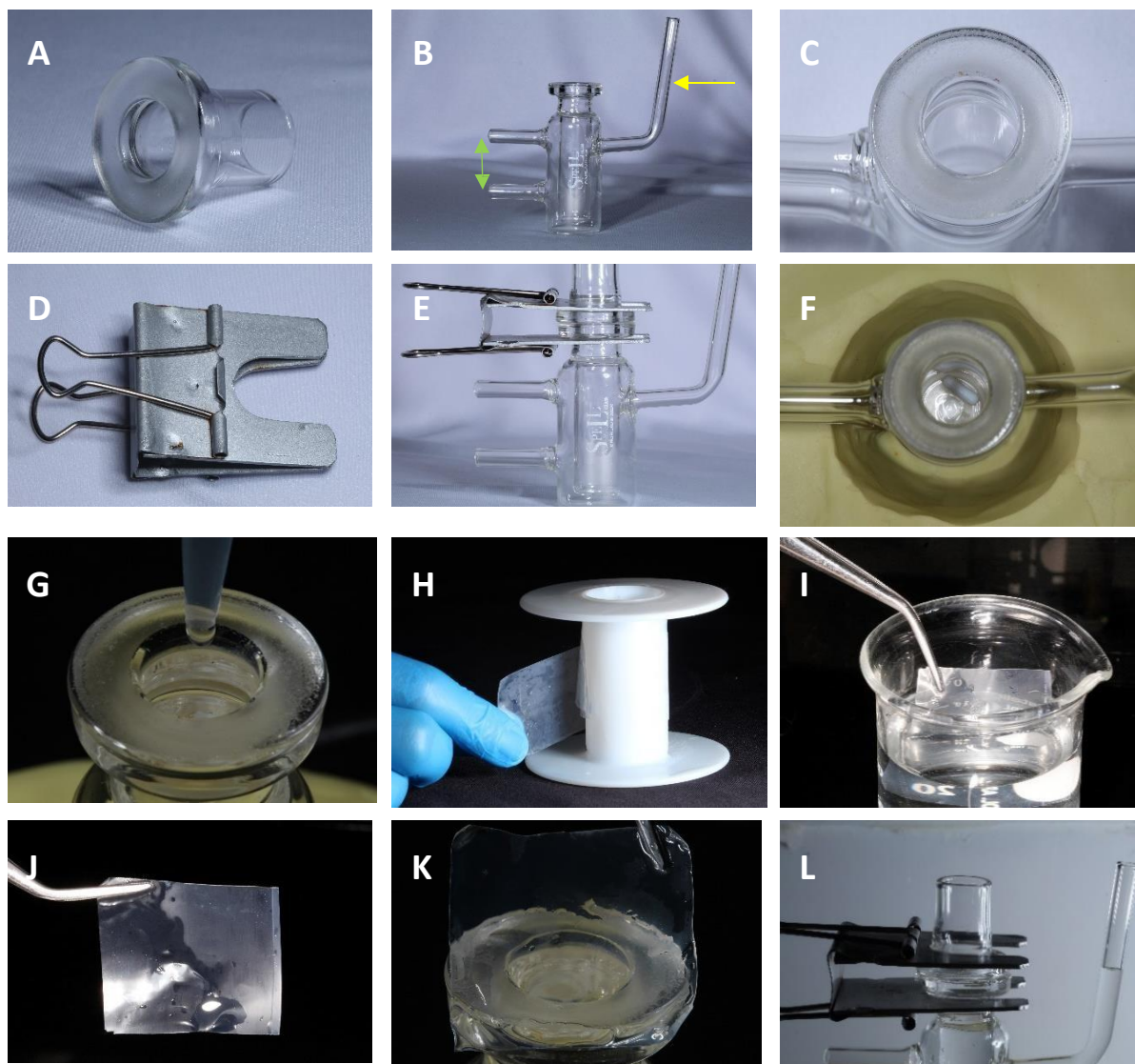
Fc = fator de correção da solução de permanganato de potássio 0,1N.

m = massa da amostra em gramas.

4.3 Preparo da célula de difusão de Franz

Para essa análise foi utilizada uma célula de difusão vertical, também conhecida como célula de Franz. Trata-se de uma vidraria formada por duas partes, uma peça superior que é basicamente um cilindro vazado que atua como câmara doadora (Figura 2A) e uma peça inferior que se assemelha a um pote tipo Becker e atua como receptora (Figura 2B). Em ambas as extremidades das duas partes existe uma junta de flange plana que serve para o acoplamento das duas câmaras (Figura 2C). Na parte inferior existe uma porta de amostragem, que é um tipo de tubo que se conecta em sua lateral (Figura 2B). No dispositivo utilizado nesse estudo a porção inferior está encamisada, apresentando duas conexões laterais, que serve para a circulação de água em temperatura controlada, quando essa função é empregada (Figura 2B). Entre os flanges da porção superior e inferior é posicionada uma membrana com porosidade que seja capaz de bloquear os excipientes da formulação e deixar passar o princípio ativo para o lado receptor, para que ele possa ser quantificado. Para conectar as duas partes se utiliza um grampo especificamente desenvolvido, que mantém as câmaras unidas (Figura 2D e 2E)

Figura 2– Componentes da Célula de difusão de Franz



Legenda: A) Câmara superior, ou doadora, da célula de Franz; B) Câmara inferior, ou receptora, da Célula de Franz com porta de amostragem à direita (seta amarela) e conexões laterais para circulação de água à esquerda (seta verde); C) Junta de flange plana da câmara inferior; D) Grampo de fixação; E) Célula de Franz completa; F) Posicionamento da barra magnética na câmara receptora; G) Preenchimento da câmara inferior, ou receptora, com água ultrapura; H) Rolo de membrana de éster-celulose; I) Ativação da membrana por meio de imersão em água; J) Membrana após ativação; K) Colocação da membrana de éster-celulose entre as câmaras doadora e receptora; L) Conjunto câmara doadora-membrana-câmara receptora estabilizado.

Fonte: Elaborado pelo autor

Uma barra magnética revestida por Teflon com 10mm de comprimento foi colocada no fundo do compartimento inferior da célula (Figura 2F), o qual foi então preenchido com a água ultrapura para funcionar como meio receptor (Figura 2G).

Como barreira de difusão foi utilizada uma membrana em celulose (Hamed et al., 2018; Kaewpinta et al., 2018a., 2018b; Ng et al., 2010; Salamanca et al., 2018a.) com uma porosidade de 100-500 Daltons (Spectra/Por® Biotech Cellulose Ester, Modelo 131060T, Repligen, Waltham, Massachusetts, USA), que é a menor porosidade disponível (Figura 2H). A membrana foi preparada previamente utilizando o método recomendado pelo fabricante antes de iniciar o experimento. A membrana foi mergulhada em um frasco Béquer com água à temperatura ambiente durante 30 minutos para remover o conservante azida sódica. Em seguida foi feito o enxágue da membrana em água deionizada (Figura 2I e 2J). Com o auxílio de uma pinça clínica, a membrana foi então posicionada sobre o compartimento receptor e a porção superior levada sobre ela (Figura 2K). A seguir o conjunto foi estabilizado entre as flanges dos compartimentos doador e receptor utilizando um grampo de fixação (Figura 2L). O agitador foi ligado, fazendo com que a haste começasse a girar no interior do líquido receptor a uma velocidade de 200 rpm (Hamed et al., 2018.; Ng et al., 2010.). Essa agitação visou obter uma distribuição homogênea dos elementos permeados através da membrana no meio receptor.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Para realização desse estudo, os seguintes géis clareadores foram testados.

- **Whiteness HP (WHP)** – Gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35%. O produto é fornecido na forma de dois frascos, um com o espessante e o outro com o peróxido concentrado. Utilizando uma placa de mistura e espátula que acompanham o kit, a manipulação do produto é feita misturando peróxido e espessante na proporção (em volume) de 3 gotas de peróxido para 1 gota de espessante.
- **Whiteness HP Automixx (WHPA)** – Gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35%. O produto é fornecido como uma seringa de corpo duplo em que as fases peróxido e espessante são combinados através de uma ponteira de

automistura, gerando um gel produto pronto para uso.

- **Pola Office Plus (POP)** – Gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 37,5%. O produto é fornecido como uma seringa de corpo duplo em que as fases peróxido e espessante são combinados através de uma ponteira de automistura, gerando um gel produto pronto para uso.
- **Whiteness HP Blue (WHPB)** – Gel clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35%. O produto é fornecido como um conjunto de seringas separadas, uma contendo o peróxido e a outra o espessante separados. Além disso existe um dispositivo para acoplamento de seringas e a ponteira para aplicação. O gel é preparado misturando as duas fases com as seringas conectadas, empurrando os êmbolos alternadamente por 8 vezes. O conteúdo é então empurrado para uma das seringas e acoplada a ponteira, estando pronto para aplicação.
- **Potenza Bianco (PB)** – Gel à base de peróxido de hidrogênio a 38%. O produto é fornecido como um conjunto de seringas separadas, uma contendo o peróxido e a outra o espessante separados. Além disso existe um dispositivo para acoplamento de seringas e a ponteira para aplicação. O gel é preparado misturando as duas fases com as seringas conectadas, empurrando os êmbolos alternadamente por 20 vezes, lentamente. O conteúdo misturado deve ser mantido na seringa que continha originalmente o peróxido de hidrogênio. As seringas então são desconectadas uma da outra e a ponteira acoplada.
- **Opalescence Boost (OB)** – Gel à base de peróxido de hidrogênio a 40%. O produto é fornecido como um conjunto de seringas separadas, uma contendo o peróxido e a outra o espessante separados. Além disso existe um dispositivo para acoplamento de seringas e a ponteira para aplicação. O gel é preparado misturando as duas fases com as seringas conectadas, empurrando os êmbolos alternadamente 50 vezes. O conteúdo deverá ser mantido na seringa que continha o peróxido. A seringas são desconectadas e a ponteira acoplada.
- **Peróxido de Hidrogênio 35% (Controle)** – Solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 35%. Foi realizada diluição de peróxido puro 50% em água ultrapura

e feita a titulação até a obtenção de uma nova solução com concentração equivalente a 35%.

