

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

SIBELLI OLIVIERI PARREIRAS

**PENETRAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE UM GEL CLAREADOR ATIVADO COM
LED/LASER EM DENTES RESTAURADOS**

**PONTA GROSSA
2014**

SIBELLI OLIVIERI PARREIRAS

**PENETRAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE UM GEL CLAREADOR ATIVADO COM
LED/LASER EM DENTES RESTAURADOS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Dentística Restauradora. Linha de Pesquisa: Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Alessandra Reis
Co-orientador Prof. Dr. Alessandro Loguercio

**PONTA GROSSA
2014**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Parreiras, Sibelli Olivieri
P227 Penetração e citotoxicidade de um gel
clareador ativado com LED/Laser em dentes
restaurados/ Sibelli Olivieri Parreiras.
Ponta Grossa, 2014.
56f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -
Área de Concentração: Dentística
Restauradora), Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Reis.
Co-Orientador: Prof. Dr. Alessandro
Loguercio.

1.Clareamento dental. 2.Peróxido de
hidrogênio. 3.Toxicidade.
4.Permeabilidade. 5.Laser. I.Reis,
Alessandra. II. Loguercio, Alessandro.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

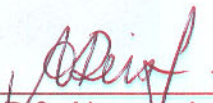
CDD: 617.67

SIBELLI OLIVIERI PARREIRAS

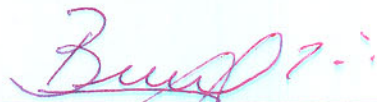
**PENETRAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE UM GEL CLAREADOR ATIVADO COM
LED/LASER EM DENTES RESTAURADOS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia –
Área de concentração em Dentística Restauradora.

Ponta Grossa, 18 de fevereiro de 2014.



Prof.ª Dr.ª Alessandra Reis
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso
Universidade Estadual Paulista



Prof.ª Dr.ª Stella Kossatz Pereira
Universidade Estadual de Ponta Grossa

A **Deus**, por simplesmente existir e sua misericórdia me sustentar a cada dia.

Aos meus **pais**, que têm me ajudado até aqui e não pensam duas vezes em me ajudar em todas as situações da minha vida.

Ao meu querido **irmão** que me faz rir, deixa minha vida mais leve e de quem tenho o maior orgulho do homem que está se tornando.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. **Alessandra Reis**, minha orientadora, que acreditou em mim e ensinou-me a perseguir os ideais da vida acadêmica, e tem se tornado uma pessoa muito especial para mim não somente no meio acadêmico.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa** e ao Prof. Dr. **João Carlos Gomes**, por abrir as portas para eu realizar o mestrado.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa**, na pessoa de sua coordenadora Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes, que demonstra tanto amor, dedicação e preocupação e não mede esforços para o crescimento do curso.

A todos os meus **colegas de turma do Mestrado** pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada pelo convívio, com certeza aprendi muito com vocês.

A **Adelaida, Alex, Ana Kovalik, Anna Luiza, Fabi Coppla, Gisele, Johanna, Issis, Vivi e Yileng** pela amizade, tardes de estudo e de tortas e café, e também a **Letícia Campos, Paola, Thaynara** que também compartilharam momentos importantes comigo.

À **Juliana**, amiga que faz parte da minha vida, tenho maior orgulho da sua pessoa, você é uma irmã para mim. E também a sua família, **Edson, Angela, André, Andressa e Amanda** que sempre estão presentes.

Ao **Andres Felipe**, em especial pelo seu companheirismo, dedicação, paciência, carinho, além da sua contribuição com este trabalho, muito obrigada por tudo.

Às amigas **Emanuelly, Camila e Simone**, pelas sugestões e colaboração neste trabalho, sinto muito carinho por vocês. Obrigada também pelos momentos alegres.

Aos meus amigos que convivem no dia a dia comigo, **Fernanda, Giovanna, Lucão, Glauco, Rafael Coelho e Luiz Vargas**, obrigada por tornarem meus dias mais divertidos.

Aos professores que participaram no desenvolvimento deste trabalho Prof. Dr. **Alessandro Loguercio**, Prof. Dr. **Michel Otuki** e Prof^a. Dr^a. **Christiane Borges**, obrigada por tudo.

A todos os professores, com os quais tive a oportunidade de conviver durante o curso de Mestrado, pelos conhecimentos e sabedoria compartilhados contribuindo para a minha formação profissional.

À Banca de Qualificação, Prof. Dr. **César Arrais** e Prof^a. Dr^a. **Katia Paludo** pelo tempo dedicado ao meu trabalho e pelas valiosas sugestões.

A **Morgana** e ao **Luiz**, funcionários da pós-graduação, pela amizade, carinho e ajuda nos momentos necessários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida durante o transcorrer do curso.

A todos que não estão citados aqui nominalmente, mas que contribuíram de forma indireta e direta na realização desta dissertação. A todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram de mais essa etapa em minha vida.

Obrigada a todos!

DADOS CURRICULARES

Sibelli Olivieri Parreiras

NASCIMENTO 27.01.1987	Cornélio Procópio, Paraná - Brasil
FILIAÇÃO	Marisa Olivieri Parreiras Hélio Luis Parreiras
2007 – 2011	Curso de Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.
2012 – 2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Dentística Restauradora. Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.

RESUMO

PARREIRAS SO. Penetração e citotoxicidade de um gel clareador ativado com Led/Laser em dentes restaurados. [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Dentística Restauradora - Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014].

Este estudo *in vitro* teve o objetivo de avaliar a quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar de dentes restaurados em diferentes profundidades com resina composta e seu efeito citotóxico sobre fibroblastos da linhagem celular 3T3/NIH. Cento e doze pré-molares humanos foram usados e divididos em 7 grupos de acordo com a combinação dos fatores: Restauração (nenhuma, dente hígido [H]; rasa [R]; profunda [P]) e Ativação por luz (ativada [A]; não ativada [NA]). Um grupo adicional de dentes hígidos não clareados (controle) foi adicionado ao desenho do estudo. Com exceção dos grupos controle, HA e HNA, cavidades de classe V foram preparadas com profundidade rasa (R) ou profunda (P) e restauradas com resina composta de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliar a quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar, todos os dentes foram seccionados 3 mm da junção cimento-esmalte, o tecido pulpar removido e um tampão de acetato foi colocado na câmara pulpar. O procedimento clareador foi realizado com peróxido de hidrogênio a 35 % (Whiteness HP Maxx, FGM Produtos Dentais) ativado ou não por luz LED/Laser. Depois do procedimento clareador, a solução de tampão de acetato foi removida e soluções de leucocrystal violeta e enzima peroxidase foram adicionadas. A densidade óptica da solução azul foi determinada espectrofotometricamente e convertida em microgramas de peróxido de hidrogênio. Para os ensaios de viabilidade celular, diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio foram aplicadas em células de linhagem de fibroblastos 3T3/NIH. Após 24 h da exposição do peróxido de hidrogênio, os ensaios MTT e vermelho neutro foram realizados. A concentração letal para 50% das células (CL₅₀) foi determinada. Os dados de cada teste foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey para contraste das médias ($\alpha = 0,05$). Todos os grupos experimentais apresentaram presença de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar, no entanto maior quantidade de peróxido de hidrogênio foi encontrada em câmara pulpar de dentes com restauração profunda ($p = 0,026$), independentemente da ativação ou não da luz. As concentrações de peróxido de hidrogênio encontradas na câmara pulpar não afetaram significativamente a viabilidade celular.

Palavras-chave: clareamento dental, peróxido de hidrogênio, toxicidade, permeabilidade, laser, cavidade pulpar.

ABSTRACT

PARREIRAS SO. Penetration and citotoxicity of a bleaching gel activated by LED/Laser in restored teeth. [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Dentística Restauradora - Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014].

This *in vitro* study aimed to evaluate the amount of hydrogen peroxide in the pulp chamber of teeth with composite resin and its cytotoxic effect on fibroblast cell line 3T3/NIH. Twelve hundred human premolars were randomized into seven groups according to the combination of factors: control (no treatment), restoration (no [C], shallow [S] and deep [D]) and activation by light (yes [A] or not [NA]). With exception of the groups (Control, CA and CNA), class V cavities were prepared and restored with composite resin according to the manufacturer's instructions. To assess the amount of hydrogen peroxide in the pulp chamber, all teeth were sectioned 3 mm from the cement-enamel junction, the pulp tissue removed and acetate buffer was placed in the pulp chamber. The bleaching procedure was performed with hydrogen peroxide (35% Whiteness HP Maxx, FGM Dental Products) activated or not with a LED/Laser light. After treatment, the solution of acetate buffer in the pulp chamber of each tooth was removed and leucocrystal violet and peroxide enzyme solutions were added. The optical density of the resulting blue solution was determined spectrophotometrically and converted into micrograms equivalent of hydrogen peroxide. For viability cell assays, different concentrations of hydrogen peroxide were applied to fibroblast cell line 3T3/NIH. After 24 h of exposure of hydrogen peroxide, the MTT and Neutral Red assays were evaluated. The lethal concentration of 50% of cells (LC₅₀) was determined. Data from each test were submitted to ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). All experimental groups showed the presence of hydrogen peroxide in the pulp chamber, but higher amount of hydrogen peroxide was found in the pulp chamber of teeth with deep restorations ($p = 0.026$), regardless of light activation. The concentrations of hydrogen peroxide that was found in the pulp chamber did not affect cell viability.

