



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

BRUNA GUERRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE CLAREADORA,
PROPRIEDADES FÍSICAS DO ESMALTE E CITOTOXICIDADE
DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA ASSOCIADO AO
ARISTOFLEX AVC**

**EVALUATION OF BLEACHING EFFECTIVENESS,
PHYSICAL PROPERTIES OF ENAMEL AND
CYTOTOXICITY OF CARBAMIDE PEROXIDE ASSOCIATED
WITH ARISTOFLEX AVC**

Piracicaba

2020

BRUNA GUERRA SILVA

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE CLAREADORA, PROPRIEDADES FÍSICAS DO ESMALTE E DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA ASSOCIADO AO ARISTOFLEX AVC.

EVALUATION OF BLEACHING EFFECTIVENESS, PHYSICAL PROPERTIES OF ENAMEL AND CYTOTOXICITY OF CARBAMIDE PEROXIDE ASSOCIATED WITH ARISTOFLEX AVC

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica, na Área de Dentística.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinical Dentistry, in Restorative Dentistry area.

Orientadora: Prof.a. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima

Este trabalho corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Bruna Guerra Silva e orientada pela Profa. Débora Alves Nunes Leite Lima.

Piracicaba

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38a Silva, Bruna Guerra, 1992-
Avaliação da efetividade clareadora, propriedades físicas do esmalte e citotoxicidade do peróxido de carbamida associado ao Aristoflex AVC / Bruna Guerra Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Débora Alves Nunes Leite Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Peróxido de carbamida. 2. Dentes - Clareamento. 3. Espessantes. 4. Materiais biocompatíveis. I. Lima, Débora Alves Nunes Leite, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of bleaching effectiveness, physical properties of enamel and cytotoxicity of carbamide peroxide associated with Aristoflex AVC

Palavras-chave em inglês:

Carbamide peroxide

Teeth - Bleaching

Thickeners

Biocompatible materials

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Débora Alves Nunes Leite Lima [Orientador]

Fernanda Miori Pascon

Thayla Hellen Nunes Gouveia

Giselle Maria Marchi Baron

Vanessa Castro Pestana da Silveira Bueno

Data de defesa: 17-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2690-6906>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0295055154543107>

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2020, considerou a candidata BRUNA GUERRA SILVA aprovada.

PROF^a. DR^a. DÉBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

PROF^a. DR^a. VANESSA CASTRO PESTANA DA SILVEIRA BUENO

PROF^a. DR^a. THAYLA HELLEN NUNES GOUVEIA

PROF^a. DR^a. GISELLE MARIA MARCHI BARON

PROF^a. DR^a. FERNANDA MIORI PASCON

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedicatória

Á Deus, que é o meu guia e minha proteção em todos os momentos da minha vida.

Á minha mãe, que é a minha força e fonte de inspiração diária, o meu porto seguro e certamente a pessoa que mais torce pelas minhas vitórias.

Agradecimento Especial

À minha orientadora, professora Débora Alves Nunes Leite Lima, por todos esses anos de orientação. Agradeço imensamente pela oportunidade de ser sua orientada, pelas palavras de incentivo, pela amizade e por agregar tanto em minha vida. Você é uma inspiração para mim.

Agradecimentos

À minha família:

Ao meu pai, pelo carinho e atenção em todos os momentos da minha vida.

As minhas queridas irmãs: Aline e Camila, por serem em todas as circunstâncias minhas cúmplices e minhas melhores amigas. Agradeço por poder contar com vocês todo o tempo. Tenho muito orgulho das mulheres que vocês se tornaram, vocês me inspiram a ser cada dia melhor. Amo vocês eternamente.

Ao Sérgio por nunca medir esforços para me ajudar e me ver sorrir. Deus não poderia ter colocado um Padrasto melhor em nossas vidas.

Agradeço, também:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP-UNICAMP e todos os professores com quem eu tive prazer e a honra em ter aprendido tanto em todos esses anos.

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

À Coordenadoria Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

Aos professores **Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, Dra. Cristiane Rumi Fujiwara Yanikian e Dr. Waldemir Francisco Vieira Júnior**, pela competência e zelo com que avaliaram meu trabalho no exame de qualificação.

Às minhas amigas: Ana Eliza, Marília, Heloisa e Marina, que nesses anos me provaram que verdadeiras amizades permanecem independente da distância.

À minha alma gêmea amiga **Renata Pereira**: Agradeço por se fazer presente em todos os momentos da minha vida e por nunca medir esforços para me ajudar. Que sorte a minha por ter você como amiga.

Aos amigos da turma do doutorado, pelo companheirismo e amizade.

Aos voluntários de pesquisa, por terem participado e empenhando para que tudo desse certo.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Este estudo, dividido em duas etapas, teve como objetivo avaliar os efeitos do peróxido de carbamida 10% (PC) associado ao espessantes carbopol (PCc) e aristoflex (PCa) na citotoxicidade às células fibroblásticas gengivais humana (FGH), e nas propriedades físicas do esmalte dental, quanto a microdureza, rugosidade e cor. Na primeira etapa, *in vitro*, as análises de citotoxicidade foram realizadas, por meio de teste de proliferação MTT - Vybrant® em Fibroblastos Gengivais Humanos (FGH). Já na segunda etapa, *in situ*, foram utilizados 144 blocos bovinos de esmalte e dentina, divididos em sete grupos (n=12), sendo 72 blocos para as análises de microdureza e 72 blocos para as análises de rugosidade e cor, fixados em dispositivos intrabucais palatinos utilizados por 12 voluntários (6 homens e 6 mulheres). As amostras foram manchadas com chá preto por 6 dias e em seguida foi realizada a estabilização de cor das amostras por 14 dias. Previamente ao início da aplicação dos géis, as amostras permaneceram por 24 horas na cavidade bucal para a formação da película adquirida e em seguida as mesmas foram submetidas ao tratamento por 4 horas diárias, durante 14 dias, com géis experimentais: Aristoflex (A), Carbopol (C), PCc, PCa, PC e gel comercial: Whiteness Perfect 10% - FGM (PCwp). Os dados de citotoxicidade e as análises de cor (ΔE , ΔE_{00}) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey; os dados de microdureza e rugosidade foram submetidos a modelos mistos para medidas repetidas no tempo e teste de Tukey; e a análise de cor (ΔWID) foi submetida ao teste de Kruskal Wallis e Dunn, sendo que em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística para os diferentes espessantes em relação a citotoxicidade e viabilidade celular. Para microdureza os grupos de géis experimentais contendo carbopol apresentaram menores valores e para rugosidade os grupos contendo PC apresentou maiores valores. Em relação a cor, não houve diferença estatística entre os grupos contendo PC. Assim, pode-se concluir que a combinação de 10% de peróxido de carbamida com aristoflex pode ser considerada uma alternativa aos produtos de branqueamento contendo carbopol comercialmente disponíveis.

Palavras chave: Peróxido de Carbamida, Clareamento Dental, Espessante, Materiais Biocompatíveis.

ABSTRACT

This study, divided into two experiments, aimed to evaluate the effects of 10% carbamide peroxide (CP) associated with carbopol (CPc) and aristoflex (CPa) thickeners on cytotoxicity to human gingival fibroblasts cells (HGF), and on physical properties of dental enamel, in terms of microhardness, roughness and color. In the first experiment, which was in vitro made, cytotoxicity analyses were performed by MTT - Vybrant® proliferation test in Human Gingival Fibroblasts (HGF). In the second experiment, which was in situ made, 144 bovine enamel and dentin blocks were used, divided into seven groups (n = 12), from which 72 blocks were used for microhardness and 72 blocks for roughness and color analyses, fixed on palatal intraoral devices used by 12 volunteers (6 men and 6 women). Samples were stained with black tea for 6 days and then the color stabilization of the samples was carried out for 14 days. Prior to start applying the gels, the samples remained for 24 hours in the oral cavity for the formation of the acquired film. Then, they were submitted to the daily treatment during 4 hours, for 14 days, with the following experimental gels: Aristoflex (A), Carbopol (C), CPc, CPa, CP, Whiteness Perfect 10% [FGM (CP + C)] and without treatment (control group). Cytotoxicity data and color analyses (ΔE , ΔE_{00}) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test; microhardness and roughness data were submitted to mixed models for repeated measures in time and Tukey-Kramer test; and color analysis (ΔWID) was submitted to Kruskal Wallis and Dunn test. In all analyses, 5% of significance level was considered. There was no statistical difference for the different thickeners regarding cytotoxicity and cell viability. For Microhardness, groups of experimental gels containing carbopol presented lower values, and for roughness the groups containing CP showed higher values. Regarding color, there was no statistical difference between groups containing CP. Thus, one may conclude that combination of 10% carbamide peroxide with aristoflex may be considered as an alternative to commercially available carbopol-containing bleaching products.

Keywords: Carbamide Peroxide, Dental Bleaching, Thickeners, Biocompatible Materials.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. ARTIGO: Effect of different bleaching gels thickeners on cytotoxicity with human gingival fibroblasts and enamel physical properties: an <i>in situ</i> study	14
3. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS*	34
Apêndice 1 - Metodologia detalhada	37
ANEXOS	49
ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética	49
ANEXO 2 - Comprovante de submissão	50
ANEXO 3 - Verificação de originalidade e prevenção de plágio	51

1.INTRODUÇÃO

O clareamento dental tem se destacado, por ser um procedimento eficaz, minimamente invasivo e seguro (Nutter et al., 2013; Corcodel et al, 2016). No entanto, o mesmo pode promover alterações na superfície e morfologia dos tecidos dentais, como a diminuição da microdureza do esmalte e o aumento da rugosidade (Zeczowski et al., 2015; Sa et al., 2013; Basting et al., 2005; Vieira-Junior WF et. al., 2019).

O clareamento de dentes com vitalidade pulpar pode ser realizado por meio de três técnicas: clareamento de consultório, que é realizado com altas concentrações de peróxido de hidrogênio; clareamento caseiro, realizado com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio ou peróxido de carbamida (Bernardon et al., 2010; Abouassi et al., 2011; Basting et al., 2012; Lima et al., 2014), sendo o peróxido de carbamida a 10% o agente clareador considerado padrão ouro pela ADA (American Dental Association, 2012); e a técnica combinada, que associa o clareamento de consultório com o caseiro, utilizando tanto géis de alta concentração quanto de baixa concentração. Independente da técnica utilizada, o processo clareador ocorre através da interação dos géis de peróxido de hidrogênio e/ou seu precursor, o peróxido de carbamida, na superfície do esmalte dental (Kwon SR et al, 2015).

Acredita-se que o mecanismo de ação dos géis clareadores, em geral, se dá pela oxidação das moléculas cromógenas por um radical livre de oxigênio (Eimar et al., 2012), que é liberado durante a dissociação do peróxido de hidrogênio. Devido ao seu baixo peso molecular, o peróxido de hidrogênio se difunde profundamente pelo esmalte, alcançando a dentina (Lima et al., 2011), onde se degrada liberando os radicais livres de oxigênio que interagem com os pigmentos que causam coloração nos dentes. Esses pigmentos presentes na estrutura dental são cadeias que possuem alto peso molecular e que através de reações de oxirredução são quebradas, decompondo-se em moléculas menores e menos pigmentadas (Haywood & Heymann, 1991; Kawamoto & Tsujimoto, 2004). Tal alteração no tamanho e pigmentação dessas moléculas pode modificar a absorção de luz do espectro visível pela molécula, de maior para menor comprimento de onda, resultando em compostos mais claros (Kwon & Wertz, 2015).

Os radicais livres de oxigênio liberados durante a dissociação do peróxido de hidrogênio não são específicos, são altamente instáveis e podem reagir não só com as moléculas

cromógenas, os anéis de carbono pigmentado, como também com as moléculas inorgânicas e orgânicas dos tecidos dentais para atingir estabilidade (Joiner, 2006; Kawamoto & Tsujimoto, 2004; Basting et al., 2005). Sendo assim, essa interação do peróxido de hidrogênio com as moléculas inorgânicas e orgânicas dos tecidos dentais podem levar a alterações na morfologia superficial do esmalte dental e redução da microdureza após o tratamento clareador. No entanto, estudos vêm demonstrando que essas alterações podem estar associadas a outros constituintes presentes na formulação do produto clareador, como os espessantes, e não somente com os radicais livres do peróxido de hidrogênio (Basting et al., 2003; Gouveia et al., 2016).