O Quadro 1 apresenta a composição e características químicas dos produtos avaliados, de acordo com os dados dos fabricantes.

Quadro 1 – Composição e características dos agentes clareadores empregados.

Nome	Composição	pH	Cor	Fabricante
Whiteness HP	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, corante, glicol e água deionizada	6.5	Vermelho carmesim	FGM, Joinville, SC, Brasil
Whiteness HP Automixx	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, água deionizada, glicol e agentes dessensibilizantes	7.0	Verde claro	FGM, Joinville, SC, Brasil
Pola Office Plus	Peróxido de hidrogênio 37,5%, polivinilpirrolidona, hidróxido de sódio, nitrato de potássio e corante azul marinho	7-8	Azul claro	SDI Ltd, Melbourne, Victoria, Austrália
Whiteness HP Blue	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, água deionizada, corante violeta, glicol, agentes neutralizantes e dessensibilizantes (3% Gluconato de cálcio)	8-9	Roxo violeta	FGM, Joinville, SC, Brasil
Potenza Bianco	Peróxido de hidrogênio 38%, Carbopol, glicerol, nitrato de potássio, fluoreto de sódio e corante	7.0	Azul claro	PHS do Brasil, Joinville, SC, Brasil
Opalescence Boost	Peróxido de hidrogênio 40%, 20% água, Carbopol e agentes dessensibilizantes (3% nitrato de potássio e 1.1% flúor)	7.0	Vermelho	Ultradent Products, South Jordan, Utah, EUA
Peróxido de Hidrogênio	Peróxido de hidrogênio 50% aquoso	7.0	Incolor	QuimisulSC, Joinville, SC, Brasil

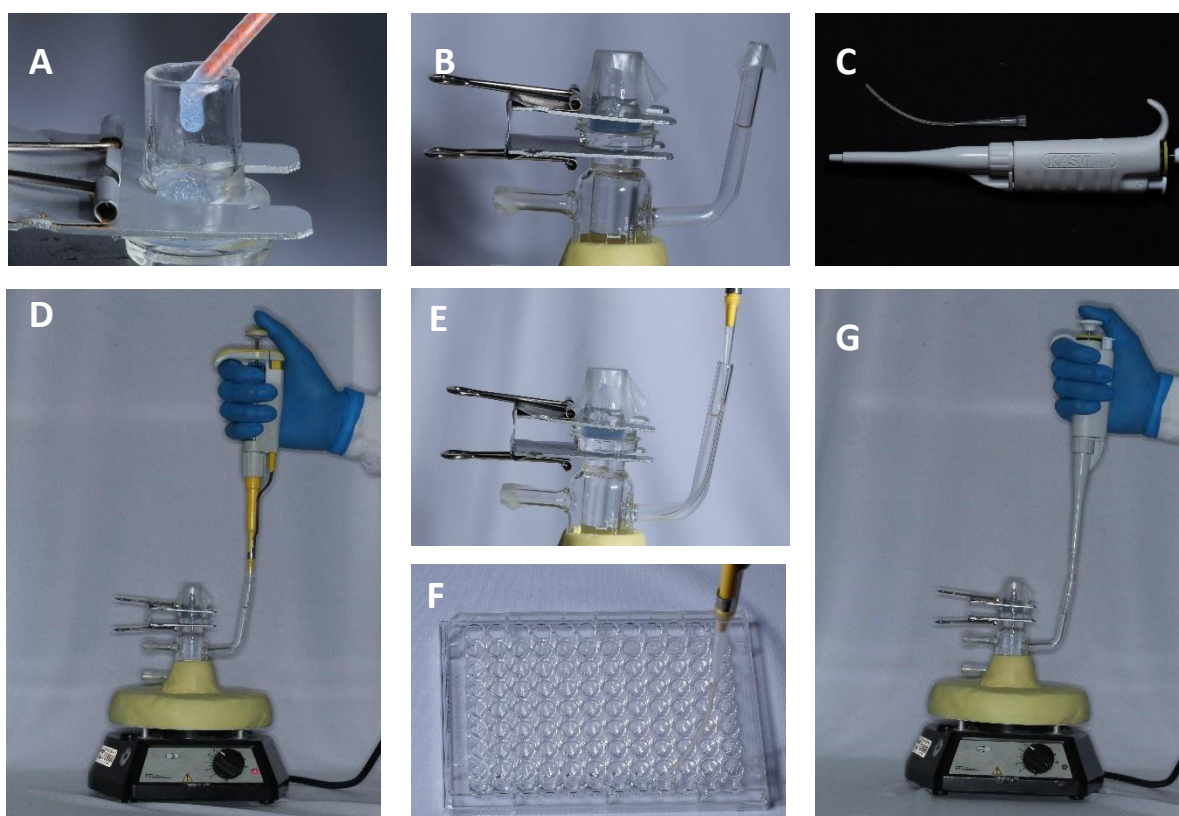
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Análise da liberação do princípio ativo pelos géis

Na câmara doadora da célula de Franz foi colocada uma amostra de 1ml dos respectivos géis clareadores (Figura 3A) (Kaewpinta et al., 2018a., 2018b.; Ng et al., 2010.) utilizando o sistema próprio com ponteira de automistura de cada gel, exceto para o Whiteness HP. Todas as aberturas da célula de Franz foram vedadas com

Parafilm (BemisCompany, Inc., Neenah, WI, EUA) para impedir a evaporação (Figura 3B). A cada 5 minutos, durante o tempo total de 45 minutos, uma amostra de 40 μ l (Klang et al., 2011.) foi coletada do compartimento inferior pelo tubo de amostragem, empregando uma mangueira de pvc pré-montada em uma pipeta monocanal (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) (Figuras 3C – 3E). No total foram obtidas 10 amostras a cada vez que um gel for inserido na câmara doadora. O volume coletado pela célula de difusão foi depositado em uma microplaca de 96 poços (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), para o armazenamento até o momento da leitura (Figura 3F). O volume coletado foi reposto usando o mesmo volume de água ultrapura e a saída novamente vedada com o Parafilm até a próxima coleta (Figura 5G). A placa foi mantida fechada após cada coleta.

Figura 3– Coleta das amostras de cada gel clareador



Legenda: A) Colocação do gel clareador na câmara doadora da célula de Franz; B) Célula de Franz vedada com Parafilm; C) Micropipeta monocanal e mangueira de coleta adaptada; D) Coleta da amostra de peróxido pelo braço de coleta da câmara receptora; E) Coleta da amostra (ampliada); F) Amostra depositada em microplaca com 96 poços; G) Reposição do volume coletado com água ultrapura.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.6 Mensuração da concentração final de peróxido no gel

Após a coleta da última amostra 45 minutos, o gel clareador remanescente na câmara doadora foi recolhido e levado em recipiente para ser feita a avaliação da concentração final de peróxido de hidrogênio pelo método de titulação.

4.7 Mensuração da concentração de peróxido nas amostras coletadas

O método proposto por Bauminger (Bauminger, 1974.) e modificado por Hanning (Hannig et al., 2006., 2005., 2003.) foi aplicado para mensurar a concentração de peróxido de hidrogênio na solução. Esse método é uma análise espectrofotométrica baseada na reação do 4-aminoantipirina e fenol com H₂O₂ catalisado por peroxidase. O peróxido inorgânico é oxidado pela peroxidase, liberando oxigênio que age oxidando liberadores de hidrogênio cromogênicos acromáticos, modificando a cor da solução de transparente para rosa. A quantidade de peróxido de hidrogênio na solução foi mensurada analisando a absorvância em espectrofotômetro com o comprimento de onda $\lambda = 510 \text{ nm}$, Aminofenazona (4- aminoantipirina; 4mmol/l), fenol (24 mmol/l) e peroxidase (0,4 U/ml) dissolvidos em tampão fosfato 0.1 M com pH 7.0 foram utilizados como reagente enzimático. Os reagentes foram armazenados à 4°C.