Keywords: tooth bleaching, hydrogen peroxide, cytotoxicity, permeability, laser, dental pulp cavity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Preparo das cavidades (A) rasa e (B) profunda, respectivamente.	25
Figura 2	Imagens radiográficas dos grupos experimentais mostrando as diferentes profundidades das restaurações. Em (A) dente hígido, em (B) cavidade rasa e em (C) cavidade profunda.	26
Figura 3	Curva analítica. $R = 0,99524$	28
Figura 4	Concentração de PH ($\mu\text{g/mL}$) dos grupos experimentais.	32
Figura 5	Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio MTT.	33
Figura 6	Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio vermelho neutro.	34
Figura 7	Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio MTT.	35
Quadro 1	Descrição dos principais materiais utilizados para o estudo.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diluição para obtenção da curva de calibração.	27
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μ	Micro
μg	Microgramas
ANOVA	Análise de Variância
HA	Hígido ativada
CL ₅₀	Concentração letal de 50% de células
cm ²	Centímetro quadrado
HNA	Hígido não ativada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Grama
h	Hora
ISO	Organização Internacional para Padronização
Kg	Quilograma
LED	Diodos emissores de luz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mol	Molar
mW	Miliwatt
Nm	Nanômetro
⁻ OH	Íon hidroxila
PA	Profunda ativada
PH	Peróxido de hidrogênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PNA	Profunda não ativada
RA	Rasa ativada
RNA	Rasa não ativada
s	Segundo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
α	Alpha
p	Probabilidade de a hipótese nula ser verdadeira
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	O CLAREAMENTO DENTAL.....	16
2.2	DESVANTAGENS DO CLAREAMENTO DENTAL.....	18
2.3	PERMEABILIDADE DENTAL AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	20
2.4	CITOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	21
3	PROPOSIÇÃO.....	23
3.1	PROPOSIÇÃO GERAL.....	23
3.2	PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	MATERIAL.....	24
4.2	MÉTODOS.....	24
4.2.1	Preparo das Amostras.....	24
4.2.2	Quantificação do Peróxido de Hidrogênio na Câmara Pulpar.....	26
4.2.3	Ensaio de Viabilidade Celular.....	29
4.2.4	Análise Estatística.....	30
5	RESULTADOS.....	32
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	APÊNDICE – Representações gráficas dos ensaios de viabilidade celular.....	52
	ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa COEP UEPG.....	54

1 INTRODUÇÃO

O clareamento de consultório é uma técnica alternativa à técnica caseira com peróxido de carbamida, geralmente utilizada em pacientes que não aceitam a moldeira de clareamento e que também desejam resultados mais rápidos, e pode ser associada ou não a ativação de luz. Apesar de o potencial benéfico da ativação da luz ser questionável (Gurgan et al.¹ 2010, Torres et al.² 2011, Buchalla e Attin³ 2007, Marson et al.⁴ 2008, Nutter et al.⁵ 2013, Moncada et al.⁶ 2013), esse procedimento é ainda utilizado por clínicos devido à pressão da mídia.

Independentemente se o gel é ativado ou não por luz, a efetividade do clareamento resulta da habilidade do peróxido de hidrogênio penetrar no esmalte e reagir com a dentina onde oxida a matriz orgânica (Eimar et al.⁷ 2012, Kawamoto e Tsujimoto⁸ 2004). Infelizmente, a penetração do peróxido de hidrogênio não é restrita somente nos tecidos duros do dente e o produto pode atingir a câmara pulpar após a aplicação (Bowles e Ugwuneri⁹ 1987, Cooper et al.¹⁰ 1992, Gokay et al.¹¹ 2000, Gokay et al.¹² 2000, Camargo et al.¹³ 2009, Camargo et al.¹⁴ 2007, Benetti et al.¹⁵ 2004).

Em contato com as células vitais da polpa, o peróxido de hidrogênio pode inibir a atividade de algumas enzimas pulpares (Bowles e Thompson¹⁶ 1986) e produzir danos celulares (Lima et al.¹⁷ 2013, Soares et al.¹⁸ 2012, Trindade et al.¹⁹ 2009, Dias Ribeiro et al.²⁰ 2009), que por sua vez, podem ser responsáveis pelo elevado risco de sensibilidade dental experimentada pelos pacientes após o clareamento de consultório (Tay et al.²¹ 2012, Basting et al.²² 2012, Martin et al.²³ 2013).

Este efeito parece ser ainda mais acentuado em pacientes com restaurações adesivas (Bonafé et al.²⁴ 2013) e com ativação da luz (Kossatz et al.²⁵ 2011). Bonafé et al.²⁴ (2013), relataram em um estudo clínico que pacientes com dentes restaurados apresentaram maior intensidade de sensibilidade dental do que pacientes com dentes hígidos. Da mesma forma, Kossatz et al.²⁵ (2011) mostraram que pacientes submetidos ao clareamento de consultório com ativação da luz relataram sensibilidade dental por até 48 horas após o clareamento, o que não foi observado nos grupos sem fotoativação.

A quantidade de peróxido de hidrogênio que atinge a câmara pulpar de dentes com restaurações adesivas mostrou ser significativamente mais elevada do que o observado em dentes hígidos (Benetti et al.¹⁵ 2004, Gokay et al.¹¹ 2000, Gokay et al.¹² 2000). No entanto, nenhum estudo até agora tentou avaliar se a ativação da luz em dentes restaurados pode aumentar a quantidade de peróxido de hidrogênio, que atinge o tecido pulpar.

Na prática clínica, o clareamento dental é realizado em dentes hígidos como também em dentes restaurados. Além disso, essas restaurações variam significativamente em tamanho e profundidade, que também podem afetar a quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar após o clareamento de consultório. Portanto, os objetivos deste estudo foram quantificar a penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar de dentes com restaurações de diferentes profundidades depois do clareamento com peróxido de hidrogênio 35% ativado ou não por luz LED/Laser e avaliar a citotoxicidade produzida por essas concentrações em células cultivadas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CLAREAMENTO DENTAL

“Pouca coisa é necessária para transformar inteira uma vida: amor no coração e sorriso nos lábios” (Martin Luther King). Por mais que o sorriso seja algo comum do comportamento na espécie humana (Darwin 1872), ele também pode proporcionar relações de cooperação entre as pessoas (Mehu e Dunbar²⁶ 2008), trazer uma percepção positiva para aqueles que o recebem (Hess et al.²⁷ 2002, Krumhuber et al.²⁸ 2009), contribuir para um retorno positivo econômico na sociedade (Godoy et al.²⁹ 2005) e é considerado uma das primeiras indicações de interesse sexual em nossa espécie (Houser et al.³⁰ 2007, Moore³¹ 1985), entre outros inúmeros fatores.

Artigos sobre clareamento em revistas populares sugerem que a cor dos dentes é um fator significativo na atratividade de um sorriso (Hendrie e Brewer³² 2012). No entanto, a maior parte das pessoas estão insatisfeitas com a cor de seus dentes (Akarslan et al.³³ 2009). Por exemplo, nos Estados Unidos, são gastos aproximadamente 1 bilhão de dólares em procedimentos odontológicos puramente cosméticos ao ano, incluindo o clareamento dental (Schmidt e Tatum³⁴ 2006). A cor do dente é uma fonte rica de informações sobre a saúde e qualidade genética, pois essa coloração provém de uma ampla variedade metabólica, hereditariedade e fatores traumáticos em adição às condições ambientais e dietéticas (Joiner³⁵ 2004, Watts e Addy³⁶ 2001, Hendrie e Brewer³² 2012).

Essa demanda do público por um sorriso mais branco na busca de se sentirem mais jovens e obter maior auto-estima (Dunn³⁷ 1998) fez do clareamento dental um procedimento odontológico popular e frequentemente solicitado (Kugel e Ferreira³⁸ 2005). É surpreendente que uma mudança na aparência com um método simples e não invasivo como o clareamento dental tenha tanta influência na odontologia e para as pessoas que servimos (Christensen³⁹ 2002). Sem contar que o clareamento dental, muitas vezes, dá resultados satisfatórios e então, encoraja os pacientes a procurar a continuação de tratamentos estéticos (Kihn⁴⁰ 2007).

Muitos métodos e abordagens para o clareamento dental têm sido descritos na literatura, porém, as duas principais técnicas utilizadas em dentes com vitalidade pulpar são a caseira e de consultório (Joiner⁴¹ 2006). A técnica caseira é realizada com a aplicação diária de baixas concentrações de agente clareador em uma moldeira plástica, sob direto monitoramento do dentista, por pelo menos duas semanas (Haywood⁴² 1997, Kugel e Ferreira³⁸ 2005). Já a técnica de consultório utiliza altas concentrações de agentes clareadores por períodos mais curtos realizados pelo cirurgião-dentista e pode ser associada ou não a fontes de luz (Minoux e Serfaty⁴³ 2008).

Independentemente da técnica, caseira ou de consultório, o peróxido de hidrogênio é o agente mais comum nestes produtos. Apesar do mecanismo de ação ainda ser questionável, a hipótese teórica mais aceita é a de que o dente se torna mais branco quando o peróxido, devido ao seu baixo peso molecular (34 g/mol), se difunde através do esmalte dental e reage na junção dentina-esmalte e na dentina (Ubdalini et al.⁴⁴ 2013). O peróxido de hidrogênio age como um forte agente oxidante com a formação de radicais, moléculas de oxigênio reativas e ânions de peróxido de hidrogênio. Esses radicais podem oxidar compostos orgânicos (Kawamoto e Tsujimoto⁸ 2004, Severcan et al.⁴⁵ 2008), resultando em moléculas que absorvem menos o comprimento de onda relativa à cor amarela (Joiner⁴¹ 2006, Dahl e Pallesen⁴⁶ 2003).

Essas técnicas têm mostrado mudanças favoráveis na cor dos dentes (de la Pena e Ratón⁴⁷ 2013, Bizhang et al.⁴⁸ 2009, Deliperi et al.⁴⁹ 2004, de Almeida et al.⁵⁰ 2012, Zekonis et al.⁵¹ 2003, McCaslin et al.⁵² 1999). Apesar de eficazes, ambas as técnicas, caseira e de consultório apresentam vantagens e limitações particulares. Por exemplo, o tempo total de tratamento, em média de 14 dias de tratamento caseiro é comparável a 60 min de tratamento de consultório para a mesma eficácia (Zekonis et al.⁵¹ 2003). No entanto, alguns autores acreditam que a técnica caseira apresenta maior eficácia em clarear estruturas mais profundas, como a dentina, devido à liberação contínua e por mais tempo de peróxido de hidrogênio (Zekonis et al.⁵¹ 2003, Dietsch et al.⁵³ 2006, de la Pena et al.⁴⁷ 2013).

Já foi demonstrado que o uso de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (35%), após duas sessões, atinge resultados satisfatórios de clareamento, com mudança de cor entre 7 e 8 unidades da escala Vita Clássica

(Kossatz et al.²⁵ 2011, Reis et al.⁵⁴ 2011). Produtos com menores concentrações podem precisar de mais uma aplicação (peróxido de hidrogênio a 20%) ou até mesmo doze aplicações (peróxido de hidrogênio a 5%) para atingir resultados similares (Suliman et al.⁵⁵ 2004, Reis et al.⁵⁶ 2013), sugerindo que a velocidade do clareamento é dependente da concentração e do tempo de contato do produto com o substrato dental.

Quanto à longevidade, alguns estudos mostram estabilidade satisfatória do clareamento de consultório após 9 (Giachetti et al.⁵⁷ 2010), 18 (Auschill et al.⁵⁸ 2012) e 24 meses (Tay et al.²¹ 2012), enquanto a técnica caseira também tem mostrado estabilidade de cor mesmo após 18 (Auschill et al.⁵⁸ 2012) e 24 meses (Mondelli et al.⁵⁹ 2012). Contudo, pode-se afirmar que ambas as técnicas podem mostrar estabilidade de cor após 2 anos (Tay et al.²¹ 2012).