Os espessantes têm como função aumentar a viscosidade, ou seja, dar a consistência de gel ao produto, permitindo assim uma maior retenção do mesmo na superfície dental e, conseqüentemente, evitar a ingestão do produto clareador pelo paciente durante a permanência do mesmo na cavidade bucal (Oliveira et al., 2007), além disso proporciona um tempo prolongado para a liberação de íons de oxigênio (McCracken e Haywood, 1996; Rodrigues et al., 2007).

Atualmente, o espessante comumente utilizado na formulação dos géis clareadores é o carbopol, um polímero carboxipolimetileno, aniônico, de natureza ácida, derivado de um ácido carboxílico. Relatos na literatura demonstram que o carbopol pode ser capaz de reduzir a microdureza do esmalte, devido a sua elevada capacidade de se ligar ao cálcio (Basting et al., 2005; Silva et al., 2018), levando a uma inibição da incorporação dos minerais presentes na saliva (Ávila DM et al., 2018).

Sendo assim, esse estudo se propõe a desenvolver um gel clareador contendo o espessante Copolímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona (Aristoflex® AVC). Este espessante é um polímero sintético pré-neutralizado, que permite a formação de géis cristalinos com boa consistência. Uma característica relevante desse espessante é ser formador de gel catiônico. Na indústria farmacêutica ele é utilizado como agente de consistência para emulsões leves e estabilizante de formulações. Na cavidade bucal, ele tem sido utilizado na confecção de dentifrícios (Golding et. al., 2014), nas concentrações de até 1%, não apresentando riscos toxicológicos conhecidos a saúde humana.

E, por não ser reconhecida a citotoxicidade do Copolímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona (Aristoflex®) à células da mucosa bucal nas concentrações acima de 1%, teste laboratoriais para a avaliação da citotoxicidade à mesma são

necessários, como testes de citotoxicidade em células de fibroblasto gengival humano (FGH) (Gutiérrez-Venegas G et al., 2015; Dabbous MK et al., 1995).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade e as alterações físicas do esmalte dental (cor, rugosidade e microdureza) quando utilizado um gel experimental de peróxido de carbamida 10% associado ao Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona (Aristoflex).

2. ARTIGO

Effect of different bleaching gels thickeners on cytotoxicity with human gingival fibroblasts and enamel physical properties: an *in situ* study

Artigo submetido ao periódico Journal of Dentistry (Anexo 2)

Bruna Guerra Silva, Renata Pereira, Jonny Burga Sánchez, Flávio Henrique Baggio Aguiar, Débora Alves Nunes Leite Lima

ABSTRACT

Objectives: To evaluate *in vitro* the effects of carbamide peroxide 10% (CP) associated with Carbopol (CPc) and Aristoflex (CPa) thickeners on cytotoxicity with human gingival fibroblasts (HGF) cells and to evaluate *in situ* the physical properties of dental enamel, in terms of microhardness, roughness and color. **Methodology:** Cytotoxicity analysis was performed using MTT - Vybrant® proliferation test with HGnF. For *in situ* stage, a total of 144 bovine enamel/dentin blocks were used, divided into seven groups (n=12), of which 72 blocks were used for microhardness analysis and 72 blocks for roughness and color analyses. Samples were stained with black tea, fixed in intraoral palatal devices and submitted to bleaching treatments for 4 hours, during 14 days, with Carbopol (C), Aristoflex (A), CPc, CPa, CP, Whiteness Perfect 10% - FGM (PCwp). Microhardness, roughness and color analyses were performed using a microdurometer, a rugosimeter and a spectrophotometer, respectively. All analyses were performed before starting and 24 hours after end of the treatment. **Results:** There was no statistical difference for the different thickeners regarding cytotoxicity. For microhardness, groups of experimental gels containing Carbopol presented lower values. For roughness, groups containing CP presented higher values. Regarding color, all groups that contained CP in their formulation showed a color change above the limits of acceptability and perceptibility, with no difference between them. **Conclusion:** Association of CP 10% with aristoflex allowed effective bleaching and less damage to the tooth surface when compared to carbopol.

Keywords: Aesthetics; At-home bleaching; Thickeners; Cytotoxicity; Aristoflex; Carbopol.

Clinical Significance: The substitution of carbopol for aristoflex does not interfere with the effectiveness of bleaching treatment. Aristoflex represents a promising agent associated with carbamide peroxide to maintain the physical properties of dental enamel after bleaching.

INTRODUCTION

Among bleaching gels, 10% carbamide peroxide is the one regarded the gold standard in Certification of Dental Products by ADA (American Dental Association, 2012) [1]. Although bleaching treatment is considered safe and minimally invasive, a major concern are the adverse effects it can cause in dental tissues, such as changes in microhardness and roughness [2,3], in addition to cytotoxicity to gingival tissues [4].

The action mechanism involved in tooth bleaching is related to oxidizing property of hydrogen peroxide and its precursor, carbamide peroxide. These radicals act as an oxidizing agent, breaking chromogenic molecules and removing by diffusion, pigments of enamel and dentin structure, promoting reduction of light absorption, what makes the tooth lighter [5-7].

Carbamide peroxide-based bleaching gels usually present in their formulations carbopol (*carboxypolymethylene*) thickener, an acidic and ionic polymer, derived from a carboxylic acid. The function of carbopol is to increase the viscosity of bleaching gels [8,9], thus allowing greater retention of the gel on dental surface. Previous studies in literature show that carbopol may be able to reduce microhardness of enamel, due to its high ability to bind to calcium [10,11], leading to inhibition of saliva minerals incorporation by the dental structure.

Thus, this study proposed to evaluate a bleaching gel with a thickener based on sulfonic acryloyldimethyltaurate acid copolymer and vinylpyrrolidone (Aristoflex), a pre-neutralized synthetic polymer, previously tested in an *in vitro* study [12], which allows the formation of crystalline gels with proper consistency. The most relevant characteristics of this thickener are: stability in acidic pH, cationic behavior, and action as inert thickener agent inside formulations. In pharmaceutical industry, it is used as a gelling agent or thickener in formulations for personal care. Additionally, it is also investigated as a compound for oral hygiene products, such as whitening toothpastes, mouth rinses and gels [13-15], not presenting toxicological risks to human health. Therefore, this study evaluated the *in vitro* cytotoxicity and *in situ* physical alterations of dental enamel, such as color, roughness and microhardness, when using an experimental gel containing carbamide peroxide 10% associated with sulfonic acryloyldimethyltaurate acid copolymer and vinylpyrrolidone (Aristoflex).

The null hypotheses tested were: 1) Aristoflex AVC would not be toxic to human gingival fibroblasts (HGF) cells; 2) 10% carbamide peroxide gel containing Aristoflex would not interfere with the bleaching efficacy, enamel microhardness and roughness.

METHODOLOGY

Cytotoxicity Analysis:

Different concentrations of dental whitening gel solutions were formulated based on initial cytotoxicity tests. Firstly, gels pH was assessed in triplicate using a digital pH meter (Phs-3b, Phtek, Sao Paulo, SP, Brazil). For this purpose, pH meter (Table 1), composed of a pH electrode and a temperature sensor connected to an ion analyzer, was immersed in approximately 3g of each gel.

For cytotoxicity test, human gingival fibroblasts (HGF), established from a previous study [16], were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with antibiotics (10000 U penicillin and 10 mg/mL streptomycin - Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil) and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. After reaching around 80% confluence, the cells were washed with 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific) in order to detach them. Detached cells were then centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant was discarded; new medium was added and mixed to the cells, which were plated in 96 well cell culture plates (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA).

Cells were exposed to different concentrations of gel formulations, with final concentration in the culture medium, as follows:

1. Carbamide Peroxide + Carbopol: 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL;
2. Carbamide Peroxide + Aristoflex: 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL;
3. FGM (Carbamide Peroxide + Carbopol): 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL;
4. Aristoflex gel vehicle: 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL;
5. Carbopol gel vehicle: 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,63 mg/mL; 0,31 mg/mL;
6. Triton X-100 0.1% (Sigma-Aldric): negative control group;
7. DMEM: positive control group.

Table 1. Manufacturers, basic composition and pH of products

Product	Manufacturer	Composition*	pH
Aristoflex (A)		Aristoflex AVC, nipagin, glycerin, amp-95 and deionized water	4,95
Carbopol (C)		Carbopol 940, nipagin, glycerin, amp-95 and deionized water.	3,72
Carbamide Peroxide 10% + carbopol 940 (CPc)	Drogal Manipulations (Piracicaba, Brazil)	Carbamide Peroxide 10%, sodium fluoride, carbopol 940, nipagin, glycerin, amp-95 and deionized water	4,56
Carbamide Peroxide 10% + aristoflex AVC (CPa)		Carbamide Peroxide 10%, sodium fluoride, Aristoflex AVC, nipagin, glycerin, amp-95 and deionized water	6,97
Carbamide Peroxide 10% (CP)		Carbamide Peroxide 10% and deionized water	7,74
Whitess Perfect 10% (CPwp)	FGM (Santa Catarina, Brazil)	Carbamide Peroxide 10%, potassium nitrate, carbopol neutralized, sodium fluoride and deionized water	5,45

*MSDS data sheet.

Culture plates (n = 7) were incubated at 37°C for 4 hours (period of bleaching treatment). Upon completion of incubation, cytotoxicity was estimated by Vybrant® MTT cell proliferation assay (Thermo Fisher Scientific), an indirect method that determines cell viability and proliferation based on mitochondrial succinate dehydrogenase activity.

In living cells, MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], a yellow tetrazole salt, is reduced by succinate enzyme complex to Formazan [(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan], which precipitate as insoluble purple-gray crystals. The color intensity (optical density) of solution after crystal dissolution, as measured by a spectrophotometer, is considered the cell viability measurement.

Cell counts were performed in a Neubauer counting chamber. For this purpose, cells were seeded 24 hours prior to the start of the incubation with extracts, namely before end of 4 hours exposure of cells to gel formulations. For cytotoxicity evaluation, 100 µL of solution containing approximately 5×10^4 cells/mL were added to each well of the culture plates. Extracts from gel formulations were then added to the wells. Subsequently, liquids were aspirated and wells were gently washed twice with phosphate buffered saline (PBS pH 7.4, Gibco, Thermo Fisher Scientific). Finally, 200 µL of 0.3 mg/mL of MTT solution in DMEM were added to the wells. The plates were incubated for 3 h with 5% CO₂ at 37 °C. Subsequently, the wells were emptied and filled with 200 µL of ethanol. Absorbance was analyzed through a micro spectrophotometer (Asys UVM340, Biochrom, Cambridge, England) at 570 nm optical

density. All assays were performed in quadruplicate at two different times. Cytotoxicity was scored according to method described by da Silva et al. [17]

In situ stage:

This was a randomized double-blind in situ study.

Freshly extracted bovine incisors, without enamel stains or fractures, were selected and stored in 0.1% thymol at 4°C. Blocks of enamel/dentin were obtained with the following sizes: 4mm mesial-distal direction x 4 mm cervical-incisal direction x 2.5mm buccal-pulp direction, for color and roughness analysis, and 4mm mesial-distal direction x 2mm cervical-incisal direction x 2.5 mm buccal-pulp direction, for microhardness analysis. For blocks obtainment, the middle third of buccal surface was sectioned with a diamond disc (102 x 0.3 x 12.7 mm Isomet Diamond Wafering Blade, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) coupled to a metallographic cutter (Isomet 1000, Buehler). Decreasing-grit silicon carbide abrasive papers (#1200, #2500 and #p4000 - Isomet, Buehler) were used to abrade and plan enamel surface until achievement of 2.5mm height. Felts (Top-, Ram- and Supra-, Arotec, Cotia, São Paulo, SP, Brazil) associated with metallographic diamond pastes (6 µm - Top, 3 µm - Ram, 1 µm – Supra, Arotec) and lubricant (Arotec) were used to polish the samples. Between polishing steps and at the end of the procedure, all samples were sonicated for 10 minutes (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) to remove residual polishing debris.

