

Atendendo solicitação da  
autora, o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 09/12/2021



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



**Carla Caroline de Oliveira Duque**

**Desenvolvimento de produtos para clareamento dental contendo a enzima  
horseradish peroxidase como agente catalisador**

**Araraquara**  
**2019**



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



**Carla Caroline de Oliveira Duque**

**Desenvolvimento de produtos para clareamento dental contendo a enzima  
horseradish peroxidase como agente catalisador**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de  
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para  
obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na  
Área de Prótese.

**Orientador:** Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

**Coorientador:** Profa Dra. Diana G. Soares dos Passos

**Araraquara**

**2019**

Duque, Carla Caroline de Oliveira

Desenvolvimento de produtos para clareamento dental  
contendo a enzima horseradish peroxidase como agente  
catalisador / Carla Caroline de Oliveira Duque. -- Araraquara:  
[s.n.], 2019

98 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação oral) – Universidade  
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Coorientador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos

1. Toxicidade 2. Clareamento dental 3. Peroxidase I. Título

**Carla Caroline de Oliveira Duque**

**Desenvolvimento de produtos para clareamento dental contendo a enzima horseradish peroxidase como agente catalisador**

**Comissão Julgadora**

**Tese de Doutorado**

Presidente e orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Profa. Dra. Vanessa Cavalli Gobbo

3º Examinador: André Luiz Fraga Briso

4º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

5º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara 09 de dezembro de 2019.

## **DADOS CURRICULARES**

### **CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE**

|                   |                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NASCIMENTO</b> | 01.07.1988                                                                                  |
| <b>FILIAÇÃO</b>   | Carlos Alberto Duque<br>Onelice Pereira de Oliveira                                         |
| <b>2009-2013</b>  | Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP                |
| <b>2012-2013</b>  | Estágio de Capacitação em Prótese Fixa pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP  |
| <b>2014-2015</b>  | Estágio de Docência em Prótese Fixa pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP     |
| <b>2013-2015</b>  | Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP  |
| <b>2014-2016</b>  | Mestrado acadêmico em Reabilitação Oral pela faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP |
| <b>2014-2018</b>  | Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP  |
| <b>2014-2018</b>  | Estágio de Docência em Prótese Total pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP    |

## *Dedicatória*

### *Ao meu mestre e guia maior, Deus:*

Primeiramente dedico a Deus todo fruto desde trabalho e todas as bênçãos colocadas em minha vida. Sem Ele nada seria possível de ser concretizado. Agradeço a Deus por todo crescimento espiritual e intelectual alcançado, mas, principalmente, pela proteção concedida durante a caminhada, tal como dito no Salmo 23: *“O Senhor é meu pastor e nada me faltará. Deita-me em verdes pastos e guia-me mansamente em águas tranquilas. Refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e o Teu cajado me consolam. Prepara-me uma mesa perante os meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”*

Pai, muito obrigada por tudo. Amo muito o Senhor

### *Ao meu marido, Matheus*

Obrigada por você ser quem você é na minha vida e por querer dividir sua trajetória comigo. Como disse em outros momentos, há quase 6 anos, você tem sido meu principal co-autor. A pessoa que me traz calma e afago nos dias de tempestade e que me faz a cada dia querer ser melhor para caminharmos juntos essa jornada que decidimos dividir. Você é meu amor maior. Te amo!

### *Ao meu melhor amigo, meu irmão Vinicius*

Porque além de sermos irmãos, somos melhores amigos! Você tem sido meu alicerce e meu braço direito. Minha admiração pela sua grandiosidade é infinita. Te amo muito!

### *Aos meus pais,*

Aos meus pais, que são minhas raízes, agradeço pelas oportunidades e pelos ensinamentos proporcionados. Vocês foram as bases para isso se tornasse possível. Amo vocês.

*À minha avó Maria,*

À minha avó **Maria** (*in memoriam*), a minha estrela guia. Por você, amor eterno.

## *Agradecimentos Especiais*

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por ter aberto as portas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB), do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP. Professor, muito obrigada pelos anos de orientação (desde a iniciação científica), os quais me trouxeram um crescimento profissional imenso e grandes oportunidades que eu jamais teria vivido se não estivesse no LPEB. Obrigada pelo crescimento científico proporcionado, pois seu amor pela ciência e pelo Laboratório são a alma dos projetos desenvolvidos no LPEB e que carregamos com tanto orgulho por todos os lugares em que passamos. Trabalhar com amor e retidão é uma lição valiosa que aprendi com sua convivência. Muito obrigada pelo carinho e pela oportunidade!

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, que é uma pessoa linda em todos os aspectos da palavra. O seu comportamento perante a pesquisa e a docência são únicos e incomparáveis. Muito obrigada por todo conhecimento transmitido com tanto carinho e carisma. Tenho uma admiração imensa pela senhora, pois além de ser uma grande pesquisadora e professora a senhora é um ser humano maravilhoso. Muito obrigada pela convivência e pelos ensinamentos.

À minha **coorientadora e amiga, Diana**. Di, para você, qualquer palavra de agradecimento seria insuficiente, pois ter convivido com você foi um divisor de águas tanto na minha vida pessoal quanto profissional e sou eternamente grata por isso. Minha admiração por você é imensa, pois seu amor e entusiasmo por aquilo que você faz é contagiante. Não me canso de falar sobre as suas grandes ideias e o quanto eu cresci no tempo em que trabalhamos juntas. Tem gente que passa pela vida da gente e desperta em nós o melhor que conseguimos ser e você é essa pessoa. Você é incrível! Muito obrigada por tudo!

À minha família LPEB, **Uxua, Rafa, Malu, Lays e Roberto**. Sem sombra de dúvidas vocês são os melhores parceiros de trabalho do mundo. E por sorte, também se tornaram meus amigos. Muito obrigada por toda alegria, risadas e companheirismo no dia a dia. Com vocês por perto, a trajetória se tornou mais leve e mais gostosa. Foi

uma honra ter convivido, ter trabalhado e ter compartilhado tantos momentos legais com vocês. Torço muito pelo sucesso individual de cada um e saibam que sempre e onde estiverem, tem uma amiga aqui que os estima muito, contem sempre comigo. Muito obrigada por tudo! Vocês são demais!

Aos alunos de Mestrado e Doutorado, **Rafael e Uxua** com quem tiver oportunidade de trabalhar junto, auxiliando em seus projetos. Meninos, muito obrigada pela convivência e pelo crescimento proporcionado. Em especial a **Uxua**, com quem estou diretamente envolvida desde o projeto de mestrado e que hoje tenho a oportunidade de também estar envolvida no seu projeto de doutorado. Mas mais do que o convívio acadêmico, a Uxua é uma grande amiga, nunca me esquecerei da sua lealdade e parceira em todos os momentos.