Embora a técnica caseira seja estudada há quase 20 anos e com comprovada eficácia, alguns pacientes não aceitam o tratamento, pois não querem utilizar o produto clareador todos os dias por 2 a 3 semanas ou não se adaptam à moldeira plástica, e podem requerer um tratamento com resultados mais imediatos, como o clareamento de consultório (Marson et al.⁴ 2008).

Mesmo que seja uma técnica com resultados consideravelmente rápidos, há autores que sugerem a realização da ativação do clareamento de consultório através da técnica denominada de “power bleaching” (Suliman⁶⁰ 2000). Esta técnica é realizada em consultório odontológico, com altas concentrações de peróxido, porém com ativação de luz. Há no mercado odontológico muitas fontes de luz com a finalidade de ativar e potencializar a ação dos agentes clareadores.

Apesar de ainda ser questionável a eficácia do uso da luz (Gurgan et al.¹ 2010, Buchalla e Attin³ 2007, Marson et al.⁴ 2008), a pressão da mídia faz com que esta técnica seja ainda utilizada na prática clínica diária. A ideia é de que a fonte de luz atua como um fator coadjuvante, aquecendo o agente clareador e aumentando a formação de radicais $\cdot\text{OH}$ a partir do peróxido de hidrogênio (Kashima-Tanaka et al.⁶¹ 2003).

2.2 DESVANTAGENS DO CLAREAMENTO

Ainda que o clareamento dental seja eficaz, esse tipo de tratamento apresenta algumas desvantagens. Na técnica caseira, em média 20 a 30% dos pacientes relatam irritação da gengiva durante o tratamento (Pohjola et al.⁶² 2002). Essa irritação da gengiva pode ser minimizada pela redução do contato do peróxido de hidrogênio com o tecido gengival, orientando o paciente quanto à quantidade de gel que deve ser aplicada a fim de evitar excesso de material (Haywood⁴² 1997). Outras desvantagens que já foram relacionadas com o clareamento caseiro são a ingestão do produto clareador e a irritação dos tecidos moles pelo uso de moldeiras (da Costa et al.⁶³ 2012).

Durante o clareamento de consultório, o peróxido de hidrogênio é utilizado em altas concentrações, o que requer a utilização de barreiras adequadas para evitar queimaduras nos tecidos moles da boca. Caso um vazamento exista, pode ocorrer uma queimadura grave no tecido que geralmente é alertada pelo paciente pela dor aguda provocada pela queimadura (Li et al.⁶⁴ 2011).

Independentemente do tipo de clareamento, o efeito adverso mais comum e indesejável é a sensibilidade dental (Kossatz et al.²⁵ 2011, Tay et al.²¹ 2012, Basting et al.²² 2012). Esse efeito adverso parece estar relacionado com a habilidade do peróxido de hidrogênio em atravessar a estrutura dental e atingir a câmara pulpar em poucos minutos após a aplicação na superfície do esmalte (Nathanson⁶⁵ 1997).

De acordo com alguns autores, pacientes com recessão gengival e sensibilidade prévia ou pacientes que ingerem frutas e sucos cítricos ou bebidas ácidas são pacientes em risco de desenvolvimento de sensibilidade dental durante o clareamento (Leonard et al.⁶⁶ 2007).

Quanto à sensibilidade pós-operatória na técnica “power bleaching”, alguns estudos mostram maior ocorrência de sensibilidade (Kossatz et al.²⁵ 2011, Tavares et al.⁶⁷ 2003, Ontiveros e Paravina⁶⁸ 2009). Essa sensibilidade tem sido associada ao aumento de temperatura na polpa causada pela luz, já que parte dessa energia é absorvida enquanto outra parte é convertida em calor (Klaric et al.⁶⁹ 2013). Por outro lado, algumas fontes de luz têm sido usadas a fim de produzir menor sensibilidade dental, como o laser diodo (Gurgan et al.¹ 2010, Marson et al.⁴ 2008). Assim, na literatura tem sido sugerido o uso de lasers para reduzir a sensibilidade (Verma et al.⁷⁰ 2012). Mesmo assim, muitos estudos devem ser realizados, pois a literatura não chegou a um consenso sobre os reais benefícios da utilização da luz. Segundo Zack

e Cohen⁷¹ (1965), a polpa pode suportar, sem causar danos a ela um aumento de temperatura de até 5,5 °C. Por isso, muitas lâmpadas como as de luzes emissores de diodo (LED) têm sido indicadas no clareamento por provocarem um aumento na temperatura pulpar de apenas 1,02 °C (Sari et al.⁷² 2013).

2.3 PERMEABILIDADE DENTAL AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Infelizmente a ação do peróxido de hidrogênio não se restringe apenas ao esmalte e dentina já que esse agente também penetra na câmara pulpar (Bharti e Wadhvani⁷³ 2013, Gokay et al.⁷⁴ 2004, Gokay et al.⁷⁵ 2005, Cooper et al.¹⁰ 1992, Thitinthapan et al.⁷⁶ 1999). A quantidade de peróxido que atinge esse tecido depende da aplicação de calor durante o procedimento clareador (Bowles e Ugwuneri⁹ 1987), se o dente é intacto ou restaurado (Gokay et al.¹² 2000, Benetti et al.¹⁵ 2004, Camargo et al.¹⁴ 2007), da presença de microfaturas no esmalte (Briso et al.⁷⁷ 2013, Ozcan⁷⁸ 2013) e da espessura da dentina (Camargo et al.¹⁴ 2007). Esse último fator pode explicar o fato de que maior sensibilidade ocorre nos incisivos inferiores e incisivos laterais superiores (de Almeida et al.⁷⁹ 2012, Haywood⁸⁰ 2005, Costa et al.⁸¹ 2010) e assim, sugerir que em dentes menos volumosos ocorrerá maior permeabilidade do peróxido de hidrogênio e seus subprodutos na câmara pulpar.

No dia a dia da clínica odontológica, muitos procedimentos de clareamento são realizados em dentes com restaurações. Vários estudos encontraram maior quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar de dentes restaurados e esse fenômeno ocorre, possivelmente, pela fácil via de acesso do peróxido pela interface dente-restauração (Gokay et al.¹² 2000, Benetti et al.¹⁵ 2004, Camargo et al.¹⁴ 2007). O tipo de material restaurador parece também influenciar na quantidade de peróxido que atinge a polpa. Comparativamente com o cimento de ionômero de vidro e resina modificada por poliácidos, a resina composta restringe a penetração do peróxido de hidrogênio, possivelmente devido à sua maior capacidade adesiva (Gokay et al.¹² 2000, Benetti et al.¹⁵ 2004, Camargo et al.¹⁴ 2007).

Um outro fator que pode aumentar a quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar é o uso de fonte de luz (Camargo et al.¹³ 2009). Camargo et al.¹³ (2009) relataram que a luz LED e laser de Nd:YAG (NeoDymium-doped Yttrium

Aluminum Garnet) podem aumentar a quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar de dentes bovinos. Em contrapartida, em um recente estudo não houve diferenças significativas de peróxido de hidrogênio com o uso da lâmpada de arco de xenônio em dentes humanos (Kwon et al.⁸² 2012). Os autores relatam que uma possível explicação para essas diferenças nos resultados entre os estudos é devido ao fato dos dentes bovinos terem conformação estrutural diferente dos dentes humanos (Kwon et al.⁸² 2012, Yassen et al.⁸³ 2011).

2.4 CITOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Quando o peróxido de hidrogênio atinge a câmara pulpar, ele pode reagir potencialmente na polpa, causando um estresse oxidativo, que leva a danos celulares no tecido pulpar (Sies⁸⁴ 1997, Coldebella et al.⁸⁵ 2009, Costa et al.⁸¹ 2010, Cintra et al.⁸⁶ 2013). As espécies reativas derivadas do oxigênio e do peróxido de hidrogênio são conhecidas como promotoras de injúrias às células vivas devido ao estresse oxidativo, podendo gerar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade celular (Li⁸⁷ 1996, Floyd⁸⁸ 1997, Kanno et al.⁸⁹ 2003).

Os efeitos adversos na polpa podem estar diretamente relacionados com a quantidade de peróxido de hidrogênio que atinge este tecido o que torna relevante mensurar a quantidade deste agente na câmara pulpar após tratamento clareador. Anderson et al.⁹⁰ (1999) detectou uma maior produção de heme-oxigenase-1 (HO-1 (HSP32) por odontoblastos e por células endoteliais de polpas intactas subjacentes a áreas expostas a peróxido de carbamida a 10% por 4 horas. Esses achados indicam que a polpa em contato com o peróxido de hidrogênio responde de forma defensiva induzindo um gene de expressão de proteínas de choque (HSP32/HO-1). Além disso, ocorre a indução da expressão de sialofosfoproteína dentinária (DSPP), proteína expressa durante a diferenciação de odontoblastos e associada à regulação da mineralização de dentina primária e reparadora (Min et al.⁹¹ 2008).

O peróxido de hidrogênio a 35% foi citotóxico em células de linhagem odontoblástica, provocando quedas significativas no seu metabolismo, sem diferenças significativas entre os grupos com e sem luz. (Coldebella et al.⁸⁵ 2009, Dias Ribeiro et al.²⁰ 2009, Trindade et al.¹⁹ 2009). No entanto, o dano celular foi proporcional ao tempo de contato do gel com as células (Soares et al.¹⁸ 2012). Com

isto, pode-se afirmar que os danos celulares são dose-dependentes da concentração de peróxido de hidrogênio: 0,025 µg/mL; 0,43 µg/mL; 2,21 µg/mL e 29,74 µg/mL podem apresentar 89,4%; 82,4%; 61,5% e 23% de células viáveis, respectivamente (de Lima et al.⁹² 2009).

Fernandez et al.⁹³ (2010) também mostrou que o efeito citotóxico depende da concentração do peróxido de hidrogênio em células 3T3/NIH. Além disso, são muito controversos os estudos quanto às concentrações de peróxido de hidrogênio que podem matar 50% das células. Há relatos de concentrações a 0,025 mM, 0,0997 mM e 0,0469 mM. Essa diferença encontrada pode ser devida às diferentes linhagens de células e então, variável sensibilidade, diferentes períodos de incubação e condições experimentais (Koulaouzidou et al.⁹⁴ 1998). No entanto, esses estudos avaliaram concentrações de peróxido de hidrogênio variáveis aplicadas nas células que nem sempre são as encontradas na câmara pulpar após clareamento dental.