After obtainment of samples, they were stained by immersion in black tea solution (Leão Junior SA, Curitiba, PR, Brazil). Tea solution was replaced every 24 hours. After 6 days of immersion, samples were kept in artificial saliva, which was also replaced every 24 hours, for 14 days in order to stabilize color [18]. Samples were then sterilized with ethylene oxide and stored in water at 4°C until use.

Twelve volunteers (six male and six female), aged 18-35 years, participated on the study after signing an informed consent form, with approval by the Ethics Committee (register number 79720117.1.0000.5418). All volunteers met the inclusion criteria: normal salivary flow, measured by sialometry, and absence of caries and/or periodontal disease. Exclusion criteria included patients who do not absorb any fluoride (through either fluoridated water intake, or use of fluoride toothpaste), patients who use orthodontic appliances, patients who use medication that interfere in salivary flow, smoking patients, and patients with fixed or removable prostheses.

An alginate (Hydrogum, Zhermack, Badia Polesine, RO, Italy) maxillary impression of each volunteer was obtained. Over the cast models, acrylic resin-based palatine devices were

confectioned with 6 cavities of 35 mm² wide and 3 mm deep. The teeth samples were embedded in the cavities and fixed to the palatal device with sticky wax (ASFER - Chemical Industry Ltda). In each cavities a color/roughness and a microhardness sample were fixed from each group and submitted to salivary exposure. That the groups were in different positions in each patient, due to the location of the salivary ducts of the parotid gland.

Palatal device remained in the volunteer's mouth for 24 hours for development of salivary pellicle, prior to beginning of the treatments. Volunteers were instructed to remove the device just for food and drink intake. In the meantime, samples should be kept moist, inside a water-filled apparatus, so that they did not suffer dehydration. After completion of 24 hours, the device was removed from the mouth and dried with absorbent paper. Teeth samples were then submitted to bleaching treatment. Each sample of the device was submitted to a single application of gel per day, during 14 days. For this purpose, the volunteers were instructed to apply the bleaching gels on enamel surfaces, and leave them acting for 4 hours at room temperature. During bleaching treatments, the device should be kept in the water-filler apparatus. It is worth to note that water should not reach the surface covered by gel. After completion of 4 hours, gels were removed with cotton swabs, washed in running water and dried with absorbent paper. The device should be then returned to the patient's mouth.

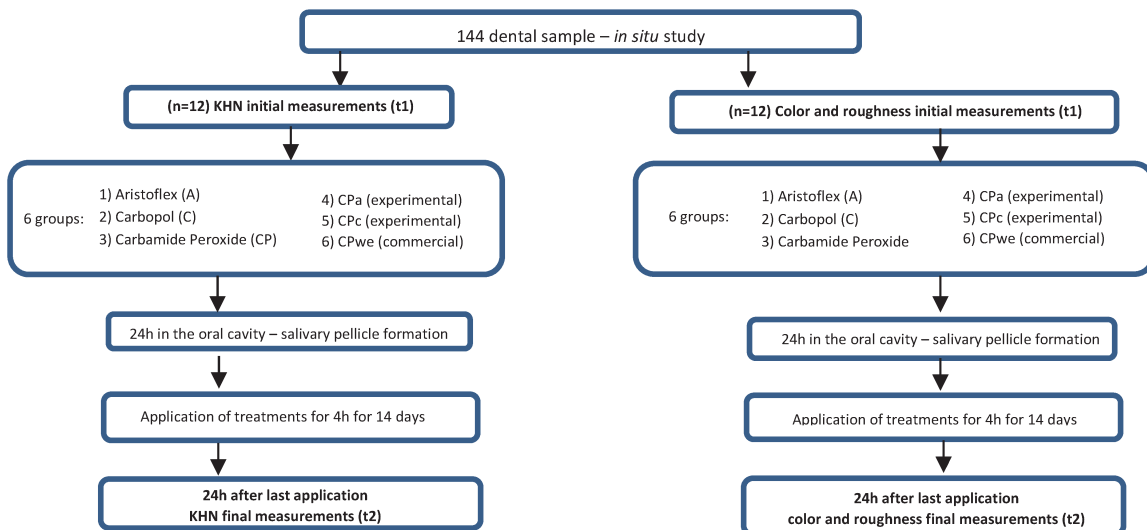


Figure 1. Flowchart of the experimental design *in situ*.

Microhardness Analysis (KHN):

Enamel surface microhardness analysis was performed using a Knoop microhardness tester (HMV 2000, Shimadzu, Kyoto, Japan). A Knoop diamond indenter applied a static load of 50 g for 5 seconds at the central region of the samples. Analyses were taken initially - after staining, and 24 hours after the bleaching treatments were finished (after bleaching) (Figure 1).

For each sample, the averages of five 100µm equidistant indentations were used in statistical analyses.

Roughness Analysis (Ra):

Surface roughness was evaluated through a roughness tester (Surftest 211, Mitutoyo, Suzano, SP Brazil) initially - after staining, and 24 hours after the bleaching treatments were finished (after bleaching) (Figure 1). Three equidistant directions were measured on the surface of each sample. Tester was set with cutoff point of 0.25 mm, reading length of 1.25 mm, load of 5 N and velocity of 0.1 mm/s. For each sample, the averages of three measurements were used in statistical analyses.

Color Analysis (ΔE^*_{ab} , ΔE_{00} , WI_D):

Color analysis was performed using a spectrophotometer (CM 700D, Minolta, Osaka, Japan) previously calibrated according to manufacturer's specifications. Samples were placed in a polytetrafluoroethylene-based device in ambient light condition (MiniMatcher MM-1, GTI Graphic Technology, Newburgh, NY, USA), in order to standardize the environment. Analyses were taken initially- after staining, and 24 after end of the treatment. Values of ΔE^*_{ab} , ΔE_{00} and Whiteness Index for Dentistry (WI_D) were calculated according to formulas:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_{LH}}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_{LH}}\right)}$$

$$WI_D = 0,511L^* - 2,324a^* - 1,100b^*$$

where ΔL^* , Δa^* and Δb^* represent the differences between times (initially and 24 hours after the bleaching treatments were finished (after bleaching) (Figure 1) for values of L, a and b, respectively. $\Delta L'$, $\Delta C'$ and $\Delta H'$ are the differences in light value (Light), chroma (Chroma) and hue (Hue), respectively, using CIE2000 metric. S_L , S_C and S_H are parameters for adjusting coordinate values as a function of variation in color difference. K_L , K_C and K_H are parameters for corrections regarding experimental conditions, and R_T is a parameter to consider the interaction between chroma and hue differences in blue region.

The following perceptibility and acceptability limits were considered [19, 20]:

- Delta Whiteness Index for Dentistry (ΔWI_D): 50%:50% perceptibility ($0.72 \Delta WI_D$); 50%:50% acceptability ($2.62 \Delta WI_D$)
- CIELAB and CIEDE2000: 50%:50% perceptibility ($1.2 \Delta E^*_{ab}$ and $0.8 \Delta E_{00}$) and 50%:50% acceptability ($2.7 \Delta E^*_{ab}$ and $1.8 \Delta E_{00}$).

Statistical Analyses:

Statistical analyses were performed using GraphPad® Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Shapiro-Wilk and Levene's tests were performed to check the normality and equality of variances.

Cytotoxicity data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. Microhardness and roughness data were analyzed by mixed models for repeated measures and Tukey-Kramer test. ΔE^*_{ab} and ΔE_{00} data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test. ΔWI_D was analyzed by non-parametric Kruskal Wallis and Dunn tests. Samples of each group were classified according to the perceptibility and acceptability limits, presented by Paravina et. al., 2015 and Pérez et. al., 2019. All analyzes considered at 5% significance level ($\alpha=0.05$).

RESULTS

Cytotoxicity:

Cytotoxicity results are shown in Figure 2. In the absence of carbamide peroxide, the carbopol and aristoflex gels showed cytotoxicity values above the IC50 in all concentrations used. However, from the 5mg / mL concentration, all groups that contained carbamide peroxide in their formulation showed cytotoxicity values below the IC50.

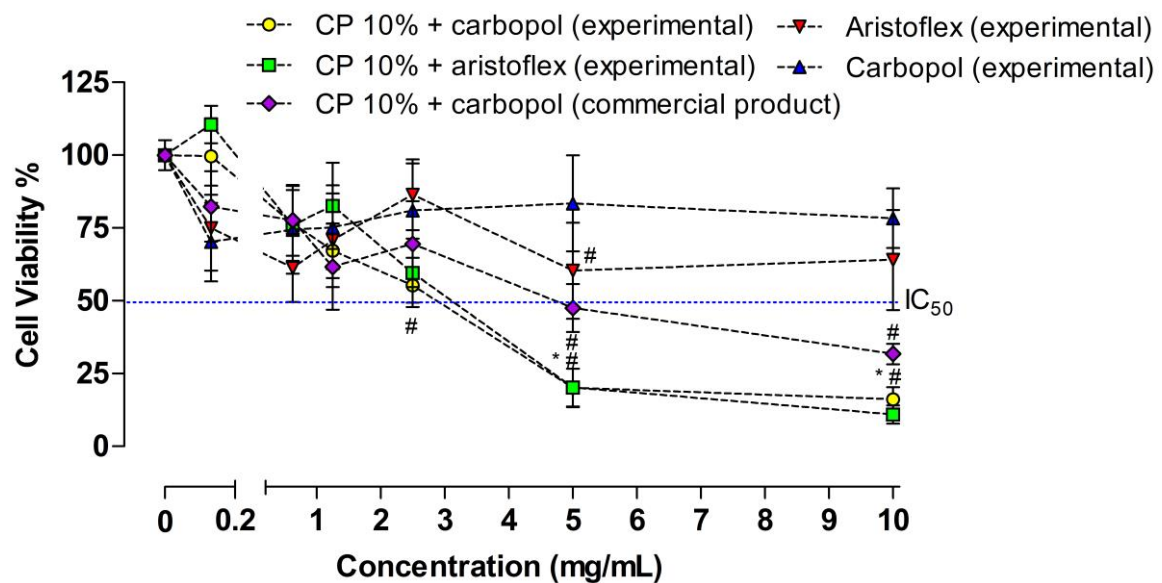


Figure 2. Cell viability according to gel concentration. # $p < 0.05$ compared to carbopol and * $p < 0.05$ compared CP 10% + carbopol (commercial product). IC_{50} : exposure concentration causing 50% cell death or inhibition of cell growth or other utilized toxicity metric.

Microhardness:

Table 2 shows a significant interaction between groups and times for microhardness ($p < 0.05$). At baseline there was no significant difference between groups ($p > 0.05$). The groups receiving carbopol (experimental) and Carbamide Peroxide 10% with carbopol (experimental) had a significant decrease in microhardness ($p < 0.05$). At final time (24 hours after end of treatment) the carbopol (experimental) group had lower microhardness than the others and the Carbamide Peroxide 10% with carbopol (experimental) group had significantly lower microhardness than most groups, but not significantly different from Carbamide Peroxide 10% with aristoflex. (experimental) ($p < 0.05$).

Table 2. Mean (standard deviation) microhardness (KHN) of enamel before and after being submitted to different bleaching treatments.

Group	Time	
	Initial	Final
Aristoflex (experimental)	293,87 (15,75) Aa	280,27 (25,53) Aa
Carbopol (experimental)	293,71 (16,43) Aa	151,00 (36,27) Bc
Carbamide Peroxide 10% with carbopol (experimental)	292,52 (16,56) Aa	250,28 (24,13) Bb
Carbamide Peroxide 10% with aristoflex (experimental)	292,97 (15,41) Aa	275,09 (36,28) Aab
Carbamide Peroxide 10% (experimental)	292,66 (14,94) Aa	285,85 (9,32) Aa
Carbamide Peroxide 10% with carbopol (commercial product - control group)	292,72 (15,21) Aa	280,60 (8,62) Aa

Means followed by distinct letter (uppercase in horizontal and lowercase in vertical comparison) differ from each other ($p \leq 0.05$). $p(\text{group}) < 0.0001$; $p(\text{time}) < 0.0001$; $p(\text{interaction}) < 0.0001$.