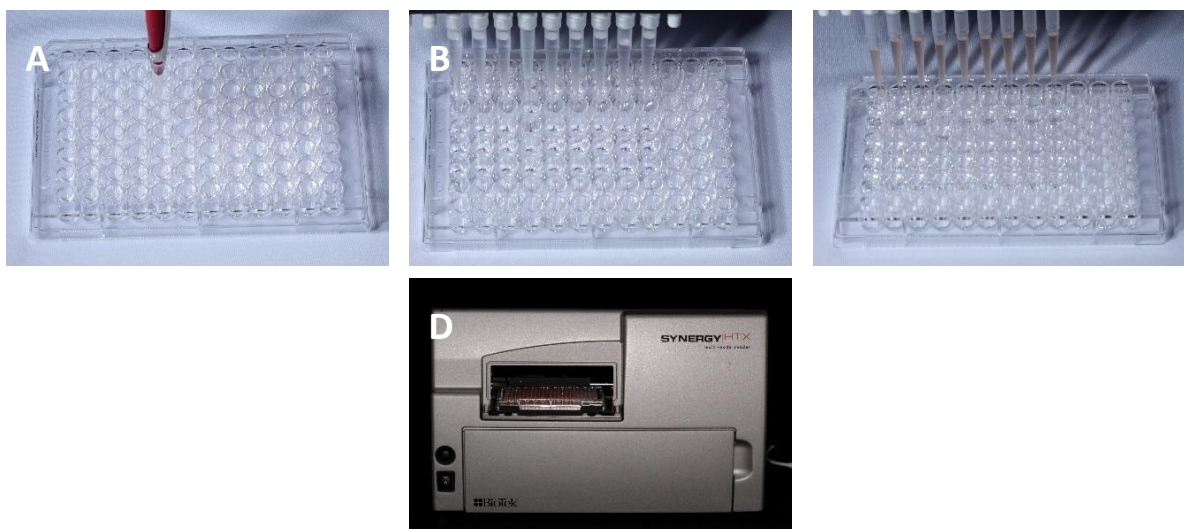
A partir de cada uma das amostras de 40 μ l obtidas à cada momento, três subamostras de 0,5 μ l foram transferidas a poços de uma outra microplaca, para que fosse efetuada a leitura da concentração de peróxido em triplicata (Figura 4A). A esses poços foram adicionados 200 μ l de água ultrapura usando uma pipeta multicanal (Figura 4B).

A partir de uma solução pura de peróxido de hidrogênio a 50%, com a concentração confirmada pelo método de titulação já descrito, uma solução padrão foi preparada numa concentração de 0,5 mM. Ela foi obtida diluindo-se 0,0680g de H₂O₂

em 2 l de água. Uma curva de calibração foi preparada em triplicata na microplaca, depositando-se nos poços a seguintes massas de peróxido: 0 (branco); 0,425; 0,85; 1,275; 1,7; 2,125; 2,55 e 2,975 μl /poço. Quantidades proporcionais de água ultrapura foram inseridas a cada poço para que houvesse um volume final de 200 μl . A seguir foram adicionados 100 μl de reagente enzimático em todos os poços, contendo as amostras e a curva de calibração, usando uma pipeta multicanal (Figura 4C).

As amostras foram inseridas no Leitor de microplacas multi-modal (Synergy HTX, BioTek, Winooski, Vermont, EUA) (Figura 4D). Ele realizou a agitação da placa por 0.05 s, seguido por um período de repouso por 180 s, para então realizar a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 507 nm. A leitura para cada tipo de gel foi repetida dez vezes.

Figura 4– Leitura das amostras por espectrofotometria



Legenda: A) Subamostras de 0,5 μl ; B) Adição de água ultrapura; C) Aplicação do reagente enzimático; D) Microplaca em posição no equipamento e antes da agitação.

Fonte: Elaborado pelo autor

O leitor de microplacas forneceu a informação sobre a massa de peróxido presente no interior de cada poço da microplaca. Considerando-se para cada poço foi inserido uma alíquota de 0,5 μl do material retirado da câmara receptora da célula de Franz, para o cálculo da concentração de peróxido o valor da massa foi dividido pelo volume utilizado na medida, segundo a fórmula abaixo:

$$C = \text{Massa } (\mu\text{g}) / \text{volume } (\mu\text{l})$$

Para se calcular a quantidade acumulada de peróxido no interior da câmara receptora, a cada intervalo de medição, o valor da concentração foi multiplicado pelo volume interno da câmara, que era de 15ml (15.000 μl). A relação entre esse valor e a área de difusão foi obtido dividindo-se a quantidade acumulada pela área da membrana exposta ao agente clareador, que foi de 1,77 cm^2 . Dessa forma, foi obtida a quantidade cumulativa em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Contudo, como os valores eram muito altos, eles foram multiplicados por 1000, para que fossem convertidos em mg/cm^2 , que foram então utilizadas nas análises estatísticas.

4.8 Análise estatística

As seguintes hipóteses de nulidade foram avaliadas nesse estudo:

- H0a – O tipo de gel clareador não influencia a quantidade cumulativa de peróxido liberada e a modificação na concentração de peróxido no gel clareador;
- H0b – O tempo de aplicação não influencia a quantidade cumulativa de peróxido liberada e a modificação na concentração de peróxido no gel clareador.

A normalidade e homoscedasticidade dos dados serão avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Os dados de quantidade acumulada de peróxido foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) a 2 fatores, sendo eles o agente clareador e o tempo. A análise post hoc foi realizada utilizando-se o teste de Tukey. Os dados de concentração de peróxido dentro dos agentes clareadores, no início e no final do procedimento, foram analisados com o teste de ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. Para todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados do teste ANOVA a 2 fatores podem ser observados na Tabela 1. Podemos verificar que diferenças significativas foram observadas para os fatores Agentes clareadores e tempo, assim como para a interação entre eles.

Tabela 1 – Resultados do teste de Anova a 2 fatores para a quantidade cumulativa de peróxido.

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
Agente Clareador	25381	6	42302,2	1040,38	0,0001*
Tempo	89169	8	11146,1	274,13	0,0001*
Agente Cl. *Tempo	34976	48	728,7	17,92	0,0001*

*diferenças significativas

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do teste de Tukey para o fator agente clareador podem ser observados na Tabela 2. Podemos verificar que o grupo controle apresentou uma quantidade cumulativa de peróxido dentro da câmara receptora significativamente maior que todos os demais grupos. O grupo Potenza Bianco não apresentou diferenças significativas em relação ao Pola Office Plus e ao Opalescence Boost. O grupo Whiteness HP Automix apresentou valores maiores que o Whiteness HP e Whiteness HP Blue, embora menor que todos os demais. O grupo Whiteness HP mostrou valores significativamente maiores que o Whiteness HP Blue, mas menores que todos os outros grupos. O grupo Whiteness HP Blue mostrou os menores valores de quantidade cumulativa de peróxido.

Tabela 2 – Resultados do teste de Tukey para o fator agente clareador quanto à quantidade cumulativa de peróxido.

Agentes Clareadores	Média	DP	Conjuntos Homogêneos*			
WHPB	14,04	6,60	a			
WHP	19,51	8,61	b			
WHPA	23,20	10,48	c			
POP	26,53	11,13	d			
PB	28,29	10,99	d e			
OPB	31,03	11,81	e			
Controle	79,12	32,27	f			

* Os grupos seguidos das mesmas letras não apresentam diferenças significantes.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do teste de Tukey para o fator tempo podem ser observados na Tabela 3. Podemos observar que quantidade cumulativa de peróxido aumenta com o decorrer do tempo, existindo diferenças significativas entre cada intervalo de 5 min, até o tempo de 25 min. A partir desse momento, diferenças significativas foram observadas somente a cada 10 min.

Tabela 3 – Resultados do teste de Tukey para o fator tempo quanto à quantidade cumulativa de peróxido

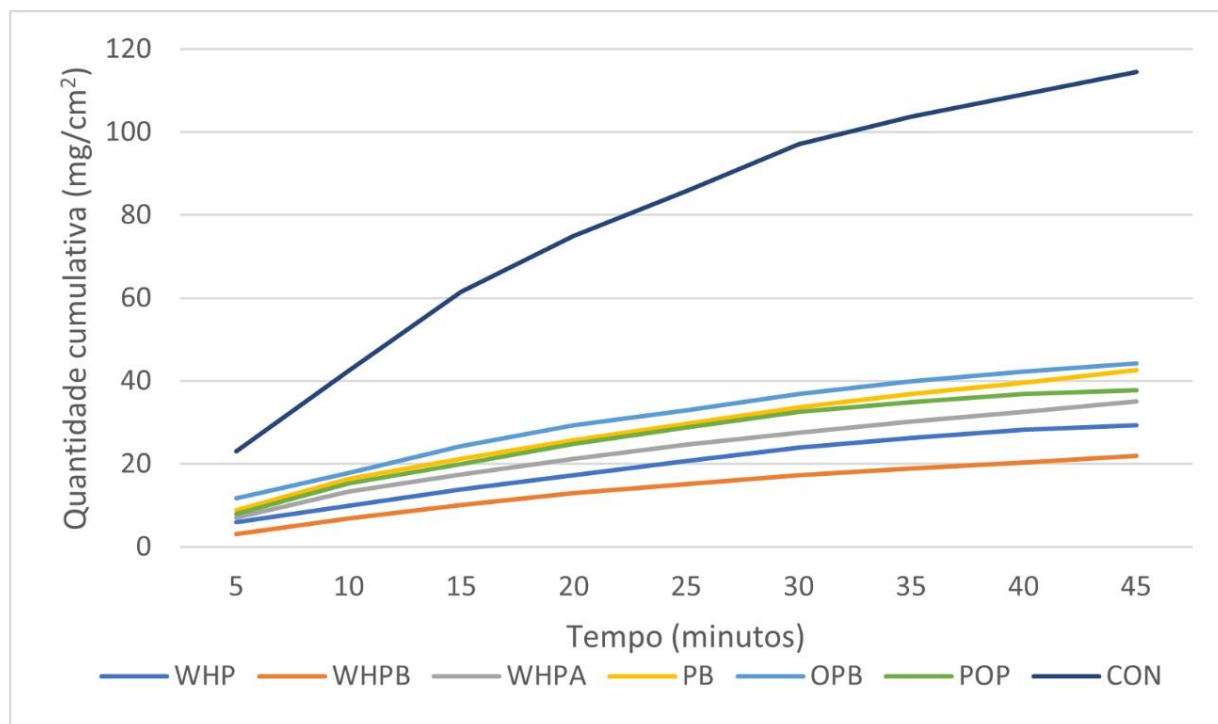
Tempo	Média	DP	Grupos Homogêneos*			
5	9,64	6,70	a			
10	17,42	11,60	b			
15	24,03	16,86	c			
20	29,50	20,44	d			
25	33,93	23,00	e			
30	38,41	25,83	f			
35	41,52	27,32	f g			
40	44,11	28,47	g h			
45	46,50	29,72	h			

* Os grupos seguidos das mesmas letras não apresentam diferenças significantes.

Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5 podemos observar a médias de quantidade cumulativa de peróxido para todos os grupos, nos diferentes intervalos de tempo. Pode-se notar claramente que o grupo controle a 35% mostrou uma difusão significativamente maior do que os demais grupos, enquanto o gel Whiteness HP Blue resultou nos menores valores.

Figura 5– Médias de quantidade cumulativa de peróxido para todos os grupos nos diferentes intervalos de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do teste ANOVA de medidas repetidas para a concentração inicial e final e peróxido podem ser observados na Tabela 4. Pode-se observar diferenças significativas para o fator “agente clareador” e para o “momento da leitura”, assim como para a interação entre eles.

Tabela 4 - resultados do teste ANOVA de medidas repetidas para a concentração inicial e final e peróxido

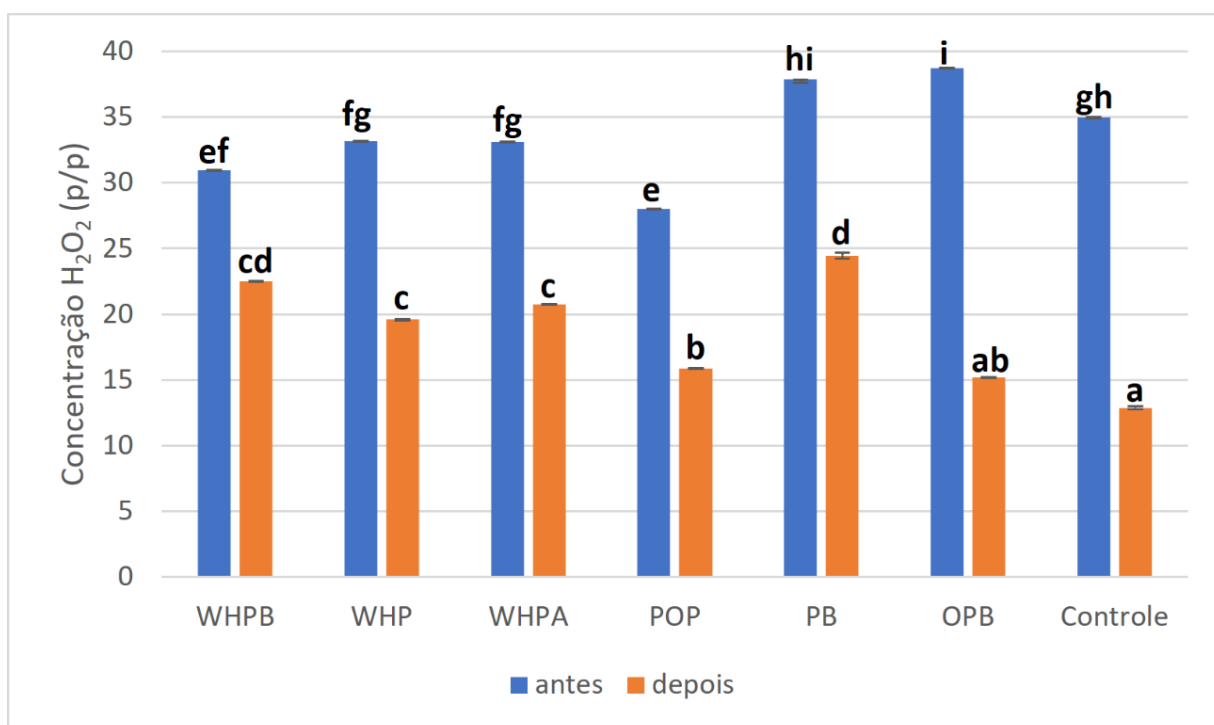
Fatores	SQ	GL	QM	F	p
Agente clareador	980	6	163	45	0,00*
Momento	7971	1	7971	1920	0,00*
Momento*agente	929	6	155	37	0,00*

*diferenças significativas

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do teste de Tukey para a interação entre os fatores podem ser observados na Figura 6. Pode-se observar que para todos os agentes clareadores ocorreu uma redução significativa da concentração inicial. o grupo controle apresentou a maior redução percentual, seguido do Opalescence Boost. Por outro lado, o Whiteness HP Blue apresentou a menor redução.

Figura 6– Médias de concentração de peróxido de hidrogênio nos agentes clareadores, no início e no final do procedimento



Legenda: Os grupos que apresentam as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.
Fonte: Elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

Dentes saudáveis variam de cor entre diferentes tipos de graduação e em intensidade, sendo determinada pela interação da luz com as duas estruturas dentárias mineralizadas. O esmalte é a camada mais externa e mineralizada dos dentes, possuindo como principal característica a translucidez. Essa propriedade permite a passagem da luz através da superfície do esmalte e a reflexão parcial dessa luz pela dentina subjacente. A dentina por sua vez corresponde à camada subjacente ao esmalte, que possui cor natural amarelada. A cor final dos dentes é influenciada por alguns fatores, como a espessura dos tecidos dentais, que podem apresentar variações entre diferentes indivíduos (Baratieri & Monteiro Jr., 2010; Mondelli, 2018; Torres, 2020). Desse modo, existem pessoas que nascem tendo dentes claros como A1 ou B1, segundo a escala Vita Clássica, ou dentes mais escuros como A3 ou A4, sem que isso deixe de ser uma coloração natural. No entanto, os dentes podem escurecer além de sua coloração natural seja pelo processo de envelhecimento ou quando na presença de fontes de manchamento (Hassel et al., 2017.). Quando esse manchamento é extrínseco, restrito à superfície do dente, como pelo consumo de bebidas pigmentadas ou uso de tabaco, ele pode ser removido por meio da técnica de profilaxia (Pereira et al., 2020.). Há de se considerar, porém, que o consumo de substâncias pigmentadas e o fumo, além de produzirem manchamento extrínseco, também podem causar manchamento intrínseco pela penetração dos pigmentos nos espaços inter cristalinos. O manchamento intrínseco também pode ser causado por fluorose, uso de tetraciclina ou por traumas, situações em que a profilaxia não é suficiente, demandando um tratamento estético (Frysh et al., 1995.; Joiner, Luo, 2017.; Kwon, 2016.; Watts, Addy, 2001.).

O clareamento dental é um procedimento comum na prática odontológica para a resolução de problemas de alterações cromáticas nos dentes (Moraru et al., 2012.; Slaska et al., 2015.; Vieira-Junior et al., 2017.; Wang et al., 2020.). O emprego dos agentes clareadores para dentes com vitalidade pulpar pode ocorrer em duas modalidades diferentes de tratamento, a técnica caseira ou a de consultório (De Geus et al., 2016.; Gonçalves et al., 2017.; Rezende et al., 2016.). Na técnica caseira, um dentista cria uma moldeira personalizada para o paciente e fornece um gel clareador

contendo baixa concentração de peróxido de hidrogênio ou carbamida. O paciente aplica o gel na moldeira e a utiliza em casa por um período específico, geralmente algumas horas por dia ou durante a noite, seguindo as instruções do dentista. Essa modalidade de tratamento pode levar algumas semanas para que se obtenha o resultado desejado. Na técnica de consultório, o dentista aplica um gel clareador de alta concentração de peróxido de hidrogênio diretamente na superfície vestibular nos dentes do paciente. O tratamento é realizado sob supervisão profissional e geralmente leva cerca de uma ou duas sessões de 45 minutos cada para obter resultados significativos (Frysh et al., 1995.; Kwon, 2016.). Embora os dois meios de tratamento possam chegar ao mesmo resultado estético (Dourado Pinto et al., 2019.), os agentes clareadores utilizados na técnica de consultório foram escolhidos como referência para o presente estudo devido ao menor tempo de protocolo para as análises.

Para que possa ser utilizado como agente clareador, o peróxido de hidrogênio, utilizado como ingrediente ativo, é incorporado em uma formulação gel, possuindo concentrações que variam de 5% (uso caseiro) a 40% (uso em consultório). A forma em gel é preferida porque permite que o produto permaneça em contato com os dentes por um período prolongado sem escorrer, permitindo uma ação clareadora mais eficaz e segura (Allen, Zanowiak, 2014.; Alqahtani, 2014.). Essa aplicação mais controlada e precisa contribui com a proteção dos tecidos moles da boca, como gengivas e mucosa oral, minimizando o risco de irritações e queimaduras. Para que se tenha o efeito clareador desejado, independente da modalidade de tratamento adotada, é imperativo que haja a liberação do ingrediente ativo pelo gel (Bartlett, Walmsley, 1992.; Kaewpinta et al., 2018a., 2018b.). Na técnica em consultório a liberação deve ser rápida, devido ao curto tempo de aplicação, enquanto na técnica caseira ela deve ocorrer lentamente, pelo maior tempo de contato do produto com a superfície dental.