Ainda não há na literatura relatos sobre os efeitos citotóxicos em células com a quantidade de peróxido de hidrogênio que atinge a câmara pulpar de dentes humanos com restaurações profundas ou rasas, na técnica de clareamento de consultório com ativação da luz LED/Laser. Dessa forma o presente estudo se propôs a investigar a quantidade de peróxido de hidrogênio que pode atingir a câmara pulpar de dentes com restaurações de diferentes profundidades submetidas ao clareamento de consultório com e sem ativação da luz assim como os seus efeitos citotóxicos em linhagem de células fibroblásticas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposição geral

Quantificar o peróxido de hidrogênio na câmara pulpar e avaliar sua citotoxicidade, após clareamento com peróxido de hidrogênio a 35% com e sem ativação por luz, em dentes com restaurações de resina composta de diferentes profundidades.

3.2 Proposição específica

1. Quantificar o peróxido de hidrogênio na câmara pulpar em dentes pré-molares humanos hígidos, com restaurações rasas e profundas após o clareamento com e sem ativação.
2. Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em fibroblastos da linhagem celular 3T3/NIH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Os principais materiais utilizados neste estudo e suas características estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição dos materiais utilizados para o estudo.

Material [Fabricante/Lote]	Composição
Adper Single Bond 2 [3M ESPE/N395127BR]	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, copolímero de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico, partículas esféricas de sílica de 5 nm.
Resina Composta Filtek Z350 [3M ESPE/L1217700673]	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA e canforoquinona, zircônia e silícia.
HP MAXX [FGM/L131112]	Peróxido de hidrogênio 35%, água destilada, carbopol, glicol, íons potássio pH 6,0-7,0.
Abreviaturas: BisGMA – bisfenol A glicidil metacrilato; HEMA – 2-hidroxietil metacrilato; UDMA – uretano dimetacrilato; Bis-EMA – bisfenol A glicol dimetacrilato	

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das Amostras

Este estudo foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Paraná, Brasil) sob o número de protocolo 256.700.

Cento e doze dentes humanos hígidos obtidos através do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, foram divididos de acordo com a combinação dos principais fatores: profundidade da restauração (nenhuma [dente hígido], rasa e profunda) e ativação da luz (sim ou não). Um grupo controle foi adicionado, composto por dentes hígidos sem exposição ao clareamento. Um total de dezesseis dentes foi empregado em cada grupo.

Nos grupos restaurados, cavidades padronizadas foram preparadas com uma ponta diamantada cilíndrica (#3145, KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) nas superfícies vestibulares dos dentes com uma largura mésio-distal de 3 mm e ocluso-

gengival de 2 mm. Todas as cavidades foram localizadas em esmalte 2 mm acima da junção cimento-esmalte. As profundidades das cavidades eram de aproximadamente 1 e 2 mm nos grupos rasa e profunda, respectivamente (Figura 1). A parede axial de todas as cavidades estava localizada em dentina.

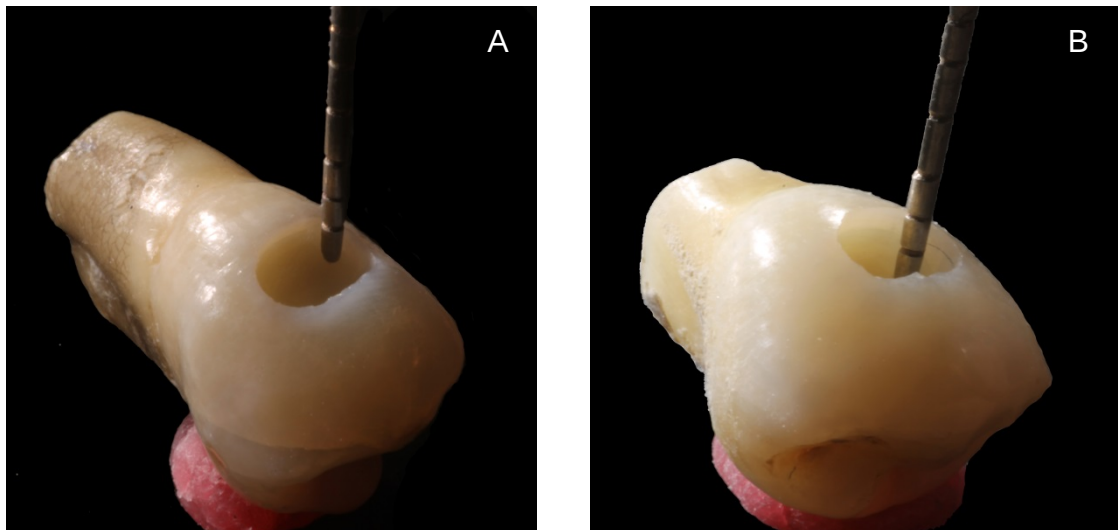


Figura 1 – Preparo das cavidades (A) rasa e (B) profunda, respectivamente.

Após a preparação das cavidades, foram tiradas radiografias raios-X (Timex 70C, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com um tempo de exposição de 0,5 s a 30 cm do foco de distância do objeto (70 KVp e 7 mA). O feixe dos raios-X central foi focado em um ângulo de 90° a superfície distal do dente (Figura 2). As imagens foram digitalizadas e a menor distância entre a parede axial e a câmara pulpar foi medida com o software 3.0 ImageTool (Universidade do Texas, San Antonio, Texas, EUA).

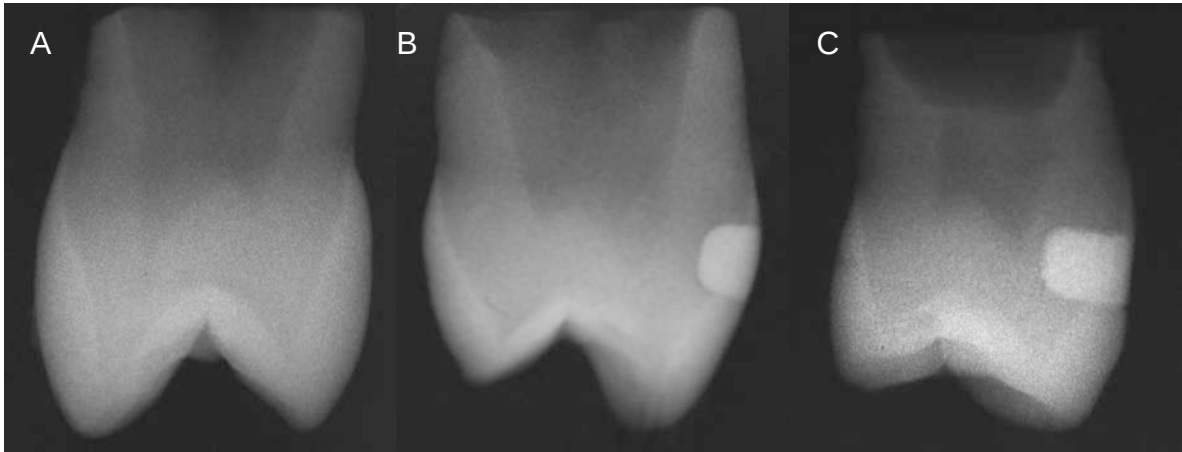


Figura 2- Imagens radiográficas dos grupos experimentais mostrando as diferentes profundidades das restaurações. Em (A) dente hígido, em (B) cavidade rasa e em (C) cavidade profunda.

As cavidades foram condicionadas com um ácido fosfórico em gel a 37% (Condac 37, FGM Produtos Odontológicos, Joinville SC, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Duas camadas consecutivas de um sistema adesivo (Single Bond, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foram esfregadas em uma dentina ligeiramente úmida. O solvente foi evaporado por 10 s e o adesivo foi fotopolimerizado durante 10 s utilizando um aparelho fotopolimerizador do tipo LED (Radii-Cal, SDI Dental Product SDI, Bayswater, Vitoria, Austrália) com intensidade de 1200 mW/cm^2 . As cavidades foram preenchidas com resina composta microhíbrida (Z350, 3M ESPE) em dois incrementos de 2 mm de espessura. Cada incremento foi fotopolimerizado por 40 s usando a mesma luz. As restaurações foram finalizadas com brocas de granulação fina (#2135F, KG Sorensen) e polidas com uma sequência de discos abrasivos (SofLex, 3M ESPE) e armazenados por 24 h em água destilada a 37°C .

4.2.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio na câmara pulpar

As raízes de todos os dentes foram cortadas em aproximadamente 3 mm apicalmente à junção cimento-esmalte, o tecido pulpar foi removido e a câmara pulpar foi lavada com água destilada. O acesso à câmara foi ampliada cuidadosamente com uma ponta diamantada esférica (#1014, KG Sorensen) para permitir a introdução de uma micropipeta (LABMATE Soft, HTL Lab Solutions,

Warsaw, Polônia) no interior da câmara pulpar. Todo cuidado foi tomado para evitar tocar nas paredes da câmara pulpar.

Ao longo deste estudo foram utilizados reagentes de grau analítico sem purificação anterior e foram preparadas com água deionizada de um sistema Milli-Q Millipore (MS2000, Gehaka, São Paulo, São Paulo, Brasil). O peróxido de hidrogênio foi adquirido da Labsynth (34-36%, Diadema, SP, Brasil). Uma solução de 5.000 µg/mL foi preparada em uma solução tampão de acetato (pH 4,5) e normalizada por meios de métodos convencionais. A solução foi titulada com uma solução padrão de permanganato de potássio (Mendham e Afonso⁹⁵ 2002). Alíquotas da solução de peróxido de hidrogênio foram diluídas volumetricamente a fim de obter soluções padrão de 0,032 – 0,397 µg/mL (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 - Diluição para obtenção da curva analítica

Massa de PH (µg)	Concentração de PH (µg/mL)	Solução Tampão (µL)	Solução Padrão (µL)	Peroxidase (µL)	Violeta Leucocristal (µL)	Água Deionizada (µL)
1,192	0,397	75	25	50	100	2750
0,953	0,318	80	20	50	100	2750
0,715	0,238	85	15	50	100	2750
0,477	0,159	90	10	50	100	2750
0,381	0,127	92	8	50	100	2750
0,191	0,064	96	4	50	100	2750
0,095	0,032	98	2	50	100	2750
0,000	0,000	100	0	50	100	2750

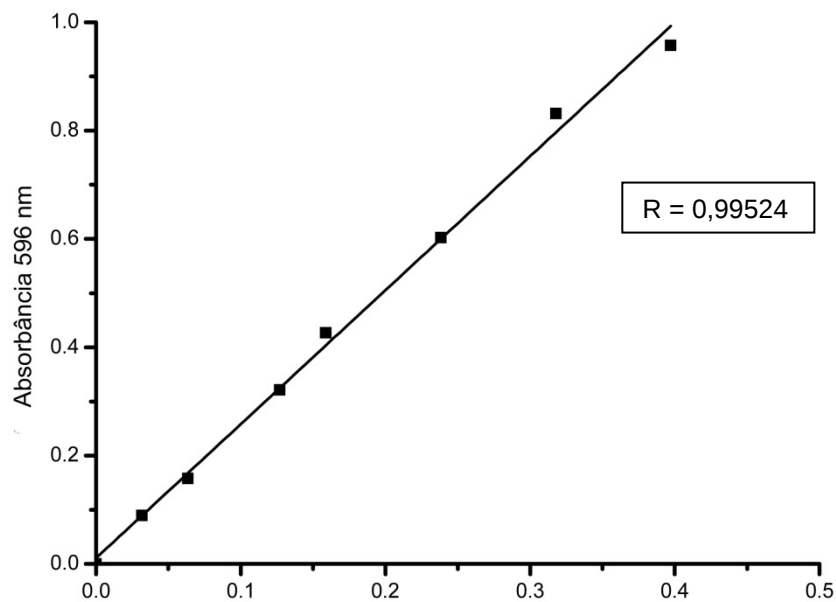


Figura 3 – Curva analítica

Todos os dentes foram fixados verticalmente em uma placa de cera e a superfície vestibular de cada dente foi isolada pela aplicação de uma barreira de resina fotopolimerizável (TopDam, FGM Produtos Dentais) de forma a padronizar a área de exposição ao gel clareador de aproximadamente 7 mm^2 . Uma alíquota de $25 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão de acetato (pH 4,5) foi colocada no interior da câmara pulpar de cada dente a fim de absorver e estabilizar qualquer peróxido de hidrogênio que possa penetrar no interior da câmara pulpar.