Roughness:

Regarding roughness (Table 3) there was also significant interaction between groups and times ($p < 0.05$). At baseline there was no significant difference between groups ($p > 0.05$) and all groups showed significant increase in roughness over time ($p < 0.05$). At final time, the group receiving carbopol (experimental) presented higher roughness than most groups ($p < 0.05$), but not significantly different from aristoflex (experimental) ($p > 0.05$).

Table 3. Mean (standard deviation) roughness (Ra) of enamel before and after being submitted to different bleaching treatments.

Group	Time	
	Initial	Final
Aristoflex (experimental)	0,12 (0,01) Ba	0,15 (0,02) Aab
Carbopol (experimental)	0,11 (0,01) Ba	0,16 (0,02) Aa
Carbamide Peroxide 10% with carbopol (experimental)	0,11 (0,01) Ba	0,14 (0,02) Ab
Carbamide Peroxide 10% with aristoflex (experimental)	0,11 (0,01) Ba	0,14 (0,01) Ab
Carbamide Peroxide 10% (experimental)	0,12 (0,01) Ba	0,14 (0,01) Ab
Carbamide Peroxide 10% with carbopol (commercial product - control group)	0,12 (0,01) Ba	0,14 (0,01) Ab

Means followed by distinct letter (uppercase in horizontal and lowercase in vertical comparison) differ from each other ($p \leq 0.05$). $p(\text{group}) < 0.0001$; $p(\text{time}) < 0.0001$; $p(\text{interaction}) < 0.0001$.

Color:

The groups receiving aristoflex (experimental) and carbopol (experimental) had significantly lower ΔE^*ab than the others ($p < 0.05$) (Figure 3). Boxplot graphs also show the limits of perceptibility and acceptability.

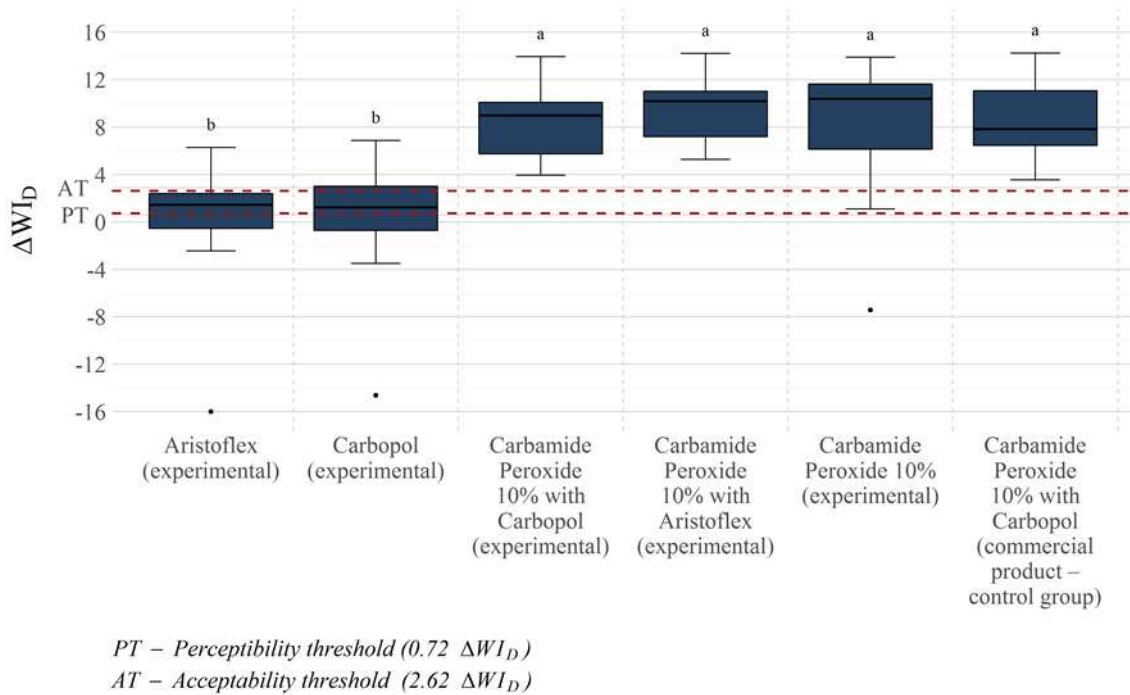
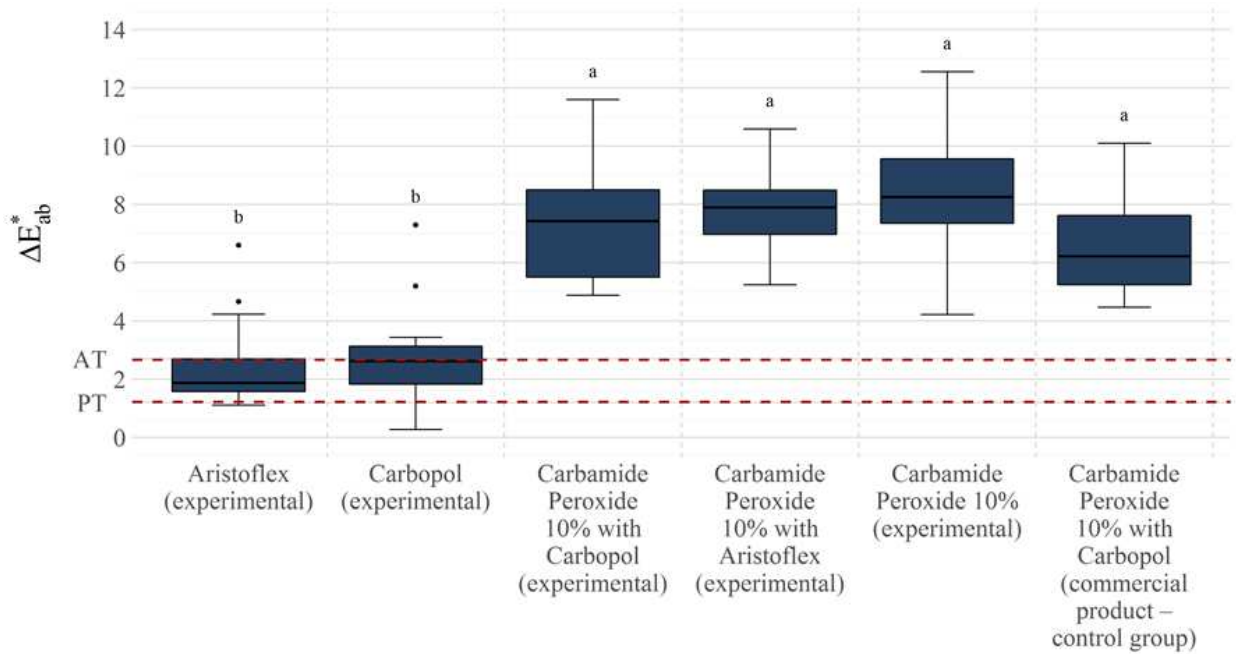


Figure 3. ΔE^*ab Boxplot as a function of group and time. Distinct letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

The aristoflex (experimental) and carbopol (experimental) groups had significantly lower ΔWI_D than the others ($p < 0.05$) (Figure 4). Variations in the Carbamide Peroxide 10% with carbopol (experimental), Carbamide Peroxide 10% with aristoflex (experimental) and Carbamide Peroxide 10% with carbopol (commercial product control group) groups are above the limits of perceived and acceptable.

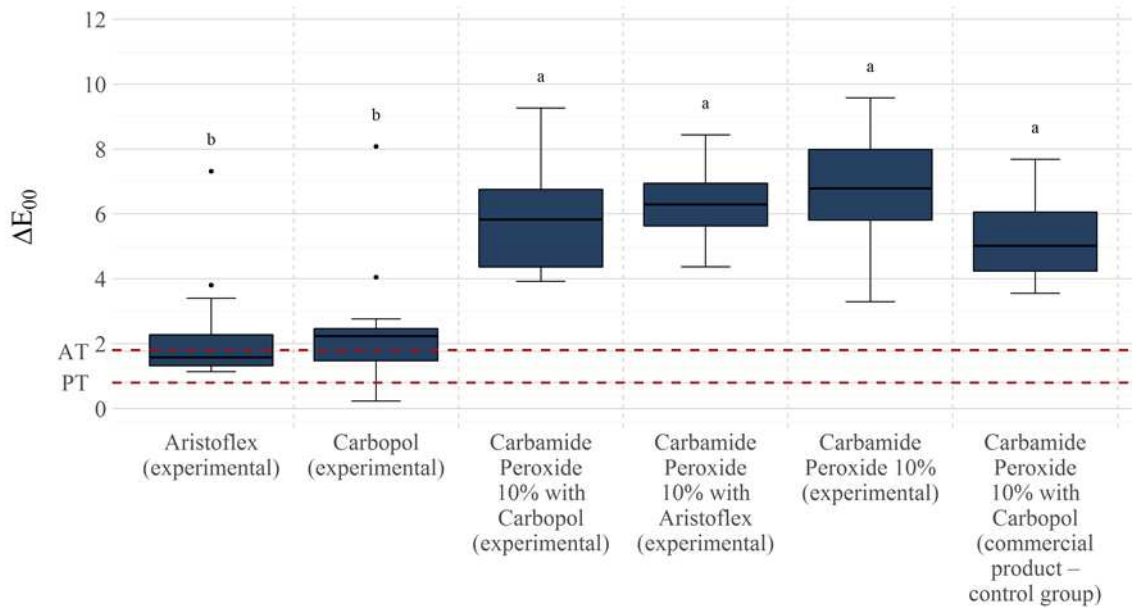


*PT – Perceptibility threshold (1.2 ΔE^*_{ab})*

*AT – Acceptability threshold (2.7 ΔE^*_{ab})*

Figure 4. Delta whiteness index for dentistry boxplot (ΔWID) as a function of group and time. Distinct letters indicate significant difference ($p \leq 0.05$).

As for ΔE_{00} (Figure 5), the aristoflex (experimental) and carbopol (experimental) groups also presented lower values than the others ($p < 0.05$). All groups containing 10% carbamide peroxide in their formulation presented ΔE_{00} values above the limits of perceptibility and acceptability.



PT – Perceptibility threshold ($0.8 \Delta E_{00}$)

AT – Acceptability threshold ($1.8 \Delta E_{00}$)

Figure 5. Boxplot of ΔE_{00} as a function of group and time. Distinct letters indicate significant difference ($p \leq 0.05$).

DISCUSSION

Based on present reports, the first hypothesis, that Aristoflex associated with carbamide peroxide would not be cytotoxicity with HGF cells, was accepted. It has been well established that bleaching of vital teeth with carbamide peroxide may be widely performed [21, 22]. However, carbamide peroxide is applied in custom-made trays. Considering such trays have contact with gingival tissue, one may be aware of possible irritations and ulcerations wounds that carbamide peroxide and all its components may promote to oral cells, as well as toxic effects to human gingival fibroblasts (HGF) [4, 23, 24].

HGF cells have been used in *in vitro* studies to evaluate possible cytotoxic compounds of bleaching agents [4, 25, 26]. The present study showed that application of CPc and CPa during 4 hours presented similar cytotoxicity curve. Increased concentration of bleaching agents promoted reduction of fibroblast viability, especially at concentrations above 2 mg/mL. One may infer that such effect is directly related to the concentration of carbamide peroxide, making it responsible for the cytotoxicity of the product. However, it should be highlighted that even at higher concentrations, when evaluated in isolation, carbopol and Aristoflex thickeners without carbamide peroxide were not toxic to cells.

Previous investigations confirm that, during tooth bleaching, mineral dissolution may occur, which explains enamel surface changes [7,27-29]. According to Basting et al., 2001,

acidic properties of bleaching gels, prolonged contact of bleaching gels to dental surface, and presence of carbopol have been indicated as potential factors responsible for surface alterations of dental structure [30].

According to previous studies [12; 30], thickeners are polymers which interact with the dental structure due to their bioadhesive capabilities. Bioadhesive ability is related to possible ionic bonds between polymers and the dental structure, creating what the authors name "film" (that is, a layer of polymer deposited on the dental structure). Such "film" is able to create a barrier that prevents salivary remineralization, which would be necessary to decrease or prevent mineral loss caused by hydrogen peroxide during treatment [29, 31].