Para que seja verificada e quantificada a liberação de um princípio ativo por um determinado produto, a metodologia mais frequentemente utilizada pela indústria farmacêutica é a de difusão pela célula de Franz, que consiste num dispositivo com dois compartimentos, uma câmara doadora e outra receptora, separadas por uma membrana utilizada como filtro (Bronaugh' And, Stewart, n.d.; Chattaraj et al., 1995.; Ng et al., 2010.; Salamanca et al., 2018a.; Sesto Cabral et al., 2015.; Vigata et al., 2020.; Vlachou et al., 1992.). A metodologia aplicada nesse estudo fez uso dessa

técnica, de modo que o agente clareador fosse colocado na câmara doadora e, a intervalos regulares, fossem coletadas amostras da câmara receptora que permitisse a quantificação do peróxido que foi liberado pelo produto. Desse modo, foi verificado que a liberação do princípio ativo ocorreu para todos os agentes clareadores testados. No entanto, verificou-se também que o grupo controle, contendo apenas o peróxido de hidrogênio puro a 35%, foi o que permitiu a maior passagem do princípio ativo através da barreira de difusão, mesmo considerando sua concentração inicial inferior a grupos como Opalescence Boost ou Potenza Bianco (Tabela 2). Isso demonstra o impacto da forma farmacêutica gel no controle da liberação do princípio ativo, em comparação a quando a substância está livre em uma solução aquosa (Caneppele, Torres, 2011.; Cavalli et al., 2019.; H Frysh et al., 1995.; Ito et al., 2019a.; Kwon et al., 2018.; de Oliveira Ribeiro et al., 2022.; Torres et al., 2014., 2015., 2021., 2022.; Wijetunga et al., 2021.). A formulação de um gel envolve a seleção e combinação de ingredientes para criar uma substância com características específicas de aplicação e estabilidade, como agentes espessantes, umectantes, conservantes e reguladores pH, além do ingrediente ativo, propriamente dito (Ruiz Martinez et al., 2007.; Singh et al., 2013.). Nesse contexto, os espessantes são os principais responsáveis por conferir a característica semissólida aos géis, atuando na formação de uma rede tridimensional retendo água e o próprio peróxido de hidrogênio, proporcionando a estrutura necessária para que a liberação do agente clareador ocorra de forma controlada e de maneira distinta ao peróxido puro (Rodrigues et al., 2007; Silva et al., 2018; Torres et al., 2021, 2022). Essa rede ajuda a manter o gel estável e coeso, impedindo que ele se torne líquido ou escorra facilmente.

Contudo, apenas a presença de um agente espessante é insuficiente para explicar os diferentes resultados observados para cada grupo de agente clareador comercial. Grupos com concentração inicial de ingrediente ativo similares apresentaram padrões de liberação diferentes, como observado entre os grupos Potenza Bianco e Opalescence Boost (Figura 6), permitindo inferir que diferentes tipos ou concentrações de espessantes favorecem uma maior ou menor liberação de peróxido de hidrogênio, como sugerem estudos anteriores (Torres et al., 2022.). Existem diferentes tipos de espessantes disponíveis que podem ser empregados nas formulações de géis clareadores pela indústria odontológica, dependendo das propriedades desejadas e da compatibilidade com outros ingredientes presentes

(Públio et al., 2019.). Embora os fabricantes não declarem exatamente o tipo de espessante em suas formulações, sabe-se que eles podem ser de natureza orgânica ou inorgânica. Os espessantes orgânicos são constituídos de cadeias de polímeros de diferentes tamanhos e pesos moleculares que apresentam interação com a água. Quando sofrem hidratação, essas cadeias se expandem e se entrelaçam, imobilizando a água e o ingrediente ativo entre elas. Os espessantes não-orgânicos por sua vez, como a sílica, são constituídos de diferentes partículas de dióxido de silício sem carga elétrica e que se atraem por meio de forças de Van de Waals, formando corentes que se entrelaçam, também imobilizando solventes. Essa imobilização dos solventes, comum aos diversos tipos de espessante, é responsável por criar uma estrutura viscoelástica, característica de um gel e permitindo a liberação gradual de seu ingrediente ativo (Remington, 2005.).

Uma das propriedades fundamentais na compreensão da dinâmica e controle de liberação do ingrediente ativo encontra-se na viscosidade dos géis (Barkat Ali Khan, 2011.; Guo et al., 1998.; Shafiei et al., 2018.). Viscosidade é definida como uma propriedade física que descreve a resistência de um fluido ao escoamento (Lee et al., 2009.). Nos géis clareadores, está relacionada à capacidade das cadeias orgânicas ou inorgânicas de se entrelaçarem e formarem uma estrutura tridimensional mais densa, conferindo resistência ao movimento das moléculas de peróxido de hidrogênio dentro do fluido. Quando um fluido é mais viscoso, ele apresenta maior resistência ao escoamento, o que significa que as moléculas de peróxido têm dificuldade em se mover no interior da rede. Por outro lado, um fluido menos viscoso tem menor resistência ao escoamento, podendo indicar que as ligações químicas dentro da estrutura do espessante são mais fracas ou menos densas, com as moléculas de peróxido mais livres para se difundirem no interior do gel e eventualmente serem liberadas para o ambiente externo (Kwon et al., 2018.; Torres et al., 2022.). Estudos prévios mostraram que a viscosidade é afetada diretamente pela concentração do agente espessante na formulação, de modo que um gel com uma concentração mais alta de agente espessante será mais denso e terá uma consistência mais espessa, enquanto um gel com uma concentração mais baixa de agente espessante será menos denso e terá uma consistência mais próxima da de um líquido. As diferenças estruturais dos espessantes e a viscosidade resultante em cada formulação gel podem ser uma das explicações do motivo pelo qual o Opalescence Boost, quando

comparado ao Potenza Bianco, apresentou uma maior queda em sua concentração de peróxido de hidrogênio em relação ao tempo e, conseqüentemente, uma maior quantidade cumulativa desse ingrediente na câmara receptora. Porém, o comportamento de cada tipo de espessante na liberação do peróxido ainda precisa ser explorado e verificado por estudos futuros.

Outra explicação para as diferenças observadas na liberação do peróxido de hidrogênio por cada tipo de gel podem ser devido ao pH de cada um deles (Acuña et al., 2022.; Alkahtani et al., 2020.; Cavalli et al., 2019.; Ito et al., 2019.; Kwon, 2016.; Nicoll, Smith, 1955.; Wijetunga et al., 2021.). O pH, ou potencial hidrogeniônico, se refere à quantidade de íons H^+ presentes no meio em relação aos íons OH^- . Quando os dois íons estão em igualdade num meio, essa solução é considerada pH neutro; quando a concentração de íons H^+ for superior considera-se uma solução com pH ácido, e quando for inferior, considera-se uma solução tem pH básico (Ucko, 1992.). Dos géis testados nesse estudo, aqueles indicados como possuindo pH próximos da neutralidade foram os que apresentaram os maiores resultados de liberação do peróxido de hidrogênio em relação ao tempo, como o Opalescence Boost e Potenza Bianco. Dentre os três géis da família Whiteness, o grupo Whiteness HP Automixx, também com pH indicado neutro pelo fabricante, foi o que apresentou a maior liberação. Quando avaliamos os géis com pH não neutros, podemos observar que a acidez do Whiteness HP pode ter sido também determinante para as diferenças observadas em relação ao Whiteness HP Automixx para a quantidade cumulativa de peróxido liberada pelo gel. Ao se avaliarem os outros dois géis, observou-se que a alcalinidade do Pola Office Plus não impediu que o peróxido fosse liberado, apresentando quantidade cumulativa similar ao Potenza Bianco, porém, para o Whiteness HP Blue, uma maior alcalinidade do meio, se comparado a todos os demais grupos, mostrou que o peróxido não foi liberado de maneira eficiente (Tabela 2).

As diferenças de liberação de peróxido podem ter ocorrido devido a influência do pH na viscosidade de cada tipo de gel. Para géis que contenham espessantes orgânicos, o pH pode influenciar na carga elétrica das moléculas dos polímeros, afetando sua capacidade de formar uma rede tridimensional e espessar a solução, enquanto para os espessantes não-orgânicos as mudanças de pH podem resultar em precipitação das partículas responsáveis pelo espessamento, reduzindo sua eficácia (Lee et al., 2009.). O aumento ou a diminuição de viscosidade devido ao pH irá

dependem dos componentes na formulação de cada gel e de suas interações com o agente espessante (Carvalho et al., 2019.). Embora a literatura relate que o pH pode influenciar na viscosidade e na eficácia dos géis clareadores (Ito et al., 2019.; Kwon et al., 2018.; Torres et al., 2022.; Wijetunga et al., 2021.), essa propriedade ainda requer que estudos de liberação de peróxido sejam feitos posteriormente para que se estabeleça uma relação.