O gel de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Maxx, FGM Produtos Dentais) foi aplicado sobre a superfície do esmalte, como recomendado pelo fabricante em três aplicações de 15 min. Nos grupos fotoativados, a luz LED/laser foi utilizada (Whitening Lase Light Plus, DMC Odontologica, São Carlos, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Esta luz é feita de uma matriz de LEDs, com comprimentos de onda de 470 nm e com três diodos de laser infravermelho, com 830 nm e a intensidade de luz de 200 mW/cm^2 . As superfícies dos dentes foram ativadas por três vezes de 1 min e intervalo de tempo de 2 min entre cada ativação. Os dentes dos grupos não clareado e hígidos (grupo controle) foram expostos somente a água destilada.

Depois de cada período de exposição, a solução de tampão de acetato foi removida da câmara pulpar de cada dente com uma micropipeta e transferida a uma cubeta de plástico. A câmara pulpar de cada dente foi lavada por quatro vezes com 25 μL de tampão de acetato, o qual foi colocado na cubeta de vidro. Após, 2.725 μL de água destilada foi adicionada a cubeta junto com 100 μL de 0,5 mg mL^{-1} de leucocristal violeta (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) e 50 μL de 1 mg mL^{-1} de enzima peroxidase (Peroxidase Type VI-A, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) (Camargo et al.¹⁴ 2007).

A absorbância da resultante cor violeta foi medida no espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis a 596 nm (Varian, Palo Alto, EUA). De acordo com a lei de Beer, a absorbância é diretamente proporcional à concentração. Dessa forma, a concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada em ($\mu\text{g/mL}$) pela comparação da curva de calibração previamente obtida (Figura 3) (Mottola et al.⁹⁶ 1970). Sabendo a concentração ($\mu\text{g/mL}$) e o volume da solução, a massa (μg) de peróxido de hidrogênio foi calculada de acordo com a equação: $m = C * MM * V$, onde m significa massa, C concentração, MM massa molar do peróxido de hidrogênio ($MM = 34$) e V seu volume ($3 \times 10^{-3} \text{ L}$).

4.2.3 Ensaios de Viabilidade Celular

Fibroblastos da linhagem celular de camundongos 3T3/NIH foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina + penicilina (10.000 U/100 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C com 5% de CO_2 em um ambiente umidificado.

Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 7×10^3 células/poço. Depois de aproximadamente 24 h, as células foram expostas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio titulado com uma solução padrão de permanganato de potássio. As concentrações de peróxido de hidrogênio empregadas foram determinadas com base na menor média de peróxido de hidrogênio que penetrou na câmara pulpar de dentes hígidos após o clareamento, obtido no experimento anterior. Esta concentração (0,3 $\mu\text{g/mL}$) e concentrações maiores (0,47; 0,58; 1,89; 2,3; 3,0; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) foram aplicadas sobre as células por 24, 48 e 72 h para os ensaios de citotoxicidade. O grupo

controle não foi exposto ao peróxido de hidrogênio, somente ao meio de cultura. Após cada período de contato, os produtos testados foram removidos e as células lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) e ambos os testes (MTT e vermelho neutro) foram executados em triplicata.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (Tada et al.⁹⁷ 1986). Este teste determina a atividade da enzima succinato desidrogenase produzida pela mitocôndria de células viáveis. A solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada e observada a viabilidade celular usando um teste colorimétrico. Devido às desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto formazan. A absorbância de cada poço foi lida a 570 nm usando uma placa de leitura (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

Para o ensaio do vermelho neutro as células foram igualmente tratadas com as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, e incubadas em meio contendo a solução de vermelho neutro (50 mg/mL de DMEM) (Borenfreund e Puerner⁹⁸ 1985). Depois de 4 h, o vermelho neutro foi removido e 100 µL de formaldeído a 1% foi adicionado em cada poço. O formaldeído foi removido e 200 µL de uma solução de 10 mL de ácido acético, 500 mL de etanol 100% e 490 mL de água destilada foi adicionada em cada poço, agitado por 5 min e então transferida a uma placa de 96 poços. Foi realizada a leitura a absorbância de 540 nm usando uma placa de leitura (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). O ensaio de vermelho neutro é baseado na habilidade de lisossomos de células viáveis incorporarem este corante.

4.2.4 Análise Estatística

Os dados da espessura do remanescente de dentina foram sujeitos a uma análise de variância de um fator. Os dados da concentração de peróxido de hidrogênio foram submetidos a uma análise de variância de dois fatores (profundidade da restauração e ativação da luz). Os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle (dentes hígidos não clareados) através do teste t de Student.

Em ambos os testes, a viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle, considerado como 100% e os dados em cada um dos períodos de exposição ao peróxido (24, 48 e 72 h) foram submetidos a uma análise de variância de um fator. A CL_{50} (concentração letal de 50% das células) foi calculada usando o programa GraphPad (Graphpad software Inc., San Diego, California, EUA).

O teste de Tukey foi empregado para o contraste das médias em todas as análises. Todos os testes foram realizados utilizando o programa Sigma Plot 11 (Systat Software Inc. Chicago, IL, EUA) com um nível de significância 5%.

5 RESULTADOS

Os grupos cavidade rasa e rasa + luz tiveram média remanescente de espessura de dentina de $1,6 \pm 0,4$ mm, o que foi estatisticamente diferente dos grupos profunda e profunda + luz ($0,6 \pm 0,3$ mm).

A concentração de peróxido de hidrogênio que atingiu a câmara pulpar está representada na Figura 4. A análise de variância não revelou efeito estatisticamente significativo para a interação dos fatores ($p = 0,948$), nem para o fator principal ativação ($p = 0,465$). Apenas o fator principal profundidade da restauração foi significativo ($p = 0,026$) onde a restauração profunda permitiu maior difusão do peróxido de hidrogênio que os outros grupos.

Comparativamente com os dentes hígidos sem clareamento, todos os outros grupos apresentaram concentração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar significativamente maior ($p < 0,05$), ou seja, a concentração de peróxido encontrada na câmara pulpar está diretamente relacionada com o procedimento clareador.

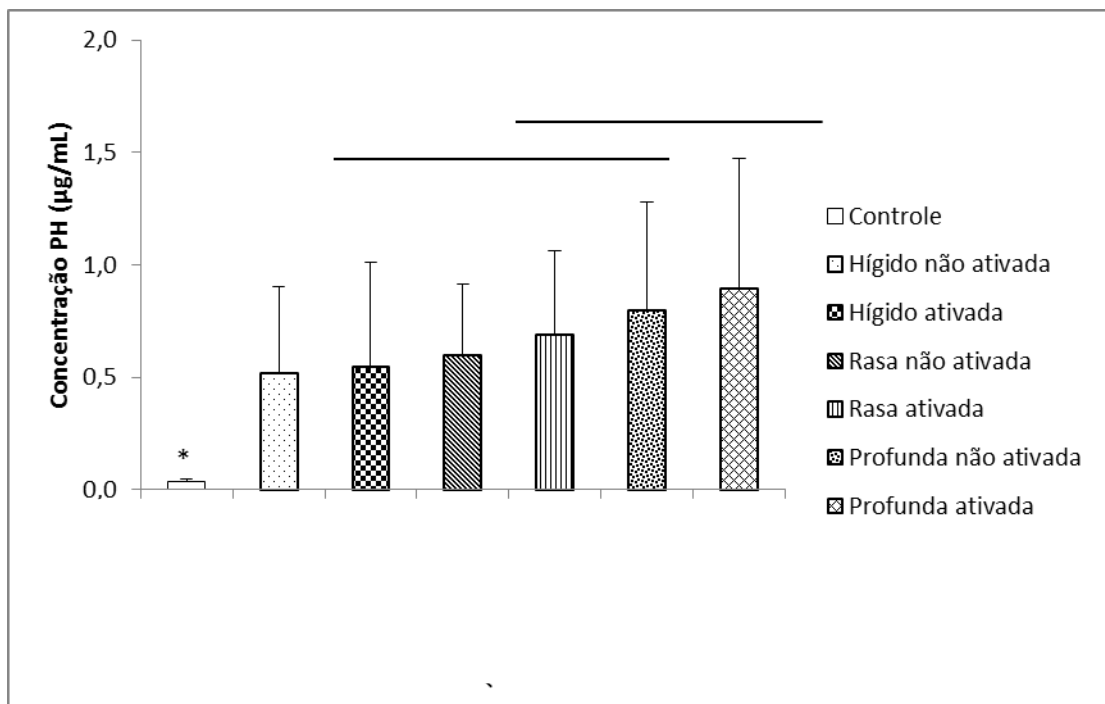


Figura 4 - Concentração de PH (µg/mL) de todos os grupos. Grupos similares são identificados com o mesmo símbolo. (*) O grupo controle foi significativamente diferente que outros (teste de Tukey, $p < 0,001$).

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade utilizando MTT e vermelho neutro após 24 h da exposição a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio estão apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Concentrações de peróxido de hidrogênio mais baixas que 3 µg/mL não afetaram a viabilidade celular, porém quantidades iguais (MTT) ou maiores que 10 µg/mL (MTT e Vermelho Neutro) a reduziram significativamente ($p = 0,01$) comparado ao grupo controle. Em concentrações mais elevadas (10 e 30 µg/mL), a viabilidade celular foi reduzida em 41,4% ($p < 0,001$) e 72,6% ($p < 0,001$), respectivamente no ensaio MTT, enquanto no ensaio vermelho neutro, esta redução foi de 27,3% e 40% ($p < 0,001$) para as mesmas concentrações.