À minha amiga de divisão de tarefas e organização do LPEB, **Malu**. Malu, nem sei como agradecer o companheirismo durante esses anos e em tantos momentos. Não tenho a menor dúvida do seu potencial e de que você chegará longe. Ainda vou citar muito seus artigos nessa vida. Muito obrigada pela boa convivência do dia a dia, por me ouvir e por nunca perder a paciência comigo. Por me dar sempre bons conselhos e por me incentivar a sempre ir em frente. Enfim, obrigada pela amizade incondicional e pelo carinho.

À pós-doutoranda e amiga **Giovana** que exerceu um papel fundamental nos auxiliando com os projetos de pesquisa e estatísticas. A Gi é uma pessoa maravilhosa, um ser humano excepcional, cheia de alegria e bons sentimentos. Sua companhia, jeito descontraído e autêntico fazem muita falta. Uma verdadeira irmã mais velha que zela pelos seus e que traz calma no meio da tempestade. Enfim, tenho um carinho e admiração enormes por você. Muito obrigada por tudo!

À Prof<sup>a</sup>. **Fernanda Gonçalves Basso** e ao Prof<sup>o</sup>. **Gelson Luis Adabo**, com os quais pude contar desde o início da elaboração deste projeto de pesquisa nos exames de Pré-Qualificação e Qualificação. Ambos contribuíram de maneira valiosa com suas avaliações. Além disso, agradeço a disponibilidade que sempre tiveram comigo enquanto aluna. Muito obrigada!

Aos amigos de Mestrado e Doutorado em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP, **Midian, Elkin, Vinícius, Carmélia, Ranulfo, Luana, Claudia, Camila, Amanda, Cibele, Diogo, Danny, Eddy, Suelen, Adriana, Larissa e Jú Padilha**. E também a pós-doc **Patty** (Laboratório da Profa. Denise). Gostaria agradecê-los pelas conversas, pelos almoços, pelas disciplinas, atendimentos clínicos e pelos cursos que organizamos juntos. Mas agradeço, principalmente, por terem para comigo um sorriso sempre amigo e acolhedor. Vocês são pessoas ímpares! Gostaria de ter passado mais tempo com vocês! Mas como diz Fernando Pessoa: *“Amigos a gente não faz. Reconhece.”* e eu logo reconheci vocês. Obrigada por tudo!

Aos alunos de Iniciação Científica com quem convivi no LPEB e aos projetos de clareamento dos quais participei. Gostaria de agradecer em especial a **Fer Cassiano, Felipe Usbert, Michelle Lobato, Filipe Koon, Flavinha e Lídia**, que foram os que tive um contato mais próximo. Vocês são alunos diferenciados e fico muito feliz de ter trabalhado, direta ou indiretamente, com vocês. Por vocês eu tenho muito carinho e admiração e agradeço todo o respeito que sempre tiveram comigo.

À aluna **Fernanda Cassiano**, com quem não trabalhei diretamente durante o desenvolvimento do projeto de iniciação científica, mas que o acaso, a convivência e a afinidade fizeram com que nos tornássemos amigas. Adoro sua amizade, Fer! Obrigada por tudo!

Aos professores, **João Neudenir Arioli Filho, Francisco de Assis Mollo Junior, José dos Santos Nunes Reis, Ana Carolina Pero e Oscar Muñoz**, os quais sempre se demonstraram extremamente dispostos a nos transmitir todo conhecimento e experiência clínica. O amor que vocês têm pela docência é algo que admiro e levarei comigo. Muito obrigada por todas as oportunidades de aprendizado que me ofertaram e pela paciência em me ensinar. Vocês são professores incríveis pelos quais tenho imensa admiração.

Gostaria de agradecer especialmente ao prof. **João Neudenir Arioli Filho**, que me acolheu como orientada durante as clínicas da pós-graduação e a quem eu devo

todo embasamento de ensinamento clínico obtido nesses anos de doutorado. Por sempre ter me orientado, tanto no aspecto profissional quanto pessoal, a quem tenho profunda admiração e amizade. Muito obrigada por tudo, João!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Lígia Antunes Pereira Pinelli**, por ter aberto as portas tanto na Graduação quanto na Pós-Graduação, através dos estágios realizados na disciplina de Prótese Fixa, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP. Muito obrigada pelos ensinamentos.

As amigas de Araçatuba, **Marjorie e Loiane**, com quem trabalhamos no LPEB e que são pessoas excepcionais. A nossa amizade nasceu pelo convívio, afinidade e carinho. Muito obrigada pela amizade, meninas. Tenho grande admiração por vocês!

Aos novos amigos mais recentes do LPEB que também são muito queridos para mim, **Igor, Carol e Fer Ali** e também a **Ester**. Embora a convivência tenha sido breve, vocês são muito especiais para mim! Tenho certeza de que o carinho é recíproco e sincero e aonde quer que eu vá, sempre carregarei a amizade de vocês! Obrigada por tudo!

Às amigas de graduação, **Jéssica, Daphine, Laís e Jú Alonso** por estarem sempre presentes e por permanecerem na minha vida durante todos esses anos. Mesmo com a distância, somos grandes amigas. Amo vocês, meninas!

À família **Oliveira Duque**, com todos os tios(as), primos(as) que fazem parte da minha base familiar, especialmente as minhas tias **Cida, Dora e Maria** que sempre cuidaram muito de mim com um amor incondicional. Vocês foram e são essenciais em todas as minhas conquistas. Amo muito vocês!

## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)**, representada pelas Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato, e vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos que foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal tanto no período de Graduação quanto de Pós-Graduação. Muito obrigada pela gentileza constante.

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

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº 2016/10928-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**. A todos os professores e funcionários, agradeço a disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo. Muito obrigada por tudo!