Considerando os resultados observados para o fator tempo, observou-se que a liberação do peróxido de hidrogênio ocorre de maneira gradual, porém ela não ocorre de maneira constante ao longo de um período de aplicação clínico. Esse tipo de comportamento é um fenômeno comum em sistemas de difusão quando testadas diferentes formulações de um ingrediente ativo de um fármaco, correspondendo a um perfil de liberação não-linear (Bolla et al., 2020b.; Das et al., 2013.; Jelvehgari et al., 2006.; Vlachou et al., 1992.). Existem algumas razões que podem explicar o comportamento observado pelos diferentes agentes clareadores, sendo eles relativos à membrana utilizada ou ao próprio ingrediente ativo.

A primeira explicação poderia ser por mudanças na permeabilidade da membrana, que se refere à facilidade com que uma substância pode se difundir através dela (Pusch, Walch, 1982.). Membranas com alta permeabilidade permitem a passagem eficiente de substâncias, enquanto membranas com baixa permeabilidade restringem a difusão das substâncias. A permeabilidade da membrana pode ser influenciada pelo tamanho e quantidade de poros presentes na sua estrutura, que são os espaços que permitem a passagem de uma substância, de modo que membranas com poros maiores tendem a ter maior permeabilidade em relação a substâncias de tamanho adequado (Bowen, Welfoot, 2002.; Joscelyne, Trägårdh, 2000.). Outros fatores que afetam a permeabilidade da membrana incluem a espessura, sendo que membranas mais finas tendem a apresentar maior permeabilidade em relação a membranas mais espessas, e as propriedades químicas da membrana, como sua polaridade e interações com a substância em estudo, de modo que alguns produtos podem ter maior afinidade com certos tipos de membrana (Parisio et al., 2013.). O material escolhido para que fossem feitas as análises do presente estudo foi a membrana a base de Ester Celulose da Spectra/Por - Repligen. O ester-celulose é derivado da celulose e é modificada por meio da esterificação com grupos éster, sendo um tipo de membrana amplamente utilizado em experimentos de difusão em várias

aplicações na indústria farmacêutica, devido às suas propriedades permeáveis e características de compatibilidade com fármacos. Seu uso relatado na literatura (Diamantoglou et al., 1994.; McKinnon, Avis, 1993.; Qaiser et al., 2009.; Runge et al., 2005.) demonstra que a membrana possui alta estabilidade química para várias condições de pH, além de ser possível sua fabricação em uma ampla faixa de tamanhos de poros controlados, de forma a permitir a passagem de ingredientes ativos de vários tamanhos moleculares enquanto restringindo a passagem de moléculas maiores. Embora o uso da membrana de ester-celulose para análises com peróxido de hidrogênio não sejam frequentes, seu uso é atestado pelo fabricante.

A segunda razão poderia ser devido à saturação da membrana, que ocorre quando a substância que está sendo avaliada se acumula ou se retém na superfície ou nos poros da membrana ao longo do tempo. Isso poderia levar a uma redução na taxa de difusão, pois a substância enfrenta uma resistência maior ao passar pela membrana (Bowen, Welfoot, 2002.). Ao utilizar membranas com a menor porosidade compatível com a substância, como a membrana de 0.1kd – 0.5kd selecionada para esse estudo, ela tem menos chances de ficar retida ou acumulada dentro dos poros da membrana, o que diminui a probabilidade de saturação. Isso permite uma difusão mais livre e contínua através da membrana ao longo do tempo. Essa propriedade da membrana é importante de ser considerada previamente ao experimento, porque embora o peróxido de hidrogênio seja uma molécula pequena, se os poros da membrana forem muito estreitos em relação ao tamanho da molécula a passagem do peróxido de hidrogênio pelos poros poderia ser bloqueada e ter uma taxa de difusão reduzida (Joscellyne, Trägårdh, 2000.). Podem ainda ocorrer interações químicas específicas entre o peróxido de hidrogênio e os componentes da membrana, como interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio, levando à retenção da molécula nos poros da membrana. Essa explicação é improvável de ter ocorrido. Foi observado que a liberação máxima alcançada no grupo controle foi de 120 mg/cm² no instante 45min, enquanto metade de sua liberação (60mg/cm²) ocorreu de maneira linear até o instante 15min, delimitando um possível ponto de saturação. Caso tivesse ocorrido a saturação da membrana, esse suposto ponto de saturação teria sido observado para todos os demais grupos, de modo que até alcançar 60mg a liberação deveria ser linear em todos os géis clareadores testados, o que não ocorreu. Até o instante 15min, todos os agentes clareadores testados apresentaram metade da quantidade liberada total

de peróxido, indicando uma mudança do padrão de liberação com o tempo (Bolla et al., 2020b.; Jelvehgari et al., 2006.).

Desse modo, a explicação mais provável para o comportamento não linear observado para os diferentes grupos seria relativo à queda da concentração inicial da substância (Ruiz Martinez et al., 2007.; Salamanca et al., 2018a.; Vlachou et al., 1992.; Yang et al., 2017.). No início do experimento, quando a concentração da substância é alta na área doadora, a difusão tende a ser mais rápida. Uma queda na concentração inicial levaria a uma taxa de difusão mais lenta ao longo do tempo, já que a substância teria menos concentração para se difundir através da membrana. Os resultados obtidos no experimento e confirmados pelo processo de titulação são compatíveis com essa explicação. Para todos os grupos pode-se observar a diminuição nas médias de concentração do peróxido ao fim do procedimento. Considerando novamente a liberação máxima alcançada pelo grupo controle, podemos inferir que o instante 15min é o ponto em que ocorreu metade da queda observada da concentração inicial, de forma que a outra metade da liberação deveria ocorrer ao longo dos próximos 30 minutos. A liberação de 90mg tendo sido identificada no intervalo entre os instantes 25min e 30min corrobora para a explicação do comportamento não linear no perfil de liberação do peróxido de hidrogênio e justifica porque a partir de 25 minutos do experimento só foram observadas diferenças significativas em intervalos maiores de tempo.

Em síntese, o presente estudo permitiu que fossem rejeitadas as duas hipóteses de nulidade testadas, de modo que tanto o tipo de gel clareador e o tempo de aplicação influenciaram na liberação e, conseqüentemente, na quantidade cumulativa do peróxido de hidrogênio. No entanto, devido a complexidade desse fenômeno, mais estudos são necessários para que se possa estabelecer como o comportamento na liberação de peróxido é influenciado por diferentes tipos de agentes espessantes e qual a compatibilidade em eficácia clínica dessa maior ou menor liberação.

7 CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- O tipo de gel clareador testado e a presença de espessante em sua composição impactam na maior ou menor liberação de peróxido de hidrogênio;
- Agentes clareadores com maior concentração inicial de peróxido de hidrogênio apresentaram uma maior liberação cumulativa do ingrediente ativo;
- A liberação de peróxido de hidrogênio de diferentes géis ocorre de maneira gradual em relação ao tempo de aplicação;
- A liberação de peróxido de hidrogênio não ocorre de maneira constante, ou linear, em relação ao tempo.

REFERÊNCIAS*

Acuña ED, Parreiras SO, Favoreto MW, Cruz GP, Gomes A, et al. In-office bleaching with a commercial 40% hydrogen peroxide gel modified to have different pHs: Color change, surface morphology, and penetration of hydrogen peroxide into the pulp chamber. *J Esthet Restor Dent*. 2022 Mar;34(2):322-327. doi: 10.1111/jerd.12453. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30790402.

Alkahtani R, Stone S, German M, Waterhouse P. A review on dental whitening. *J Dent*. 2020 Sep;100:103423. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103423. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32615235

Allen LV, Zanolwiak P. Pharmaceutical Dosage Forms. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Weinheim: Wiley; 2014. p. 1–45. ISBN 9783527306732. doi: 10.1002/14356007.a19_241.pub2.

Alqahtani MQ. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dent J*. 2014 Apr;26(2):33-46. doi: 10.1016/j.sdentj.2014.02.002. Epub 2014 Mar 12. PMID: 25408594; PMCID: PMC4229680.

Bach RD, Ayala PY, Schlegel HB. A reassessment of the bond dissociation energies of peroxides. an ab initio study. *J Am Chem Soc*. 1996.118(50):12758–65. doi: 10.1021/ja961838i.

Baratieri, L.N. et al. *Odontologia Restauradora - Fundamentos e Técnicas*. Sao Paulo: Livraria e Editora Santos, 2010.

Barkat Ali Khan. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011 Dec; 525(25):2715-2725. doi: 10.5897/AJPP11.698.

Bartlett DW, Walmsley AD. Home bleaching. *Dent Update*. 1992 Sep;19(7):287-8, 290. PMID: 1303364.

Bauminger BB. Micro method for manual analysis of true glucose in plasma without deproteinization. *J Clin Pathol*. 1974 Dec;27(12):1015-7. doi: 10.1136/jcp.27.12.1015. PMID: 4452743; PMCID: PMC475577.

Bolla PK, Clark BA, Juluri A, Cheruvu HS, Renukuntla J. Evaluation of Formulation Parameters on Permeation of Ibuprofen from Topical Formulations Using Strat-M® Membrane. *Pharmaceutics*. 2020 Feb 13;12(2):151. doi: 10.3390/pharmaceutics12020151. PMID: 32069850; PMCID: PMC7076669.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Borges AB, Zanatta RF, Barros AC, Silva LC, Pucci CR, Torres CR. Effect of hydrogen peroxide concentration on enamel color and microhardness. *Oper Dent*. 2015 Jan-Feb;40(1):96-101. doi: 10.2341/13-371-L. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25136902.