Os resultados de viabilidade celular em períodos mais prolongados de exposição ao peróxido de hidrogênio (48 e 72 h) foram semelhantes ao observados após 24 h de exposição, razão pela qual apenas os dados de 24 h estão apresentados neste estudo.

A quantidade de peróxido de hidrogênio detectada na câmara pulpar após clareamento nos diferentes grupos de estudo não ultrapassou o máximo de 1,5 µg/mL o que sugere que concentração de peróxido após 1 sessão de clareamento não seja capaz de alterar a viabilidade celular.

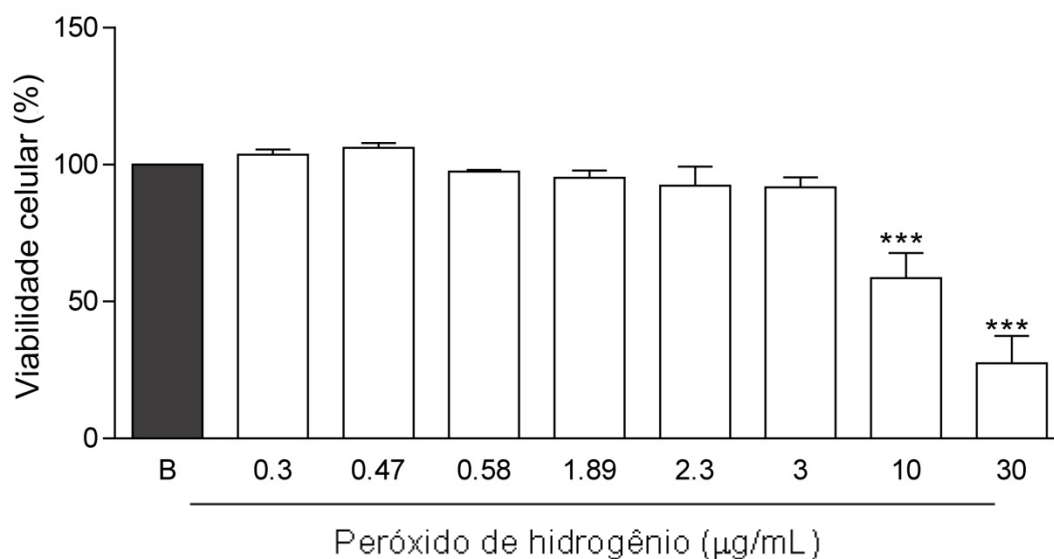


Figura 5 – Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio MTT. *** Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

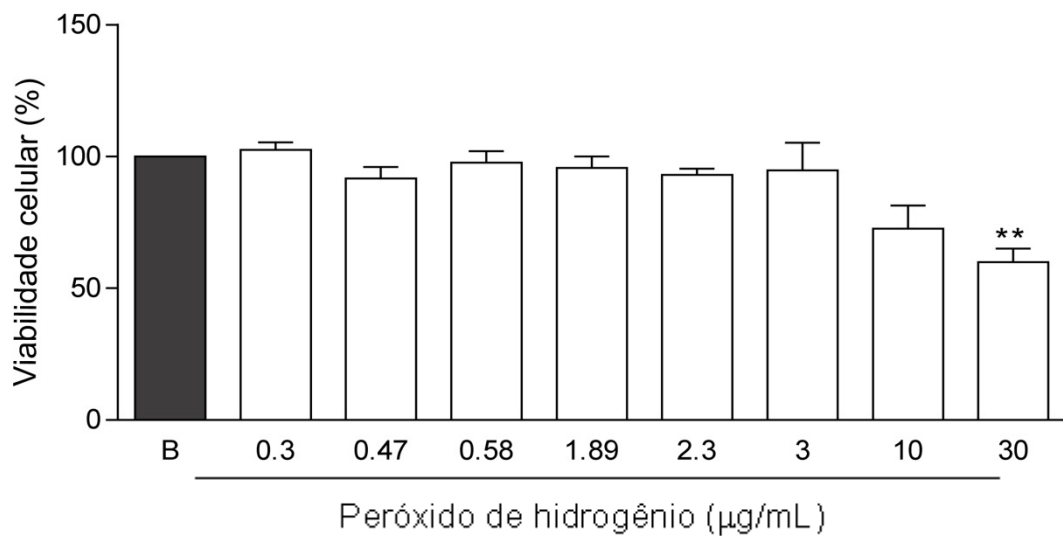


Figura 6 - Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio vermelho neutro. *** Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

A fim de demonstrar qual a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CL_{50}), foi realizada uma regressão não linear da morte celular dos grupos em função do logaritmo da concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 7). Os valores encontrados para $\log CL_{50}$ foi 1,258 e CL_{50} foi igual a 18,13 µg/mL ($R^2 = 0,8996$).

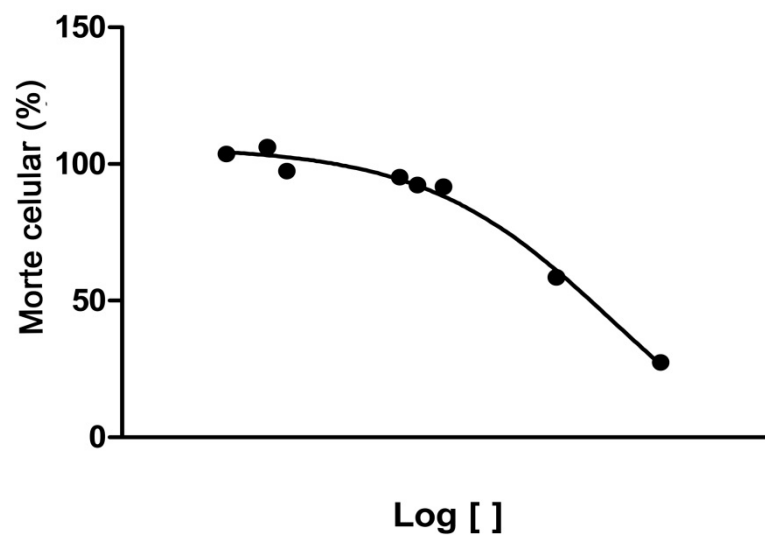


Figura 7 – Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 24 h da exposição, com o ensaio MTT. *** Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Um material dental pode ser considerado de risco ao complexo dentina-polpa dependendo da capacidade de seus componentes se difundirem através do esmalte e dentina e reagir no tecido pulpar (Wataha et al.⁹⁹ 1994). Isso ressalta a importância em detectar a quantidade e a concentração de peróxido de hidrogênio que atinge a câmara pulpar após o clareamento de consultório, já que o mesmo pode causar danos pulpares (Cintra et al.⁸⁶ 2013, Buchalla & Attin³ 2007, Haywood¹⁰⁰ 1992) e aumentar a sensibilidade dental após o tratamento (Nathanson et al.⁶⁵ 1997, Tredwin et al.¹⁰¹ 2006).

O presente estudo revelou que todos os grupos clareados apresentaram peróxido de hidrogênio na câmara pulpar, independentemente do uso de fotoativação. Esses resultados estão em acordo com vários estudos anteriores que também demonstraram que peróxido de hidrogênio pode alcançar a câmara pulpar logo após o clareamento (Bowles e Ugwuneri⁹ 1987, Cooper et al.¹⁰ 1992, Hanks et al.¹⁰² 1993, Thitinthapan et al.⁷⁶ 1999, Gokay et al.⁷⁵ 2005, Briso et al.⁷⁷ 2013).

Kwon et al.¹⁰³ (2013) também demonstraram que a ativação de luz não afetou a penetração de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, maiores quantidades de peróxido de hidrogênio foram encontradas quando o diodo emissor de luz (LED) ou laser Nd:YAG foi usado em associação com peróxido de hidrogênio a 35% em dentes bovinos extraídos (Camargo et al.¹³ 2009). Sabe-se que os dentes bovinos são mais porosos e tem um número diferente de túbulos dentinários, o que pode ter contribuído para os resultados contraditórios destes estudos (Kwon et al.¹⁰³ 2012, Yassen et al.⁸³ 2011). Além disso, especula-se que diferentes fontes de luz podem causar a formação de diferentes radicais (Kashima-Tanaka et al.⁶¹ 2003) e, por conseguinte, os resultados obtidos com um tipo de luz não podem ser generalizados para outros métodos de ativação.

Maiores quantidades de peróxido de hidrogênio foram encontradas na câmara pulpar de dentes com restaurações de 2 mm de profundidade em comparação com os dentes hígidos, possivelmente pela via de acesso mais fácil ao redor das interfaces entre o dente e o material restaurador (Gokay et al.¹¹ 2000, Benetti et al.¹⁵ 2004, Camargo et al.¹⁴ 2007). O mesmo achado foi observado no presente estudo,

uma vez que as restaurações profundas deste estudo tinham a mesma profundidade destes estudos anteriores (Gokay et al.¹¹ 2000, Benetti et al.¹⁵ 2004, Camargo et al.¹⁴ 2007).

O fato de não ter sido detectado diferença estatisticamente significativa entre os grupos com cavidade rasa e dentes hígidos, neste estudo, sugere que a profundidade da restauração possa afetar a concentração de peróxido que atinge a câmara pulpar. Quanto mais profunda é a restauração, menor a quantidade de tecido disponível para sofrer oxidação pelo peróxido de hidrogênio e maior a concentração de peróxido livre, que se difunde e atinge a câmara pulpar. O fato de o peróxido de hidrogênio geralmente se acumular mais nas regiões com maior conteúdo orgânico do dente, como a junção dentina-esmalte e dentina profunda (Ubal dini et al.⁴⁴ 2013) reforçam esta hipótese.

É muito provável que a quantidade de peróxido de hidrogênio que penetra na estrutura do dente é influenciada pela espessura de dentina, uma vez que maior reação inflamatória foi detectada em incisivos inferiores em comparação com pré-molares (Costa et al.⁸¹ 2010). Em pacientes com restaurações profundas ou dentes com menor espessura de dentina, cuidados devem ser tomados para minimizar a sensibilidade dental, como por exemplo o uso de menores concentrações de peróxido de hidrogênio, devido a maior quantidade de peróxido de hidrogênio que provavelmente vai alcançar a câmara pulpar. Além disso, apesar de o esmalte comportar-se como uma membrana permeável a pequenos íons (Atkinson¹⁰⁴ 1947), a sua presença pode modular e reduzir a taxa de penetração do peróxido de hidrogênio. Talvez maior a espessura do esmalte, menor a passagem de moléculas de peróxido de hidrogênio (Palo et al.¹⁰⁵ 2012).

É por isso que este estudo avaliou a viabilidade celular após exposição a concentrações variadas de peróxido de hidrogênio. Em ensaios citotóxicos, uma série de linhagens celulares tem sido utilizada para avaliar os danos celulares causados pelos materiais dentários, tais como fibroblastos do tecido gengival humano, fibroblastos do ligamento periodontal e fibroblastos de ratos (Szep et al.¹⁰⁶ 2000, Franz et al.¹⁰⁷ 2007, Wiegand et al.¹⁰⁸ 2006, Cao et al.¹⁰⁹ 2005, Moodley et al.¹¹⁰ 2005, Grobler et al.¹¹¹ 2004, Grobler et al.¹¹² 2008). Neste estudo, células 3T3/NIH foram selecionadas para os ensaios de citotoxicidade pelo fato dessas células serem bem caracterizadas, de rápido crescimento e permitirem um bom

ranqueamento dos materiais dentários (Schmalz¹¹³ 1994). Adicionalmente, fibroblastos são o tipo celular mais comum na polpa (Wataha et al.⁹⁹ 2003) e são a linhagem celular aprovada pela ISO (*International Organization for Standardization*) em estudos de citotoxicidade (Ausiello et al.¹¹⁴ 2013).

A quantidade média de peróxido de hidrogênio que atingiu a câmara pulpar variou de 0,5 a 0,9 µg/mL, em todos os grupos experimentais, não afetando significativamente a viabilidade celular após a exposição ao peróxido por períodos de 24 a 72 h (Figuras 5 e 6). Apenas concentrações superiores a 10 µg/mL foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular neste estudo.

Resultados variáveis em relação à concentração de peróxido necessária para afetar a viabilidade celular são encontrados na literatura. Por exemplo, Aren¹¹⁵ (2003), demonstrou que uma concentração cinco vezes maior (50 µg/mL) seria necessária para afetar a viabilidade celular em 40% das células FM3A. Outros autores, utilizando modelos de citotoxicidade através de membranas permeáveis (Transwell®, Corning Incorporated, NY, EUA) com células MDPC-23, observaram significativas reduções na viabilidade celular após contato com o peróxido de hidrogênio a 35% e peróxido de carbamida a 16% (Soares et al.¹¹⁶ 2013, Coldebella et al.⁸⁵ 2009, Trindade et al.¹⁹ 2009, Lima et al.¹¹⁷ 2010). A comparação dos resultados do presente estudo com estudos mais recentes é dificultada pelas diferentes metodologias empregadas, como o modelo de citotoxicidade, o tipo de linhagem celular e de substrato dentinário (humano ou bovino) (Yassen et al.⁸³ 2011).

A CL₅₀, que é a concentração de peróxido que provoca a morte de 50% das células, foi de 18,1 µg/mL. Sob nenhuma circunstância foi detectada essa quantidade de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar dos dentes empregados neste estudo. Não há um consenso na literatura com relação a CL₅₀ do peróxido de hidrogênio. Diferentes tipos de células, períodos de incubação e condições experimentais também podem afetar a CL₅₀. Estudos anteriores revelaram que concentrações a 0,025 mM (850 µg/mL) de peróxido de hidrogênio podem inibir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos (Aren¹¹⁵ 2003), enquanto concentrações a 0,0997 e 0,0469 mmol/L (3389 e 1594 µg/mL) podem reduzir o crescimento das células L929 e BHK21/C13, respectivamente após 24 h (Koulaouzidou et al.⁹⁴ 1998).

Numerosos métodos colorimétricos estão disponíveis para a determinação da concentração do peróxido de hidrogênio. O método experimental selecionado neste estudo é considerado um método conveniente, sensível, seletivo e com boa acurácia (Mottola et al.⁹⁶ 1970). Este método permitiu concluir que as concentrações de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar de dentes hígidos e restaurados são muito menor que a concentração necessária para produzir danos celulares *in vitro*, após uma sessão de clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio 35%.

Os resultados do presente estudo não podem ser extrapolados para todos os produtos comerciais disponíveis no mercado. Thitinthapan et al.⁷⁷ (1999), mostraram que a penetração do peróxido de hidrogênio de produtos clareadores era diferente, mesmo que o produto tenha sido identificado possuindo a mesma concentração de peróxido de hidrogênio. Além disso, outras variações da técnica podem afetar a penetração de peróxido de hidrogênio, como o tempo de contato do gel, a pressão osmótica dos géis (Hanks et al.¹⁰² 1993), aplicação de calor durante o clareamento (Bowles e Ugwunei⁹ 1987) e dimensões da câmara pulpar (Moncada et al.⁶ 2013, Ozan⁷⁹ 2013).

Deve-se salientar ainda que estudos *in vitro* têm limitações devido a sua incapacidade para simular variáveis clínicas importantes. Em dentes vitais, a pressão do fluido pulpar é capaz de reduzir a difusão dos produtos químicos para o interior (Ghazali¹¹⁸ 2003), ao passo que a presença de microfraturas (Moncada et al.⁶ 2013, Ozan⁷⁹ 2013) pode aumentá-los. Dessa forma, a quantidade de peróxido de hidrogênio que atinge a polpa vital pode ser diferente da que foi medida *in vitro*.

Apesar da etiologia da sensibilidade dental decorrente do clareamento ainda não ser completamente esclarecida na literatura, os resultados deste estudo sugerem que a morte celular produzida pelo peróxido não seja um fator preponderante, uma vez que as concentrações de peróxido que atingem o tecido pulpar após uma sessão de clareamento são muito inferiores às necessárias para produzir dano significativo. Infelizmente a metodologia deste estudo não permitiu avaliar outros tipos de danos celulares tampouco inflamação do tecido pulpar e produção de mediadores químicos produzidos pelo peróxido (Chung et al.¹¹⁹ 2013) e que podem estar envolvidos na sensibilidade dental. Portanto, outros estudos devem ser realizados a fim de esclarecer quais alterações celulares podem ser causadas em contato com o agente clareador e sua relação com a sensibilidade dental.

7 CONCLUSÕES

O peróxido de hidrogênio foi detectado na câmara pulpar de todos os dentes submetidos ao clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35%, independentemente da ativação da luz, entretanto maiores concentrações de peróxido de hidrogênio foram encontradas em dentes com restaurações profundas. No entanto, a quantidade de peróxido de hidrogênio que alcançou a câmara pulpar não afetou a viabilidade celular nos ensaios citotóxicos utilizando uma linhagem celular de fibroblastos.

REFERÊNCIAS*

1. Gurgan S, Cakir FY, Yazici E. Different light-activated in-office bleaching systems: a clinical evaluation. *Lasers Med Sci.* 2010;25(6):817-22.
2. Torres CR, Barcellos DC, Batista GR, Borges AB, Cassiano KV, Pucci CR. Assessment of the effectiveness of light-emitting diode and diode laser hybrid light sources to intensify dental bleaching treatment. *Acta Odontol Scand.* 2011;69(3):176-81.
3. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. *Dent Mater.* 2007;23(5):586-96.
4. Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araujo 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.
5. Nutter BJ, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy of light activated in-surgery whitening versus in-surgery whitening without light activation. *J Dent.* 2013;19(13):76-6.
6. Moncada G, Sepulveda D, Elphick K, Contente M, Estay J, Bahamondes V, et al. Effects of Light Activation, Agent Concentration, and Tooth Thickness on Dental Sensitivity After Bleaching. *Oper Dent.* 2013;38(5):467-76.
7. Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent.* 2012;40(Suppl 2):25-33.
8. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004;30(1):45-50.
9. Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987;13(8):375-7.

* De acordo com as normas do programa de Mestrado em Odontologia da UEPG, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992;18(7):315-7.
11. Gokay O, Yilmaz F, Akin S, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000;26(2):92-4.
12. Gokay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000;27(5):428-31.
13. Camargo SE, Cardoso PE, Valera MC, de Araujo MA, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent.* 2009;4(1):82-8.
14. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007;33(9):1074-7.
15. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004;37(2):120-4.
16. Bowles WH, Thompson LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986;12(3):108-12.
17. Lima AF, Ribeiro AP, Soares DG, Sacono NT, Hebling J, de Souza Costa CA. Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(5):1319-25.
18. 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.* 2012;17(8):1901-9.
19. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J.* 2009;42(6):516-24.
20. 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.

21. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2012;25(4):199-204.

22. Basting R, Amaral F, Franca F, Florio F. Clinical Comparative Study of the Effectiveness of and Tooth Sensitivity to 10% and 20% Carbamide Peroxide Home-use and 35% and 38% Hydrogen Peroxide In-office Bleaching Materials Containing Desensitizing Agents. *Oper Dent.* 2012;37(5):464-73.

23. Martin J, Fernandez E, Bahamondes V, Werner A, Elphick K, Oliveira OB, Jr., et al. Dentin hypersensitivity after teeth bleaching with in-office systems. Randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2013;26(1):10-4.

24. Bonafe 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.

25. 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.

26. Mehu M, Dunbar RI. Relationship between smiling and laughter in humans (*Homo sapiens*): testing the power asymmetry hypothesis. *Folia Primatol (Basel).* 2008;79(5):269-80.

27. Hess U, Beaupré MG, Cheung N, Ceia C. Who to whom and why—cultural differences and similarities in the function of smiles. An empirical reflection on the smile. 2002;4:187.

28. Krumhuber E, Manstead AS, Cosker D, Marshall D, Rosin PL. Effects of dynamic attributes of smiles in human and synthetic faces: A simulated job interview setting. *J Nonverbal Behav.* 2009;33(1):1-15.

29. Godoy R, Reyes-García V, Huanca T, Tanner S, Leonard WR, McDade T, et al. Do smiles have a face value? Panel evidence from Amazonian Indians. *J Econ Psychol.* 2005;26(4):469-90.

30. Houser ML, Horan SM, Furler LA. Predicting relational outcomes: An investigation of thin slice judgments in speed dating. *Human Communication.* 2007;10(2):69-81.