Carbopol thickener is an anionic compound highly capable to bind to calcium present on the dental surface, thus showing great affinity with it. Such affinity leads to creation of a "film" in a well-adhered and thick form, which ends up interfering in the salivary remineralization process [12; 30]. Aristoflex, on the other hand, has distinct characteristics from carbopol, as it is a cationic compound. Namely, it does not have great affinity with dental structures, leading to formation of a not so adhered "film" and consequently increasing chances of salivary remineralization [12].

Reports of Gouveia THN et. al., 2019; Ávila DM et. al., 2017, are in agreement with the present results. Regarding the gels tested in this study, when comparing the initial and final times, a decrease in microhardness of the experimental groups that contained carbopol (C and CPc) may be noticed. When evaluating only the final time, the experimental groups containing carbopol showed lower values of microhardness and the experimental group containing 10% carbamide peroxide with aristoflex thickener (CPa) presented intermediate values when compared to the others.

Although CPwp gel is also composed of neutralized carbopol thickener, which can reduce the incidence of possible changes on the enamel surface, its exact concentration is unknown. As formulation specific details of the material are unknown, it is difficult to predict the impact of each specific compound on the final properties of the material. However, it may be suggested that carbopol concentration in FGM gel is not high enough to cause changes in microhardness, as occurred with the experimental gels containing carbopol thickener.

In oral cavity, saliva is supersaturated with minerals, such as calcium and phosphate, which act in remineralization process [29,35] or in the reduction of demineralization process [7]. During remineralization process, saliva minerals may be deposited irregularly on the enamel surface, which may lead to increased roughness [10], just as mineral dissolution. In this study, increased roughness was observed for all groups and it may be associated with mineral

reorganization on the enamel surface after demineralization and remineralization processes. Twenty-four hours after end of treatment, carbopol presented higher roughness than all other groups. This finding may be related to low pH value (3.72) of carbopol gel, which may cause greater loss of minerals. In fact, when loss of minerals occurs at greater depths (50, 75 and 100 μ m), it may not be recovered through saliva remineralization processes [7]. Accordingly, decrease of microhardness and increase of roughness may occur.

The ΔE and ΔE_{2000} formulas have traditionally been used in dentistry to evaluate color changes after bleaching, and are based on CIE L^* , a^* , b^* system. It is worth noting, however, that ΔE assumes equal importance for all CIE L^* , a^* , b^* coordinates, while ΔE_{2000} considers parametric factors to evaluate CIE L^* , a^* , b^* color differences. Namely, through spectral dimension of CIE L^* , a^* , b^* , it is possible to evaluate bleaching variations by means of differences in one or more of its coordinates (L^* : luminosity; a^* : red-green axis and b^* : yellow-blue axis) [35]. The whitening index (white level) - WI_D - also based on CIE system L^* , a^* , b^* , was later introduced in dentistry. It suggests better correlation to visual perception, when compared to the other indices [36, 37, 19]. Evaluation of efficacy of bleaching gels is of great importance, and the thresholds of visual perception and acceptability of color change work as a quality control of them.

In this study, the samples were stained with a black tea solution to standardize their initial color [12, 6, 38]. From the samples evaluated in this study, a similar trend was observed: all groups containing carbamide peroxide (CPc, CPa, and CPwp) were above the limits of perceptibility (PL) and acceptability (AL) in all formulas - ΔE (PL: 1.2 and AL: 2.7), ΔWI_D (PL: 0.72 and AL: 2.62), and ΔE_{2000} (PL: 0.8 and AL: 1.8). This means that bleaching of samples with CPa was effective, presenting the same noticeable and acceptable results of color change when compared to the groups containing CPc and CPwp. Namely, Aristoflex thickener did not interfere in the bleaching efficacy.

However, groups treated with aristoflex (A) and carbopol (C) also presented color change above PL for all formulas, although it was smaller when compared to color change of peroxide-based groups. It is known that thickeners have no ability to whiten dental structures. During bleaching, thickeners act as modelers in the chemical reaction process of releasing oxygen free radicals from hydrogen peroxide, which is responsible for bleaching [12, 9, 39]. Nevertheless, the color change may be related to the acidic nature of the thickeners, as they may cause surface demineralization and alter enamel morphology. Such enamel morphology alteration may lead to change in the surface reflectance patterns of the samples, promoting color change.

Accordingly, the second null hypothesis was partially accepted, since the 10% carbamide peroxide gel containing aristoflex would not interfere in the whitening efficacy or enamel microhardness when comparing the initial and final times, but there was an increase in the roughness of the enamel

Although in vivo and clinical studies are still required to corroborate the present findings, the results of this study prove conceptions from previous researches, which point out Aristoflex as a promising thickener alternative for at-home bleaching.

CONCLUSION

The present study concluded that combination of 10% carbamide peroxide with aristoflex may be considered as an alternative to commercially available carbopol-containing bleaching products, since it showed similar results of effective bleaching, microhardness and roughness, besides not being cytotoxic to human gingival fibroblastic cells.

REFERENCES

- [1] ADA (2012) Home-use tooth stain removal products. http://www.ada.org/sections/scienceAndReserach/pdfs/guide_home_stain.pdf.
- [2] Cakir FY, Korkmaz Y, Firat E, Oztas SS, Gurgan S, Chemical analysis of enamel and dentin following the application of three different at-home bleaching systems. *Oper Dent*, 36 (5) (2011) 529-36, doi: 10.2341/11-050-L.
- [3] de Vasconcelos AA, Cunha AG, Borges BC, Vitoriano Jde O, Alves-Júnior C, Machado CT, dos Santos AJ, Enamel properties after tooth bleaching with hydrogen/carbamide peroxides in association with a CPP-ACP paste. *Acta Odontol Scand*, 70 (4) (2012) 337-43, doi: 10.3109/00016357.2011.654261.
- [4] Furukawa M, K-Kaneyama JR, Yamada M, Senda A, Manabe A, Miyazaki A, Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on Human Gingival Fibroblasts In Vitro, *Oper Dent* 40 (4) (2015) 430-9, doi: 10.2341/14-059-L.
- [5] Basting R.T. , A.L. Rodrigues, M.P. Serra, The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time, *J Am Dent Assoc*. 134 (10) (2003) 1335-1342.
- [6] Joiner A, The bleaching of teeth: a review of the literature, *J Dent*. 34 (7) (2006) 412-419.

- [7] Vieira-Junior WF, Ferraz LN, Giorgi M, Ambrosano G, Aguiar F, Lima D, Effect of mouth rinse treatments on bleached enamel properties, surface morphology, and tooth color, *Oper Dent.* 44 (2) (2019) 178-187, doi: 10.2341/17-250-L.
- [8] do Carmo Públio J, Zeczkowski M, Burga-Sánchez J, Ambrosano GMB, Groppo FC, Aguiar FHB, Lima DANL, Influence of different thickeners in at-home tooth bleaching: a randomized clinical trial study, *Clin Oral Invertig.* 23 (5) (2019) 2187-2198, doi: 10.1007/s00784-018-2613-9.
- [9] Oliveira GPF, Toyoshim AER, Soldani P, Bueno ALN, Cassoni A, Amaral C, Rodrigues JÁ, Effect of the thickener agent carbopol on dental enamel surface in the at-home dental bleaching, *Revista Odontológica UNESP* 36 (2007) 113-119, <https://doi.org/10.1590/S1806-83242007000200013>.
- [10] Silva BG, Gouveia THN, da Silva MAP, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL, Evaluation of home bleaching gel modified by different thickeners on the physical properties of enamel: An insitu study, *Eur J Dent.* 12 (4) (2018) 523-527, doi: 10.4103/ejd.ejd_352_17.
- [11] Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC, The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness, *Oper Dent.* 30 (5) (2005) 608616.
- [12] Gouveia THN, Danielle Ferreira Sobral de Souza, Aguiar FHB, Ambrosano GMB, Lima DANL, Effect of ammonium acryloyldimethyltaurate copolymer on the physical and chemical properties of bleached dental enamel, *Clin Oral Investig* (2019), doi: 10.1007/s00784-019-03132-3.
- [13] Ávila DM, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CR, Borges AB, Influence of bioadhesive polymers on the protective effect of fluoride against erosion, *J Dent* 56 (2017) 45-52, doi: 10.1016/j.jdent.2016.10.015.
- [14] S. Golding, A.P. Jarvis, A. Joiner, C.J. Philpotts, J. Whittaker [inventor], Oral care compositions, Google Patents (2014).
- [15] R.E. Montgomery [inventor], Highly stable oxidizing compositions, Google Patents (2011).
- [16] Bagordakis E, Sawazaki-Calone I, Macedo CC, Carnielli CM, de Oliveira CE, Rodrigues PC, Rangel AL, Dos Santos JN, Risteli J, Graner E, Salo T, Paes Leme AF, Coletta RD, Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and c

- collagen metabolic process signatures, *Tumour Biol.* 37 (7) (2016) 9045-57, doi: 10.1007/s13277-015-4629-y. Epub 2016 Jan 13.
- [17] Silva EJ, Santos CC, Zaia AA, Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers, *J Appl Oral Sci* 21 (1) (2013) 43-7.
- [18] Sulieman M, Addy M, Rees JS, Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J Dent.* 31 (2003) 415–422.
- [19] Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ, Bona AD, Igiel C, Linninger M, Sakai M, Tashkandi E, Perez Mdel M, Color difference thresholds in dentistry, *J Esthet Restor Dent.* (2015) 27 Suppl 1:S1-9, <https://doi.org/10.1111/jerd.12149>. 27.
- [20] Pérez MM, Herrera LJ, Carrillo F, Pecho OE, Dudea D, Gasparik C, Ghinea R, Bona AD, Whiteness difference thresholds in dentistry. *Dent Mater.* 35 (2) (2019) 292-297, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.022>.
- [21] Féliz-Matos L, Hernández LM, Abreu N, Dental Bleaching Techniques. Hydrogen-carbamide Peroxides and Light Sources for Activation, an Update. Mini Review Article. *Open Dent J.* 6 (8) (2015) 264-8, doi: 10.2174/1874210601408010264.
- [22] Maia E, Baratieri LN, Caldeira de Andrada MA, Monteiro S Jr, Vieira LC, The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in-situ study, *J Dent.* 36 (1) (2008) 2-7.
- [23] Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence Books. (1995) 165.
- [24] Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM, Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching, *Braz Oral Res.* 21 (2) (2007) 170-5.
- [25] Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hånström L, Lerner UH. IL-1 β and TNF- α regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts, *J Dent Res.* 87 (6) (2008) 558-563.
- [26] Kiyoshima T, Enoki N, Kobayashi I, Sakai T, Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Ookuma Y, Sakai H, Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts, *Int J Mol Med.* 30 (5) (2012) 1007-12, doi: 10.3892/ijmm.2012.1102.
- [27] Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C, In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel, *J Dent.* 35 (4) (2007) 325-330.
- [28] Justino LM, Tames DR, Demarco FF, In situ and in vitro effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel, *Oper Dent.* 29 (2) (2004) 219-25.

- [29] Zeczowski M, Tenuta LMA, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL, Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study, *J Dent.* 43 (9) (2015) 1154-1161, doi: 10.1016/j.jdent.2015.06.004.
- [30] Ávila DM, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CR, Borges AB, Influence of bioadhesive polymers on the protective effect of fluoride against erosion, *J Dent.* 56 (2017) 45-52, [https://doi.org/ 10.1016/j.jdent.2016.10.015](https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.10.015)
- [31] Pozzobon RT, Evaluation of the pH of different tooth whitening agents, *Dent J Online.* 7 (2003) 124.
- [32] Basting RT, Rodrigues Júnior AL, Serra MC, The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and demineralized enamel and dentin in situ, *Oper Dent* 26 (6) (2001) 531-9.
- [33] van der Reijden WA, Buijs MJ, Damen JJ, Veerman EC, ten Cate JM, Nieuw Amerongen AV, Influence of polymers for use in saliva substitutes on de- and remineralization of enamel in vitro. *Caries Res.* 31 (3) (1997) 216-23.
- [34] Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GMB, Heymann HO, Pimenta LAF, Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater* 21 (11) (2005) 1059-67.
- [35] Carpenter GH, The secretion, components, and properties of saliva, *Annual Review of Food Science and Technology*, 4 (2013) 267-76. doi: 10.1146/annurev-food-030212-182700.
- [36] Pérez MM, Ghinea R, Herrera LJ, Carrillo F, Ionescu AM, Paravina RD, Color difference thresholds for computer-simulated human gingiva, *J Esthet Restor Dent* 30 (2) (2018) E24-E30. doi: 10.1111/jerd.12373.
- [37] Pérez Mdel M, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD, Herrera LJ, Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space, *Dent Mater* 32 (3) (2016) 461-467, doi: 10.1016/j.dental.2015.12.008.
- [38] Khashayar G, Bain PA, Salari S, Dozic A, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ, Perceptibility and acceptability thresholds for colour differences in dentistry, *J Dent.* 42(6) (2014) 637–644, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.017>
- [39] Kawamoto K, Tsujimoto Y, Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching, *J Endod.* 30 (1) (2004) 45–50, <https://doi.org/10.1097/00004770-200401000-00010>.