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

*“Uma resposta aproximada para o problema certo vale muito mais do  
que uma resposta exata para um problema aproximado.”*

*John Wilder Tukey*



Duque CCO. Desenvolvimento de produtos para clareamento dental contendo a enzima horseradish peroxidase como agente catalisador [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

## RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficácia clareadora e toxicidade sobre células pulpares humanas (HDPCs) de dois produtos experimentais recomendados para terapia clareadora de consultório. Para isso, dois sistemas clareadores foram desenvolvidos: um gel clareador contendo um espessante catalisador (EP) e um primer polimérico catalisador (PR), indicado para aplicação sobre o esmalte previamente ao uso de agentes clareadores. Em ambos os produtos foi incorporada a enzima horseradish peroxidase (HRP) como agente catalisador do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Na primeira etapa deste estudo, géis clareadores com 10% e 20% de  $H_2O_2$  foram preparados a partir de uma solução estoque de 35% de  $H_2O_2$  combinada com um espessante contendo ou não as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL de HRP ( $\pm$ HRP). Estes produtos foram avaliados quanto ao pH, temperatura, estabilidade de reação, formação de radicais-livres (EROs, sonda HORAC) e radicais hidroxila ( $HO\bullet$ , sonda  $H_2DCFDA$ ), bem como eficácia clareadora ( $\Delta E$ ). Um protocolo *in vitro* de pigmentação intrínseca de discos de esmalte/dentina bovinos foi usado para avaliar a citotoxicidade e a difusão trans-amelodentinária  $H_2O_2$ . De modo geral, o pH e a temperatura dos géis mantiveram-se constantes durante todo período de análise, sendo que a adição da enzima HRP ao EP acelerou a catálise do  $H_2O_2$ , estimulando a produção de EROs e  $HO\bullet$  (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Além disso, a presença da HRP no EP aumentou o  $\Delta E$  do gel e reduziu a difusão trans-amelodentinária de  $H_2O_2$  residual, minimizando a citotoxicidade desta molécula, a qual foi concentração/dependente (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Dentre os parâmetros testados, o gel contendo 10% de  $H_2O_2$ +2 mg/mL de HRP foi o que mostrou os melhores resultados. Embora o gel com 20% de  $H_2O_2$ +2mg/mL de HRP tenha apresentado  $\Delta E$  similar àquela obtida com o gel contendo 35% de  $H_2O_2$  aplicado por 45 minutos sobre o esmalte (protocolo de consultório), este último foi altamente tóxico para as HDPCs. Por essa razão, o gel com 10% de  $H_2O_2$  ( $\pm$ HRP) foi selecionado para ser avaliado nas etapas subsequentes deste estudo. Com o objetivo de aproximar o  $\Delta E$  deste produto àquela proporcionada pelo gel de consultório, as concentrações de HRP incorporadas ao espessante do gel com 10% de  $H_2O_2$  foram aumentadas para 4, 6 e 10 mg/mL. A concentração de 10 mg/mL de HRP resultou em valores de  $\Delta E$  similares ao protocolo de consultório (Dunnett's;  $\alpha=5\%$ ), desse modo, esta mesma concentração foi selecionada para as etapas seguintes deste estudo, bem como para ser incorporada ao PR. Como o comportamento do PR se equiparou ao do EP, ambos os produtos foram aplicados (1x45, 1x30, 1x10 e 1x5 minutos) sobre discos de esmalte/dentina, cujas espessuras simulavam incisivos inferiores ( $2,3 \text{ mm} \pm 0,2$ ) e superiores ( $3,5 \text{ mm} \pm 0,2$ ). Apenas o gel com 10% de  $H_2O_2$  + 10mg/mL de HRP (1x45 minutos) apresentou  $\Delta E$  similar ao grupo 35% de  $H_2O_2$  (45 minutos). A aplicação do PR antes do gel com 10% de  $H_2O_2$  (-HRP) não interferiu na eficácia clareadora para ambas as espessuras de discos usadas (ANOVA/Tukey;  $p > 0,05$ ). Quanto à citotoxicidade, apenas o grupo 35% de  $H_2O_2$  (clareamento de consultório) reduziu a viabilidade das HDPCs (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Assim, foi possível concluir que a adição de HRP na composição de um gel com 10% de  $H_2O_2$  exerceu atividade catalítica sobre o  $H_2O_2$ ,

evidenciada pelo aumento na formação do radical  $\text{HO}\bullet$ . Desde que este radical tem intensa ação oxidativa, sua elevada produção potencializou a eficácia clareadora do produto e reduziu a difusão trans-amelodentinária de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual, o que minimizou os efeitos tóxicos do procedimento clareador sobre as células pulpares.

**Palavras-chave:** Toxicidade. Clareamento dental. Peroxidase.

Duque CCO. Development and analyses of experimental bleaching products based on the use of a hemic peroxidase as buster agent [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

## ABSTRACT

The main objective of this study was to assess the bleaching effectiveness and cytotoxicity on human dental pulp cells (HDPCs) of two experimental products recommended in-office tooth bleaching therapy. For this, two bleaching systems were developed: a gel containing a catalyst thickener (CT) and a polymeric catalyst primer (CP) indicated for application on the enamel prior to the use of bleaching agents, were prepared. The horseradish peroxidase enzyme (HRP) was incorporated in both products as a catalyst for hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) molecules. In the first step of this study, 10% and 20%  $H_2O_2$  bleaching gels were prepared from a 35%  $H_2O_2$  stock solution combined with a thickener with or without concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL of HRP ( $\pm$ HRP). These products were evaluated concerning the pH, temperature, reaction stability, free radicals (ROS, HORAC probe) and hydroxyl radical ( $OH^\bullet$ ,  $H_2DCFDA$  probe) formation, as well as bleaching efficacy ( $\Delta E$ ). An *in vitro* protocol for intrinsic pigmentation of bovine enamel/dentin discs was used to assess the cytotoxicity as well as the trans-enamel and trans-dentinal diffusion of  $H_2O_2$ . Overall, the pH and temperature of the gels remained constant during all the analysis period. The addition of HRP enzyme to the CT accelerated the  $H_2O_2$  catalysis, stimulating the production of ROS and  $OH^\bullet$  (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Furthermore, the HRP added to the CT enhanced  $\Delta E$  of the gel and reduced the trans-enamel and trans-dentinal diffusion of residual  $H_2O_2$ , minimizing the cytotoxicity of the bleaching gel, which was  $H_2O_2$ -concentration dependent (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Among the tested parameters, the gel containing 10%  $H_2O_2$  + 2 mg/mL HRP determined the best results. Despite the 20%  $H_2O_2$  + 2mg/mL HRP gel presented  $\Delta E$  similar to the conventional in-office protocol, this product caused high toxic effects to the HDPCs. For this reason, the gel with 10%  $H_2O_2$  ( $\pm$ HRP) was selected to be evaluated in the subsequent steps of this study. In order to approximate the  $\Delta E$  of this product to that obtained with the gel used for in-office bleaching (35%  $H_2O_2$ ), higher concentrations of HRP (4, 6 and 10 mg/mL) were added to the 10%  $H_2O_2$  gel thickener. Since the 10 mg/mL of HRP provided an  $\Delta E$  similar to the traditional protocol (Dunnett's;  $\alpha = 5\%$ ), this concentration incorporated into CP was selected for the following laboratorial tests. Since the general behavior of CP and CT was similar, both products were applied (1x45, 1x30, 1x10 and 1x5 minutes) on enamel/dentin discs with thickness of  $2.3 \text{ mm} \pm 0.2$  (mimic lower incisors) or  $3.5 \text{ mm} \pm 0.2$  (mimic upper incisors). Only the bleaching gel with 10%  $H_2O_2$  + 10 mg/mL HRP (1x45 minutes) presented  $\Delta E$  similar to the 35%  $H_2O_2$  group (45 minutes). For both enamel/dentin thickness no  $\Delta E$  difference was observed when PC was applied on enamel before the gel with 10%  $H_2O_2$  (-HRP) (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Only the 35%  $H_2O_2$  group (conventional in-office bleaching) reduced the viability of HDPCs (ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ). Therefore, one can conclude that the presence of HRP in bleaching gel with 10%  $H_2O_2$  triggered the catalysis of  $H_2O_2$  molecules, increasing the  $OH^\bullet$  generation. Since this free-radical has intense oxidative effects, its high concentration in the enamel/dentin discs enhanced the bleaching efficacy of the product and reduced the trans-enamel and trans-dentinal diffusion of residual  $H_2O_2$ .