31. Moore MM. Nonverbal courtship patterns in women: Context and consequences. *Ethol Sociobiol.* 1985;6(4):237-47.

32. Hendrie CA, Brewer G. Evidence to suggest that teeth act as human ornament displays signalling mate quality. *PLoS One*. 2012;7(7):e42178.
33. Akarslan ZZ, Sadik B, Erten H, Karabulut E. Dental esthetic satisfaction, received and desired dental treatments for improvement of esthetics. *Indian J Dent Res*. 2009;20(2):195-200.
34. Schmidt CJ, Tatum SA. Cosmetic dentistry. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;14(4):254-9.
35. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent*. 2004;32(Suppl 1):3-12.
36. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*. 2001;190(6):309-16.
37. Dunn JR. Dentist-prescribed home bleaching: current status. *Compend Contin Educ Dent*. 1998;19(8):760-4.
38. Kugel G, Ferreira S. The art and science of tooth whitening. *J Mass Dent Soc*. 2005;53(4):34-7.
39. Christensen GJ. The tooth-whitening revolution. *J Am Dent Assoc*. 2002;133(9):1277-9.
40. Kihn PW. Vital tooth whitening. *Dent Clin North Am*. 2007;51(2):319-31.
41. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent*. 2006;34(7):412-9.
42. Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and research. *J Am Dent Assoc*. 1997;128(Suppl):19-25.
43. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence Int*. 2008;39(8):645-59.
44. 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.

45. Severcan F, Gokduman K, Dogan A, Bolay S, Gokalp S. Effects of in-office and at-home bleaching on human enamel and dentin: an in vitro application of Fourier transform infrared study. *Appl Spectrosc*. 2008;62(11):1274-9.
46. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):292-304.
47. de la Pena VA, Raton ML. Randomized Clinical Trial on the Efficacy and Safety of Four Professional At-home Tooth Whitening Gels. *Oper Dent*. 2013;17.
48. Bizhang M, Chun YH, Damerau K, Singh P, Raab WH, Zimmer S. Comparative clinical study of the effectiveness of three different bleaching methods. *Oper Dent*. 2009;34(6):635-41.
49. Deliperi S, Bardwell DN, Papathanasiou A. Clinical evaluation of a combined in-office and take-home bleaching system. *J Am Dent Assoc*. 2004;135(5):628-34.
50. de Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML, Briso AL. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012;32:303-9.
51. Zekonis R, Matis BA, Cochran MA, Al Shetri SE, Eckert GJ, Carlson TJ. Clinical evaluation of in-office and at-home bleaching treatments. *Oper Dent*. 2003;28(2):114-21.
52. McCaslin AJ, Haywood VB, Potter BJ, Dickinson GL, Russell CM. Assessing dentin color changes from nightguard vital bleaching. *J Am Dent Assoc*. 1999;130(10):1485-90.
53. Dietschi D, Rossier S, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. *Quintessence Int*. 2006;37(7):515-26.
54. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent*. 2011;36(1):12-7.
55. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent*. 2004;32(4):295-9.

56. Reis A, Kossatz S, Martins G, Loguercio A. Efficacy of and Effect on Tooth Sensitivity of In-office Bleaching Gel Concentrations: A Randomized Clinical Trial. *Oper Dent*. 2013;38(4):386-93.
57. Giachetti L, Bertini F, Bambi C, Nieri M, Scaminaci Russo D. A randomized clinical trial comparing at-home and in-office tooth whitening techniques: A nine-month follow-up. *J Am Dent Assoc*. 2010;141(11):1357-64.
58. Auschill TM, Schneider-Del Savio T, Hellwig E, Arweiler NB. Randomized clinical trial of the efficacy, tolerability, and long-term color stability of two bleaching techniques: 18-month follow-up. *Quintessence Int*. 2012;43(8):683-94.
59. Mondelli RF, Azevedo JF, Francisconi AC, Almeida CM, Ishikiriama SK. Comparative clinical study of the effectiveness of different dental bleaching methods - two year follow-up. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(4):435-43.
60. Sulieman MA. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol*. 2000;48:148-69.
61. Kashima-Tanaka M, Tsujimoto Y, Kawamoto K, Senda N, Ito K, Yamazaki M. Generation of free radicals and/or active oxygen by light or laser irradiation of hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. *J Endod*. 2003;29(2):141-3.
62. Pohjola RM, Browning WD, Hackman ST, Myers ML, Downey MC. Sensitivity and tooth whitening agents. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(2):85-91.
63. da Costa JB, McPharlin R, Hilton T, Ferracane JI, Wang M. Comparison of two at-home whitening products of similar peroxide concentration and different delivery methods. *Oper Dent*. 2012;37(4):333-9.
64. Li Y. Safety controversies in tooth bleaching. *Dent Clin North Am*. 2011;55(2):255-63, viii.
65. Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc*. 1997;128(Suppl):41-44.
66. 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 Restor Dent*. 2007;19(6):355-64.

67. 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.
68. Ontiveros JC, Paravina RD. Color change of vital teeth exposed to bleaching performed with and without supplementary light. *J Dent.* 2009;37(11):840-7.
69. Klaric E, Rakic M, Sever I, Tarle Z. Temperature rise during experimental light-activated bleaching. *Lasers Med Sci.* 2013;19.
70. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *Natl J Maxillofac Surg.* 2012;3(2):124-32.
71. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19:515-30.
72. Sari T, Celik G, Usumez A. Temperature rise in pulp and gel during laser-activated bleaching: in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013;21:21.
73. Bharti R, Wadhwani K. Spectrophotometric evaluation of peroxide penetration into the pulp chamber from whitening strips and gel: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2013;16(2):131-4.
74. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004;30(12):887-9.
75. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005;38(8):516-20.
76. Thitinanthapan W, Satamanont P, Vongsavan N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent.* 1999;11(5):259-64.
77. Briso A, Lima A, Goncalves R, Gallinari M, Santos PD. Transenamel and Transdental Penetration of Hydrogen Peroxide Applied to Cracked or Microabrasioned Enamel. *Oper Dent.* 2013;26:26.
78. Ozcan M, Abidin S, Sipahi C. Bleaching induced tooth sensitivity: do the existing enamel craze lines increase sensitivity? A clinical study. *Odontology.* 2013;12:12.
79. de Almeida LC, Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam.* 2012;25(1):3-8.

80. Haywood VB. Treating sensitivity during tooth whitening. *Compend Contin Educ Dent*. 2005;26(9 Suppl 3):11-20.
81. 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.
82. Kwon SR, Li Y, Oyoyo U, Aprecio RM. Dynamic model of hydrogen peroxide diffusion kinetics into the pulp cavity. *J Contemp Dent Pract*. 2012;13(4):440-5.
83. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci*. 2011;53(3):273-82.
84. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
85. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J*. 2009;20(4):267-74.
86. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, et al. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 2013;39:1576-80.
87. Li Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food Chem Toxicol*. 1996;34(9):887-904.
88. Floyd RA. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. *J Am Dent Assoc*. 1997;128(Suppl):37-40.
89. Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci*. 2003;92(2):166-70.
90. Anderson DG, Chiego DJ, Jr., Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999;25(4):247-50.
91. Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, et al. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod*. 2008;34(8):983-9.

92. de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(2):907-12.
93. Fernandez MR, Carvalho RV, Ogliari FA, Beira FA, Etges A, Bueno M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. *Int Endod J.* 2010;43(2):102-8.
94. Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(1):21-5.
95. Mendham J, Afonso JC. Vogel: análise química quantitativa: Livros Tecnicos e Científicos; 2002.
96. Mottola HA, Simpson BE, Gorin G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Analytical Chemistry.* 1970;42(3):410-11.
97. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986 Nov 6;93(2):157-65.
98. Borenfreund E, Puerner J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth.* 1985;9(1):7-9.
99. Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):453-62.
100. Haywood VB. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int.* 1992;23(7):471-88.
101. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J.* 2006;200(7):371-6.
102. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993;72(5):931-8.

103. Kwon SR, Oyoyo U, Li Y. Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: An in vitro study. *J Dent*. 2013;41(Suppl 3):39-45.
104. Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. *Br Dent J*. 1947;83(10):205-14.
105. Palo RM, Bonetti-Filho I, Valera MC, Camargo CH, Camargo S, Moura-Netto C, Pameijer C. Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide. *Oper Dent*. 2012;37(6):660-4.
106. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives--in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(1):53-60.
107. Franz A, Konig F, Skolka A, Sperr W, Bauer P, Lucas T, et al. Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area. *Dent Mater*. 2007;23(11):1438-46.
108. Wiegand A, Caspar C, Becker K, Werner C, Attin T. [In vitro cytotoxicity of different self-etching dental adhesive systems]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2006;116(6):614-21.
109. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol*. 2005;25(2):101-8.
110. Moodley D, Grobler SR, Olivler A. Cytotoxicity of a dentine bonding agent on four different cell-lines. *Sadj*. 2005;60(6):234-6.
111. Grobler SR, Olivier A, Moodley D, van WKTW. Cytotoxicity of two concentrations of a dentine bonding agent on mouse 3T3 and human pulp fibroblast cell-lines. *Sadj*. 2004;59(9):368-70, 72.
112. Grobler SR, Oliver A, Moodley D, Van Wyk Kotze TJ. Cytotoxicity of recent dentin bonding agents on mouse fibroblast cells. *Quintessence Int*. 2008;39(6):511-6.
113. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22(Suppl 2):6-11.

114. Ausiello P, Cassese A, Miele C, Beguinot F, Garcia-Godoy F, Di Jeso B, et al. Cytotoxicity of dental resin composites: an in vitro evaluation. *J Appl Toxicol*. 2013;33(6):451-7.
115. Aren G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence Int*. 2003;34(5):361-5.
116. Soares DG, Ribeiro AP, Lima AF, Sacono NT, Hebling J, Costa CA. Effect of fluoride-treated enamel on indirect cytotoxicity of a 16% carbamide peroxide bleaching gel to pulp cells. *Braz Dent J*. 2013;24(2):121-7.
117. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(4):70-6.
118. Ghazali FB. Permeability of dentine. *Malays J Med Sci*. 2003;10(1):27-36.
119. Chung G, Jung SJ, Oh SB. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res* 2013; 92: 948-55.

APÊNDICE A

Representações gráficas dos ensaios de viabilidade celular

Figura 8 – Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 48 h da exposição, com o ensaio MTT. *** Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 9 – Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações de PH em células 3T3/NIH após 72 h da exposição, com o ensaio MTT. *** Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

ANEXO A

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa. COEP - UEPG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação da penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar e seu efeito citotóxico em células MDPC-23 após clareamento com ou sem ativação por luz em dentes com restaurações

Pesquisador: Alessandra Reis

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13872013.0.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 256.700

Data da Relatoria: 25/04/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta todos os itens necessários a sua avaliação ética.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é a quantificação da penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar e seu efeito citotóxico em células MDPC-23 após clareamento com ou sem ativação por luz em dentes com restaurações

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos serão adequadamente minimizados com o uso de EPIs.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está corretamente delineada e cumpre os requisitos do ponto de vista ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Corretos. A declaração do banco de dentes foi anexada.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: **CEP:** 84.030-900

UF: PR **Município:** PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: seccoop@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

PONTA GROSSA, 26 de Abril de 2013

Assinador por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: **CEP:** 84.030-900

UF: PR **Município:** PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: seccoop@uepg.br