Bowen WR, Welfoot JS. Modelling of membrane nanofiltration—pore size distribution effects. *Chem Eng Sci*. 2002 Apr;57(8):1393–407. doi: 10.1016/S0009-2509(01)00412-2.

Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *J Pharm Sci*. 1985 Jan;74(1):64-7. doi: 10.1002/jps.2600740117. PMID: 3981421.

Carvalho FSR, Verde MML, Viana KF, Bezerra TMM, Fonseca SGDC, et al. Pharmacological Characterization and Raman Spectroscopy Evaluation of Oral and Maxillofacial Surgery-Related Carnoy'S Solution Modified by Different Viscosity Agents. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Nov 1;20(11):3335-3339. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.11.3335. PMID: 31759357; PMCID: PMC7063025.

Cavalli V, Silva BGD, Berger SB, Marson FC, Tabchoury CPM, Giannini M. Decomposition Rate, pH, and Enamel Color Alteration of At-Home and In-Office Bleaching Agents. *Braz Dent J*. 2019 Jul 22;30(4):385-396. doi: 10.1590/0103-6440201902484. PMID: 31340230.

Chattaraj SC, Swarbrick J, Kanfer I. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. *Int J Pharm*. 1995 Jun; 120(1) 119–124. doi: 10.1016/0378-5173(94)00426-6

Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Flury S. Enamel Surface Changes After Exposure to Bleaching Gels Containing Carbamide Peroxide or Hydrogen Peroxide. *Oper Dent*. 2016 Jan-Feb;41(1):E39-47. doi: 10.2341/15-010-L. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26449590.

Das B, Nayak AK, Nanda U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. *Int J Biol Macromol*. 2013 Nov;62:514-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.049. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24099938.

Diamantoglou M, Lemke HD, Vienken J. Cellulose-ester as membrane materials for hemodialysis. *Int J Artif Organs*. 1994 Jul;17(7):385-91. PMID: 7806425.

Dourado Pinto AV, Carlos NR, Amaral FLBD, França FMG, Turssi CP, Basting RT. At-home, in-office and combined dental bleaching techniques using hydrogen peroxide: Randomized clinical trial evaluation of effectiveness, clinical parameters and enamel mineral content. *Am J Dent*. 2019 Jun;32(3):124-132. PMID: 31295393.

Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig*. 2014 Jul;18(6):1631-7. doi: 10.1007/s00784-013-1147-4. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24264642.

Fang JY, Hwang TL, Leu YL. Effect of enhancers and retarders on percutaneous absorption of flurbiprofen from hydrogels. *Int J Pharm*. 2003 Jan 16;250(2):313-25. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00540-9. PMID: 12527159.

Frysh H, Goldstein RE, Garber DA. *Complete Dental Bleaching*. 1st ed. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc; 1995. 25–33 p.

Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent*. 2004 Jul-Aug;29(4):363-8. PMID: 15279473.

Van der Geld P, Oosterveld P, Van Heck G, Kuijpers-Jagtman AM. Smile attractiveness. Self-perception and influence on personality. *Angle Orthod*. 2007 Sep;77(5):759-65. doi: 10.2319/082606-349. PMID: 17685777.

de Geus JL, Wambier LM, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. At-home vs In-office Bleaching: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oper Dent*. 2016 Jul-Aug;41(4):341-56. doi: 10.2341/15-287-LIT. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27045285.

Gonçalves MLL, Tavares ACDS, Mota ACCD, Penna LAP, Deana AM, Bussadori SK. In-Office Tooth Bleaching for Adolescents Using Hydrogen Peroxide-Based Gels: Clinical Trial. *Braz Dent J*. 2017 Nov-Dec;28(6):720-725. doi: 10.1590/0103-6440201701516. PMID: 29211128.

Guo J-H, Skinner GW, Harcum WW, Barnum PE. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharm Sci Technol Today*. 1998 Sep;1(6):254–61. doi: 10.1016/S1461-5347(98)00072-8.

Guth É, Bacon W. [Smile in self-representation and self-esteem]. *Orthod Fr*. 2010 Dec;81(4):323-9. French. doi: 10.1051/orthodfr/2010033. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21144473.

Hamed R, AbuRezeq A, Tarawneh O. Development of hydrogels, oleogels, and bigels as local drug delivery systems for periodontitis. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018 Sep;44(9):1488-1497. doi: 10.1080/03639045.2018.1464021. Epub 2018 May 7. PMID: 29669437.

Hannig C, Willenbücher S, Becker K, Mahony C, Attin T. Recovery of peroxides in saliva during home bleaching--influence of smoking. *J Oral Rehabil*. 2006 Jul;33(7):533-41. doi: 10.1111/j.1365-2842.2005.01579.x. PMID: 16774513.

Hannig C, Zech R, Henze E, Dorr-Tolui R, Attin T. Determination of peroxides in saliva--kinetics of peroxide release into saliva during home-bleaching with

Whitestrips and Vivastyle. *Arch Oral Biol.* 2003 Aug;48(8):559-66. doi: 10.1016/s0003-9969(03)00102-x. PMID: 12828984.

Hannig C, Zech R, Henze E, Dreier S, Attin T. Peroxide release into saliva from five different home bleaching systems in vivo. *Am J Dent.* 2005 Feb;18(1):13-8. PMID: 15810475.

Hassel AJ, Johanning M, Grill S, Schröder J, Wahl HW, Corcodel N, Klotz AL, Rammelsberg P, Zenthöfer A. Changes of tooth color in middle and old age: A longitudinal study over a decade. *J Esthet Restor Dent.* 2017 Nov 12;29(6):459-463. doi: 10.1111/jerd.12334. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28858417.

Hussain Shah SN, Hussain T, Ullah Khan I, Asghar S, Shahzad Y. Formulation study of topically applied lotion: in vitro and in vivo evaluation. *Bioimpacts.* 2013;3(1):11-9. doi: 10.5681/bi.2013.006. Epub 2013 Jan 26. PMID: 23678465; PMCID: PMC3648906.

Ito Y, Otsuki M, Tagami J. Effect of pH conditioners on tooth bleaching. *Clin Exp Dent Res.* 2019 Feb 19;5(3):212-218. doi: 10.1002/cre2.172. PMID: 31249701; PMCID: PMC6585585.

Javaid KA, Al-Shadfan EA, Hussein SA. Evaluation of in Vitro Release of Diclofenac Sodium Formulated Gels through Diffusion Cell. *Journal of Pharmaceutical Research.* 2009 Oct; 8(4): 202. doi: 10.18579/jpcrkc/2009/8/4/79705.

Jelvehgari M, Siahi-Shadbad MR, Azarmi S, Martin GP, Nokhodchi A. The microsp sponge delivery system of benzoyl peroxide: preparation, characterization and release studies. *Int J Pharm.* 2006 Feb 3;308(1-2):124-32. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.001. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16359833.

Joiner A, Luo W. Tooth colour and whiteness: A review. *J Dent.* 2017 Dec;67S:S3-S10. doi: 10.1016/j.jdent.2017.09.006. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28928097.

Joscelyne SM, Trägårdh G. Membrane emulsification — a literature review. *J Memb Sci.* 2000.169(1):107–17. doi: 10.1016/S0376-7388(99)00334-8.

Kaewpinta A, Khongkhunthian S, Chaijareenont P, Okonogi S. Preparation and characterization of rice gels containing tooth bleaching agent. *Drug Discov Ther.* 2018a;12(5):275-282. doi: 10.5582/ddt.2018.01057. PMID: 30464158.

Kaewpinta A, Khongkhunthian S, Chaijareenont P, Okonogi S. Tooth whitening efficacy of pigmented rice gels containing carbamide peroxide. *Drug Discov Ther.* 2018b;12(3):126-132. doi: 10.5582/ddt.2018.01023. PMID: 29998993.

Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004 Jan;30(1):45-50. doi: 10.1097/00004770-200401000-

00010. PMID: 14760908.

Klang V, Schwarz JC, Matsko N, Rezvani E, El-Hagin N, Wirth M, Valenta C. Semi-solid Sucrose Stearate-Based Emulsions as Dermal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2011 May 30;3(2):275-306. doi: 10.3390/pharmaceutics3020275. PMID: 24310496; PMCID: PMC3864235.

Kovacevic Pavicic D, Kolceg M, Lajnert V, Pavlic A, Spalj S. Changes in quality of life induced by tooth whitening are not influenced by global self-esteem: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Odontology*. 2020 Jan;108(1):143-151. doi: 10.1007/s10266-019-00442-6. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31289971.

Kovacevic Pavicic D, Pavlic A, Kinkela Devcic M, Lajnert V, Spalj S. Tooth Color as a Predictor of Oral Health-Related Quality of Life in Young Adults. *J Prosthodont*. 2019 Apr;28(4):e886-e892. doi: 10.1111/jopr.12666. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29086473.

Kwon SR. *Tooth Whitening*. Cham: Springer International Publishing; 2016. 21–29 p. ISBN 978-3-319-38847-2. doi: 10.1007/978-3-319-38849-6.

Kwon SR, Pallavi F, Shi Y, Oyoyo U, Mohraz A, Li Y. Effect of Bleaching Gel Viscosity on Tooth Whitening Efficacy and Pulp Chamber Penetration: An In Vitro Study. *Oper Dent*. 2018 May/Jun;43(3):326-334. doi: 10.2341/17-099-L. PMID: 29676980.