The low concentration of residual  $\text{H}_2\text{O}_2$  associated with the fact that  $\text{OH}\cdot$  has a very short life-time minimized the toxicity of the product to pulp cells.

**Keywords:** Toxicity. Tooth-Bleaching. Horseradish Peroxidase.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                | <b>17</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                | <b>21</b> |
| <b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>                                                                                                                                                   | <b>21</b> |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                                                                                     | <b>22</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>                                                                                                                                                         | <b>30</b> |
| <b>4.1 Formulação dos Produtos Experimental .....</b>                                                                                                                                    | <b>30</b> |
| <b>4.1.1 Manipulação do espessante experimental.....</b>                                                                                                                                 | <b>30</b> |
| <b>4.1.2 Manipulação do gel clareador experimental.....</b>                                                                                                                              | <b>31</b> |
| <b>4.1.3 Análise cinética da reação da enzima horseradish peroxidase (HRP)<br/>incorporada no espessante dos géis clareadores experimentais.....</b>                                     | <b>31</b> |
| <b>4.1.3.1 Observação de efervescência e subprodutos .....</b>                                                                                                                           | <b>32</b> |
| <b>4.1.3.2 Monitoramento do pH .....</b>                                                                                                                                                 | <b>32</b> |
| <b>4.1.3.3 Variação da temperatura.....</b>                                                                                                                                              | <b>33</b> |
| <b>4.1.4 Análise da produção de radicais livres e radicais hidroxila (OH•) nos géis<br/>clareadores .....</b>                                                                            | <b>34</b> |
| <b>4.2. Padronização das Amostras (Estudo Preliminar): Análise da Influência da<br/>Pigmentação na Citotoxicidade trans-amelodentinária mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b> | <b>35</b> |
| <b>4.2.1 Obtenção dos discos de esmalte e dentina.....</b>                                                                                                                               | <b>35</b> |
| <b>4.2.2 Mensuração da cor dos discos .....</b>                                                                                                                                          | <b>36</b> |
| <b>4.2.3 Padronização da cor dos discos.....</b>                                                                                                                                         | <b>36</b> |
| <b>4.2.4 Cultivo celular .....</b>                                                                                                                                                       | <b>37</b> |
| <b>4.2.5 Procedimento experimental .....</b>                                                                                                                                             | <b>37</b> |
| <b>4.2.6 Procedimento clareador .....</b>                                                                                                                                                | <b>38</b> |
| <b>4.2.7 Viabilidade celular (ensaio de MTT).....</b>                                                                                                                                    | <b>39</b> |
| <b>4.2.8 Estresse oxidativo celular .....</b>                                                                                                                                            | <b>39</b> |
| <b>4.2.9 Lesão da membrana celular (sondas Calcein AM e EthD-1) .....</b>                                                                                                                | <b>40</b> |
| <b>4.2.10 Quantificação da difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</b>                                                                                                               | <b>40</b> |
| <b>4.3 Eficácia Clareadora e Citotoxicidade Inicial dos Géis Clareadores com a<br/>Enzima HRP .....</b>                                                                                  | <b>40</b> |
| <b>4.3.1 Eficácia clareadora.....</b>                                                                                                                                                    | <b>41</b> |

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.2 Cultura primária de células pulpares humanas (HDPCs) .....                                                            | 42        |
| 4.3.3 Citotoxicidade trans-amelodentinária .....                                                                            | 43        |
| 4.3.4 Resultados preliminares dos géis clareadores contendo HRP .....                                                       | 44        |
| 4.4. Ensaio dose-resposta para alteração de cor (screening através de $\Delta E$ )....                                      | 44        |
| 4.5. Formulação do Primer Polimérico Catalisador (PR) .....                                                                 | 45        |
| 4.5.1 Seleção do produto e protocolo de aplicação de acordo com a espessura dos discos de esmalte/dentina .....             | 47        |
| 4.5.2 Análise da eficácia clareadora (tempo-resposta) de acordo com a espessura dos discos de esmalte/dentina.....          | 47        |
| 4.5.3 Citotoxicidade trans-amelodentinária: análise (tempo-resposta) de acordo com a espessura de esmalte e dentina .....   | 48        |
| 4.5.4 Eficácia clareadora e análise biológica do protocolo selecionado: influência da espessura do substrato dental .....   | 49        |
| 4.6. Análise Estatística .....                                                                                              | 50        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                                                                                   | <b>51</b> |
| 5.1. Avaliação da Produção de Radicais-livres e Radicais hidroxila dos Géis Clareadores Formulados Laboratorialmente .....  | 51        |
| 5.1.1 Cinética de degradação do gel clareador .....                                                                         | 51        |
| 5.2 Avaliação da Influência da Pigmentação na Citotoxicidade Trans-amelodentinária de um Gel Clareador de Consultório ..... | 53        |
| 5.2.1 Citotoxicidade trans-amelodentinária .....                                                                            | 53        |
| 5.2.2 Quantificação da difusão de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ $\mu g/mL$ ).....                                       | 55        |
| 5.3 Avaliação Inicial da Eficácia Clareadora e Citotoxicidade dos Géis Clareadores Catalisadores .....                      | 56        |
| 5.3.1 Eficácia clareadora.....                                                                                              | 56        |
| 5.3.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária .....                                                                            | 57        |
| 5.3.3 Quantificação da difusão trans-amelodentinária de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ $\mu g/mL$ ).....                 | 59        |
| 5.4 Ensaio Dose-resposta para Alteração de Cor (screening através do $\Delta E$ ) ...                                       | 60        |
| 5.5 Seleção da Formulação e Protocolo de Aplicação de acordo com a Espessura Dental .....                                   | 62        |
| 5.5.1 Análise da eficácia clareadora de acordo com a relação tempo-resposta e espessura dos discos.....                     | 62        |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5.2 Análise da citotoxicidade de acordo com a relação tempo-resposta e espessura dos discos .....                       | 64 |
| 5.5.3 Eficácia clareadora e análise biológica do protocolo selecionado: influência da espessura do substrato dental ..... | 66 |
| 6 DISCUSSÃO .....                                                                                                         | 71 |
| 7 CONCLUSÃO .....                                                                                                         | 86 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                         | 87 |
| ANEXO A - COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS .....                                               | 95 |
| ANEXO B - PAPER EM REVISÃO RESULTADO DO PRESENTE PROJETO DE PESQUISA NA REVISTA OPERATIVE DENTISTRY .....                 | 96 |