3. CONCLUSÃO:

O presente estudo concluiu que a combinação de peróxido de carbamida a 10% com aristoflex pode ser considerada uma alternativa aos produtos de branqueamento contendo carbopol disponíveis no mercado, uma vez que mostrou resultados semelhantes de eficácia clareadora, microdureza e rugosidade, além de não ser citotóxico às células fibroblásticas gengivais humanas.

REFERÊNCIAS*

- [1] Abouassi T, Wolkewitz M, Hahn P. Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2011 Oct;15(5):673-80.
- [2] ADA. Home-use tooth stain removal products 2012 (accessed August 28.08.13) http://www.ada.org/sections/scienceAndReserach/pdfs/guide_home_stain.pdf.
- [3] Basting R, Amaral F, França F, Flório 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, *Op. Dent*. 2012; 37(5):464-473.
- [4] Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Oper Dent*. 2005; 30(5):608-16.
- [5] Vieira-Junior WF, Ferraz LN, Giorgi M, Ambrosano G, Aguiar F, Lima D. Effect of Mouth Rise Treatments on Bleached Enamel Properties, Surface Morphology, and Tooth Color. *Oper Dent*. 2019 Mar/Apr; 44(2):178-187. doi 10.2341/17-250-L.
- [6] Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc*. 2003 Oct; 134(10):1335-42.
- [7] Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes GC, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Op. Dent*. 2010 Jan-Feb; 35 (1):3-10. doi: 10.2341/09-008CR.
- [8] Corcodel N, Hassel A J, Sen S, Saure D, Rammelsberg P, Lux CJ, Zingler S. Effect of enamel sealants on tooth bleaching and on the color stability of the result. *Odontology*, 2017 Apr; 105(2):155-161. doi: 10.1007/s10266-016-0253-6.
- [9] Kwon SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent*. 2015 Sep-Oct;27(5):240-57. doi: 10.1111/jerd.12152.
- [10] Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent*. 2012 Dec; 40(2):25-33. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.008.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- [11] Gouveia TH, Públio Jdo C, Ambrosano GM, Paulillo LA, Aguiar FH, Lima DA. Effect of at-home bleaching with different thickeners and aging on physical properties of a nanocomposite. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar;10(1):82-91. doi: 10.4103/1305-7456.175683
- [12] Gutiérrez-Venegas G, Guadarrama-Solís A, Muñoz-Seca C, Arreguín-Cano JA. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Dec 1; 8(12):15563-72.
- [13] Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int*. 1991 Jul; 22(7):515-23.
- [14] Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent*. 2006 Aug; 34(7):412-9.
- [15] Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod*. 2004 Jan; 30(1):45-50.
- [16] Kwon SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent*. 2015 Sep-Oct; 27(5):240-57. doi: 10.1111/jerd.12152.
- [17] Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. Influence of chemical or physical catalysts on high concentration bleaching agents. *Eur J Esthet Dent*. 2011 Winter; 6(4):454-66
- [18] Lima DA, Aguiar FH, Pini NI, Soares LE, Martin AA, Liporoni PC, Ambrosano GM, Lovadino JR. In vitro effects of hydrogen peroxide combined with different activators for the in-office bleaching technique on enamel. *Acta Odontol Scand*. 2015; 73(7):516-21. doi: 10.3109/00016357.2014.997793.
- [19] McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent* 1996 Nov; 24(6):395-8.
- [20] 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 Nov; 41 Suppl 5:e3-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.03.004.
- [21] Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Braz Oral Res*. 2007 Apr-Jun; 21(2):170-5

- [22] S. Golding, A.P. Jarvis, A. Joiner, C.J. Philpotts, J. Whittaker [inventor], Oral care compositions, Google Patents (2014).
- [23] Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jian T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: an in situ vs. in vitro study. *Oper dent*. 2013 Jul, 40 Suppl 1:e26-34.
- [24] Silva BG, Gouveia THN, da Silva MAP, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL. Evaluation of home bleaching gel modified by different thickeners on the physical properties of enamel: An *in situ* study. *Eur J Dent*. 2018 Oct-Dec; 12(4):523-527. doi: 10.4103/ejd.ejd_352_17.
- [25] Ávila DM, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CR, Borges AB. Influence of bioadhesive polymers on the protective effect of fluoride against erosion. *J Dent*. 2017 Jan;56:45-52. doi: 10.1016/j.jdent.2016.10.015.
- [26] Zeczkowski M, Tenuta LM, Ambrosano GM, Aguiar FH, Lima DA. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. *J Dent*. 2015 Sep; 43(9):1154-61. doi: 10.1016/j.jdent.2015.06.004.

APÊNDICE

Metodologia detalhada

1. Delineamento Experimental

Este estudo foi dividido em duas etapas.

4.1. Etapa I

Local da pesquisa: A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual de Campinas, na unidade de Piracicaba (Faculdade de Odontologia de Piracicaba), no departamento de Odontologia Restauradora.

4.1.1 Citotoxicidade das Células FGH

Para o ensaio foi utilizado fibroblasto gengival humano de linhagem primária – FGH (estabelecido como descrito por Sobral LM et al., 2011).

4.1.3. Coleta das células FGH:

Culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos (FGH) foram estabelecidas utilizando células de tecido obtidos por gengivectomia/gengivoplastia de 1 paciente submetido ao tratamento periodontal da Clínica de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, SP. A idade média do paciente foi de $24,41 \pm 3,72$ anos, sendo possível tanto do sexto feminino quanto do masculino. Fibroblastos foram derivados de gengiva não inflamada ou hiperplásica. A obtenção do fibroblasto gengival se deu da seguinte forma: o tecido gengival foi removido cirurgicamente, lavado várias vezes, picado, colocado em placas de cultura e incubado em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil), 50 pg / ml de penicilina G e 50 ng / d de anfotericina B (DMEM-10%) a 37 ° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após as células atingirem confluência, elas foram tripsinizadas com 0,2% de tripsina (Sigma) em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Condições experimentais

As concentrações dos géis clareadores utilizadas nesse estudo foram baseadas em testes de citotoxicidade realizados previamente. As células foram expostas a diferentes concentrações das formulações dos géis com pH próximo ao pH fisiológico e com a concentração final do meio de cultura indicado abaixo:

1. Clareador CP+C: 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,63 mg/ml; 0,31 mg/ml.
2. Clareador CP+A: 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,63 mg/ml; 0,31 mg/ml.
3. Clareador FGM (CP+C): 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,63 mg/ml; 0,31 mg/ml.
4. Veículo do gel Aristoflex: 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,63 mg ml; 0,31 mg/ml.
5. Veículo do gel Carbopol: 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,63 mg ml; 0,31 mg/ml.
6. Triton X-100 0,1% - grupo controlo negativo
7. Meio de cultura DMEM - grupo de controlo positivo

As placas (n = 9) foram incubadas a 37 °C por 4 horas (tempo de tratamento). Após o término da incubação, a viabilidade celular foi calculada através do método de redução de MTT, (ensaio de proliferação Vybrant® MTT).

Ensaio de proliferação celular e função mitocondrial (ensaio de proliferação Vybrant® MTT)

O MTT é um método indireto que determina a viabilidade e proliferação celular com base na atividade da desidrogenase succinato mitocondrial. Em células vivas, esta enzima reduz o sal de tetrazol amarelo, 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo, para formazan precipitando como cristais cinzento-púrpura insolúveis. A intensidade da cor da solução após a dissolução dos cristais, medida por um espectrofotômetro, é uma medida da viabilidade celular. Para a baixa sobrevivência celular, baixa atividade enzimática é encontrada, resultando em um baixo conteúdo de formazan roxo e menores valores de densidade óptica. A contagem de células foi realizada em uma câmara de Neubauer e 100 µl de solução contendo aproximadamente 5×10^4 células/ml, foram adicionadas a cada poço das placas de cultura e incubadas por 24h e depois desse tempo foram adicionados os tratamentos nas diferentes concentrações detalhadas anteriormente por 4h. Posteriormente, os poços das placas de cultura foram esgotados e lavados suavemente duas vezes com solução salina de fosfato (pH 7,4; PBS-GIBCO, EUA) e depois foram adicionados 200 µl de solução de MTT a 0,3 mg/ml em DMEM. As placas foram incubadas por 3h em 5% de CO₂ a 37 °C. Posteriormente, os poços foram esgotados e preenchidos com 200 µl de etanol PA. Finalmente, a absorbância foi lida em um micro-espectrofotômetro (ASYS UVM340; Biochrome, England) a uma densidade ótica de 570 nm. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata em dois momentos diferentes.

1.2 ETAPA II:

Local da pesquisa: A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual de Campinas, na unidade de Piracicaba (Faculdade de Odontologia de Piracicaba), no departamento de Odontologia Restauradora.

Delineamento do Estudo: Trata-se de um estudo duplo-cego, pois nem o pesquisador operador nem o voluntário souberam qual gel contém peróxido de carbamida 10% com espessante carbopol ou Copolímero do Ácido Sulfônico (aristoflex AVC).

Unidades Experimentais: 144 amostras cúbicas de dente bovino.

Fatores em Estudo:

- Tratamento:

→ Aristoflex (A) – Gel experimental;

→ Carbopol (C) – Gel experimental

→ Peróxido de Carbamida 10% com espessante Carbopol (PCc) – Gel experimental

→ Peróxido de Carbamida 10% com espessante Aristoflex (PCa) – Gel experimental;

→ Peróxido de Carbamida 10% (PC) - Gel experimental

→ Peróxido de Carbamida 10% com espessante Carbopol (PCwp) - Whiteness Perfect –

FGM

1.2.1) Divisão dos grupos:

As amostras foram divididas em 6 grupos, e foram avaliadas de acordo com o seu tratamento clareador (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos de experimento do Estudo I.

Tratamento	Grupo
Aristoflex (Drogal)	A
Carbopol (Drogal)	C
Peróxido de Carbamida 10% + Carbopol (Gel experimental - Drogal)	PCc
Peróxido de Carbamida 10% + Aristoflex (Gel experimental – Drogal)	PCa
Peroxido de Carbamida 10% (Gel experimental – Drogal)	PCwp
Peróxido de Carbamida 10% - FGM	PC

1.2.2) Variáveis de Resposta

→ Microdureza (KHN)

→ Rugosidade (Ra)

→ Cor (CIE LAB)

1.2.3) Preparo das amostras

Inicialmente, para a realização desse estudo, foram utilizados dentes bovinos que, após a sua extração foram submetidos à raspagem manual com cureta periodontal para remoção de debris orgânicos e armazenados em solução aquosa de timol 0,1% (Dinâmica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) tamponado com água destilada. Em seguida, os mesmos foram submetidos a profilaxia com taças de borracha associada a pasta de pedra-pomes (Maquira Dental Products, Maringá, PR, Brasil) e água. Para verificar a presença de trincas ou manchamento, que por ventura poderiam influenciar nos resultados do estudo, todos dentes foram examinados sob lupa (Zeiss- Carl Zeiss do Brasil) com aumento de quatro vezes. Em seguida, os mesmos foram armazenados em água destilada sob-refrigeração, até o momento da sua utilização. Os dentes selecionados tiveram a coroa separada da raiz com uso de disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) acoplado a contra ângulo em baixa rotação sob irrigação constante, à 2 mm da junção cimento-esmalte.