Kwon SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent*. 2015 Sep-Oct;27(5):240-57. doi: 10.1111/jerd.12152. Epub 2015 May 13. PMID: 25969131.

El Laithy HM, El-Shaboury KM. The development of Cutina lipogels and gel microemulsion for topical administration of fluconazole. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):E35. doi: 10.1208/pt030435. PMID: 12916929; PMCID: PMC2751344.

Lecocq G, Truong Tan Trung L. Smile esthetics: calculated beauty? *Int Orthod*. 2014 Jun;12(2):149-70. English, French. doi: 10.1016/j.ortho.2014.03.015. Epub 2014 May 14. PMID: 24835014.

Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release*. 2009 Jun 5;136(2):88-98. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.02.013. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19250955.

Magalhães JG, Marimoto AR, Torres CR, Pagani C, Teixeira SC, Barcellos DC. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. *Acta Odontol Scand*. 2012 Mar;70(2):122-6. doi: 10.3109/00016357.2011.600704. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21780968.

Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. *J Periodontol*. 1995 Sep;66(9):786-96. doi: 10.1902/jop.1995.66.9.786. PMID: 7500245.

McEvoy SA. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. II. Current techniques and their clinical application. *Quintessence Int*. 1989 Jun;20(6):379-84. PMID: 2756093.

McKinnon BT, Avis KE. Membrane filtration of pharmaceutical solutions. *Am J Hosp Pharm*. 1993 Sep;50(9):1921-36. PMID: 8135243.

Mondelli J. *Estética E Cosmética Em Clínica Integrada Restauradora*. 2^a. Quintessence; 2018.

Moraru I, Tuculină M, Bătăiosu M, Gheorghiuță L, Diaconu O. Whitening non vital teeth - a case report. *Curr Health Sci J*. 2012 Jul;38(3):132-5. Epub 2012 Sep 19. PMID: 24778849; PMCID: PMC3945272.

Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Sep;11(3):1432-41. doi: 10.1208/s12249-010-9522-9. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20842539; PMCID: PMC2974154.

Nicoll WD, Smith AF. Stability of Dilute Alkaline Solutions of Hydrogen Peroxide. *Ind Eng Chem*. 1955 Dec;47(12):2548-54. doi: 10.1021/ie50552a051.

Parisio G, Stocchero M, Ferrarini A. Passive Membrane Permeability: Beyond the Standard Solubility-Diffusion Model. *J Chem Theory Comput*. 2013 Dec 10;9(12):5236-46. doi: 10.1021/ct400690t. Epub 2013 Nov 6. PMID: 26592263.

Pereira R, Corado D, Silveira J, Alves R, Mata A, Marques D. Dental prophylaxis influence in tooth color assessment-Clinical study. *J Esthet Restor Dent*. 2020 Sep;32(6):586-592. doi: 10.1111/jerd.12593. Epub 2020 May 12. PMID: 32400106.

do Carmo Públio J, Zeczkowski M, Burga-Sánchez J, Ambrosano GMB, Groppo FC, Aguiar FHB, Lima DANL. Influence of different thickeners in at-home tooth bleaching: a randomized clinical trial study. *Clin Oral Investig*. 2019 May;23(5):2187-2198. doi: 10.1007/s00784-018-2613-9. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30280326.

Pusch W, Walch A. Membrane structure and its correlation with membrane permeability. *J Memb Sci*. 1982 Apr;10(2-3):325-60. doi: 10.1016/S0376-7388(00)81417-9.

Qaiser AA, Hyland MM, Patterson DA. Control of polyaniline deposition on microporous cellulose ester membranes by in situ chemical polymerization. *J Phys Chem B*. 2009 Nov 12;113(45):14986-93. doi: 10.1021/jp9038336. PMID: 19888765.

Remington T. *The Science and Practice of Pharmacy*. 21st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Rezende M, Ferri L, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. Combined Bleaching Technique Using Low and High Hydrogen Peroxide In-Office Bleaching Gel. *Oper Dent*. 2016 Jul-Aug;41(4):388-96. doi: 10.2341/15-266-C. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26919081.

Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Braz Oral Res*. 2007 Apr-Jun;21(2):170-5. doi: 10.1590/s1806-83242007000200013. PMID: 17589654.

Rodríguez-Martínez J, Valiente M, Sánchez-Martín MJ. Tooth whitening: From the established treatments to novel approaches to prevent side effects. *J Esthet Restor Dent*. 2019 Sep;31(5):431-440. doi: 10.1111/jerd.12519. Epub 2019 Aug 25. PMID: 31448534.

Ruiz Martinez MA, López-Viota Gallardo J, de Benavides MM, de Dios García López-Duran J, Gallardo Lara V. Rheological behavior of gels and meloxicam release. *Int J Pharm*. 2007 Mar 21;333(1-2):17-23. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.09.045. Epub 2006 Sep 30. PMID: 17056213.

Runge SW, Shelton KR, Melton SA, Moran WM. Maintaining the ionic permeability of a cellulose ester membrane. *J Biochem Biophys Methods*. 2005 Sep 30;64(3):200-6. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.07.003. PMID: 16112200.

Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2018 Sep 5;10(3):148. doi: 10.3390/pharmaceutics10030148. PMID: 30189634; PMCID: PMC6161298.

Sesto Cabral ME, Ramos AN, Cabrera CA, Valdez JC, González SN. Equipment and method for in vitro release measurements on topical dosage forms. *Pharm Dev Technol*. 2015;20(5):619-25. doi: 10.3109/10837450.2014.908308. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25318476.

Shafiei M, Balhoff M, Hayman NW. Chemical and microstructural controls on viscoplasticity in carbopol hydrogel. *Polymer (Guildf)*. 2018 Mar;139:44–51. doi: 10.1016/j.polymer.2018.01.080.

Silva BG, Gouveia THN, da Silva MAP, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL. Evaluation of home bleaching gel modified by different thickeners on the physical properties of enamel: An in situ study. *Eur J Dent*. 2018 Oct-Dec;12(4):523-527. doi: 10.4103/ejd.ejd_352_17. PMID: 30369797; PMCID: PMC6178682.

Singh MP, Nagori BP, Shaw NR, Tiwari M, Jhanwar B. Formulation Development & Evaluation of Topical Gel Formulations Using Different Gelling Agents and Its

Comparison with Marketed Gel Formulation. *International Journal of Pharmaceutical Erudition*. 2013 Nov;3(3):1–10.

Slaska B, Liebman AI, Kukleris D. Restoration of Fluorosis Stained Teeth: A Case Study. *Dent Clin North Am*. 2015 Jul;59(3):583-91. doi: 10.1016/j.cden.2015.03.003. Epub 2015 May 21. PMID: 26140966.

Tas C, Ozkan Y, Savaser A, Baykara T. In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Farmaco*. 2003 Aug;58(8):605-11. doi: 10.1016/S0014-827X(03)00080-6. PMID: 12875891.

Torres C. *Modern Operative Dentistry*. Cham: Springer International Publishing; 2020. ISBN 978-3-030-31771-3. doi: 10.1007/978-3-030-31772-0.

Torres C, Moecke SE, Mafetano A, Cornélio LF, Di Nicoló R, Borgesd AB. Influence of Viscosity and Thickener on the Effects of Bleaching Gels. *Oper Dent*. 2022 May 1;47(3):E119-E130. doi: 10.2341/20-309-L. PMID: 35649221.

Ucko DA. *Química Para as Ciências da Saúde: Uma Introdução à Química Geral, Orgânica*. 2ª. São Paulo - SP - Brasil: Editora Manole LTDA; 1992.

Vieira-Junior WF, Gouveia THN, Silva BG, Bueno VCPS, Aguiar FHB, Lima DANL. Toothpaste Use Protocol with Dental Bleaching for a Conservative Treatment: Case Reports. *Contemp Clin Dent*. 2017 Oct-Dec;8(4):637-641. doi: 10.4103/ccd.ccd_192_17. PMID: 29326518; PMCID: PMC5754988.

Vigata M, Meinert C, Hutmacher DW, Bock N. Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 7;12(12):1188. doi: 10.3390/pharmaceutics12121188. PMID: 33297493; PMCID: PMC7762425.

Vlachou MD, Rekkas DM, Dallas PP, Choulis NH. Development and in vitro evaluation of griseofulvin gels using Franz diffusion cells. *Int. J. Pharm*. 1992 Apr; 82:47-52. doi: 10.1016/0378-5173(92)90070-I.

Wang Q, Meng Q, Meng J. Minimally invasive esthetic management of dental fluorosis: a case report. *J Int Med Res*. 2020 Oct;48(10):300060520967538. doi: 10.1177/0300060520967538. PMID: 33121307; PMCID: PMC7607159.

Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*. 2001 Mar 24;190(6):309-16. doi: 10.1038/sj.bdj.4800959. PMID: 11325156.

Wijetunga CL, Otsuki M, Hiraishi N, Luong MN, Tagami J. Effect of pH of bleaching agent on tooth bleaching action in vitro. *Dent Mater J*. 2021 May 29;40(3):566-572. doi: 10.4012/dmj.2020-191. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33456029.

Yang R, Wei T, Goldberg H, Wang W, Cullion K, Kohane DS. Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv Mater.* 2017 Oct;29(37):10.1002/adma.201606596. doi: 10.1002/adma.201606596. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28752600; PMCID: PMC5683089.

Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent.* 2004 Jan;32(1):41-6. doi: 10.1016/s0300-5712(03)00138-6. PMID: 14659717.