## 1 INTRODUÇÃO

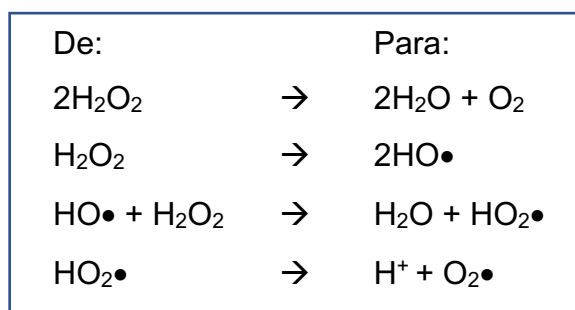
Tem sido amplamente demonstrado na literatura, que a utilização de géis com elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para realizar o clareamento dental de consultório, pode causar intensa toxicidade sobre células pulpares; este efeito adverso é decorrente da indução de estresse oxidativo e da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, o que resulta na ruptura de membrana e morte das células por necrose<sup>1-3</sup>. Consequentemente, este tipo de tratamento estético pode causar reação inflamatória aguda na polpa de dentes humanos<sup>4-6</sup>, com aumento na pressão intra-pulpar e estimulação das fibras nervosas<sup>7</sup>, o que leva ao quadro clínico de hipersensibilidade dental durante e após o procedimento clínico<sup>8-10</sup>. Desta forma, apesar do excelente resultado estético imediato obtido com o emprego de géis clareadores com elevadas concentrações de  $H_2O_2$ <sup>11</sup>, estes têm sido considerados incompatíveis com a manutenção da homeostasia e vitalidade da polpa dentária<sup>4,5,12,13</sup>.

Os efeitos adversos do clareamento de dentes vitais são diretamente proporcionais à concentração de  $H_2O_2$  capaz de se difundir pela estrutura dental e interagir com as células pulpares<sup>2,14,15</sup>. Assim, a redução na concentração de  $H_2O_2$  nos agentes clareadores tem sido considerada crucial para se obter um protocolo de clareamento biocompatível com o complexo dentino-pulpar. Pesquisas recentes demonstraram que o emprego de géis clareadores contendo concentrações mais baixas de  $H_2O_2$  (10% e 17,5%) reduziu significativamente, em comparação ao gel com 35% de  $H_2O_2$ , a citotoxicidade trans-amelodentinária causada pela terapia estética sobre células da polpa<sup>14,15</sup>. No entanto, este efeito deletério não foi completamente eliminado, visto que as células ainda apresentaram elevada sensibilidade ao estresse oxidativo mediado pelo  $H_2O_2$ . Quando o gel com 17,5%  $H_2O_2$  foi aplicado sobre o esmalte por 45, 15 e 5 minutos, ocorreu redução de 86%, 77% e 65% na viabilidade celular, respectivamente<sup>2</sup>. Foi demonstrado que a aplicação por 45 minutos do gel com 17,5%  $H_2O_2$  alcançou eficácia clareadora similar à técnica tradicional de consultório apenas após a partir 4ª sessão de clareamento. Quando o gel com 10% de  $H_2O_2$  foi aplicado por 45 minutos sobre discos de esmalte/dentina, o mesmo efeito clareador causado pelo gel contendo 35% de  $H_2O_2$  (45 minutos) foi obtido apenas a partir da 4ª e 6ª sessões para os espécimes que simularam a espessura de incisivos inferiores e pré-molares superiores, respectivamente<sup>15</sup>. Assim, foi demonstrado que a

redução do tempo de aplicação e/ou da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no gel clareador resulta na queda da eficácia estética da terapia, além de não eliminar completamente o dano biológico<sup>15</sup>.

De maneira geral, o clareamento da estrutura dental ocorre devido à elevada capacidade de oxidação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e seus subprodutos de decomposição. Essas espécies químicas são altamente reativas e capazes de clivar cadeias polipeptídicas e componentes orgânicos, incluindo os cromóforos (agentes orgânicos de pigmentação) presentes nos tecidos duros do dente, reduzindo assim a taxa de absorção de luz pela estrutura dental<sup>16,17</sup>. Consequentemente, acredita-se que o nível de saturação das cadeias orgânicas responsáveis pela absorção da radiação no espectro de luz visível (cromóforos) esteja intimamente relacionado com a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  necessária para que o clareamento dentário seja esteticamente aceitável. Isto porque a difusão trans-amelodentinária do  $\text{H}_2\text{O}_2$  varia dependendo do nível de saturação dos cromóforos presentes no substrato dentário<sup>19</sup>. Por isso, géis clareadores com elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podem permitir que parte destas moléculas tóxicas não reagidas com os cromóforos se difunda pelos túbulos dentinários, atingindo a câmara pulpar para promover lesão das células locais<sup>19</sup>.

Sabe-se que o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , espécie reativa derivada do oxigênio (EROs), é capaz de se decompor em outras espécies químicas ainda mais reativas, sendo que isto depende das condições do meio em que a reação de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre. A dissociação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode resultar na formação de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e diversas EROs, tais como radicais hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), peri-hidroxila ( $\text{HO}_2\bullet$ ) e superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ), conforme as reações demonstradas abaixo<sup>20</sup>:



Algumas moléculas (EROs) derivadas do  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentam curto tempo de meia-vida, sendo que dentre elas é possível citar o radical hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ,  $10^{-9}$  segundos), oxigênio singlete ( $\text{O}_2\bullet$ ,  $10^{-5}$  segundos) e o radical peri-hidroxil (7 segundos)<sup>21</sup>. Assim, essas espécies químicas reativas intermediárias, as quais são

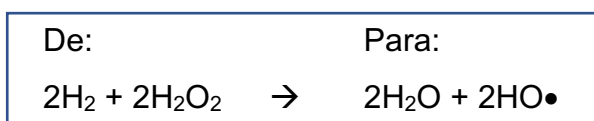
originadas de uma reação primária de dissociação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , são decompostas muito rapidamente. Devido a essa característica eletroquímica, os radicais-livres derivados do  $\text{H}_2\text{O}_2$  necessitam de menor energia de ativação para promover a reação de oxidação<sup>21</sup>. Por essa razão, o aumento na velocidade de reação para formar subprodutos gerados a partir da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem sido considerado, dentro do campo da pesquisa em clareamento dental, uma alternativa interessante tanto do ponto de vista estético quanto biológico<sup>19,22</sup>.