1.2.4) Confeção das amostras

Para obtenção das amostras, a porção coronária foi fixada em uma placa de acrílico com auxílio de cera utilidade, permitindo a obtenção de blocos de dentes através de um disco de corte diamantado (Extec Dia. Wafer Blade 102 x 0,3 x 12,7mm) acoplado em uma Cortadeira Metalográfica (Isomet 1000, Buehler Ltda. Lake Buff, IL, USA) (Figura 1). As amostras foram seccionadas em dois cortes no sentido méso-distal e dois cortes no sentido cérvicoincisal, obtendo-se 1 bloco de cada dente da região mais cervical da coroa. Sendo assim, foram obtidos, das superfícies vestibulares dos dentes bovinos, blocos com 16 mm² e 8mm²; que foram utilizados para os testes de cor/rugosidade e microdureza, respectivamente.

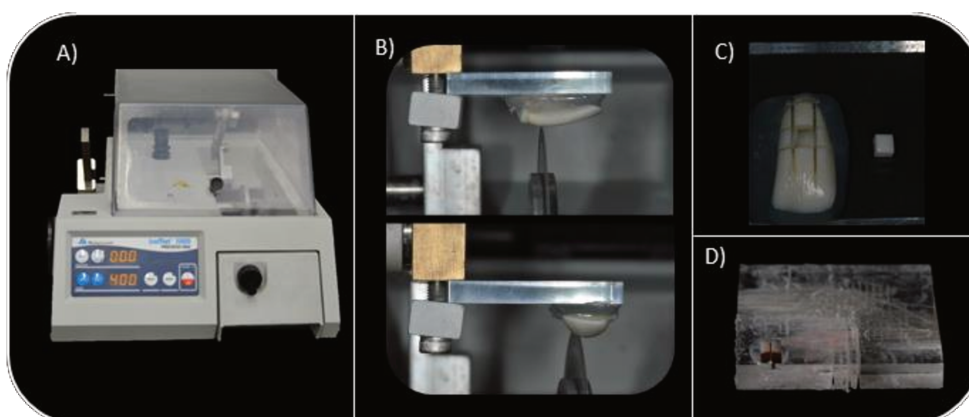


Figura 1. A) Cortadeira metalográfica de precisão Isomet 1000 (Buehler); B) cortes no sentido méso-distal e cérvicoincisal; C) Amostra no tamanho 4x4 para cor e rugosidade e D) Amostra no tamanho 4x2 para microdureza.

Para planificação, regularização e polimento da superfície de esmalte, os espécimes foram posicionados em discos de acrílico de forma que a superfície do esmalte ficasse paralela à base do disco, permitindo assim, o posicionamento do conjunto (espécime e disco de acrílico) paralelamente à superfície da lixa ou feltro utilizado.

Para a etapa de planificação e regularização da superfície do esmalte, foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação decrescente (#600, #1200 e #p4000 – Carborundum Abrasivos, São Paulo, SP, Brasil) acoplados a politriz (Arotec Ind. Com., Cotia, SP, Brasil), sob constante refrigeração com água até se obter a altura do bloco. Para a etapa de polimento foram utilizados feltros (TOP, RAM e SUPRA - Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil), associados às pastas diamantadas metalográficas (6 µm – TOP, 3 µm – RAM, 1 µm – SUPRA

- Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil), juntamente com o lubrificante específico (Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil), também acoplados a politriz giratória (Aropol E, Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2). Entre a realização de cada etapa (regularização, planificação e polimento) bem como ao final de todas as etapas, as amostras foram lavadas com água destilada em cuba ultrassônica (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) para que pudessem ser removidos quaisquer debris presentes na superfície de esmalte.

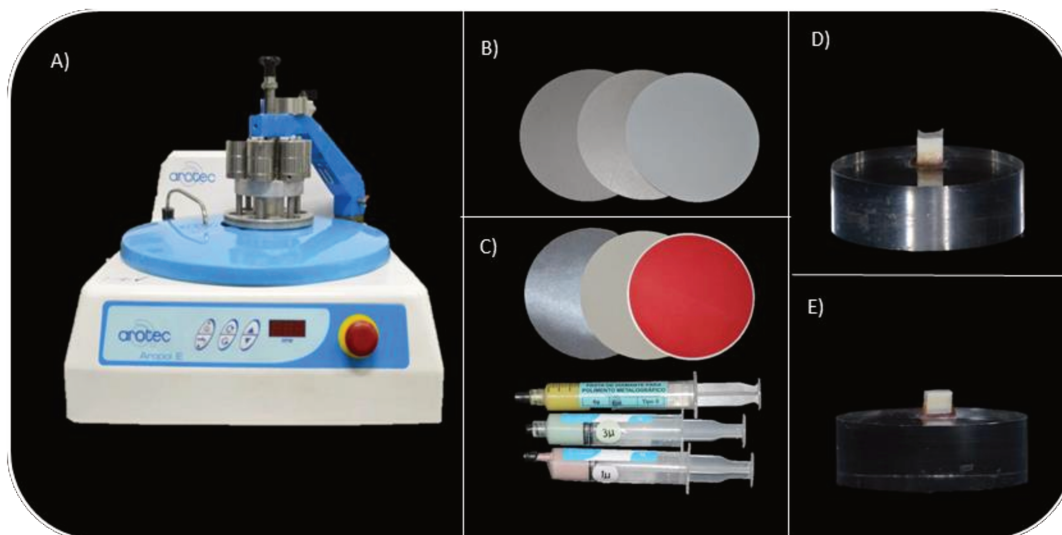


Figura 2. A) A) Politriz giratória B) Lixas de carbeto de silício de granulação #600, #1200 e #4000. C) Feltros TOP, RAM e SUPRA e pastas diamantadas; D) Amostra antes da planificação e E) Amostra após a planificação.

1.2.5) Protocolo para manchamento

Para a realização do manchamento das amostras, as mesmas foram imersas por 6 dias em uma solução de chá preto, que foi trocada a cada 24 horas. A solução de chá preto foi produzida a partir de 100 ml de água destilada fervida por 5 minutos, em seguida, misturada a 1,6g de chá preto (Leão Junior S.A., Curitiba, PR, Brasil) em infusão por 5 minutos. Após 6 dias de imersão na solução, as amostras foram armazenadas em saliva artificial, trocada a cada 24 horas, durante 14 dias, até a estabilização de cor das amostras.

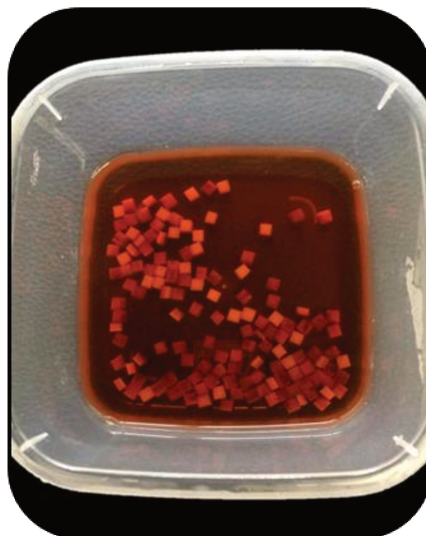


Figura 3. Manchamento das amostras.

A remoção da borra de chá preto formada sobre o esmalte e a dentina, foi realizada por uma taça de borracha associada a uma mistura de pedra pomes e água (proporção 2:1), em baixa rotação.

Sequencialmente, cada amostra recebeu uma marcação, com broca esférica nº 1012 (KG Sorensen) em uma das suas faces laterais, para padronizar o posicionamento da amostra durante a leitura com o espectrofotômetro e rugosímetro.

1.2.6) Esterilização das amostras

Por se tratar de um estudo *in situ*, todas as amostras passaram pela esterilização com óxido de etileno, que foi realizada pela empresa Acecil - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, previamente à inserção nos dispositivos intra-bucais.

1.2.7) Questões éticas

Projeto aprovado pelo Comitê Permanente de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/Unicamp (protocolo de nº 79720117.1.0000.5418).

1.2.8) Seleção dos voluntários

Doze voluntários, com faixa etária estimada de 18-35 anos, estudantes de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/Unicamp foram convidados para participar da pesquisa, tanto para utilizarem o dispositivo intrabucal. Os critérios de inclusão foram: fluxo

salivar normal, medido através de sialometria, e ausência de cáries e/ou doença periodontal. Os critérios de exclusão foram: pacientes em uso de dispositivos ortodônticos, em uso de medicamentos que interferem no fluxo salivar, pacientes fumantes e com presença de prótese fixa ou removível. Todos os detalhes sobre o estudo foram esclarecidos pelos pesquisadores previamente à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1.2.9) Confeção do dispositivo intrabucal:

Os voluntários passaram pelo procedimento de moldagem com alginato (Jeltrate Plus – Dentsply, Petrópolis, RJ) e os modelos foram confeccionados em gesso-pedra Tipo III (Asfer – Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP). Para a confecção dos dispositivos intrabucais palatinos foi utilizada resina acrílica autopolimerizável (VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP). Durante a confecção do aparelho, foram posicionados no modelo de gesso, blocos de silicone (5 mm x 7 mm x 2,5 mm) a fim de proporcionar as lojas necessárias à inserção dos blocos dentários (Figura 4.A). Cada placa continha nichos para 12 blocos, que foram utilizados para dois blocos de cada grupo, que foi submetido à exposição da saliva. A fixação das amostras foi realizada com cera pegajosa (ASFER – Indústria Química Ltda) de forma que sua superfície da amostra ficasse 1 mm abaixo do nível da resina acrílica (Figura 4.B). Os dispositivos foram adaptados em cada voluntário, de forma que a superfície de cada amostra ficasse em contato com a saliva no ambiente bucal.

Previamente ao início desta etapa experimental *in situ*, foram realizadas profilaxia e instrução de higiene oral ao voluntário e para cada um, foi distribuído uma escova dental (Oral-B Indicator) e um dentífrico (Colgate), para serem utilizados durante todo o experimento. O dispositivo foi utilizado pelos pacientes durante todo o dia, retirando-o apenas durante as refeições, ingestão de líquidos (exceto água) e higienização. Durante esse período, os dispositivos foram armazenados em recipiente com gaze embebida em água, promovendo um ambiente com umidade relativa, evitando o ressecamento dos espécimes. Os pacientes foram orientados para não submeter os dispositivos em soluções contendo flúor nem escovar os corpos de prova com escova dental e dentífrico. Os dispositivos foram higienizados a cada 12 horas, durante todo o experimento, com água e escova dental sem dentífrico, de maneira a simular a higienização diária.

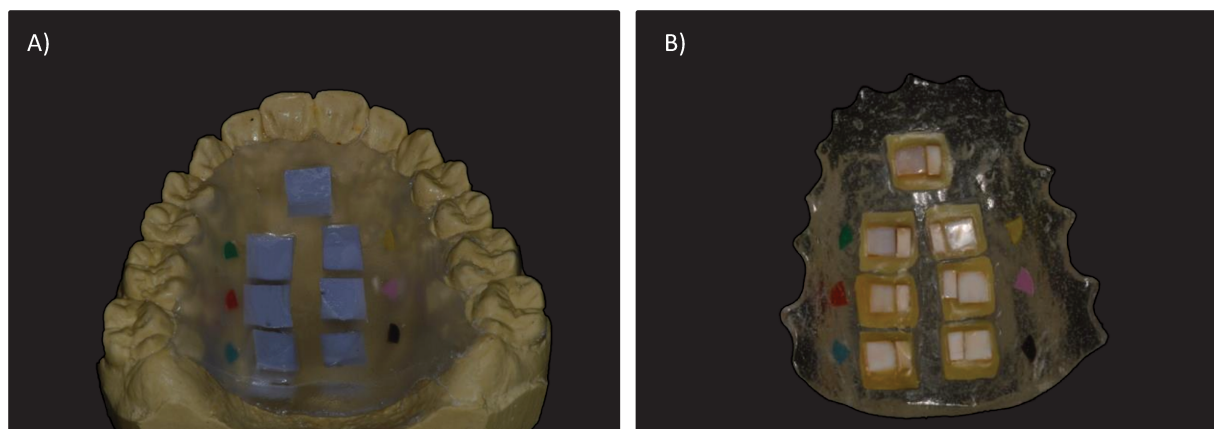


Figura 4: Dispositivo intrabucal A) com os blocos de silicone (5 mm x 7 mm x 2,5 mm) a fim de proporcionar as lojas necessárias à inserção dos blocos dentários e B) com as amostras fixadas

1.2.10) Adequação dos voluntários

Foi realizado exame clínico, a fim de avaliar a presença de cárie, restaurações e resseções gengivais. Uma semana antecedendo o início do tratamento clareador todos os voluntários receberam profilaxia com pedra-pomes de granulação extra-fina (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, e raspagem supragengival nos casos que haviam a presença de cálculos dentais, ainda, jatos de ar foram aplicados sobre a superfície dos dentes para a avaliação de sensibilidade dental. Nessa sessão, foram feitas impressões em alginato da maxila para obtenção de modelos de estudo e posterior confecção dos dispositivos Intra-oral.