Dentre as EROs existentes, o radical  $\text{HO}\bullet$  é o que apresenta menor tempo de meia-vida e maior potencial de oxidação ( $E^\circ=+2,8\text{V}$ )<sup>21</sup>. Assim, pesquisadores tem buscado promover a atividade catalítica da molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para potencializar a reatividade do gel clareador com a estrutura dental e limitar a profundidade de penetração trans-amelodentinária do  $\text{H}_2\text{O}_2$  não reagido com os cromóforos da estrutura dental. Estudos laboratoriais demonstraram que o aumento da reatividade do gel clareador através da formação de radicais  $\text{HO}\bullet$ , favorece o resultado estético e reduz a citotoxicidade desta modalidade de terapia clareadora<sup>19,22-25</sup>.

A velocidade de reação e formação de subprodutos gerados a partir da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser alterada na presença de metais de transição (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, Mn) e enzimas oxidantes (peroxidase e catalase). Alguns estudos demonstraram que a adição de ativadores químicos ricos em metais de transição, tais como sulfato de ferro, gluconato de manganês e cloridrato de manganês, potencializa a eficácia estética dos géis clareadores e reduz a difusão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela estrutura dental<sup>23,25-27</sup>. Contudo, embora agentes catalisadores derivados de sais metálicos, possam aumentar a eficácia clareadora de um gel comercial contendo 35% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>22,25</sup>, os mesmos, resultam em uma limitada queda na citotoxicidade trans-amelodentinária do produto sobre células pulpares, bem como, podem promover um manchamento periférico da estrutura dentária ao final da reação devido à formação de subprodutos coloridos<sup>25</sup>. Assim, novas alternativas de agentes catalisadores têm sido testadas na Odontologia e em diversas outras áreas.

Na indústria farmacêutica e química, bem como no campo da engenharia tecidual, agentes catalisadores têm sido amplamente empregados no desenvolvimento de biomateriais inovadores<sup>28</sup>. Isto porque as cascatas enzimáticas mimetizam os processos que ocorrem na natureza e a biocatálise se mantém estável em temperatura ambiente<sup>29</sup>, o que torna o uso destes catalisadores vantajoso do ponto de vista biológico. Na presença da enzima horseradish peroxidase (HRP), a

taxa de degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{HO}\bullet$  é intensificada, sendo que esta molécula altamente reativa é originada a partir da reação detalhada abaixo<sup>26</sup>.



Um estudo recente<sup>22</sup> demonstrou que a adição de HRP, catalase ou cloridrato de manganês ao espessante de um gel com 35% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentou os valores de eficácia clareadora ( $\Delta E$ ) em cerca de 1,8, 1,5 e 1,6 vezes, respectivamente, quando comparado ao gel convencional (sem adição de catalisadores). Ainda, a presença destes agentes catalisadores no gel clareador reduziu a difusão trans-amelodentinária do  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>22</sup>. A incorporação da peroxidase (HRP) ao espessante resultou num produto homogêneo e estável, sem que houvesse formação de subprodutos coloridos ao término da reação<sup>19,22</sup>. No entanto, apesar dos resultados promissores, a elevada concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presente nos géis clareadores, que não é catalisada ou que interage com os cromóforos de pigmentação, faz com que parte desta molécula seja capaz de se difundir pelo esmalte e dentina causando um efeito tóxico para células pulpares<sup>19,22,25</sup>.

Desta forma, o uso da enzima HRP como agente catalisador de géis clareadores parece ser uma alternativa interessante devido a sua capacidade de aumentar da eficácia clareadora do produto, o qual também passaria a ser menos tóxico para as células da polpa dentária. Dentro desse contexto, fica evidente a necessidade de se desenvolver e testar agentes clareadores inovadores para uso em consultório, contendo enzimas catalisadoras na sua composição. Estes produtos, além de apresentar maior potencial clareador devido ao aumento da reatividade dos radicais livres derivados da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com cromóforos presentes nos tecidos duros dos dentes, também deverão resultar na manutenção de uma menor quantidade de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  livres tóxicas nos dentes. Desta forma, estes novos géis clareadores e suas técnicas de aplicação clínica poderão ser biocompatíveis com o complexo dentino-pulpar.

## 7 CONCLUSÃO

1. A adição da enzima horseradish peroxidase na composição de um gel com 10% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , potencializou a eficácia clareadora do produto devido ao aumento na formação de EROs com forte potencial oxidativo, decorrente da dissociação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  causada pela ação catalisadora da enzima. Esta atividade enzimática minimizou a difusão trans-amelodentinária do  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual, o que reduziu os efeitos tóxicos do procedimento clareador sobre as células pulpares.
2. A confecção do primer polimérico como barreira protetora catalisadora, resultou nos menores valores para eficácia clareadora após ser associado associado à uma baixa concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  devido à redução da penetração o  $\text{H}_2\text{O}_2$  trans-amelodentinário; no entanto, a partir do presente estudo, sugere-se que utilização de elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  poderiam ser associadas à esta barreira polimérica, de maneira que a mesma poderia proporcionar a difusão controlada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , associada ao aumento da atividade catalítica desta molécula em elevadas concentrações.
3. A incorporação da enzima HRP na formulação do espessante catalisador, aumentou significativamente a reatividade do produto para as duas espessuras testadas. Sendo esta maior para a espessura de incisivos inferiores durante o protocolo de 45 minutos de aplicação. Além disso, foi possível observar redução na difusão trans-amelodentinária de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e citotoxicidade em ambas as espessuras testadas para os dois materiais propostos neste estudo.

## REFERÊNCIAS\*

1. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(3): 458-64.
2. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42(2): 185-98.
3. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J.* 2009; 42(6): 516-24.
4. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 59-64.
5. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B.* 2014; (4): 178-85.
6. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulp to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.
7. Park CK, Kim MS, Fang Z, Li HY, Jung SJ, Choi SY, et al. Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. *J Biol Chem.* 2006; 281(25): 17304-11.
8. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent.* 2011; 36(3): 251-7.
9. de Almeida LC, de Souza Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam.* 2012; 25(1): 3-8.
10. Lima SNL, Ribeiro IS, Grisotto MA, Fernandes ES, Hass V, de Jesus Tavares RR, et al. Evaluation of several clinical parameters after bleaching with hydrogen peroxide at different concentrations: A randomized clinical trial. *J Dent.* 2018; 68: 91-7.
11. de Geus JL, Wambier LM, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. At-home vs in-office bleaching: a systematic review and meta-analysis. *Oper Dent.* 2016; 41(4): 341-56.

---

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

12. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod*. 2013; 39(12): 1576-80.
13. Vaz MM, Lopes LG, Cardoso PC, Souza JB, Batista AC, Costa NL, et al. Inflammatory response of human dental pulp to at-home and in-office tooth bleaching. *J Appl Oral Sci*. 2016; 24(5): 509-17.
14. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(8): 1901-9.
15. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(8): 2509-20.
16. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(1): 1-10.
17. Cviki B, Lussi A, Moritz A, Flury S. Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide. *Oper Dent*. 2016; 41(1): 39-47.
18. Moreira JC, Gallinari M de O, Rahal V, Fagundes TC, Santos PH, Moura MR, Briso AL. Effect of dental pigmentation intensity on the transenamel and transdental penetration of hydrogen peroxide. *Braz Dent J*. 2016; 27(4), 399-403.
19. Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, Leite ML, Bordini E, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity. *Oper Dent*. 2019; 44(4): 414-23.
20. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent*. 1993; 69(1): 46-8.
21. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999; 65(18-19): 1865-74.
22. Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Ortecho-Zuta U, Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180453.
23. Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy--in vitro study. *J Dent*. 2010; 38(10): 838-46.
24. Gopinath S, James V, Vidhya S, Karthikeyan K, Kavitha S, Mahalaxmi S. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1): 45-9.

25. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(6): 1631-7.
26. Travassos AC, Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010; 35(3): 287-94.
27. Torres CR, Souza CS, Borges AB, Huhtala MF, Caneppele TM. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 193241.
28. Lancaster L, Bulutoglu B, Banta S, Wheeldon I. Enzyme colocalization in protein-based hydrogels. *Methods Enzymol*. 2019; 617: 265-85.
29. Ruales-Salcedo AV, Higueta JC, Fontalvo J, Woodley JM. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals. *Z. Naturforsch C*. 2019; 74(3-4): 77-84.
30. Fernández E, Bersezio C, Bottner J, Avalos F, Godoy I, Inda D, et al. Longevity, esthetic perception, and psychosocial impact of teeth bleaching by low (6%) hydrogen peroxide concentration for in-office treatment: a randomized clinical trial. *Oper Dent*. 2017; 42(1): 41-52.
31. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa CA. Tooth whitening: complications from the use of peroxides. Switzerland: Springer; 2016. p. 45-79.
32. Rodrigues JL, Rocha PS, Pardim SLS, Machado ACV, Faria-E-Silva AL, Seraidarian PI. Association between in-office and at-home tooth bleaching: a single blind randomized Clinical Trial. *Braz Dent J*. 2018; 29(2): 133-9.
33. Leonard RH Jr, Smith LR, Garland GE, Tiwana KK, Zaidel LA, Pugh G Jr, et al. Evaluation of side effects and patients' perceptions during tooth bleaching. *J Esthet Rest Dent*. 2007; 19(6): 355-64.
34. Reis A, Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. *Oper Dent*. 2013; 38(4): 386-93.
35. de Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, et al. In-office bleaching with a two-and seven-day intervals between clinical sessions: a randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent*. 2015; 43(4): 424-9.
36. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract*. 2014; (14Supl): 70-6.
37. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent*. 2015b; 43(6): 750-6.
38. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(4): 292-304.
39. De Geus JL, Bortoluzzi MC, Reis A, Loguercio AD. Do dental bleaching agents induce genetic damage on oral mucosa cell. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(5): 2511-3.

40. Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, et al. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res*. 2013; 92(2): 187-92.
41. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig*. 2015a; 19(5): 1013-20.
42. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1428-36.
43. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human pulpal responses to peroxides. In: Perdigão J. *Tooth whitening: an evidence-based perspective*. Berlin: Springer; 2016. p. 81-97.
44. de Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari Mde O, de Souza Costa CA, Santos PH, et al. At-home bleaching: color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Braz Dent J*. 2015; 26(4): 378-83.
45. Simões RC, Soares D, de Souza Costa CA, Santos PD, Cintra L, Briso A. Effect of diferente light sources and enamel preconditioning on color change, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetration, and cytotoxicity in bleached teeth. *Oper Dent*. 2015; 41(1): 83-92.
46. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J*. 2010; 43(7): 572-80.
47. Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent*. 2013; 41(4): 363-9.
48. Titley K, Torneck CD, Smith D. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphology of human tooth enamel. *J Endod*. 1988; 14(2): 69-74.
49. Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent*. 2008; 36(9):718-25.
50. Briso AL, Gonçalves RS, Costa FB, Gallinari Mde O, Cintra LT, Santos PH. Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. *Braz Dent J*. 2015; 26(2):135-40.
51. Kwon SR, Wertz PW. Review of the mechanism of tooth whitening. *J Esthet Restor Dent*. 2015; 27(5): 240-57.
52. Ramotowska S, Zarzeczańska D, Dąbkowska I, Wcisło A, Niedziałkowski P, Czaczyk E, et al. Hydrogen bonding and protonation effects in amino acids' anthraquinone derivatives - Spectroscopic and electrochemical studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2019; 222: 117226.
53. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(4): 474-82.

54. Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res*. 1992; 100(4): 193-9.
55. Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL, dos Santos Ida S, Della Bona A, Demarco FF. Efficacy and safety of 10% and 16% carbamide peroxide tooth-whitening gels: A randomized clinical trial. *Oper Dent*. 2008; 33(6): 606-12.
56. Chemin K, Rezende M, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Effectiveness of and Dental Sensitivity to At-home Bleaching With 4% and 10% Hydrogen Peroxide: A Randomized, Triple-blind Clinical Trial. *Oper Dent*. 2018; 43(3): 232-40.
57. Cosmetic Products Safety Amendment Regulations. [Council Directive 2011/84/EU]. EU; 2011. [acesso em 2018 June]. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:283:0036:0038:en:PDF>.
58. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989; 20(3):173-6.
59. Hess WT. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, 4th ed. New York: Wiley; 1995.
60. Suty H, De Traversay C, Cost M. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol*. 2004; 49(4): 227-33.
61. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol*. 2013; 528: 3-25.
62. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 661-5.
63. Schrank SG, José HJ, Moreira RF, Schröder HF. Applicability of fenton and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV reactions in the treatment of tannery wastewaters. *Chemosphere*. 2005; 60(5): 644-55.
64. Bveris A. Biochemistry of radicals: from electron to tissues. *Medicine*. 1998; 58(4): 350-6.
65. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, et al. Light augments tooth whitening with peroxide. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(2): 167-75.
66. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J*. 2005; 199(1): 37-40.
67. Karaarslan ES, Özmen ZC, Aytac F, Bicakci AA, Buldur M, Aydogan L, et al. Evaluation of biochemical changes in dental tissues after different office bleaching methods. *Hum Exp Toxicol*. 2019; 38(4): 389-97.
68. Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence, 1995, pp. 25-33.
69. Morales Urrea DA, Haure PM, García Einschlag FS, Contreras EM. Horseradish peroxidase mediated decolourization of Orange II: modelling hydrogen peroxide utilization efficiency at different pH values. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(20): 19989-20002.

70. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desentizer before light activated bleaching. *Oper Dent*. 2011; 36(1): 12-7.
71. Mena-Serrano AP, Garcia E, Luque-Martinez I, Grande R, Loguercio AD, Reis A. A single-blind randomized trial about the effect of hydrogen peroxide concentration on light-activated bleaching. *Oper Dent*. 2016; 41(5): 455-64.
72. Maran BM, Ziegelmann PK, Burey A, de Paris Matos T, Loguercio AD, Reis A. Different light-activation systems associated with dental bleaching: a systematic review and a network meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(4): 1499-1512.
73. Marson FC1, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent*. 2008; 33(1): 15-22.
74. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2012; 40(8): 644-53.
75. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod*. 2008; 34(12): 1462-5.
76. Sun B, Guan X, Fang J, Tratnyek PG. Activation of manganese oxidation with bisulfite for enhanced oxidation of organic contaminants: the involvement of Mn (III). *Environ Sci Technol*. 2015; 49(20): 12414-21.
77. Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szöke H, Henriksen A, Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*. 2002; 417(6887): 463-8.
78. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004; 65(3): 249-59.
79. Sato S, Nakamura K, Nakamura H. Horseradish-Peroxidase-Catalyzed Tyrosine Click Reaction. *Chembiochem*. 2017; 18(5): 475-8.
80. Liu CL, Sun WT, Liao W, Lu WX, Li QW, Jeong Y, et al. Colour stabilities of three types of orthodontic clear aligners exposed to staining agents. *Int J Oral Sci*. 2016; 8(4): 246-53.
81. Bent DV, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides: II. Phenylalanine. *J Am Chem Soc*. 1975; 97(10): 2606-12.
82. Freire A, Archegas LR, de Souza EM, Vieira S. Effect of storage temperature on pH of in-office and at-home dental bleaching agents. *Acta Odontol Latinoam*. 2009; 22(1): 27-31.
83. Cavalli V, Rosa DAD, Silva DPD, Kury M, Liporoni PCS, Soares LES, Martins AA. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26: e20170589.
84. Zhang F, Meng F, Wang ZY, NA W. Interpolymer complexation between copovidone and carbopol and its effect on drug release from matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016; 43(2): 190-203.

85. Strzepa A, Pritchard KA, and Dittel BN. Myeloperoxidase: a new player in autoimmunity. *Cell. Immunol.* 2017; 31: 1-8.
86. Sakai S, Nakahata M. Horseradish Peroxidase Catalyzed Hydrogelation for Biomedical, Biopharmaceutical, and Biofabrication Applications. *Chem Asian J.* 2017; 12 (24): 3098-109.
87. Khanmhamadi M, Dastjerd MB, Ai A, Ahmadi A, Godarzi A, Rahimia A, et al. Horseradish peroxidase-catalyzed hydrolation for biomedical applications. *Biomater Sci.* 2018; 6: 1286-98.
88. Liang X, Zhong Y, Zhu S, Zhu J, Yuan P, He H, et al. The decolorization of Acid Orange II in non-homogenous Fenton reaction catalyzed by natural vanadium-titanium magnetite. *J Hazard Mater.* 2010; 181(1-3): 112-20.
89. Chen JX, Zhu L. Degradation mechanism of Orange II in UV-Fenton process with hydroxyl-Fe-pillared bentonite as heterogeneous catalyst. *ICAEE.* 2010: 281-4.
90. Wang S. A Comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes and Pigments.* 2008; 76(3): 714-20.
91. Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater.* 2003; 98(1-3): 33-50.
92. Chen J, Zhu L. Oxalate enhanced mechanism of hydroxyl-Fe-pillared bentonite during the degradation of Orange II by UV-Fenton process. *J Hazard Mater.* 2011; 185(2-3): 1477-1481.
93. Malik PK, Saha SK. Oxidation of direct dyes with hydrogen peroxide using ferrous ion as catalyst. *Sep Purif Technol.* 2003; 31(3): 241-50.
94. Jung YS, Lim WT, Park J, Kim Y. Effect of pH on Fenton and Fenton-like oxidation. *Environ Technol.* 2009; 30(2): 183-90.
95. Bersezio C, Martín J, Prieto MV, Meneses P, Angel P, Eduardo Fernández G, et al. One-year bleaching efficacy using two HP products with different pH: A double-blind randomized clinical trial. *J Esthet Restor Dent.* 2019 Jun 13. [Epub ahead of print].
96. Young N, Fairley P, Mohan V, Jumeaux C. A study of hydrogen peroxide chemistry and photochemistry in tea stain solution with relevance to clinical tooth whitening. *J Dent.* 2012; 40(Suppl 2): e11-e16.
97. de Arruda AM, dos Santos PH, Sundfeld RH, Berger SB, Briso AL. Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the de-remineralization process: an in situ study. *Oper Dent.* 2012; 37(5): 518-25.
98. Torres CR, Crastechini E, Feitosa FA, Pucci CR, Borges AB. Influence of pH on the effectiveness of hydrogen peroxide whitening. *Oper Dent.* 2014; 39(6): E261-8.
99. Gantumur E, Sakai S, Nakahata M, Taya M. Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars. *Soft Matter.* 2019; 15: 2163-69.

100. Lee BJ, Ryu SG, Cui JH. Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25(4): 493-501.
101. Sako K, Sawada T, Nakashima H, Yokohama S, Sonobe T. Influence of water-soluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *J Control Release.* 2002; 81(1-2): 165-72.
102. Ebube NK, Jones AB. Sustained release of acetaminophen from a heterogeneous mixture of two hydrophilic non-ionic cellulose ether polymers. *Int J Pharm.* 2004; 272(1-2): 19-27.
103. Mamani PL, Ruiz-Caro R, Veiga MD. Matrix tablets: the effect of hydroxypropyl methylcellulose/anhydrous dibasic calcium phosphate ratio on the release rate of a water-soluble drug through the gastrointestinal tract I. In vitro tests. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2012; 13(4): 1073-83.
104. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.