1.2.11) Análise do pH dos géis clareadores

O pH dos géis clareadores foi mensurado em triplicata utilizando um pH-metro digital PHS-3B (Phtek, São Paulo, SP, Brasil) composto de um eletrodo de pH e um sensor de temperatura conectados a um analisador de íons, utilizando aproximadamente 3g de cada gel, antes dos géis serem entregues aos voluntários.

Antes das aferições, o eletrodo foi removido da imersão na solução conservadora (solução KCl 3 mol/L) e lavado abundantemente em água destilada. Em seguida foi realizado a calibração do eletrodo em soluções tampão de pH 4 e 7 em temperatura ambiente ± 230 C.

Sequencialmente o eletrodo de pH foi completamente submerso no gel clareador de modo a favorecer um contato uniforme (Figura 5), de maneira cuidadosa para não induzir formação de mais bolhas de ar na amostra dos géis durante as medições. Os dados dos valores de pH para os diferentes géis foram anotados e submetidos a análise.

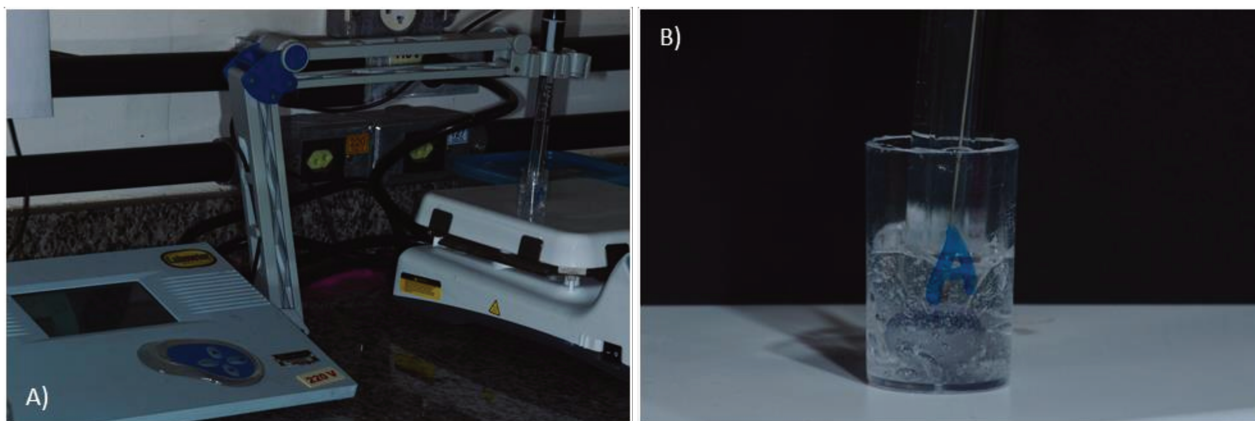


Figura 5: Aferição do pH A) pH-metro digital PHS-3B (Phtek, São Paulo, SP, Brasil) com os blocos de silicone e B) eletrodo de pH completamente submerso no gel clareador de modo a favorecer um contato uniforme

1.2.12) Protocolo de clareamento dental

O dispositivo intrabucal permaneceu durante um dia na boca do voluntário, previamente ao início dos tratamentos clareadores, para a formação de película adquirida.

Removido o dispositivo da boca do voluntário e seco com papel absorvente, os espécimes foram submetidos ao tratamento clareador à base de peróxido de carbamida a 10% com carbopol (FGM), peróxido de carbamida a 10% com carbopol (Gel experimental), peróxido de carbamida a 10% com aristoflex (Gel experimental), apenas peróxido de carbamida a 10% (Gel experimental), apenas com o gel de carbopol e apenas com gel de aristoflex, sendo realizada uma sessão de tratamento clareador por dia, durante 14 dias. O gel foi aplicado, de acordo com as recomendações do fabricante, na superfície de esmalte e permaneceu em contato com o mesmo por 4 horas em temperatura ambiente (Tabela 2). O dispositivo foi mantido em um aparato contendo água, durante o tratamento, para os espécimes não sofrerem desidratação, porém, sem contato com a superfície que contém o gel. Após cada aplicação, cada gel foi removido com o auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão, e em seguida os dispositivos foram lavados em água corrente, secos com papel absorvente e o retornou a boca do paciente.

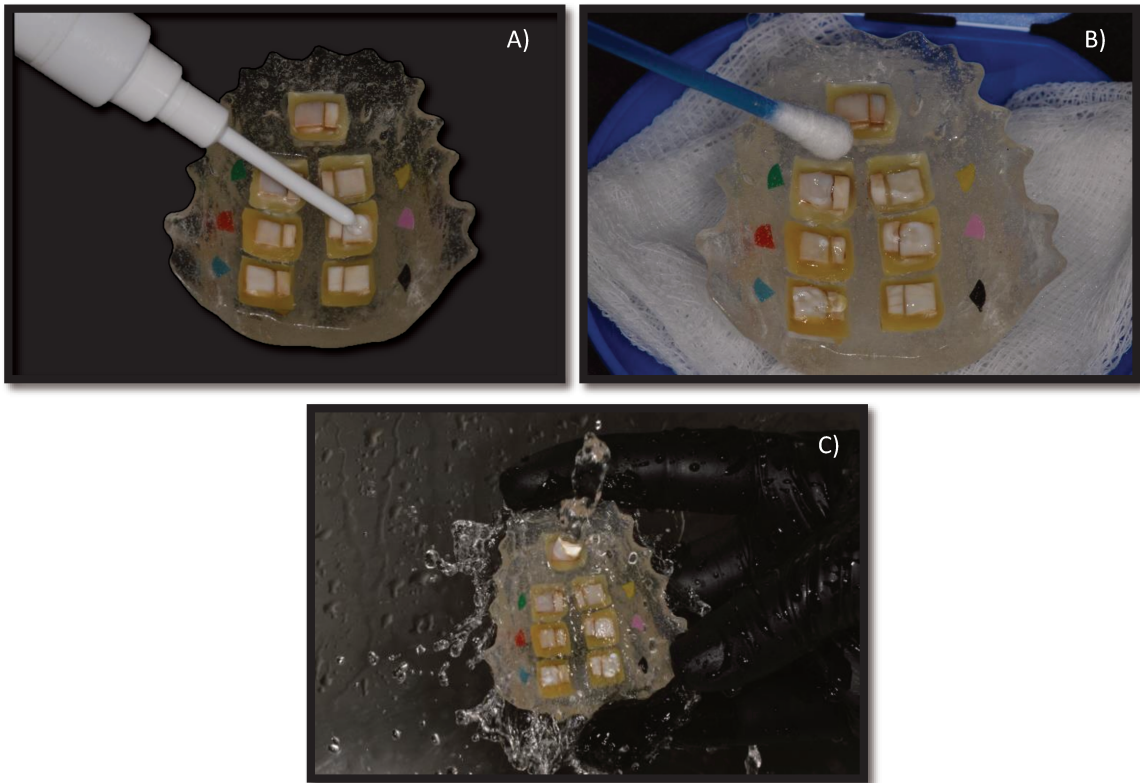


Figura 6: Protocolo de clareamento dental A) Aplicação do gel; B) Remoção do gel com hastes flexíveis de algodão e C) Lavagem do dispositivo em água corrente

Tabela 2: Tratamentos e modo de aplicação.

Material	Fabricante	Modo de aplicação
Aristoflex	Gel experimental - Drogal	Diariamente Por 4 horas, durante 14 dias.
Carbopol	Gel experimental – Drogal	
Peróxido de Carbamida 10% + carbopol	Gel experimental – Drogal	
Peróxido de Carbamida 10% + aristoflex	Gel experimental – Drogal	
Peróxido de Carbamida 10%	Drogal	
Peróxido de Carbamida 10% + carbopol	FGM	

1.2.13) Análises

Cor (Cie Lab):

Para a realização das leituras de cor, as amostras foram posicionadas em um dispositivo de teflon (porta amostra) dentro de uma Câmara de luz (GTI, Newburgh, NY, USA), com o intuito de padronização do ambiente. O equipamento utilizado para a leitura de cor foi um espectrofotômetro Konica Minolta CM-700d previamente calibrado. As leituras foram realizadas nos tempos: inicial e após tratamento (14 dias).

Rugosidade (Ra):

A análise da rugosidade superficial foi avaliada através de um rugosímetro: Mitutoyo Surftest 211 (São Paulo Brasil). Foram realizadas três leituras em diferentes direções em cada espécime de cada grupo, nos tempos: inicial e após tratamento (14 dias). Os valores obtidos foram calculados a partir da média das três leituras. Assim a média das três leituras foi considerada a rugosidade média (Ra) de cada superfície.

Microdureza (KHN):

A análise de microdureza superficial do esmalte foi realizada por meio de microdurômetro com edentador Knoop (Shimadzu HMV-2000, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), com carga estática de 50 gramas por 5 segundos. Foram realizadas cinco endentações com distância 100 µm entre elas, na região central dos espécimes. As leituras nos tempos: inicial e após tratamento (14 dias).

ANEXO 1

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética

	UNICAMP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS - FOP/UNICAMP	
---	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE CLAREADORA E DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DO ESMALTE QUANDO SUBMETIDO AO CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA ASSOCIADO AO COPOLÍMERO DO ÁCIDO SULFÔNICO

Pesquisador: Bruna Guerra Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 79720117.1.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.611.657

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de EMENDA 1 de 17/07/2019 para Inserção de uma nova etapa no projeto de

	UNICAMP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS - FOP/UNICAMP	
---	---	--

Continuação do Parecer: 3.611.657

Outros	4Comentarios.pdf	13:50:04	Bruna Guerra Silva	Aceito
Outros	CEPCompleto.pdf	09/11/2017 08:24:07	jacks jorge junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	64AltInfra.pdf	07/11/2017 09:55:01	Bruna Guerra Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	62Declnst.pdf	07/11/2017 09:54:45	Bruna Guerra Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	61DecPesq.pdf	17/10/2017 20:23:00	Bruna Guerra Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLE.pdf	17/10/2017 20:22:17	Bruna Guerra Silva	Aceito
Outros	2Cartadeenvio.pdf	17/10/2017 20:21:00	Bruna Guerra Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 01 de Outubro de 2019

ANEXO 2

Anexo 2 - Comprovante de submissão

Journal of Dentistry Contact us Help

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: dalima@unicamp.br
Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2019.8

Submissions Being Processed for Author **Débora Alves Nunes Leite Alves Nunes Leite Lima, DDS, MSc, PhD, Associate Professor**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Effect of different bleaching gels thickeners on biocompatibility with human gingival fibroblasts and enamel physical properties: an in situ study	21 Jan 2020	21 Jan 2020	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

AA ees.elsevier.com

Journal of Dentistry Contact us Help

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: dalima@unicamp.br
Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2019.8

Author's Decision

Thank you for approving "Effect of different bleaching gels thickeners on biocompatibility with human gingival fibroblasts and enamel physical properties: an in situ study". An email has been sent to you confirming that the journal has received this submission. Your Co-Author(s) may also receive this email, depending on the journal policy.



To keep track of how your article is performing
[get your Author stats on Mendeley](#)

[Main Menu](#)

ANEXO 3**Anexo 3 - Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio**