



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DOS PRODUTOS DE
BRANQUEAMENTO: COMPARAÇÃO ENTRE OS PRODUTOS
UTILIZADOS EM CONSULTÓRIO E OS PRODUTOS
UTILIZADOS EM AMBULATÓRIO**

Trabalho submetido por
Kristel Pitz
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Junho de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DOS PRODUTOS DE
BRANQUEAMENTO: COMPARAÇÃO ENTRE OS PRODUTOS
UTILIZADOS EM CONSULTÓRIO E OS PRODUTOS
UTILIZADOS EM AMBULATÓRIO**

Trabalho submetido por
Kristel Pitz
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

e coorientado por
Prof. Doutora Ana Mano Azul e Prof. Doutora Madalena Salema Oom

Junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Terminada agora esta etapa da minha vida, agradeço a todos aqueles que estiveram presentes e me apoiaram na concretização deste projeto:

À orientadora desta tese, Prof. Doutora Isabel Barahona, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio sempre demonstrado. Aqui lhe exprimo a minha gratidão. Às co-orientadoras Prof. Doutora Ana Mano Azul e Prof. Doutora Madalena Salema Oom, pelo apoio dado nos trabalhos de campo, pelo incentivo, disponibilidade e igualmente pelo apoio na elaboração deste trabalho. Agradeço também a Susana Bandarra e Paulo Mascarenhas pelas respostas a todas as minhas grandes dúvidas, durante as minhas práticas.

À minha família, especialmente aos meus pais Brigitte e Patrick por todo o apoio económico, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida académica. Lutaram toda a vida para nos dar o melhor: agora é a minha vez de retribuir. Estou eternamente grata. Aos meus irmãos Nicolas e Aurélie que sempre me apoiaram mesmo nos momentos de maior ansiedade, um obrigado especial por toda a paciência, por todas as palavras de carinho e incentivo, por todos os momentos de alegria e principalmente por me tornarem na pessoa que sou hoje. Aos meus avós, Joëlle e Vincent, Jean e Danièle aqueles que tornaram este momento possível e que deram o suporte, a força e o exemplo de perseverança ao longo destes 5 anos. À minha tia Sylvie, à minha madrinha Magalie, ao meu tio Alain, bem como às minhas primas Manon, Charlène e Laura, obrigada por estarem presentes na minha vida.

À Luisa e ao Jan, que, quando cheguei em Portugal, estiveram comigo, agradecendo à Luisa por ter participado e me ajudado na elaboração da presente tese, a qual sem o seu apoio teria sido impossível. À dentina, especialmente Daniela Flora, uma vez que sem ela, este estudo não teria sido feito, obrigada, por ter me fornecido os produtos para o estudo.

Às minhas amigas de infância, Johanna, Amandine e Marie por estarem sempre presentes, pelos momentos que passamos e por todos os que ainda estão para vir. À Sarah, por ser a melhor parceira de box que poderia ter tido, pela paciência, atenção e força que me prestou em momentos menos fáceis. Aos meus amigos de coração, Kawthar, Mickael, Nicolas, Mégane, Ophélie, Marine, Carine, Hamza, Charles, Romain, Kheira, Lola, Doria, Nisrine, Ion, Nelly e minha pequena Elodie, mesmo que a distância nos separe, você é a família que escolhi. A Cyril Lindenmeyer e Jean Marc Paillon por me ter dado a paixão do trabalho. A JP e Marraine ...

Enfim, quero manifestar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização da presente dissertação.

A todos um muito sincero obrigada.

RESUMO

Introdução: Branquear os dentes para ter um sorriso mais branco e brilhante é uma tendência muito popular e, atualmente, pode-se fazê-lo em casa ou no consultório do médico dentista. No entanto, os produtos branqueadores não são inócuos e a legislação europeia é clara, limitando o teor de peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Objetivo: Este trabalho pretende quantificar e comparar o efeito dos produtos de branqueamento comercializados em Portugal na viabilidade dos fibroblastos.

Métodos: Para o estudo em causa foram utilizadas as células NIH/3T3, que constituem fibroblastos embrionários de ratinho, utilizadas em muitos estudos e por isso considerados como fibroblastos de referência. Fibroblastos de embrião de ratinho (NIH / 3T3) foram incubados com diluições sucessivas em meio de cultura de Opalescence® PF Boost 40%, Opalescence® PF 16%, Opalescence® PF 10% de Ultradent, (EUA) e BBryance® 0,095% (França) durante uma hora. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio sem produtos branqueadores e a viabilidade celular foi determinada após 24h através do ensaio MTT. Como controlo positivo, usámos soluções com diferentes concentrações de H_2O_2 (v/v).

Resultados: Os nossos resultados mostraram uma grande diminuição na viabilidade dos fibroblastos após uma hora de incubação com ambos os tipos de produtos contendo H_2O_2 ou peróxido de carbamida. Para atingir condições consideradas não tóxicas, ou seja, mostrando uma redução na viabilidade celular <30%, foi necessário diluir os produtos branqueadores de pelo menos 100 a 62 500 vezes, para 0,0001-0,0004% de H_2O_2 .

Conclusões: Embora não possamos extrapolar este efeito citotóxico diretamente para os dentes humanos, porque a concentração de H_2O_2 que chega à polpa depende da difusão através dos túbulos dentinários, as nossas observações são preocupantes, sobretudo o que diz respeito à saúde das células gengivais. Além disso, os produtos de branqueamento vendidos para uso doméstico são tão citotóxicos como os produtos de utilização em consultório sob a supervisão do profissional médico dentista. Quando calculado os valores de IC_{50} para todos os produtos incluindo peróxido de hidrogénio obtivemos valores da mesma ordem de grandeza (à volta de 10^{-3}) o que indica que a toxicidade dos produtos depende essencialmente da concentração de peróxido de hidrogénio.

Palavras-chave: Branqueamento Dentário, Peróxido de Hidrogénio, Peróxido de Carbamida, Citotoxicidade, Células 3T3

ABSTRACT

Introduction: Bleaching teeth to have a whiter and bright smile is a popular trend and currently one can do it at home or at the dentist's office. However, bleaching products are not innocuous and the European legislation is clear, limiting the content in hydrogen peroxide (H₂O₂).

Objective: This work aims to verify how bleaching products commercialized in Portugal impact on fibroblasts viability.

Materials and Methods: NIH / 3T3 cells, which constitute mouse embryonic fibroblasts, used in many studies and therefore considered as reference fibroblasts were used for this study. Mouse embryo fibroblasts (NIH/3T3) were incubated with serial dilutions of Opalescent® PF Boost 40%, Opalescent® PF 16%, Opalescent® PF 10% from Ultradent, (USA) and BBryance® 0,095% (France) in culture medium for one hour. After that period, the culture medium was removed, and cell viability was determined using the MTT assay. As a positive control, we used diluted H₂O₂ solutions.

Results: Our results showed a huge decrease in fibroblasts viability after 1-hour exposure to both product types: containing H₂O₂ or carbamide peroxide. To achieve conditions considered nontoxic, i.e. showing a reduction in cell viability <30%, it was necessary to dilute whitening products at least 100 to 62 500-fold, down to 0,0001 - 0,0004 % H₂O₂.

Conclusions: Although we cannot extrapolate this effect directly to human teeth, because of the concentration of H₂O₂ arriving at the pulp depends on diffusion through the dentinal tubules, our observations are of great concern, in particular for gingivae cells health. Moreover, the whitening products sold for at-home use are as cytotoxic as the in-office product to be applied under the supervision of the dental professional. When calculating the IC₅₀ values for all products including hydrogen peroxide we obtained values of the same order of magnitude (around 10⁻³) which indicates that the toxicity of the products depends essentially on the concentration of hydrogen peroxide.

Key-words: Tooth Whitening, Hydrogen Peroxide, Carbamide Peroxide, Cytotoxicity, 3T3 Cells

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUÇÃO	13
I.1. O BRANQUEAMENTO DENTÁRIO	13
I.1.1. História do branqueamento.....	13
I.1.2. A pigmentação dentária	15
I.2. AGENTES DE BRANQUEAMENTO	16
I.2.1. Peróxido de hidrogénio	16
I.2.2. Peróxido de carbamida	17
I.2.3. Perborato de sódio	17
I.2.4. Mecanismos de ação dos agentes branqueadores.....	17
I.3. SISTEMAS DE BRANQUEAMENTO	18
I.3.1. Branqueamento dentário em ambulatório.....	18
I.3.2. Branqueamento dentário em consultório	20
I.3.3. Branqueamento com produtos de venda livre	21
I.4. RISCOS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADOS AO BRANQUEAMENTO	21
I.5. ASPETOS LEGAIS DO BRANQUEAMENTO.....	25
I.6. OBJETIVOS.....	27
I.7. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	27
II. MATERIAIS E MÉTODOS	29
II.1. MATERIAIS	29
II.1.1. Produtos de branqueamento.....	29
II.1.2. Linha Celular.....	31
II.1.3. Reagentes.....	32
II.1.4. Equipamentos do laboratório de cultura de células	33
II.2. MÉTODOS	33
II.2.1. Cultura de células – Fibroblastos 3T3	33
II.2.2. Preparação dos produtos	36

<i>II.2.3. Ensaio I: Otimização do número de células.....</i>	<i>39</i>
<i>II.2.4. ENSAIO II: Incubação do tóxico durante 1hora com diferentes concentrações em contacto com 5×10^4 células.....</i>	<i>40</i>
<i>II.2.5. ENSAIO III e IV: Incubação do tóxico durante 1hora com diferentes concentrações em contacto com 5×10^4 células.....</i>	<i>45</i>
<i>II.2.6. Determinação da viabilidade celular.....</i>	<i>47</i>
<i>II.2.7. Ensaio do MTT.....</i>	<i>47</i>
III. RESULTADOS.....	49
IV. DISCUSSÃO.....	59
V. CONCLUSÕES.....	65
VI. BIBLIOGRAFIA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Moldeira de branqueamento confeccionada após impressão em alginato, https://clinicadentariajardimdosarcos.pt/instrucoes-post-goteira-oclusal/	19
Figura 2: Imagens pré e pós branqueamento no consultório (<i>in-office</i>) com a supervisão do médico dentista https://willisdentistry.com/cosmetic-treatments/teeth-whitening/opalescence-boost/	20
Figura 3: Opalescence® Boost PF 40%, peróxido de hidrogénio a 40%, https://www.ododo.gr/en/products/product/677-opalescence-boost-4	29
Figura 4: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% e 10%, https://www.opalescence.com/eu/pages/take-home.aspx	30
Figura 5: Kit de branqueamento BBryance® a 0,095% de peróxido de hidrogénio, https://www.bbryance.fr/boutique/1-kit-de-blanchiment-de-dents-bbryance	30
Figura 6: A- Câmara de Neubauer (hemacitómetro) B- Células na câmara de Neubauer observadas ao microscópio ótico, ampliação 100x https://www.trade21.com.sg/counting-chamber-neubauer-improved-bright-line/	35
Figura 7: Esquema duma câmara de Neubauer observada ao microscópio ótico. Realce para as células presentes no conjunto de 16 quadrados periféricos. http://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf	36
Figura 8: Esquema ilustrativo de uma preparação com diluição respetiva para o produto Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% (S1: solução 1, S2: solução 2, S3: solução 3, S4: solução 4, S5 solução 5, S6: solução 6)	37
Figura 9: Soluções preparadas A- Opalescence® Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40% B-Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16%	38
Figura 10: Soluções preparadas C- Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% D- BBryance®, 0,095% de peróxido de hidrogénio.....	39
Figura 11: 4 Placas de 96 poços com células a incubar (5×10^4) após 24h, e fotografias de imagens de microscopia ótica das células com uma ampliação de 100 x.	40
Figura 12: Fotografia das 3 placas de 96 Poços após incubação do toxico durante 1H 1- Placa 1: Peróxido de hidrogénio 30% H ₂ O ₂ 2- Placa 2: Opalescence® Boost PF, peróxido de carbamida a 40%/ Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% (≈5,8% peróxido de hidrogénio) 3-Placa 3:Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈3,6% H ₂ O ₂) / BBryance® H ₂ O ₂ 0,095%.....	41

Figura 13: Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio II, III, IV	48
Figura 14: Valores da Absorvância (eixo Y) obtidos para cada as diferentes quantidades de células (eixo X) (valores referentes à tabela 11).....	49
Figura 15: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ (eixo X) feitas a partir de uma solução concentrada de H ₂ O ₂ a 30% (valores referentes à Tabela 12).	51
Figura 16: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) de Opalescence [®] Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40% (valores referentes à Tabela 13).....	52
Figura 17: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) para Opalescence [®] PF, peróxido de carbamida a 16% (≈ 5,8% de H ₂ O ₂) (valores referentes à Tabela 14).....	53
Figura 18: Valores de viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes diluições (eixo X) de Opalescence [®] PF, peróxido de carbamida a 10% (≈ 3,6% de H ₂ O ₂) (valores referentes à Tabela 15)	54
Figura 19: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) de BBryance [®] , 0,095% de peróxido de hidrogénio (valores referentes à Tabela 16)	55
Figura 20: Curvas de resposta das células à dose de H ₂ O ₂ em escala logarítmica. Valores IC ₅₀ calculado através da Calculadora IC ₅₀ da Quest Graph [™]	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de conversão dos agentes branqueadores (OMD, 2013).	19
Tabela 2: Resumo das características dos materiais testados neste estudo	31
Tabela 3: Reagentes biológicos usados neste estudo.....	32
Tabela 4: Equipamentos laboratoriais	33
Tabela 5: Peróxido de hidrogénio a 30%, com uma primeira diluição de 1:5 (6%), as outras diluições estão indicadas na tabela;	42
Tabela 6: Opalescence® Boost PF, peróxido de carbamida a 40%, com uma primeira diluição de 1:2 (20%), uma segunda de 1:5 (4%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;	43
Tabela 7: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ peróxido de hidrogénio), com uma primeira diluição de 1:6 (0,96%), uma segunda de 1:5 (0,19%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;.....	43
Tabela 8: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% ($\approx 3,6\%$ peróxido de hidrogénio), com uma primeira diluição de 1:6 (0,6%), uma segunda de 1:5 (0,12%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;.....	44
Tabela 9: Tabela de diluição do BBryance®, a 0,095% de peróxido de hidrogénio com uma primeira diluição de 1:2 (concentração de 0,0475%) e uma segunda diluição de 1:5 (0,0095%), as outras diluições estão indicadas na tabela;.....	44
Tabela 10: Tabela com as diferentes concentrações usadas nos Ensaio III e IV. 1- Placa 1 2- Placa 2 2- Placa 3	45
Tabela 11: Valores de Absorvância do ensaio de otimização do número de células	49
Tabela 12: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto de referência H ₂ O ₂ a 30%.....	51
Tabela 13: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence® Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40%.....	52
Tabela 14: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ de H ₂ O ₂)	53
Tabela 15: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% ($\approx 3,6\%$ de H ₂ O ₂)	54

Tabela 16: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto BBryance [®] , 0,095% de peróxido de hidrogénio.	55
Tabela 17: Valores de IC ₅₀ calculados através da calculadora do Quest GraphTMEC ₅₀	56
Tabela 18: Comparação entre concentrações máximas e mínimas testadas para cada produto e viabilidade celular.	57
Tabela 19: Diluições necessárias para atingir condições não tóxicas (viabilidade > 70%)	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CV - Cristal Violeta

IC₅₀ - Concentração para 50% inibição

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Reino Unido)

DMSO - Dimetilsulfóxido (Merck, EUA)

FBS - Fetal Bovine Serum (Sigma, EUA)

ISO - International Organization Standardization

MEV - Microscopia Electrónica de Varrimento

MO - Microscópio Ótico Invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA)

MTT - Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, Reino Unido)

OMD - Ordem dos Médicos Dentistas

OTC - Over the Counter

PBS - Phosphate Buffered Saline (Gibco, Reino Unido)

PC (CH₆N₂O₃) - Peróxido de carbamida

PH - Peróxido de hidrogénio

I. INTRODUÇÃO

I.1. O Branqueamento Dentário

A estética em Medicina Dentária é um conceito moderno, eminentemente cultural, e hoje em dia a pressão social, cultural e laboral que a sociedade exerce no sentido da obtenção da beleza e da estética ideal, faz com que esta tenha nas sociedades avançadas, um lugar importante e de grande reconhecimento (Carey, 2014). Sendo o sorriso, uma preocupação atual que engloba uma dimensão emocional e relacional, podemos afirmar que o sorriso e a forma como sorrimos, promove a saúde e favorece a relação interpessoal, sendo que um sorriso perfeito pode ser considerado, hoje, como um acessório fundamental na apresentação de uma pessoa (Hirata, 2017).

Atualmente, o branqueamento dentário, é um dos procedimentos cosméticos mais populares em Medicina Dentária. É uma técnica eficiente, e cada vez mais os pacientes, procuram obter informação sobre as diferentes soluções existentes e disponíveis no mercado, sendo que, muitas destas soluções podem ser vendidas sem receita médica e decorrem de grandes campanhas publicitárias (De Almeida et al., 2015; Demarco et al., 2009). Acreditamos que o desafio atual dos tratamentos de branqueamento está em definir, não só, uma técnica que providencie bons resultados estéticos sem danificar os tecidos dentários, como também, promover altos níveis de satisfação para os pacientes que desejam um tratamento acessível, rápido e com efeitos colaterais mínimos (Baldea et al., 2017).

Neste sentido, o objetivo da minha investigação é o de avaliar a citotoxicidade de diferentes produtos que podemos usar em consultório, em ambulatório, e dos produtos vendidos sem receita médica (*Over the Counter* - OTC).

I.1.1. História do branqueamento

A história do branqueamento em Medicina Dentária é uma história de muitos esforços e de muitos desafios superados, que visaram alcançar um método efetivo de branqueamento dentário. O branqueamento dentário sobre o dente não vital iniciou-se em 1848 com o uso de cloreto de cal, e em 1864, Truman introduziu uma técnica mais eficaz para o branqueamento de dentes não vitais, nomeadamente um método que usava cloro a partir de uma solução de hipoclorito de cálcio e ácido acético (Kirk, 1889).

O derivado comercial disso, mais tarde conhecido como solução de Labarraque, era uma solução aquosa de hipoclorito de sódio. No final do século XIX, foram usados outros agentes de branqueamento em dentes não vitais, também com sucesso, sendo que posteriormente se concluiu que os oxidantes diretos mais eficazes eram a pirozona, o superoxol e o dióxido de sódio, enquanto o oxidante indireto de escolha era um derivado do cloro (Franchi, 1950). O superoxol tornou-se, devido à sua elevada segurança, a substância química usada pela maioria dos médicos dentistas. Mas, a pirozona continuou a ser usada para dentes não vitais no final da década de 1950 e início da década de 1960 assim como o perborato de sódio (Sulieman, 2004).

No final dos anos 1970, Nutting começou a usar superoxol em vez de pirozona, por razões de segurança, e mais tarde combinou-o com perborato de sódio para obter um efeito sinérgico (Nutting, 1976). Além disso, recomendou o uso de AmosanTM, um monohidrato de peroxiborato de sódio, que é conhecido por libertar mais oxigénio do que o perborato de sódio (Alqahtani, 2014). Os dentes vitais também foram branqueados em 1868, com ácido oxálico ou pirozona e posteriormente com peróxido de hidrogénio. A partir de 1911, a utilização de peróxido de hidrogénio concentrado associado a uma fonte de luz azul foi considerada como uma técnica aceitável em clínicas de Medicina dentária (Alqahtani, 2014).

Além disso, no final da década de 1960, uma técnica bem-sucedida de branqueamento em ambulatório foi estabelecida quando o Dr. Bill Klusmier, um ortodontista, que instruiu os seus pacientes para usarem à noite um antisséptico oral, o Gly-Oxide[®], que continha 10% de peróxido de carbamida colocado numa moldeira personalizada. O Dr. Klusmier mostrou que este método não só favorecia a saúde gengival, assim como branqueava os dentes (Haywood et al., 1990).

Posteriormente, o Proxigel[®] (combinação de 10% de peróxido de carbamida, água, glicerina e carbopol) foi comercializado e substituído o Gly-Oxide[®] por pacientes ortodônticos, em consequência à sua lenta libertação de peróxido de carbamida. Mais tarde, a Universidade da Carolina do Norte aprovou a eficácia clínica do Proxigel[®]. Haywood e Heymann em 1989, apresentaram a técnica ainda em vigor de branqueamento em ambulatório (Haywood et al., 1989).

Os agentes de branqueamento de venda livre (*Over the Counter* - OTC) foram lançados nos Estados Unidos na década de 1990, contendo concentrações mais baixas de peróxido de hidrogénio ou peróxido de carbamida e vendidos diretamente aos consumidores para uso doméstico (Caldas et al., 2015).

I.1.2. A pigmentação dentária

As causas da pigmentação dos dentes são variadas e complexas, mas geralmente são classificadas como de natureza intrínseca ou extrínseca. A pigmentação extrínseca aparece quando pigmentos externos são depositados na superfície do dente ou dentro da camada da película. A pigmentação intrínseca ocorre quando os pigmentos são depositados dentro da maior parte do dente, geralmente na dentina, e são frequentemente de origem sistémica ou pulpar. Uma terceira categoria de "internalização de manchas" foi recentemente descrita para incluir as circunstâncias em que os compostos cromogéneos entram no dente através de defeitos na estrutura do dente (Watts & Addy, 2001; Alqahtani, 2014).

A pigmentação intrínseca é dividida em causas metabólicas, hereditárias, iatrogénicas, traumáticas e de envelhecimento. A coloração intrínseca iatrogénica apresenta-se mais frequentemente associada à ingestão de tetraciclina durante a formação do dente e é classicamente uma aparência em faixas de cor amarela, castanha, azul, preta ou cinzenta, dependendo da gravidade. Causas traumáticas de descoloração são vistas frequentemente na forma de hipoplasia de esmalte, produtos hemorrágicos pulpares e reabsorção radicular. A cor do dente mais escura observada no envelhecimento é o resultado de alterações de textura / esmalte no esmalte, bem como deposição de dentina secundária e terciária (Vogel, 1975; Sulieman, 2004).

A pigmentação extrínseca é causada por cromogéneos que se ligam diretamente ao dente, como os pigmentos contidos no tabaco, chá, café, vinho tinto, medicamentos e placa; ou por aqueles que se ligam indiretamente pela combinação com outro elemento para produzir a mancha. O último grupo inclui sais metálicos polivalentes, tais como suplementos de ferro e anti-sépticos catiónicos, como a clorexidina, que se combina com o chá para produzir as manchas pretas e castanhas características (Vogel, 1975; Alqahtani, 2014).

Com o tempo, as fissuras nos dentes podem ficar manchadas e as manchas ficam internalizadas como resultado da perda de esmalte ou recessão gengival. Assim, as manchas internalizadas podem resultar de trauma, cáries ou restaurações (Sulieman, 2004).

I.2. Agentes de branqueamento

Os agentes de branqueamento dentário utilizados poderão possuir como princípio ativo o peróxido de hidrogénio, peróxido de carbamida, e o perborato de sódio. Além destes agentes ativos, os produtos de branqueamento são compostos por espessantes, como o carbopol, que aumentam a viscosidade e diminuem a taxa libertação de oxigénio; excipiente, como a glicerina que usada como veículo para outros ingredientes; surfactantes, que permitem a difusão do produto de branqueamento; e outros produtos como os aromas e conservantes que tornam a utilização mais fácil do produto e que permitem que o mesmo, seja conservado (Alqahtani, 2014; Plotino et al., 2008).

O peróxido de hidrogénio e o peróxido de carbamida são os agentes mais vulgarmente utilizados nos sistemas branqueadores, sendo o peróxido de carbamida mais usado por ser uma forma mais estável do peróxido de hidrogénio (Da Costa et al., 2012).

I.2.1. Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio age como um forte agente oxidante quando entra em contato com a saliva e a estrutura dentária, e dependendo das características do ambiente de reação, pode formar espécies reativas de oxigénio. Essas moléculas têm um baixo peso molecular e são capazes de penetrar no esmalte e na dentina e alcançar os pigmentos. Estes são moléculas orgânicas de longas cadeias com muitas ligações insaturadas, ou anéis aromáticos com grande capacidade de absorção de luz na gama do visível dando cor à superfície do dente. As espécies reativas de oxigénio são capazes de quebrar as longas cadeias de pigmentos, convertendo-os em moléculas menores, que podem ser libertados da estrutura dentária por difusão. Com o decréscimo de pigmentos dentro do dente, a reflexão da luz emitida aumenta o que confere um aspeto mais branco brilhante. Uma característica do peróxido de hidrogénio é a rápida ativação das reações de oxidação, com picos entre os 30 a 50 minutos (Colares et al., 2019; De Almeida et al., 2015; Hirata, 2017).

I.2.2. Peróxido de carbamida

O peróxido de carbamida quando entra em contacto com a água decompõe-se em peróxido de hidrogénio e ureia. Enquanto o peróxido de hidrogénio forma espécies reativas como referido anteriormente, a ureia, forma amónia durante o branqueamento. A amónia aumenta o pH do meio e facilitar o processo de branqueamento. Isso pode ser explicado pelo facto de que, em soluções básicas, é necessária menos energia de ativação para formar radicais livres de oxigénio, tais como, e.g. hidroperoxilo, que é um radical com alto poder de branqueamento. Isso aumenta a taxa de reação e os resultados são melhores quando comparados com os de ambiente ácido, que estabiliza o peróxido de hidrogénio e evita a formação de radicais com maior poder de branqueamento. Uma característica importante que influencia sua indicação para utilização na clínica é a lentidão na formação de radicais livres, que dura cerca de 3 a 4 horas, e que pode ser estendida pela ação de carbopol (Caldas et al., 2015; De Almeida et al., 2015; Hirata,2017).

I.2.3. Perborato de sódio

O perborato de sódio é habitualmente indicado para o branqueamento de dentes com tratamento endodôntico. É geralmente comercializado em pó e pode ser usado com água, soro fisiológico ou em conjunto com outros produtos de branqueamento (peróxido de carbamida e peróxido de hidrogénio). A pasta formada é colocada dentro da câmara pulpar, pela técnica do “walking bleach”. Quando entra em contato com água, o perborato de sódio é decomposto em metaborato de sódio, peróxido de hidrogénio e oxigénio. O peróxido de hidrogénio continua sendo o agente de reação ativo (Nutting, 1976; Hirata, 2017).

I.2.4. Mecanismos de ação dos agentes branqueadores

O mecanismo de branqueamento por peróxido de hidrogénio não esta bem esclarecido. Os géis de branqueamento em consultório ou em ambulatório possuem peróxido de hidrogénio ou o seu precursor, o peróxido de carbamida, como componente ativo em concentrações que variam de 3% a 40% de equivalente de peróxido de hidrogénio (Alqahtani, 2014).

O branqueamento com peróxido de hidrogénio geralmente decorre através do anião hidroperoxilo (HO^*_2). Outras condições podem dar origem à produção de radicais

livres, por exemplo, por clivagem homolítica de uma ligação O-H ou da ligação O-O em peróxido de hidrogénio para fornecer $H^+ + \cdot OH$ e $2\cdot OH$ (radical hidroxilo), respetivamente (Kashima-Tanaka et al., 2003).

Sob reações fotoquímicas iniciadas pela luz ou lasers, a formação de radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio mostrou aumentar (Kashima-Tanaka et al., 2003). O peróxido de hidrogénio é um agente oxidante que, se difundir no dente, e pode originar radicais livres instáveis, como radicais hidroxilo ($HO\cdot$), radicais hidroperóxido ($HOO\cdot$), e aniões superóxido ($OO\cdot$), que atuarão sobre moléculas orgânicas pigmentadas nos espaços entre os sais inorgânicos no esmalte dentário, ao nível das ligações duplas de moléculas cromóforas dentro dos tecidos dentais. A oxidação das duplas ligações elimina cromóforos e resulta em constituintes menos fortemente pigmentados (Godinho, et al., 2014; Joiner, 2006).

I.3. Sistemas de Branqueamento

Os três tipos de terapia de branqueamento são o branqueamento em consultório, o branqueamento ambulatório e os produtos vendidos sem receita médica. O branqueamento em consultório é o método mais antigo e pode envolver a aplicação de calor ou de luz para acelerar o branqueamento. O branqueamento em ambulatório envolve a aplicação de uma menor concentração de peróxido aplicado em casa numa moldeira confeccionada no consultório. O terceiro tipo de branqueamento envolve produtos de venda livre (OTC), que são totalmente geridos pelo consumidor, sem qualquer exame, orientação ou instruções do médico dentista (Hilton, 2013).

I.3.1. Branqueamento dentário em ambulatório

O branqueamento em ambulatório requer uma história clínica adequada, um exame clínico e radiográfico, e toma de impressões para confecção da moldeira. Alguns médicos dentistas gostam de ver o paciente em visitas de acompanhamento semanais para avaliar a evolução do tratamento, enquanto outros observam o paciente apenas no final do tratamento. Planos para tratamento da sensibilidade e determinação do tempo total de tratamento devem ser comunicados ao paciente durante a primeira visita (Haywood et al., 1992; Hilton et al., 2013).

O branqueamento em ambulatório é o processo de branqueamento mais utilizado porque é fácil de executar, é geralmente menos dispendioso para o paciente e revela fortes evidências da sua eficácia. Utiliza um método personalizado de ajuste da moldeira, (Fig.1) que contém uma solução de 10% a 16% de peróxido de carbamida (aproximadamente igual a uma solução de 3,5% a 6% de peróxido de hidrogénio) (Tabela 1). Embora o processo exija um tempo de contato maior em comparação com a técnica de branqueamento em consultório, é seguro e os resultados estão comprovados clinicamente. Os produtos que levam o rótulo “*ADA accepted*” passaram por um rigoroso conjunto de padrões de segurança e eficácia (De Almeida et al., 2015). Embora o peróxido de carbamida esteja comercializado numa variedade de concentrações, a melhor combinação de segurança, efeitos colaterais limitados e eficiência são obtidos com uma solução de 10 % (Lima et al., 2013).

Tabela 1: Tabela de conversão dos agentes branqueadores (OMD, 2013).

Tabela de conversão		
1% de peróxido de hidrogénio = 2,77% de peróxido de carbamida		
Peróxido de hidrogénio	Peróxido de carbamida	Perborato de sódio
0,1%	0,28%	
3,6%	9,94%	
4,4%	12,19%	
6%	16,62%	3%



Figura 1: Moldeira de branqueamento confeccionada após impressão em alginato, <https://clinicadentariajardimdosarcos.pt/instrucoes-post-goteira-oclusal/>

I.3.2. Branqueamento dentário em consultório

O branqueamento em consultório dos dentes vitais usa geralmente uma solução de peróxido de hidrogénio de 35 a 40% colocada diretamente sobre os dentes e pode envolver a aplicação de luz e / ou calor para aumentar a libertação de peróxido. Como a concentração de peróxido de hidrogénio é alta e o material é cáustico, os tecidos moles devem ser muito bem protegidos (Silveira et al., 2015). Esta técnica destina-se a produzir o efeito de branqueamento com uma necessidade limitada de *compliance* por parte do paciente. É indicado para obter resultados mais rápidos (Fig. 2) ou para pacientes que podem ter dificuldade em seguir o regime em ambulatório. Levantam-se várias questões, e as possíveis desvantagens devem ser tidas em consideração (Silveira et al., 2015). Os custos geralmente são mais altos porque é necessário mais tempo de presença na cadeira; existe uma possibilidade de lesão tecidual do agente mais potente utilizado; e os resultados de um tratamento em consultório podem ser inferiores ao método mais lento em ambulatório. O branqueamento em consultório pode exigir mais de uma visita para alcançar os resultados desejados. De fato, os fabricantes de sistemas de branqueamento em consultório geralmente recomendam o branqueamento em ambulatório após o término do tratamento em consultório (Hirata, 2017; SR Kwon et al., 2013).



Figura 2: Imagens pré e pós branqueamento no consultório (*in-office*) com a supervisão do médico dentista <https://willisdentistry.com/cosmetic-treatments/teeth-whitening/opalescence-boost/>

I.3.3. Branqueamento com produtos de venda livre

Os produtos OTC (*Over-the-Counter*) estão disponíveis na forma de sistemas de moldeira, sistemas sem moldeira, tiras branqueadoras, pastas dentífricas, produtos de aplicação com pincel e alguns colutórios. O problema fundamental com os produtos OTC é que não há um exame clínico, nem um diagnóstico sobre a causa da descoloração. Assim, qualquer tratamento de branqueamento eficaz pode mascarar sintomas de outro problema. A descoloração pode ser causada por restaurações antigas, lesões de cárie dentária, reabsorção interna ou manchas. É aconselhável que os pacientes que considerem efetuar um branqueamento façam um exame clínico e radiográfico adequados, realizado por um médico dentista, mesmo que estejam a usar produtos OTC (Demarco e al., 2009).

Embora sejam produtos de venda livre, a insuficiência de evidência científica da sua real eficácia, põe em causa a segurança desses mesmos produtos (Caldas et al., 2015).

No passado, os agentes branqueadores OTC não se mostraram muito eficazes. Embora o custo inicial do agente seja nitidamente inferior ao dos métodos prescritos pelo médico dentista, ele é inseparável do produto, e há sempre um custo final significativo para resultados muitas vezes insatisfatórios. Além disso, há alguns relatos de efeitos prejudiciais da erosão da estrutura dentária pelo uso excessivo de soluções mal formuladas. Embora o modo específico de aplicação varie entre os produtos, os fabricantes tornaram os produtos relativamente fáceis para o paciente aplicar (Greenwall-Cohen et al., 2019).

I.4. Riscos e complicações associados ao branqueamento

De um modo geral os riscos e complicações associados ao branqueamento, a nível dentário ou a nível das gengivas, estão relacionados com a concentração dos produtos, a maneira da aplicação e as condições específicas de cada paciente. Os efeitos indesejáveis mais frequentes são a sensibilidade dentária e algum desconforto gengival que geralmente desaparece com a interrupção do tratamento. No entanto, a aplicação incorreta dos produtos químicos de maior concentração, com ou sem aplicação de luz acessória, pode produzir lesões mais graves e permanente. O médico dentista pode avisar e controlar clinicamente estas condições (Hilton, 2013).

Os principais efeitos locais do processo de branqueamento são:

- Efeitos nos tecidos moles

O branqueamento mais eficaz no consultório (30-40% de peróxido de hidrogênio) é capaz de provocar queimaduras de tecidos moles, sendo importante proteger os tecidos moles. Geralmente, essas queimaduras são reversíveis, sem consequências a longo termo, se a exposição ao material de branqueamento for limitada em tempo e quantidade. A referência na literatura a lesão dos tecidos moles com o branqueamento em ambulatório, é mais provavelmente devida a um processo inadequado do que ao próprio agente de branqueamento (Colares et al., 2019; Silveira et al., 2015).

- Efeitos do branqueamento dentário na estrutura dentária

Ainda há polêmicas acerca dos efeitos do branqueamento dentário sobretudo nas propriedades físicas do esmalte e da dentina.

- Efeitos na morfologia e textura do esmalte

O efeito do branqueamento pode ocorrer na morfologia e na textura superficial do esmalte, tais como, alteração morfológica da superfície do esmalte, o aumento da porosidade da estrutura superficial do esmalte, a desmineralização e a diminuição da concentração proteica, degradação da matriz orgânica e modificação do cálcio. Alguns estudos relataram que o branqueamento não afeta significativamente a superfície do esmalte (Abouassi et al., 2011; Potocnik et al., 2000; Sasaki et al., 2009).

No entanto, num estudo demonstrou as alterações morfológicas na superfície do esmalte branqueado: depressões, porosidade e aumento da profundidade dos sulcos do esmalte (Azrak et al., 2010).

- Efeitos na dureza superficial e resistência ao desgaste do esmalte

A dureza da superfície do esmalte e a resistência ao desgaste após um branqueamento dentário têm sido investigada. Sasaki et al. (2009) mostraram que não tenho nenhum efeito, enquanto Azer e al. 2009 por exemplo mostraram significativa

diminuição na dureza e resistência à fratura. Sasaki et al. (2009) estudaram o efeito de agentes de branqueamento de uso doméstico contendo 10% de peróxido de carbamida e 7,5% de peróxido de hidrogénio na microdureza do esmalte e na micromorfologia da superfície. Concluíram que estes agentes de branqueamento podem alterar a micromorfologia da superfície do esmalte, embora não tenham sido detetadas alterações na microdureza. Potocnik et al. (2000) analisaram o efeito do peróxido de carbamida a 10% na camada subsuperficial do esmalte humano de microdureza, microestrutura e conteúdo mineral. Concluíram que o peróxido de carbamida a 10% causou alterações químicas e microestruturais locais clinicamente insignificantes no esmalte. No entanto, Azer et al. (2009) examinaram a nanodureza e o módulo elástico do esmalte humano após o tratamento com sistemas de branqueamento com aplicação em moldeira e em tiras. Expuseram o esmalte humano foi exposto a cinco diferentes agentes branqueadores e os resultados mostraram que a nanodureza e o módulo de elasticidade do esmalte humano diminuíram significativamente após a aplicação dos sistemas dos branqueamentos de aplicação ambulatorio.

- Efeitos na dentina

Pouco foi publicado sobre a influência do branqueamento dentário na estrutura dentinária comparativamente ao esmalte. Zalkind et al. (1996) utilizaram a microscopia electrónica de varrimento (MEV) para verificar mudanças na morfologia da superfície dentinária. Pecora et al. (1994) verificaram que a microdureza dentinária diminuiu após a aplicação de peróxido de carbamida a 10% durante 72 h. Num estudo realizado por Basting et al. (2003), os resultados mostraram que o agente espessante (carbopol e / ou glicerina), e não apenas o peróxido de carbamida a 10%, causa uma diminuição na microdureza da dentina. Além disso, Tam et al. (2005) concluíram que a exposição direta ao peróxido de carbamida a 10% causa uma diminuição significativa na resistência à flexão e no módulo de flexão da dentina bovina. Faraoni-Romano et al. (2008) estudaram os efeitos de vários agentes branqueadores de baixa e alta concentração na microdureza e rugosidade superficial do esmalte e da dentina radicular e provaram que, embora o branqueamento não alterasse a microdureza do esmalte e a rugosidade superficial, afeta a dentina radicular em termos de microdureza. dependendo do agente utilizado. Além disso, Lewinstein et al. (1994) mostraram uma diminuição na microdureza da dentina após a exposição a uma solução de 30% de peróxido de hidrogénio com pH=3, tal como o estudo

de Tam et al. (2007) que mostrou que a resistência da dentina por fratura *in vitro* foi reduzida após o uso prolongado de produtos de branqueamento aplicados diretamente à dentina. Noutro estudo, Engle et al. (2010) realizaram um estudo sobre o efeito da interação entre a abrasividade do branqueamento, erosão e dentífrico no esmalte e na dentina. Eles indicaram que o branqueamento com 10% de peróxido de carbamida não aumentou o desgaste erosivo e abrasivo do esmalte. No entanto, pode alterar o desgaste abrasivo da dentina.

- Sensibilidade dentária e efeitos a nível pulpares

Um dos efeitos adversos mais achados no branqueamento dentária de dentes vitais é a sensibilidade dentária (Leite et al., 2010). Conhece-se que este tratamento só é possível devido algumas características dos agentes branqueadores, tal como o baixo peso molecular de alguns elementos químicos ativos, dentre eles o peróxido de hidrogénio e a sua capacidade de difusão pelo esmalte e dentina, sendo capaz de atingir a polpa. Esta difusão pelos tecidos dentais ainda pode ser aumentada na existência de dentina exposta em áreas de recessões gengivais, defeitos na junção cimento-esmalte, defeitos no esmalte, ou em áreas marginais entre o dente e a restauração (Vieira et al., 2015).

A resposta pulpar varia de paciente para paciente e mesmo de dente para dente. O peróxido penetra através do dente em direção à polpa em cerca de 5 a 15 minutos (J.S. et al., 1992). A molécula de peróxido é de pequena dimensão de modo que facilmente passa através dos espaços intersticiais do dente, em vez de viajar pelos túbulos dentinários. Portanto, o branqueamento pode produzir sensibilidade (Haywood, 1995). Os pacientes submetidos ao branqueamento ambulatorio também devem ser informados de que pode ocorrer diminuição de sensibilidade, descritas para cerca de dois terços dos pacientes. Estudos relataram sensibilidade em 25% a 70% dos pacientes. No entanto, esses estudos também mostram que 20% a 30% dos pacientes mencionam sensibilidade quando um placebo é usado, e 18% relatam sensibilidade apenas ao usar uma moldeira de branqueamento sem qualquer gel (Leonard et al. 2001). Os fabricantes incluíram nitrato e fluoreto de potássio ou fosfato de cálcio amorfo no gel branqueamento. Estas novas

fórmulas de branqueamento mostraram ter graus variados de eficácia na diminuição da sensibilidade dentária (Sulieman, 2004; Soares 2014).

- Efeito nas restaurações

Um dos fatores a ser avaliado durante o branqueamento dentário é a presença de restaurações na superfície a ser branqueada. Uma preocupação de segurança relevante é a libertação de mercúrio das restaurações de amálgama durante e após o branqueamento (Bahari et al., 2016; Al-Salehi, 2009). Há pouca disputa sobre a libertação de mercúrio associada ao branqueamento; no entanto, a quantidade relatada de libertação de mercúrio varia muito. Devido à toxicidade conhecida do mercúrio, como regra geral, não é aconselhável realizar o branqueamento em pacientes cujos dentes foram restaurados extensivamente com amálgamas (Li & Greenwall, 2013).

Efeitos idênticos também são aplicáveis a outros materiais restauradores baseados em resina que requerem polimerização *in situ*. Como o peróxido é um forte agente oxidante, existe uma possibilidade que o mesmo pode reagir não exclusivamente com os cromóforos presentes na estrutura dentária, mas também com qualquer molécula orgânica que esteja disponível, o que poderia resultar em alterações na estrutura dos materiais restauradores com resinas (Costa & Huck, 2006; Daniel et al., 2011; Vieira et al., 2015). Alguns fatores como a aplicação de produtos de branqueamento sobre as restaurações em resina composta podem levar a alterações da superfície do dente (Camacho et al., 2008; Soares et al., 2014).

I.5. Aspetos Legais do Branqueamento

A União Europeia instituiu novas regras sobre a temática do branqueamento dentário. Os produtos usados nos branqueamentos são classificados, pela Comissão Europeia, como cosméticos e não como sendo dispositivos médicos (OMD, 2013).

Portugal encontra-se de momento em fase de regulamentação sobre o branqueamento dentário, devido à diretiva emitida pela União Europeia a 20 de setembro de 2011, que tem como fundamento a revisão da legislação dos estados membros sobre os produtos cosméticos. As novas condições são dirigidas à utilização de produtos que

contêm peróxido de hidrogénio, ou a soluções que o libertem, como o peróxido de carbamida, peróxido de zinco, perborato de sódio e ácido perbórico (OMD, 2013).

A Diretiva Comunitária aborda três parâmetros:

I. Produtos que contenham valores entre 0,1% e 6% de peróxido de hidrogénio:

Os produtos com estas percentagens de peróxido de hidrogénio podem ser vendidos exclusivamente a médicos dentistas ou estomatologistas. A utilização destes produtos deve ser feita, a primeira vez, em ambiente clínico ou de consultório de medicina dentária. A aplicação deve ser feita, ou supervisionada por um médico dentista, desde que este certifique um nível equivalente de segurança. É obrigatório realizar um exame clínico e assegurar que a exposição, a estes produtos, é limitada; A aplicação não pode ser feita em menores de idade (OMD, 2013).

II- Produtos que contenham valores abaixo de 0,1% de peróxido de hidrogénio:

Produtos com os valores atrás registados são designados por cosméticos e encontram-se disponíveis ao consumidor, no mercado, sob supervisão do INFARMED, I.P; o produto de branqueamento de venda livre só pode conter até 0,1% de peróxido de hidrogénio. A colocação, no mercado nacional destes produtos, tem de cumprir todos os requisitos do Decreto-Lei no 189/2008, de 24 de setembro (OMD, 2013).

III- Produtos que contenham valores acima de 6% de peróxido de hidrogénio:

Segundo a Diretiva Comunitária é proibida a comercialização de produtos cosméticos que contenham peróxido de hidrogénio com percentagem igual ou superior a 6% (OMD, 2013).

Produtos com estas concentrações já não podem ser comercializados, nem adquiridos ou utilizados em consultório dentário, passando a não haver possibilidade de adquirir estes produtos. Em parceria com o INFARMED, I.P., a OMD está a tentar que produtos de branqueamento dentário, com percentagens iguais ou superiores a 6%, possam ser classificados como produtos médicos (OMD, 2013).

I.6. Objetivos

Com o presente estudo pretende-se:

Observar e comparar *in vitro*, o efeito citotóxico de quatro tipos de produtos de branqueamento: Opalescence[®] Boost PF 40%, peróxido de hidrogénio a 40% Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% e 10%, BBryance[®] a 0,095% e peróxido de hidrogénio a 30% quando em contacto com fibroblastos da linha celular 3T3 de ratinho.

I.7. Hipóteses experimentais

Hipótese 1: Todas as formulações dos produtos de branqueamento testados são citotóxicas.

Hipótese 2: A citotoxicidade dos produtos varia consoante o tipo de formulação do produto de branqueamento.

II.MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Materiais

II.1.1. Produtos de branqueamento

Neste trabalho foram usados quatro tipos de produtos de branqueamento: Opalescence® Boost PF 40%, Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% e 10%, BBryance® a 0,095% de peróxido de hidrogénio e peróxido de hidrogénio a 30%, com a apresentação representada nas Fig. 3,4 e 5.

O **Opalescence® Boost PF 40%** (Fig. 3) é utilizado para branqueamento no consultório sob supervisão de um médico dentista.

O produto **Opalescence® PF 10% e 16%** (Fig. 4) é utilizado para branqueamento em ambulatório sob supervisão de um médico dentista e contém peróxido de carbamida, nitrato de potássio e fluoreto.

O Kit de branqueamento Dentário **BBryance® com 0,095%** (Fig.5) de peróxido de hidrogénio é um produto em venda livre (*Over the Counter* - OTC).



Figura 3: Opalescence® Boost PF 40%, peróxido de hidrogénio a 40%, <https://www.ododo.gr/en/products/product/677-opalescence-boost-4>



Figura 4: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% e 10%, <https://www.opalescence.com/eu/pages/take-home.aspx>



Figura 5: Kit de branqueamento BBryance® a 0,095% de peróxido de hidrogénio, <https://www.bbryance.fr/boutique/1-kit-de-blanchiment-de-dents-bbryance>

Tabela 2: Resumo das características dos materiais testados neste estudo

Nome do produto	Fabricante*	Lote	Técnicas*	Tempo de aplicação*	Ingredientes**	Conformidade com nova legislação (OMD 2013)
Opalescence® Boost PF 40%	Ultradent Products, Inc	R3FL8C	Branqueamento direto no consultório	20 min por visita	***Um ativador (Nitrato de Potássio, Hidróxido de Potássio, Fluoreto de Sódio) O gel (Peróxido de hidrogênio)	Não (40% H ₂ O ₂)
Opalescence® PF 16% (≈ 5,8% H ₂ O ₂)	Ultradent Products, Inc	BFSNG	Branqueamento ambulatorio com moldeiras individuais	4-6 horas/dia (ou noite)	Glicerina, Água, Xilitol, Peróxido de Ureia (Carbamida), Carbómero, PEG-300, Hidróxido de Sódio, Sabor (Aroma), Nitrato de Potássio, EDTA, Fluoreto de Sódio	Sim 16% de PC (≈5,8% H ₂ O ₂)
Opalescence® PF 10% (≈ 3,6% H ₂ O ₂)	Ultradent Products, Inc	BFSNG	Branqueamento ambulatorio com moldeiras individuais	8-10 horas/dia (ou noite)	Glicerina, Água, Xilitol, Peróxido de Ureia (Carbamida), Carbómero, PEG-300, Hidróxido de Sódio, Sabor (Aroma), Nitrato de Potássio, EDTA, Fluoreto de Sódio	Sim 10% de PC (≈ 3,6% H ₂ O ₂)
BBryance® (≈ 0,095% H ₂ O ₂)	BBRYANCE SAS	UGS:BB0000001	Branqueamento ambulatorio em venda livre (OTC)	30 min por dia	Propilenoglicol, Glicerina, Carbómero, Ácido Azelaico, Peróxido de Ureia, Água, Óleo de <i>Mentha piperita</i>	Sim (0,095% H ₂ O ₂)

* Segundo Procedimientos, M. D. E. P. Y. (2019). Manual de productos y procedimientos.

** Segundo “Documentação Científica” do produto

*** Segundo informação da ficha de dados de Segurança do Opalescence® Boost PF 40%

II.1.2. Linha Celular

Para o estudo em causa foram utilizadas as células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), que constituem uma linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de rato (3T3), utilizadas em muitos estudos e por isso considerados como fibroblastos de referência (Thonemann et al., 2002).

A linha celular 3T3 tem sido regularmente utilizada para estudos de citotoxicidade *in vitro*, dado que estas células apresentam inibição de contacto e não são tumorigénicas, apresentando assim propriedades similares às células normais (ATCC, 1925). Vários estudos têm indicado que as respostas citotóxicas em linhagens celulares primárias de humanos têm a mesma ordem de classificação que as linhas celulares contínuas (Thonemann et al., 2002).

Em culturas, as células 3T3 apresentam uma forma fusiforme, com núcleo central e prolongamentos citoplasmáticos típicos, com crescimento aderente, formando uma monocamada de células.

II.1.3. Reagentes

Encontram-se na Tabela 3 os reagentes usados neste estudo.

Tabela 3: Reagentes biológicos usados neste estudo

Reagente	Fonte
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 0,5mg/ml, 99% puro	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Dimetilsulfóxido (DMSO), filtrado-esterilizado, 99% puro	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (Meio Eagle Dulbecco modificado), filtrado-esterilizado, testado para endotoxinas	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão-fosfato, PBS) 1xC, pH 6,0-7,0	Gibco, Londres, Reino Unido
<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> (FBS); esterilizado, pH 7,1, testado para endotoxina e hemoglobina	PAA, Pasching, Áustria.
Gentamicina 50mg/ml	Gibco, Londres, Reino Unido.
NEM Non-essential Amino Acid Solution 100x; filtrado-esterilizado, testado para endotoxinas	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução Tripan Blue (0,4%) (Azul de tripano), filtrada-esterilizada	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução de Piruvato de Sódio 100 mM (PNA)	Gibco, Londres, Reino Unido
Solução de Anfoterizina B 250 µg/ml (Fungizona), filtrada-esterilizada	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução L-glutamina-penicilina-estreptomicina (200 mg L-glutamina, 10000 U/ml Penicilina, 10 mg/ml Estreptomicina), filtrada-esterilizada (pen-strep-glu)	Gibco, Londres, Reino Unido
Tripsina de pâncreas suíno 1xC, filtrado-esterilizado, pH 6,4-7,0	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Água destilada estéril (autoclavada)	

II.1.4. Equipamentos do laboratório de cultura de células

Os equipamentos utilizados neste estudo encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Equipamentos laboratoriais

Equipamentos laboratoriais	Fonte
Balança de precisão M-Power, modelo AZ214	Sartorius TM , Goettingen, Alemanha
Câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2	LaboGene TM , Lynge, Dinamarca
Centrifugadora 3-16PK	Sigma [®] , Londres, Reino Unido
Câmara de Neubauer, modelo 8100104	Hirschmann Neubauer-Improved [®] , Estugarda, Alemanha
Criotubos	DentaLab TM , Madrid, Espanha
Espátula de metal	Asa Dental, Luca, Itália
Estufa incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO ₂ Water Jacketed	Shel Lab TM , Cornelious, EUA
Filtros de celulose com poros de 45 µm	Whatman [®] , Nova Jersey, EUA
Frascos de cultura de 25 cm ² (T25)	Sarstedt [®] , Nümbrecht, Alemanha
Leitor de microplacas, modelo 680	BioRad [®] , Califórnia, EUA
Micropipetas P10 e P100 e pontas estéreis	Gilson [®] , Middleton, EUA
Microscópio óptico invertido	Axiovert [®] 25, Zeiss, EUA
Pipeta multicanal BPE-300	Labnet International [®] , Nova Jersey, EUA
Placa de 96 poços	VWR International [®] , Xangai, China
Tubos Eppendorf de 2ml	DentaLab TM , Madrid, Espanha
Tubos Falcon 15ml e 50 ml	DentaLab TM , Madrid, Espanha

II.2. Métodos

Neste estudo foram efetuados testes de citotoxicidade *in vitro* de um produto de referência (H₂O₂ a 30%) e quatro produtos de branqueamento, utilizando concentrações diferentes de cada produto.

II.2.1. Cultura de células – Fibroblastos 3T3

O presente trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Universitário Egas Moniz, mais concretamente na sala de cultura de células.

De forma a impedir possíveis contaminações biológicas nas culturas de células e sabendo que as mesmas podem modificar os resultados dos ensaios de toxicidade, todos os procedimentos laboratoriais de manipulação de células, nomeadamente a utilização de

reagentes ou materiais de experiência ocorreram de forma asséptica, manuseando-se instrumentos esterilizados na câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene™, Lynge, Dinamarca). Esta câmara foi anteriormente desinfetada com álcool a 70% e após incidência de luz ultravioleta (UV), e os materiais usados foram esterilizados em autoclave (121°C, 30 min.) ou obtidos comercialmente estéreis.

As células 3T3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma, Reino Unido) suplementado com 10% de soro FBS (Sigma, USA), 1% de PNA 100mM (Gibco, Reino Unido), 1% fungizona 250 µg/mL (Sigma, Reino Unido), 1% MEM 100x (Sigma, Reino Unido), 1% de solução de penstrep-glutamina (Sigma, Reino Unido) e 0,1% de gentamicina 50mg/mL (Gibco, Reino Unido).

As células 3T3 estavam guardadas inicialmente em criotubos congeladas a -80°C em 10% de DMSO, tendo sido descongeladas rapidamente em água a 37°C, às quais se adicionou meio de cultura DMEM suplementado e as células foram transferidas para um frasco de cultura de 25cm²(T25) e adicionado 6 ml de DMEM.

As células foram incubadas a 37°C (incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO₂ Jacketed Incubator, Shel Lab), numa atmosfera humidificada com 5% CO₂ até atingirem uma confluência de 80% (as células ficam aderentes à base do frasco T25, e a confluência é calculada a partir das áreas com células vs áreas sem células), tendo o meio de cultura sido substituído a cada três dias. Quando as células estavam com a confluência entre 80% e 90% foram realizadas subculturas com parte das células e as outras células foram congeladas em DMSO para manter um stock de células viáveis guardado a -80°C, para utilização futura.

Para congelar as células, foi adicionado ao meio de cultura 10% de DMSO (Sigma, Reino Unido), colocadas num criotubo e congeladas lentamente, dos -20°C até aos -80°C.

Subculturas

O meio de cultura existente no frasco T25 foi aspirado e as células foram lavadas 1 vez com 3 ml PBS (1xc), e logo de seguida fez-se o tratamento com tripsina (700µl de tripsina a 0,25 mg/ml) para hidrolisar as proteínas de adesão possibilitando o destacamento e recolha das células.

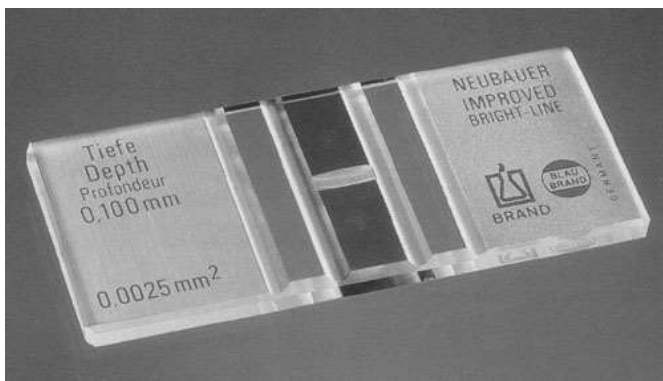
A tripsinização decorreu a 37°C, na incubadora durante 2-5 minutos, após os quais foi adicionado meio de cultura suplementado para parar esta reação (3 vezes o volume de tripsina). As suspensões celulares foram centrifugadas durante 3-5 minutos a 1500 rpm (centrifugadora Sigma, modelo 3-16 K). O sobrenadante é descartado e as células foram ressuspensas no pequeno volume de meio restante e adicionado meio de cultura suplementado até ao volume final de 3 ml.

Contagem de células em Suspensão

O número de células foi calculado a partir de 10µl de suspensão de células em 10µl de uma solução de azul de tripano, utilizando uma câmara de Neubauer modelo 8100104 Hirschmann Neubauer-improved (Hirschmann), (Fig. 6 e 7) adicionando, e o número de células por ml é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \text{média do n}^\circ \text{ de células contadas por quadrante (3 contagens)} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

A



B

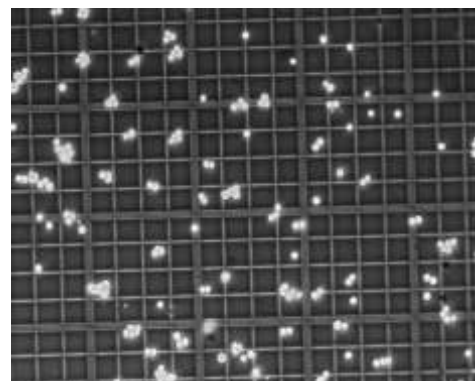


Figura 6: A- Câmara de Neubauer (hemacitómetro) B- Células na câmara de Neubauer observadas ao microscópio ótico, ampliação 100x <https://www.trade21.com.sg/counting-chamber-neubauer-improved-bright-line/>

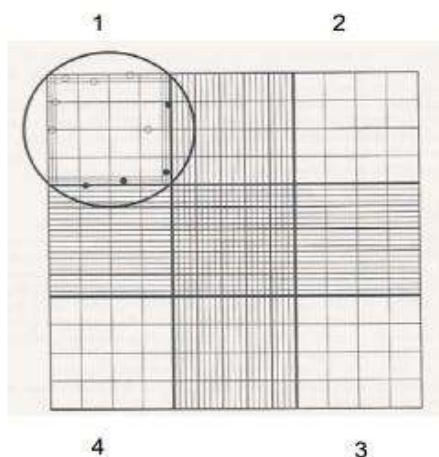


Figura 7: Esquema duma câmara de Neubauer observada ao microscópio óptico. Realce para as células presentes no conjunto de 16 quadrados periféricos. http://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf

As subculturas foram mantidas rotineiramente em frascos de cultura de 25 cm² (T25 – Sarstedt) com meio de cultura DMEM suplementado e as células foram subcultivadas (passadas) 10 a 20 vezes, o que significa que os testes de viabilidade celular foram realizados quando as células 3T3 tinham entre 10 a 20 passagens.

II.2.2. Preparação dos produtos

O presente trabalho avalia a citotoxicidade de 4 produtos de branqueamento e peróxido de hidrogénio (H₂O₂ a 30%) utilizada como referência:

- ◇ Peróxido de hidrogénio a 30%
- ◇ Opalescence[®] Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40%
- ◇ Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16%
- ◇ Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 10%
- ◇ BBryance[®], peróxido de hidrogénio a 0,095%

No 2º dia do ensaio MTT foram preparadas as soluções. O protocolo de preparação dos produtos foi realizado em condições de assepsia, com instrumentos esterilizados ou desinfetados com *spray* de álcool a 70%, em conformidade com o tipo, e uso de luvas de látex, assim como indicado nas normas ISO 10993 - Parte: “Preparação de amostras e materiais de referência” (2009).

Para cada produto, foram efetuadas 7 diluições a partir da diluição *stock*. As diluições foram em DMEM e feitas sequencialmente após boa dissolução no Vortex (Kurzmann et al., 2019).

Para a primeira diluição de Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% por exemplo, utilizámos a seringa que corresponde a 1ml e adicionámos 6ml de DMEM (diluição 1:6). Após mistura no Vortex, com uma nova pipeta, retirámos 0,4 ml da solução e adicionámos 1,6ml de DMEM (diluição 1:5). Esta solução chama-se solução STOCK. A partir do STOCK tiramos 1ml e adicionamos 1ml de DMEM (diluição 1:2) e a esta diluição chamámos solução S1. A partir de S1 retirámos 0,4 ml de S1 e adicionámos 1,6ml de DMEM (diluição 1:5). A esta solução chamámos S2. Posteriormente e conforme se pode observar na Figura 8, fizemos 4 outras diluições 1:5, designadas S3, S4, S5, S6 (Kurzmann et al., 2019).

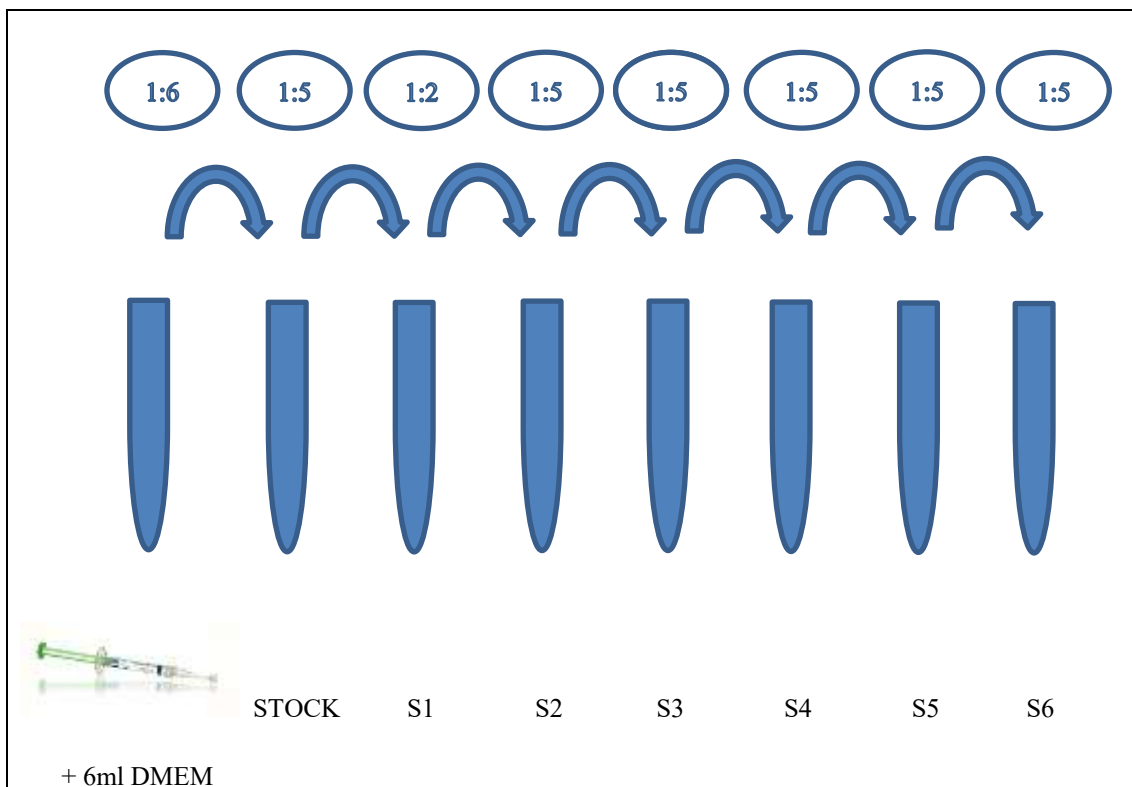


Figura 8: Esquema ilustrativo de uma preparação com diluição respectiva para o produto Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% (S1: solução 1, S2: solução 2, S3: solução 3, S4: solução 4, S5 solução 5, S6: solução 6)

As soluções/diluições dos outros produtos foram preparadas (Fig. 9 e 10) com procedimentos, mais o menos iguais de acordo com as seguintes Tabelas H₂O₂ = PH (peróxido de hidrogénio) / PC (peróxido de carbamida):

- H₂O₂ 30%
- Seringa H₂O₂ 40% - Falcon (15ml) - 1 ml seringa 40% + 1ml DMEM
- Seringa PC 16% (5,8% H₂O₂) - Falcon (15ml) - 1 ml seringa 16% PC + 5ml DMEM
- Seringa PC 10% (3,6% H₂O₂) - Falcon (15ml) - 1 ml seringa 16% PC + 5ml DMEM
- BBryance[®] H₂O₂ 0,095% - Falcon (15ml) – 1,5ml seringa 0,095% + 1,5ml DMEM

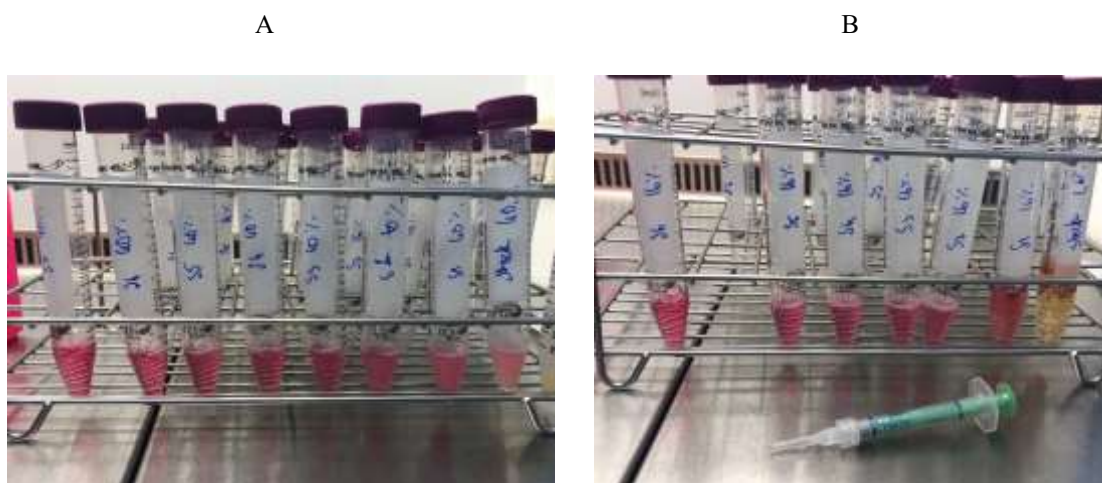


Figura 9: Soluções preparadas A- Opalescence[®] Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40% B- Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16%

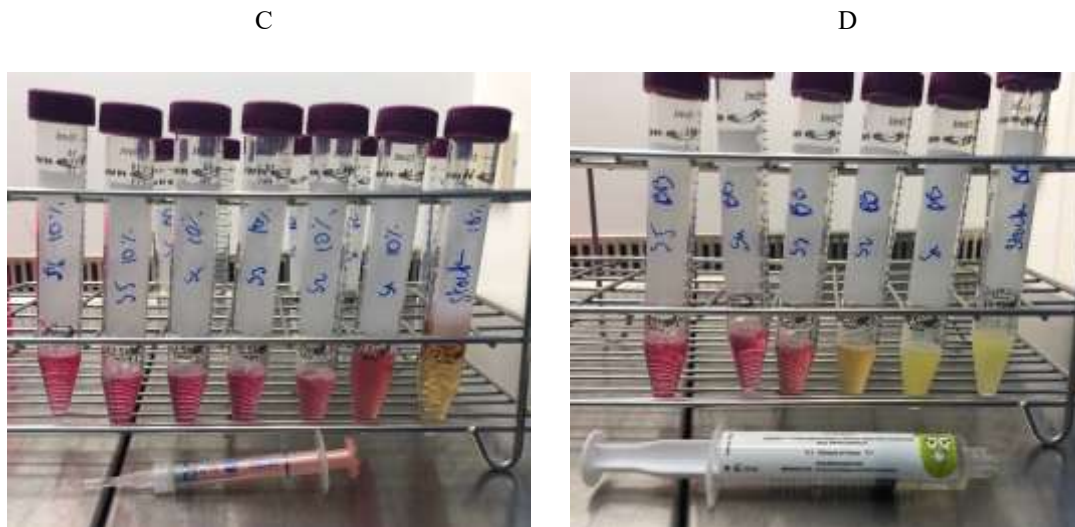


Figura 10: Soluções preparadas C- Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% D- BBryance®, 0,095% de peróxido de hidrogénio

II.2.3. Ensaio I: Otimização do número de células

Inicialmente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com concentrações crescentes de células: 5×10^4 , 3×10^4 , 1×10^4 e 5×10^3 em 200 μ l de meio de cultura por poço, incubadas a 37°C, com uma atmosfera humidificada com 5% CO₂, durante 24 horas.

Após as 24 horas de incubação foi retirado o meio de cultura e adicionado novo meio por mais 24 horas.

Passadas as 24 horas de incubação as células foram lavadas com meio de cultura e adicionados 200 μ l de solução de MTT que incubou durante 2 horas e foram lidos os resultados de Absorvâncias.

Foram realizados dois ensaios experimentais independentes para cada ensaio, com 8 réplicas para cada concentração de células.

Neste estudo utilizámos 5×10^4 células por poço e realizámos 3 ensaios independentes para as diferentes diluições de cada um dos produtos.

II.2.4. ENSAIO II: Incubação do tóxico durante 1 hora com diferentes concentrações em contacto com 5×10^4 células

Foram semeadas as células em 200 μ l de DMEM contendo 5×10^4 células em cada poço de 4 placas de 96 poços incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% CO₂, por 24 horas (Fig. 11).

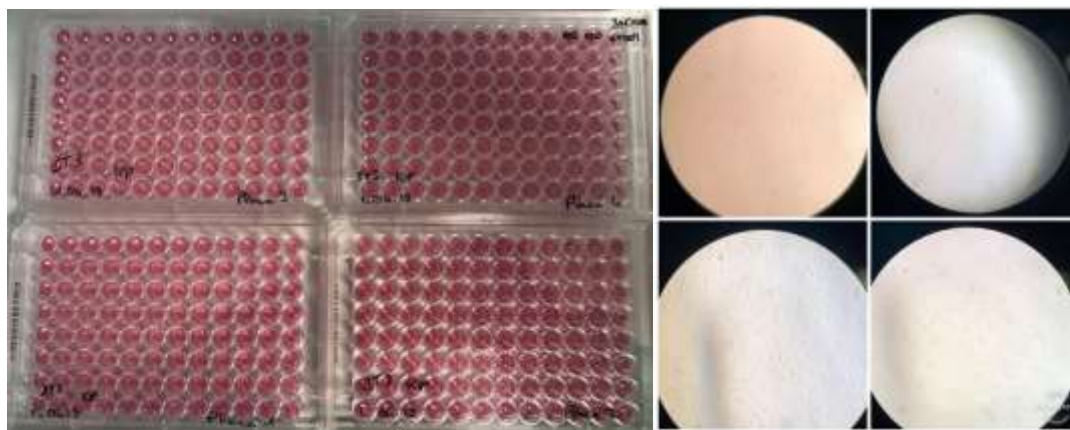


Figura 11: 4 Placas de 96 poços com células a incubar (5×10^4) após 24h, e fotografias de imagens de microscopia ótica das células com uma ampliação de 100 x.

No dia seguinte preparámos as soluções dos diferentes produtos como indicado posteriormente com concentrações diferentes para cada produto com as respetivas diluições. As soluções foram distribuídas em 4 placas:

- Placa 1: Peróxido de hidrogénio 30% H₂O₂
- Placa 2: Opalescence[®] Boost PF, peróxido de carbamida a 40%/ Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ peróxido de hidrogénio)
- Placa 3: Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 10% ($\approx 3,6\%$ H₂O₂) / BBryance[®] H₂O₂ 0,095%
- Placa 4: Controlo sem tóxico.

Retirámos o meio (DMEM) e incubar as células com 200 μ l de meio com o tóxico dissolvido, nas diferentes condições durante 1H. Para cada diluição dos produtos foi utilizada 1 coluna, com 8 Poços. A cada poço com as células aderentes foi adicionado um volume total de 200 μ l de cada diluição. Estas condições foram repetidas para todos os tipos de produtos.

Como branco de controlo foram utilizadas 3 colunas de 8 poços nos quais foram colocados apenas 200 µl de DMEM suplementado sem tóxico.

Após 1H de incubação, tirámos o tóxico e colocámos 200µl de meio completo (DMEM), e deixámos as células a crescer durante mais 24horas (Fig. 12).

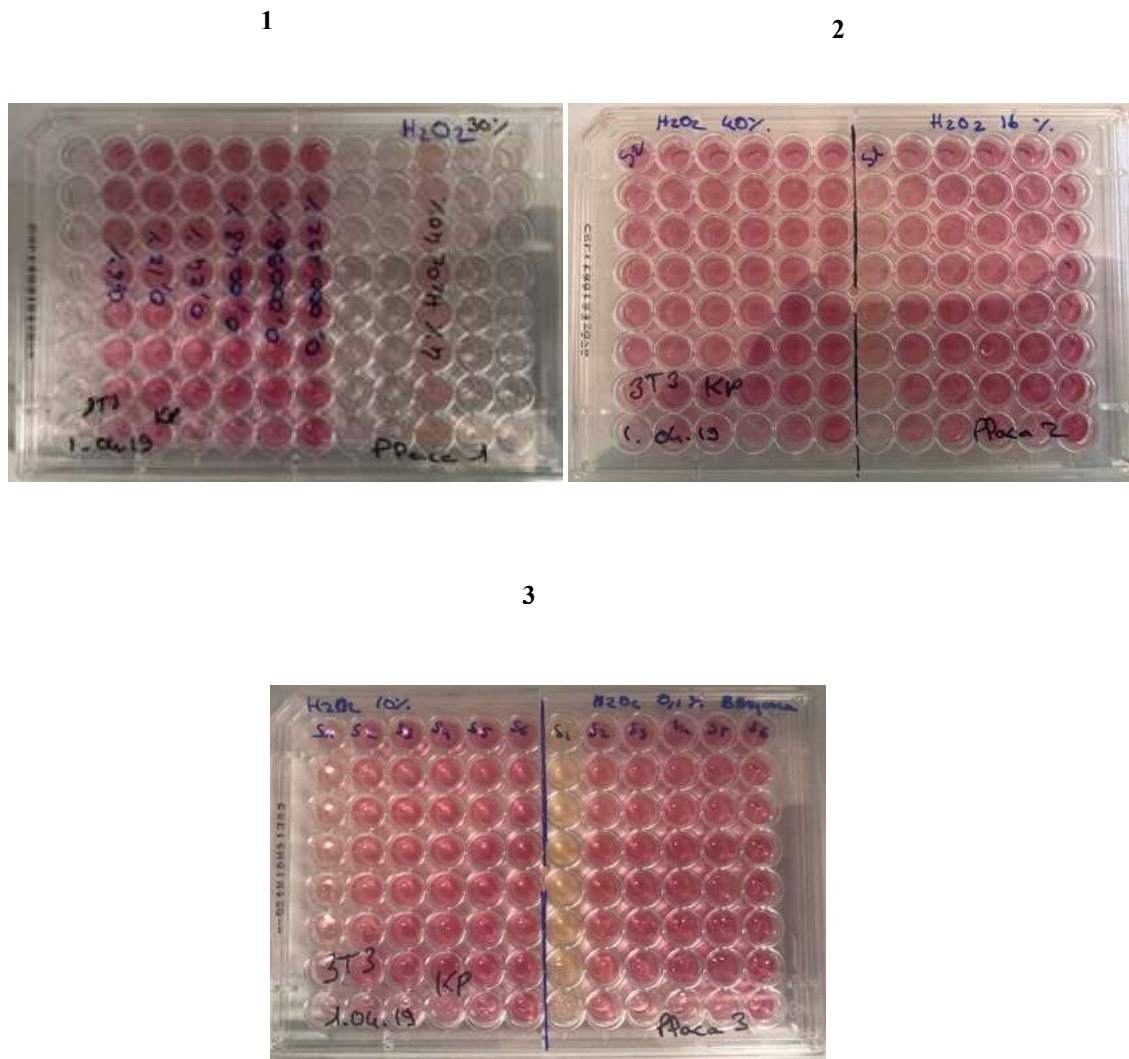


Figura 12: Fotografia das 3 placas de 96 Poços após incubação do toxico durante 1H 1- Placa 1: Peróxido de hidrogénio 30% H₂O₂ 2- Placa 2: Opalescence® Boost PF, peróxido de carbamida a 40%/ Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% (≈5,8% peróxido de hidrogénio) 3-Placa 3:Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈3,6% H₂O₂) / BBryance® H₂O₂ 0,095%

Após as 24 horas de incubação das células com o tóxico, foi interrompido este contacto e realizou-se o ensaio de redução do MTT para medir a percentagem de viabilidade celular. Os cristais de cor púrpura de formazan formados através da metabolização pelas enzimas desidrogenases mitocondriais das células viáveis foram solubilizados com DMSO e as placas foram lidas por espectrofotometria num comprimento de onda de 595 nm.

Podemos ver nas Tabelas 5,6,7,8,9 as diferentes diluições efetuadas para a preparação das soluções.

- Placa 1 da Fig.12: Peróxido de hidrogénio 30% H₂O₂

Tabela 5: Peróxido de hidrogénio a 30%, com uma primeira diluição de 1:5 (6%), as outras diluições estão indicadas na tabela;

Coluna	Nome	Solução	Concentração H ₂ O ₂ no poço
1ª coluna		Só células	
2ª coluna	S2	0,4ml (S1) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,6%
3ª coluna	S3	0,4ml (S2) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,12%
4ª coluna	S4	0,4ml (S3) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,024%
5ª coluna	S5	0,4ml (S4) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,0048%
6ª coluna	S6	0,4ml (S5) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00096%
7ª coluna	S7	0,4ml (S6) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,000192%
8ª coluna		Só células	
9ª coluna		Só células	
10ª coluna	S1*Boost	1ml Stock 4% + 1 ml meio	2% Opalescence® Boost
11ª coluna		Só células	
12ª coluna		Só células	

S1* H₂O₂ Seringa PH 40%

- Placa 2 da Fig. 12: Opalescence[®] Boost PF, peróxido de carbamida a 40%/ Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ peróxido de hidrogénio)

Tabela 6: Opalescence[®] Boost PF, peróxido de carbamida a 40%, com uma primeira diluição de 1:2 (20%), uma segunda de 1:5 (4%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;

Colona	Nome	Solução	Concentração H ₂ O ₂ no poço
Esta na placa 1	S1	1ml Stock 4% + 1ml meio (diluição 1:2)	2%
1ª coluna	S2 Boost	0,4ml (S1) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,4%
2ª coluna	S3	0,4ml (S2) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,08%
3ª coluna	S4	0,4ml (S3) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,016%
4ª coluna	S5	0,4ml (S4) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,0032%
5ª coluna	S6	0,4ml (S5) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00064%
6ª coluna	S7	0,4ml (S6) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,000128%

Tabela 7: Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ peróxido de hidrogénio), com uma primeira diluição de 1:6 (0,96%), uma segunda de 1:5 (0,19%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;

7ª coluna	S1	1ml Stock à 0,19% + 1ml meio (diluição 1/2)	0,096%
8ª coluna	S2	0,4ml (S1) + 1,6 ml meio (diluição 1/5)	0,019%
9ª coluna	S3	0,4ml (S2) + 1,6 ml meio	0,0038%
10ª coluna	S4	0,4ml (S3) + 1,6 ml meio	0,00077%
11ª coluna	S5	0,4ml (S4) + 1,6 ml meio	0,000154%
12ª coluna	S6	0,4ml (S5) + 1,6 ml meio	0,0000309%

- Placa 3 da Fig 12: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈3,6% H₂O₂) / BBryance® H₂O₂ 0,095%

Tabela 8: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈3,6% peróxido de hidrogénio), com uma primeira diluição de 1:6 (0,6%), uma segunda de 1:5 (0,12%) designada solução Stock e as outras diluições estão indicadas na tabela;

Colona	Nome	Solução	Concentração no poço
1ª colona	S1	1ml Stock 0,12% + 1ml meio (diluição 1:2)	0,06%
2ª colona	S2	0,4ml (S1) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,012%
3ª colona	S3	0,4ml (S2) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,0024%
4ª colona	S4	0,4ml (S3) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00048%
5ª colona	S5	0,4ml (S4) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,000096%
6ª colona	S6	0,4ml (S5) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,0000192%

Tabela 9: Tabela de diluição do BBryance®, a 0,095% de peróxido de hidrogénio com uma primeira diluição de 1:2 (concentração de 0,0475%) e uma segunda diluição de 1:5 (0,0095%), as outras diluições estão indicadas na tabela;

7ª colona	S1	1ml Stock 0,0095% + 1ml meio (diluição 1:2)	0,00475%
8ª colona	S2	0,4ml (S1) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00095%
9ª colona	S3	0,4ml (S2) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00019%
10ª colona	S4	0,4ml (S3) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,000038%
11ª colona	S5	0,4ml (S4) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,0000076%
12ª colona	S6	0,4ml (S5) + 1,6 ml meio (diluição 1:5)	0,00000152%

A partir do Ensaio II foram realizados 2 outros ensaios com um protocolo igual.

II.2.5. ENSAIO III e IV: Incubação do tóxico durante 1 hora com diferentes concentrações em contacto com 5×10^4 células

Nestes ensaios III e IV mantivemos o mesmo protocolo (Fig. 13), mas utilizámos menos concentrações de alguns dos produtos.

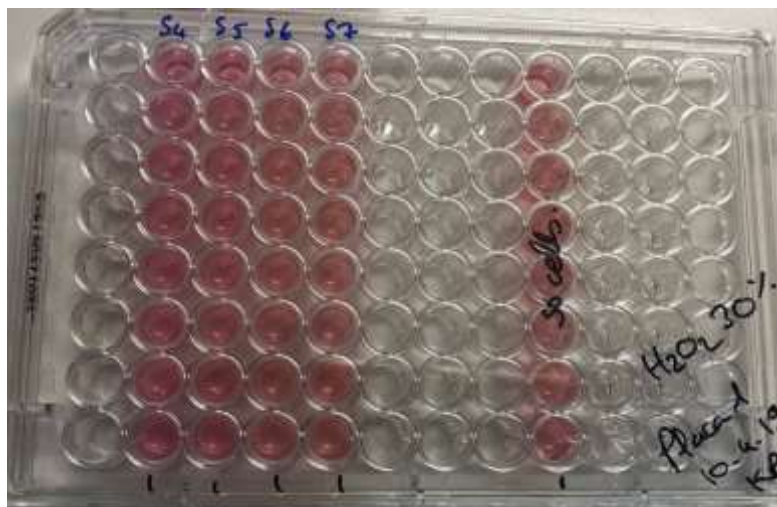
Fizemos 4 placas, com as diluições indicadas na Tabela 10.

- Placa 1: Peróxido de hidrogénio 30% H_2O_2
- Placa 2: Opalescence[®] Boost PF, peróxido de carbamida a 40%/ Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% ($\approx 5,8\%$ peróxido de hidrogénio)
- Placa 3: Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 10% ($\approx 3,6\%$ H_2O_2) / BBryance[®] H_2O_2 0,095%
- Placa 4: Controlo apenas com células sem tóxico

Tabela 10: Tabela com as diferentes concentrações usadas nos Ensaio III e IV. 1- Placa 1 2- Placa 2 2- Placa 3

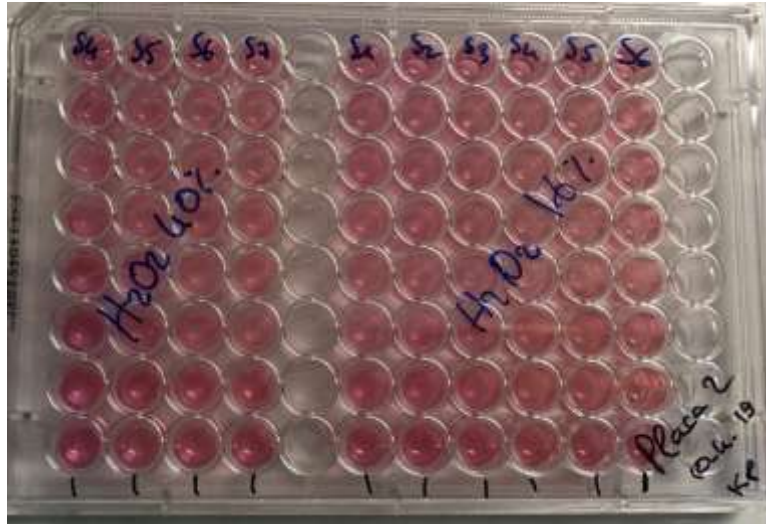
1

Nome da placa	Placa 1: Peróxido de hidrogénio 30% H_2O_2				
Nome da coluna	S4	S5	S6	S7	Só células
Concentração no Poço	0,024%	0,0048%	0,00096%	0,000192%	



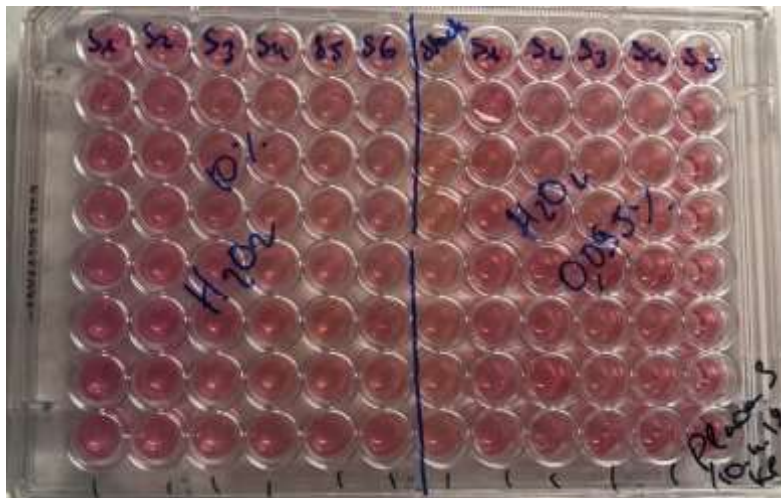
2

Nome da placa	Placa 2: Opalescence® Boost PF, peróxido de carbamida a 40%				Placa 2: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 16% (≈5,8% peróxido de hidrogénio)					
Nome da coluna	S4	S5	S6	S7	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Concentração no Poço	0,016 %	0,003 2%	0,000 64 %	0,00012 8%	0,19 %	0,096 %	0,019 %	0,003 8%	0,0007 7%	0,00015 4%



3

Nome da placa	Placa 3: Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈3,6% H ₂ O ₂)						Placa 3: BBryance® H ₂ O ₂ 0,095%					
Nome da coluna	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Stoc k	S1	S2	S3	S4	S5
Concentração no Poço	0,1 2%	0,0 6%	0,0 12 %	0,00 24%	0,000 48%	0,000 096%	0,04 75%	0,023 75%	0,004 75%	0,000 95%	0,000 19%	0,0000 038%



II.2.6. Determinação da viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio de redução do MTT. O ensaio do MTT baseia-se na redução de um sal de cor amarela, num produto de cor púrpura, o formazan, pelas enzimas succinonato desidrogenase presentes na membrana interna das mitocôndrias intactas de células viáveis. Só as células viáveis mantêm a posição destas enzimas na membrana possibilitando o contato com o sal que se acumulou na matriz mitocondrial, o que permite relacionar o número de células vivas com a concentração de formazan formado após contacto das células com um produto tóxico. Este ensaio é largamente utilizado para ensaios *in vitro* de citotoxicidade.

Os valores de Absorvância dos cristais de formazan são determinados por espectrofotómetro após serem solubilizados num solvente orgânico, DMSO, e estão relacionados com o número de células viáveis, como explicado anteriormente.

II.2.7. Ensaio do MTT

As células 3T3 são incubadas durante 24 horas com 200 µl do composto eventualmente tóxico determinado para cada ensaio, após esse tempo é retirado o composto que estava em contacto com as células que são lavadas com 100 µl meio de cultura. Adiciona-se então 200 µl de uma solução de MTT por poço, numa concentração de 0,5mg/ml, dissolvido em meio de cultura. Após a adição do MTT, a placa é incubada durante 2 horas, a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% CO₂. Após a incubação a solução de MTT é retirada das placas, as células são cuidadosamente lavadas com 4 gotas de PBS 1x e posteriormente secas, por inversão da placa e remoção do líquido por absorção em papel. Depois de estarem bem secas, adicionam-se 200 µl de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de MTT formados. As placas são lidas num leitor de microplacas Model 680 (Bio-Rad, California) num comprimento de onda de 595 nm (Vital, 2009).

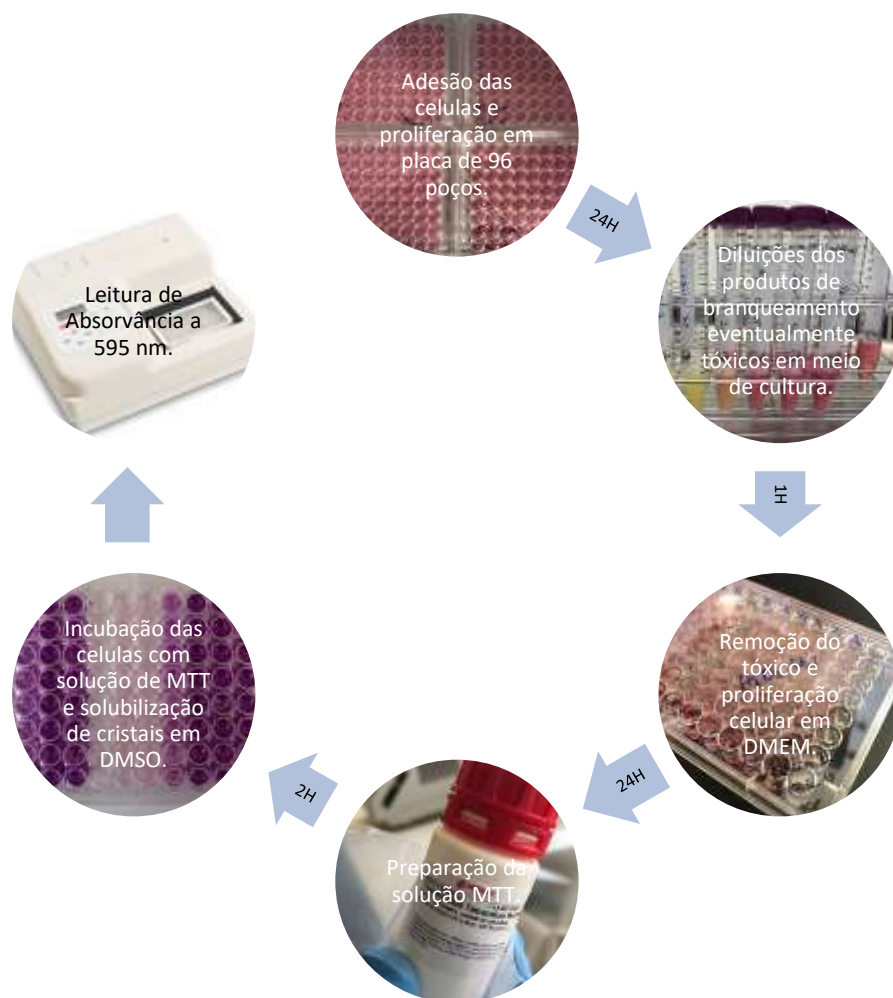


Figura 13: Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio II, III, IV

III. RESULTADOS

Ensaio nº1: Otimização do número de células a incubar

Como anteriormente mencionado, o 1º ensaio destinava-se à determinação do número de células a adotar nos ensaios nº II, III e IV, dado que nestes ensaios há uma certa variabilidade dependente do manipulador. As células em cada poço de uma placa com 96 poços, em quantidades crescentes (0 a 5×10^4) por coluna foram expostas a todo o procedimento do teste de MTT detalhado na secção de material e métodos. Seguidamente à solubilização dos cristais de formazan criados na reação de redução do MTT, distinguimos tonalidades de intensidade crescente por coluna, cujos valores médios de Absorvância estão apresentados na Tabela 11 e Figura 14.

Tabela 11: Valores de Absorvância do ensaio de otimização do número de células

	Abs (595 nm)				
	0 células	5×10^4 células	3×10^4 células	1×10^4 células	5×10^3 células
Abs Média (n=1)	0,029	2,147	1,816	1,511	1,404
Média-Branc	0,000	2,118	1,787	1,482	1,375
Desvio-padrão	0,002	0,330	0,045	0,114	0,135
ERRO (%)	6,29	15,37	2,49	7,53	9,60

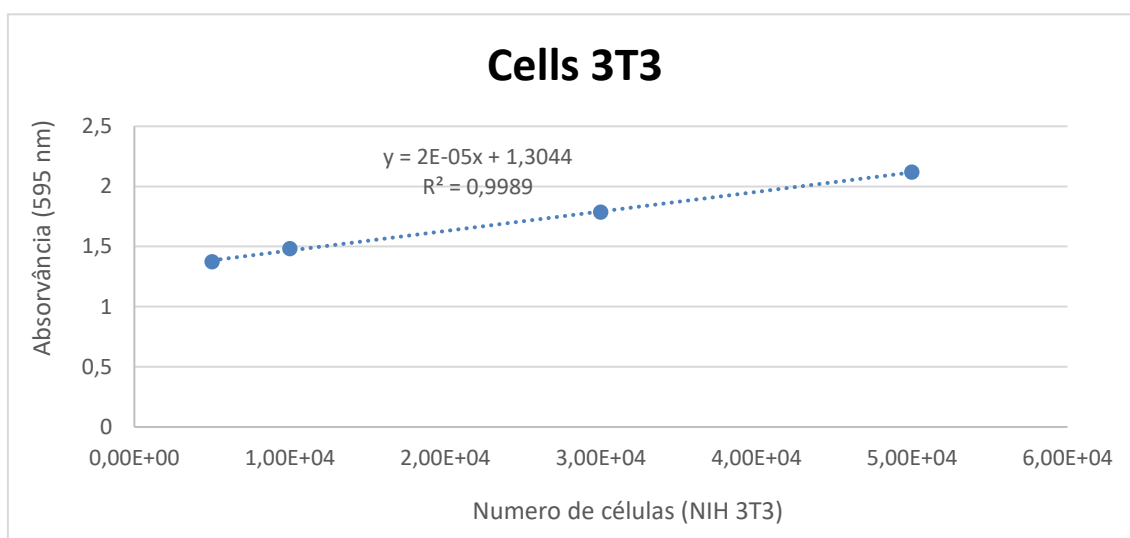


Figura 14: Valores da Absorvância (eixo Y) obtidos para cada as diferentes quantidades de células (eixo X) (valores referentes à tabela 11).

Pela análise destes resultados, verificámos que a quantidade de células que dão origem os valores mais elevados de Absorvância dentro da linearidade da Lei de Lambert-Beer é de 5×10^4 células, tendo sido esta a quantidade de células por poço escolhida para os seguintes estudos de viabilidade celular.

Ensaio nº II, III, IV: Incubação de 5×10^4 células com diferentes concentrações de diferentes tóxicos durante 1 hora.

O ensaio da incubação com os tóxicos visa a avaliação da citotoxicidade dos produtos, permitindo comparações entre várias variáveis, neste caso entre vários produtos. Como anteriormente verificámos que após a solubilização dos cristais de formazan com DMSO, os poços de cada coluna da placa de 96, apresentam diferentes tonalidades de acordo com as diferentes concentrações dos produtos postos em contacto com as células (Fig. 13). Os resultados de viabilidade celular apresentados a seguir para cada produto (Tabelas 12 a 16 e Fig. 15 a 19) representam 3 ensaios independentes em que cada concentração de produto testada corresponde a 8 poços (1 coluna) por ensaio.

Produto de referência H₂O₂ a 30%

Tabela 12: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto de referência H₂O₂ a 30%

Concentração H ₂ O ₂ (%, v/v)	Viabilidade celular*(%)				
	0%	0,024%	0,0048%	0,00096%	0,000192%
Viabilidade celular (n=3) (%)	100	7,9	39,8	94,3	97,7
Desvio-padrão	0,000	2,160	8,797	22,207	18,055
ERRO (%)	0,0	27,4	22,1	23,6	18,5

* a viabilidade foi calculada pela razão entre as Absorvâncias (595nm) de cada diluição e a Absorvância na ausência de qualquer tóxico (100% viabilidade)

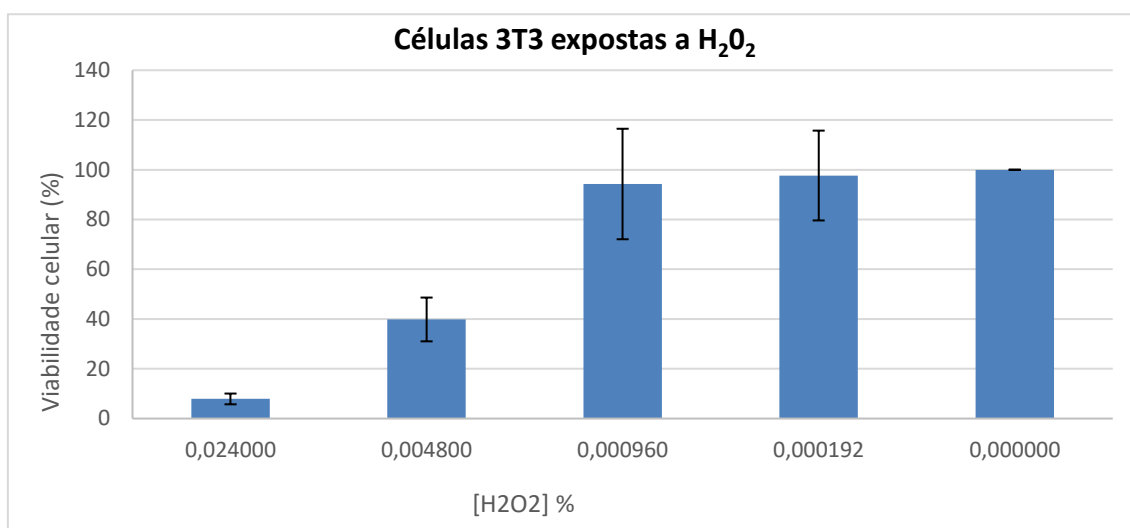


Figura 15: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ (eixo X) feitas a partir de uma solução concentrada de H₂O₂ a 30% (valores referentes à Tabela 12).

Opalescence® Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40%

Tabela 13: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence® Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40%

Concentração H ₂ O ₂ (%, v/v)	Viabilidade celular* (%)						
	0,00%	0,4%	0,08%	0,016%	0,0032%	0,00064%	0,000128%
Viabilidade celular (n=3) (%)	100	4,8	4,8	5,9	36,0	82,8	85,5
Desvio-padrão	0,000	0,008	0,010	0,019	0,018	0,043	0,115
ERRO (%)	0,0	12,8	16,2	26,4	4,0	4,0	10,6

* a viabilidade foi calculada pela razão entre as Absorvâncias (595nm) de cada diluição e a Absorvância na ausência de qualquer tóxico (100% viabilidade)

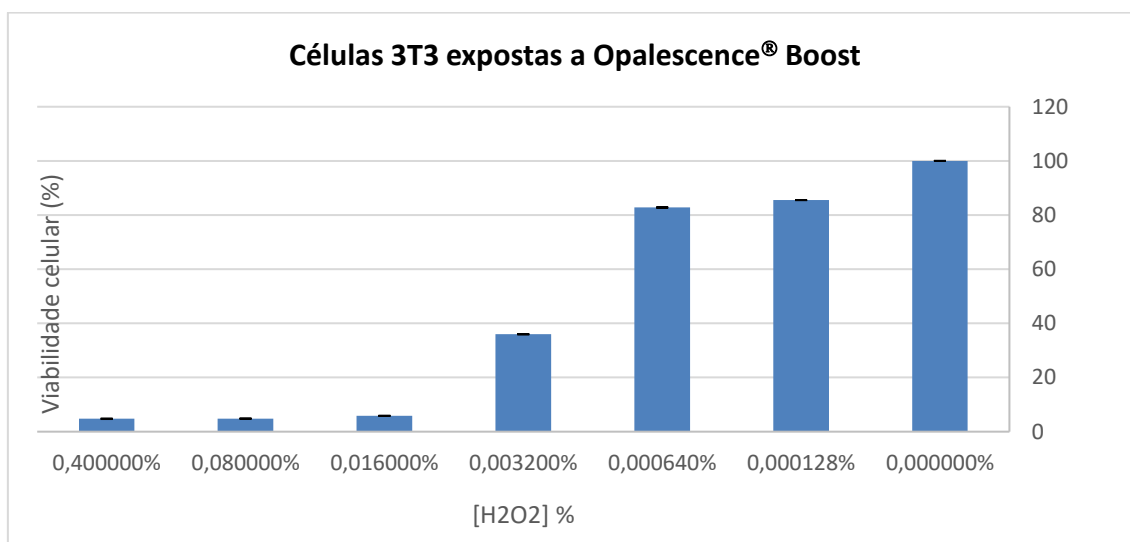


Figura 16: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) de Opalescence® Boost PF, peróxido de hidrogénio a 40% (valores referentes à Tabela 13)

Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% (≈ 5,8% de H₂O₂)

Tabela 14: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% (≈ 5,8% de H₂O₂)

Concentração H ₂ O ₂ (%, v/v)	Viabilidade celular*(%)					
	0,00%	0,096%	0,019%	0,0038%	0,00077%	0,000154%
Viabilidade celular (n=3) (%)	100	8,2	23,0	64,9	68,0	89,6
Desvio-padrão	0,000	1,812	14,929	24,990	33,040	8,641
ERRO (%)	0,00	22,1	64,9	38,5	48,6	9,6

* a viabilidade foi calculada pela razão entre as Absorvâncias (595nm) de cada diluição e a Absorvância na ausência de qualquer tóxico (100% viabilidade)

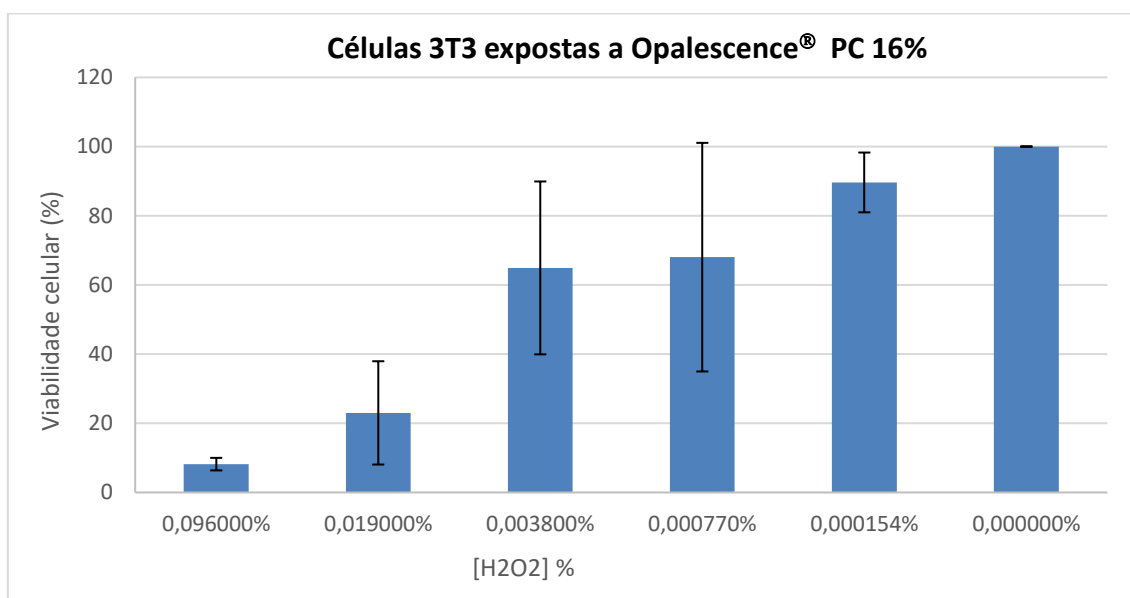


Figura 17: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) para Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% (≈ 5,8% de H₂O₂) (valores referentes à Tabela 14)

Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈ 3,6% de H₂O₂)

Tabela 15: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈ 3,6% de H₂O₂)

Concentração H ₂ O ₂ (%, v/v)	Viabilidade celular* (%)					
	0%	0,06%	0,012%	0,0024%	0,00048%	0,000096%
Viabilidade celular (n=3) (%)	100	10,0	40,1	83,0	92,9	93,4
Desvio-padrão	0,000	6,043	1,980	10,949	8,456	11,447
ERRO (%)	0,0	60,6	4,9	13,2	9,1	12,3

* a viabilidade foi calculada pela razão entre as Absorvâncias (595nm) de cada diluição e a Absorvância na ausência de qualquer tóxico (100% viabilidade)

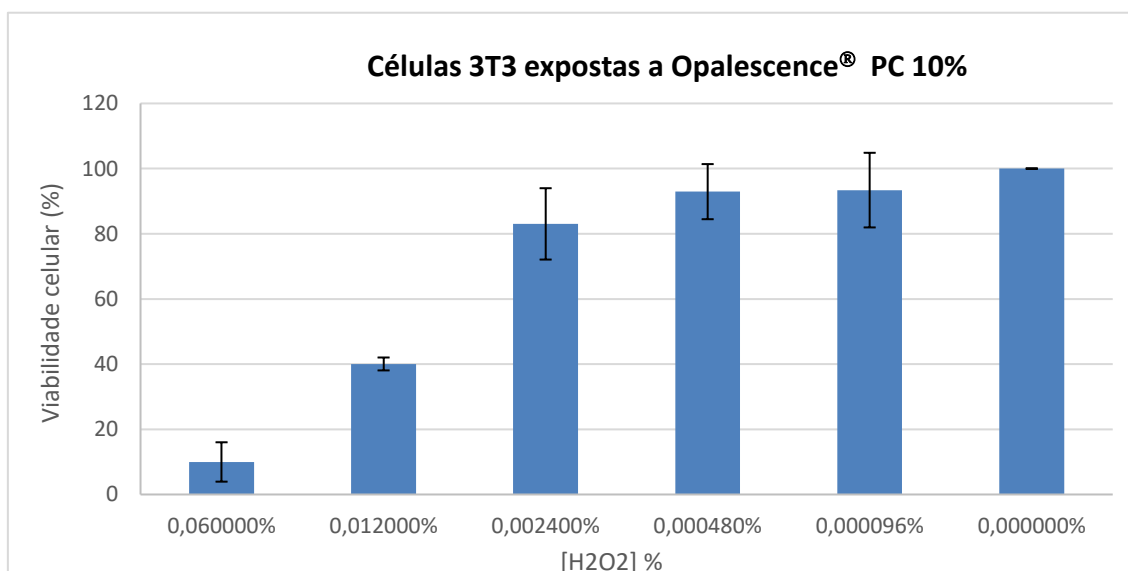


Figura 18: Valores de viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes diluições (eixo X) de Opalescence® PF, peróxido de carbamida a 10% (≈ 3,6% de H₂O₂) (valores referentes à Tabela 15)

BBryance[®], 0,095% de peróxido de hidrogénio**Tabela 16: Resultados de viabilidade celular após exposição das células 3T3 a diferentes diluições do produto BBryance[®], 0,095% de peróxido de hidrogénio.**

	Viabilidade celular*(%)				
Concentração H ₂ O ₂ (%, v/v)	0%	0,02375%	0,00475%	0,00095%	0,00019%
Viabilidade celular (n=3) (%)	100	17,4	49,6	93,7	94,4
Desvio-padrão	0,000	6,866	15,787	7,678	9,450
ERRO (%)	0,0	39,5	31,8	8,2	10,0

* a viabilidade foi calculada pela razão entre as Absorvâncias (595nm) de cada diluição e a Absorvância na ausência de qualquer tóxico (100% viabilidade)

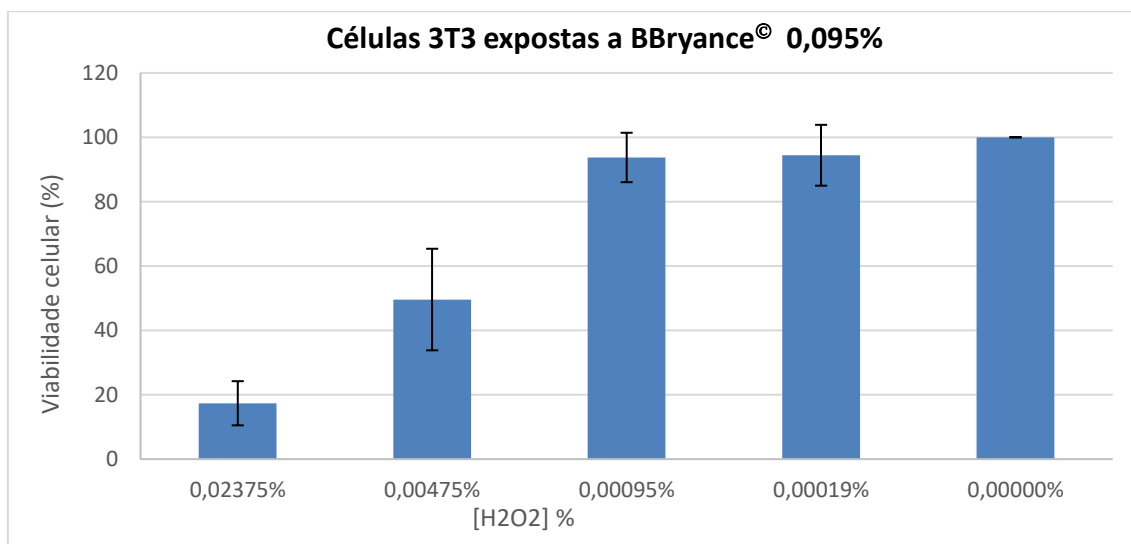


Figura 19: Valores da viabilidade celular (eixo Y) na presença de diferentes concentrações (eixo X) de BBryance[®], 0,095% de peróxido de hidrogénio (valores referentes à Tabela 16)

Os resultados mostram que os vários produtos de branqueamento deste estudo bem como o peróxido de hidrogénio utilizado como referência são tóxicos nas concentrações mais elevadas deste estudo dado que os valores de viabilidade celular atingem valores abaixo de 70% definido como o limite pela ISO 10993 - Part 5: “Tests for in vitro cytotoxicity” (2009) para classificar os produtos como tóxicos. A toxicidade dos produtos diminui à medida que se aumenta a sua diluição, e nas maiores diluições testadas a viabilidade

celular atinge valores superiores a 90 % para os géis Opalescence® PF de peróxido de carbamida a 10% e BBryance® 0,095% o que não acontece com os géis Opalescence® PF de peróxido de carbamida 16% e Opalescence® Boost PF peróxido de hidrogénio 40% que atingem valores de viabilidade celular ligeiramente inferiores, embora se possa dizer que todos os produtos deixam de ser tóxicos nas maiores diluições testadas.

Comparação entre o produto de referência H₂O₂ e os diferentes produtos incluídos neste estudo.

Tabela 17: Valores de IC₅₀ calculados através da calculadora do Quest GraphTMEC₅₀

	Opalescence® PF Boost 40% peróxido de hidrogénio	Opalescence® PF 16% peróxido de carbamida	Opalescence® PF 10% peróxido de carbamida	BBryance® 0.095% peróxido de hidrogénio	H ₂ O ₂ 30% peróxido de hidrogénio
IC ₅₀	1×10 ⁻³	6×10 ⁻³	1×10 ⁻³	4×10 ⁻³	4×10 ⁻³

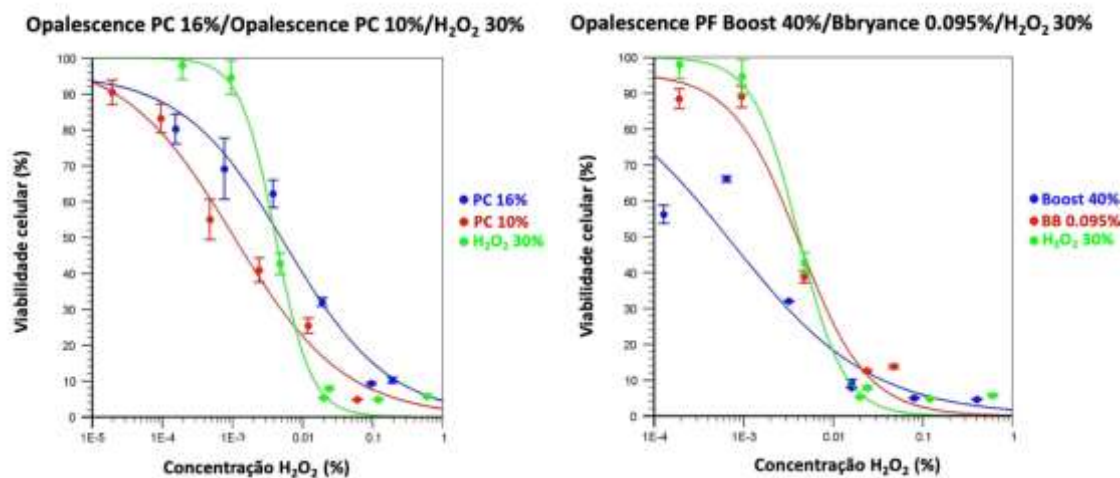


Figura 20: Curvas de resposta das células à dose de H₂O₂ em escala logarítmica. Valores IC₅₀ calculado através da Calculadora IC₅₀ da Quest Graph™

Os valores de IC₅₀ (Tabela 17) que representam as concentrações efetivas dos extratos que provocam uma redução de 50% no número de células viáveis foram para o gel de branqueamento a 40% de peróxido de hidrogénio de 0,001%, e para os géis de peróxido de carbamida a 10% e 16% de 0,006% e 0,001%, e para BBryance® de 0,004%. A IC₅₀ para o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) utilizado como referência, nas mesmas

condições foi de 0,004%. Estes resultados mostram que as IC₅₀ para os vários produtos de branqueamento testados e o peróxido de hidrogénio H₂O₂ referência são da mesma ordem de grandeza.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 17 e na Figura 20, podemos concluir que o produto Opalescence® PF a 16% de peróxido de carbamida é mais tóxico do que o produto Opalescence® PF a 10% de peróxido de carbamida e que o H₂O₂ controlo tem uma toxicidade intermédia entre estes dois produtos de acordo com os valores de IC₅₀ obtidos, embora com ambos os produtos as células atinjam valores de viabilidade celular acima dos 90% nas maiores diluições.

Da mesma maneira como se pode ver na Tabela 17 e Figura 20, o produto Opalescence® Boost PF a 40% de peróxido de hidrogénio é o mais tóxico dos produtos testados porque em vez de atingir 100% de viabilidade numa concentração baixa como o H₂O₂, atinge apenas 70% de viabilidade, embora o valor de IC₅₀ seja idêntico ao valor calculado para Opalescence® PF a 16% de peróxido de carbamida. Em relação ao BBryance® a 0.095% de peróxido de hidrogénio podemos ver que os resultados são iguais ao H₂O₂ usado como referência quer a nível de recuperação da viabilidade celular quer a nível da IC₅₀ que têm o mesmo valor de 4×10^{-3} .

Comparação da viabilidade das células expostas aos vários produtos de branqueamento em função das concentrações máxima e mínima testadas

Tabela 18: Comparação entre concentrações máximas e mínimas testadas para cada produto e viabilidade celular.

	H ₂ O ₂ 30% peróxido de hidrogénio	Opalescence® Boost PF 40% peróxido de hidrogénio	Opalescence® PF 16% peróxido de carbamida	Opalescence® PF 10% peróxido de carbamida	BBryance® 0.095% peróxido de hidrogénio
Concentração máxima (%) / viabilidade celular (%)	0,024/7,89	0,08/4,82	0,096/8,19	0,06/9,98	0,024/17,36
Concentração mínima (%) / Viabilidade celular (%)	0,000192/97,69	0,000128/85,53	0,000154/89,63	0,000096/93,40	0,00019/94,41

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 18), podemos afirmar, que quando se utilizam concentrações elevadas dos vários produtos estudados a viabilidade celular é

muito baixa, mas concentrações muito baixas dos mesmos produtos apesar de afetarem ligeiramente a viabilidade celular (valores de viabilidade celular superior a 85%) não são tóxicas.

Tabela 19: Diluições necessárias para atingir condições não tóxicas (viabilidade > 70%)

Utilização	Produto / agente de branqueamento	Equivalente em H ₂ O ₂ no produto (%)	Diluições do produto	Concentração prevista de H ₂ O ₂ para atingir 70% de viabilidade	*Razão em ambulatório /no consultório
No consultório	Opalescence [®] Boost PF 40% / peróxido de hidrogénio	40	1/62500	0.000081	1
Em ambulatório	Opalescence [®] PF 16% / peróxido de carbamida	5.8	1/37500	0.000133	1.6
	Opalescence [®] PF 10% / peróxido de carbamida	3.6	>1/1500	0.000352	4.3
	BBryance [®] 0.095% / peróxido de hidrogénio	0.095	1/100	0.000190	2.3
Referência	H ₂ O ₂ 30% / peróxido de hidrogénio	30	> 1/31250	0.002420	-

* razão entre a concentração prevista para atingir 70% de viabilidade entre os vários produtos e o Opalescence[®] Boost PF usado apenas em consultório

Os resultados mostraram uma grande diminuição na viabilidade dos fibroblastos após a exposição aos produtos de branqueamento contendo H₂O₂ ou peróxido de carbamida (Fig.20). Para atingir condições consideradas não-tóxicas, ou seja, mostrando uma redução na viabilidade celular <30%, foi necessário diluir os produtos branqueadores pelo menos 100 até 62.500 vezes, ou seja para concentrações entre 0,0001 – 0,0004% H₂O₂, como mostrado na Tabela 19. A toxicidade dos produtos depende evidentemente do seu teor de H₂O₂, mas também pode resultar de outros componentes presentes nos produtos comerciais, como é o caso dos ácidos utilizados para estabilizar o H₂O₂ ou iões adicionados para ativação do H₂O₂ (De Oliveira Duque e al., 2014).

IV. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade das células, após a exposição aos géis de branqueamento contendo H_2O_2 e comparar citotoxicidade entre os produtos utilizados em consultório e em ambulatório (incluindo OTC) com o produto de referência, o peróxido de hidrogénio H_2O_2 . Como os fibroblastos desempenham um papel central nos tecidos da gengiva e dente, essas células têm sido usadas como células-alvo para estes estudos de citotoxicidade de materiais dentários.

De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, um dos agentes de branqueamento Opalescence® Boost PF utilizado contem 40% de peróxido de hidrogénio, o qual atua diretamente como substância branqueadora. Em contrapartida, a segunda e a terceira geração de branqueadores que contêm peróxido de carbamida a 16% e 10%, libertam espécies reativas de oxigénio equivalentes ao peróxido de hidrogénio, a concentrações máximas de 5,8% e 3,6% de peróxido de hidrogénio, respetivamente (Goldberg et al., 2010). A quarta geração foi um gel de branqueamento vendido sem receita médica *Over-the-Counter*; BBryance® que liberta de peróxido de hidrogénio com concentração de cerca de 0,095% (Carey, 2014).

Optamos por testar as várias diluições de H_2O_2 para atingir 70% de viabilidade celular que são consideradas como não tóxicas, e desta forma ver qual dos produtos é mais tóxico entre os produtos em ambulatório, consultório e OTC. Podemos concluir que o mais tóxico é o Opalescence® Boost PF a 40% de peróxido de hidrogénio, dado que as células não recuperam totalmente a sua viabilidade como acontece na presença de grandes diluições dos outros produtos. O produto BBryance® é o menos tóxico de nosso estudo porque tem menor concentração de peróxido de hidrogénio embora o valor de IC_{50} seja idêntico ao do H_2O_2 utilizado como referência (Kurzmann et al., 2019; De Almeida et al., 2015).

Muitas das diluições dos géis de branqueamento e de H_2O_2 utilizadas foram tóxicas para as células 3T3 e a extensão dos efeitos variou entre os materiais, as suas diluições e os aditivos utilizados. Como esperado, as concentrações mais elevadas de todos os produtos de branqueamento testados provocaram uma enorme redução na viabilidade celular, como mostrado nas Tabelas 12 a 16 e figuras 15 a 19. Após 1 hora de

exposição tóxica e 24 horas de recuperação, podemos observar na Tabela 19 que para alcançar condições não tóxicas (viabilidade > 70%) foi necessário diluir os produtos de branqueamento pelo menos 62 500 vezes no caso de Opalescence® Boost PF a 40% de peróxido de hidrogénio. Para o produto Opalescence® PF a 16% de peróxido de carbamida fizemos uma diluição de 37 500 e pelo menos 1500 para o produto Opalescence® PF a 10% de peróxido de carbamida por fim foi necessário diluir 100 vezes no caso do produto BBryance® (Kurzmann et al., 2019).

Como referido anteriormente, o produto em consultório que testamos é o Opalescence® Boost PF(peróxido de hidrogénio a 40%), que se encontra disponível no mercado apesar de a Diretiva Comunitária proibir a comercialização, de produtos cosméticos que contenham peróxido de hidrogénio com percentagem acima ou igual a 6% (Regra III) (OMD, 2013; Sulieman, 2004).

Como produtos em ambulatório foram testados os produtos Opalescence® PF (peróxido de carbamida a 10% e 16%), que são produtos que só podem ser adquiridos pelo médico dentista ou estomatologista e que fazem parte da regra I do OMD (inferior a 6% de peróxido de hidrogénio) (OMD, 2013; Sulieman, 2004).

O BBryance® (0,095% de peróxido de hidrogénio) também é um produto de uso em ambulatório sem nenhuma proibição o que permite que as pessoas o possam adquirir livremente sem prescrição médica (OMD, 2013; Sulieman, 2004).

De acordo com a Tabela 19, percebemos que para atingir 70% de viabilidade, no gel de branqueamento com 40% de peróxido de hidrogénio temos de fazer uma diluição de 1/62.500. Por outro lado, para atingir a mesma percentagem de viabilidade celular nos géis a 16% e 10% de peróxido de carbamida, temos que fazer diluições de 1/37.500 e 1/1500, respetivamente, o que indica que o produto com 16% de carbamida é bastante mais tóxico do que o produto com 10% de carbamida, embora ambos sejam bastante menos tóxicos que o produto com H₂O₂ a 40%. Para o gel BBryance® verificámos que para obter 70% da viabilidade celular, temos de utilizar apenas uma diluição de 1/100. Estes resultados mostram que a maior parte das células após uma hora de exposição e 24 horas de recuperação, não recuperam a viabilidade de acordo com as condições experimentais utilizadas e que todos os géis testados no nosso estudo são tóxicos nas

menores diluições, embora com diluições muito elevadas possa não haver toxicidade (viabilidade celular superior a 70%) (Kurzmann et al., 2019).

Por se tratar do produto Opalescence[®] Boost PF a 40% que vai ser depositado nos dentes, diretamente no esmalte, com proteção dos tecidos, notámos que com uma concentração de 0,08% temos uma viabilidade de 4,82% e em comparação com o nosso produto de referência, o peróxido de hidrogénio (H₂O₂ a 30%), para uma concentração quase idêntica de 0,024%, temos uma viabilidade de 7,89%, indicando que o produto branqueador é tanto ou mais citotóxico que produto de referência, o peróxido de hidrogénio (H₂O₂ a 30%). Os nossos resultados estão de acordo com Almeida e al (2015) que afirma que uma concentração muito forte na boca provoca uma baixa viabilidade celular sugerindo citotoxicidade do produto.

A citotoxicidade observada dos agentes branqueadores testados é consistente com os dados da literatura, como por exemplo, num estudo que mostra que as preparações de branqueamento a 35-40% H₂O₂ são citotóxicas em odontoblastos imortalizados (Coldebella et al., 2009) ou em culturas primárias de fibroblastos de polpa humana (Dantas et al., 2010). Mesmo baixas concentrações (10-20% de peróxido de carbamida) são citotóxicas para odontoblastos imortalizados (Lima et al., 2013), fibroblastos dérmicos humanos (Baldea et al., 2017) e células estaminais do folículo dentário humano (Baldea et al., 2017).

De acordo com Greenwall-Cohen et al. (2019), podemos dizer que os géis de branqueamento de venda livre (OTC) podem reduzir não só a dureza do esmalte como também induzir alterações na sua superfície e produzir um efeito citotóxico. No nosso estudo, podemos afirmar que o produto BBryance[®] a 0,095% de peróxido de hidrogénio também é tóxico para as células NIH / 3T3.

É interessante notar que o dano celular após uma hora de exposição ao H₂O₂ e para os quatro extratos de gel branqueador foi irreversível nas concentrações efetivas, porém em concentrações onde fizemos diluições maiores, podemos ver que para o mesmo protocolo (1 hora de exposição, 24h de recuperação), as células recuperam e temos uma viabilidade celular próxima a 100% (Fernandes et al., 2018).

Os nossos dados indicam que os mecanismos envolvidos na toxicidade dos agentes de branqueamento são muito similares, se não idênticos, aos mecanismos induzidos pelo peróxido de hidrogénio a 30% usado como referência, dado que os efeitos são muito semelhantes.

Os nossos resultados corroboram os resultados de Fernandes et al. (2018), segundo os quais o efeito citotóxico dos géis de peróxido de carbamida 16% ou 10% é menor comparativamente ao gel de branqueamento a 40% de peróxido de hidrogénio, o que confirma que as quantidades de peróxidos incluídos no gel de peróxido de carbamida, são mais baixas para além de que a quantidade de peróxido de hidrogénio é ainda menor porque resulta da decomposição da carbamida ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$) em peróxido. Recentemente, tem sido sugerido que os níveis de peróxido de hidrogénio que excedem a capacidade dos antioxidantes celulares para manter a homeostasia redox são uma das principais causas de *stress* oxidativo, resultando em danos no DNA provocando a morte celular apoptótica. De acordo com nossos dados, também podemos ver uma diferença na toxicidade entre o gel de 10% e o gel de 16%, sendo que a viabilidade celular é maior no gel a 10%.

Os valores de citotoxicidade não dependem apenas dos produtos testados. Muitos fatores externos podem influenciar a resposta citotóxica como seja, e a título de exemplo, a escolha de células, os erros inerentes ao operador e o método limitado usado para avaliar os parâmetros em questão.

Vitral et al. (2009) demonstraram que as linhas celulares dos animais, tal como por exemplo, a linha 3T3 de fibroblasto de ratinho são menos sensíveis aos testes de citotoxicidade do que as humanas. A resistência de diferentes tipos de células a diferentes tipos de agressões é variável e pode envolver diferentes mecanismos. A utilização neste estudo de outras linhas celulares dar-nos-ia eventualmente outros resultados (Coldebella et al., 2009).

Erros relacionados com o operador podem estar presentes nos resultados desta investigação, uma vez que as técnicas laboratoriais, exigem uma certa prática, reconhecendo-se que pode haver pequenas variações intra e inter-testes na precisão do volume, temperaturas, durações, etc.

Soares et al. (2013) afirmaram que a difusão do peróxido de hidrogénio através dos tecidos dentários e seus efeitos citotóxicos foram proporcionais ao tempo de contato do gel branqueador com o esmalte. No entanto, o peróxido pode ter efeitos adversos no dente e outros tecidos orais (Colares et al., 2019).

Foi demonstrado num outro estudo de Soares et al. (2011) que o gel de branqueamento contendo peróxido de carbamida a 16% causa efeitos tóxicos trans-esmalte e transdentinais a células MDPC-23 cultivadas e também reduz a microdureza do esmalte após 1, 7 e 14 dias de aplicação do gel clareador. No entanto, mais estudos clínicos são necessários para avaliar a segurança de terapias de branqueamento ambulatorio envolvendo diversas técnicas e produtos.

Neste estudo, a hipótese 1 foi aceite, porque todas as formulações dos produtos de branqueamento testados são citotóxicas. A segunda hipótese foi aceite também porque a citotoxicidade dos produtos varia consoante o tipo de formulação (sobretudo a concentração do agente de branqueamento) do produto de branqueamento.

V. CONCLUSÕES

Todos os géis de branqueamento deste estudo foram citotóxicos para os fibroblastos de ratinho em concentração eficazes, presentes nos produtos de branqueamento. Após uma hora de exposição e 24h de recuperação, pudemos observar que, nas concentrações eficazes há uma viabilidade muito fraca, no entanto, com diluições mais ou menos elevadas a partir dessas concentrações ótimas, a viabilidade celular aumenta para valores superiores a 70%, deixando de ser considerados citotóxicos.

Os nossos resultados estão de acordo com outros estudos que também mostram que concentração elevadas de peróxido de hidrogénio resultam numa viabilidade celular baixa, mas para concentrações baixas de peróxido de hidrogénio, a viabilidade celular é elevada.

Embora não possamos extrapolar este efeito diretamente para os dentes humanos, porque a concentração de H_2O_2 que chega à polpa depende da difusão através dos túbulos dentinários, as nossas observações são de grande preocupação, em particular para a saúde das células gengivais. Além disso, os produtos de branqueamento vendidos para uso doméstico são tão citotóxicos quanto o produto em consultório a ser aplicado sob a supervisão de um profissional. Quando calculado os valores de IC_{50} para todos os produtos incluindo peróxido de hidrogénio obtivemos valores da mesma ordem de grandeza (à volta de 10^{-3}) o que indica que a toxicidade dos produtos depende essencialmente da concentração de peróxido de hidrogénio.

Uma vez que descobrimos que os produtos ambulatoriais têm toxicidades semelhantes, prevemos que o gel de BBryance[®] induzirá efeitos menos graves devido à menor concentração de H_2O_2 presente no gel.

Com base nas condições deste estudo, concluiu-se que as substâncias libertadas pelos géis de branqueamento Opalescence[®] Boost PF 40%, Opalescence[®] PF, peróxido de carbamida a 16% e 10%, BBryance[®] (0,095%) e peróxido de hidrogénio a 30% (peróxido de hidrogénio) não diluídas são altamente citotóxicas para fibroblastos em cultura.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abouassi, T., Wolkewitz, M., & Hahn, P. (2011). Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: An in vitro study. *Clinical Oral Investigations*, *15*(5), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0439-1>
- Alqahtani, M.Q. (2014). Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dental Journal*, *26*(2), pp.33–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2014.02.002>
- Al-Salehi, S. K. (2009). Effects of bleaching on mercury ion release from dental amalgam. *Journal of Dental Research*, *88*(3), 239–243. <https://doi.org/10.1177/0022034508328676>
- Azer, S. S., Machado, C., Sanchez, E., & Rashid, R. (2009). Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus. *Journal of Dentistry*, *37*(3), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.11.005>
- Azrak, B., Callaway, A., Kurth, P., & Willershausen, B. (2010). Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *22*(6), 391–399. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2010.00372.x>
- Bahari, M., Alizadeh Oskoe, P., Savadi Oskoe, S., Pouralibaba, F., & Morsali Ahari, A. (2016). Mercury release of amalgams with various silver contents after exposure to bleaching agent. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, *10*(2), 118–123. <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.019>
- Baldea, I., Olteanu, D. E., Filip, A. G., Cenariu, M., Dudea, D., Tofan, A., ... Moldovan, M. (2017). Toxicity and efficiency study of plant extracts-based bleaching agents. *Clinical Oral Investigations*, *21*(4), 1315–1326. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1882-4>
- Basting, R. T., Rodrigues, A. L., & Serra, M. C. (2003). The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *Journal of the*

- American Dental Association*, 134(10), 1335–1342.
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0047>
- Caldas, A., Vasconcelos, D., Sampaio, G., Campos, J., & Aragão, L. (2015). Produtos Clareadores Over the Counter. *Revista Bahiana de Odontologia*, 6(2), 113–121.
<http://dx.doi.org/10.17267/2238-2720revbahianaodonto.v5i2.586>
- CAMACHOa, G. B., NEDELb, F., MARTINSb, G. B., & Gabriela Garcia TORINO. (2008). Avaliação da rugosidade superficial de resinas compostas expostas a diferentes agentes. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 37(3), 211–216.
<http://www.revodontolunesp.com.br/files/v37n3/v37n3a02.pdf>
- Carey, C.M. (2014). Tooth whitening: What we now know. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 14(SUPPL.), pp.70–76.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jebdp.2014.02.006>
- Coldebella, C. R., Ribeiro, A. P. D., Sacono, N. T., Trindade, F. Z., Hebling, J., & Costa, C. A. de S. (2009). Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Brazilian Dental Journal*, 20(4), 267–274.
- Colares, V. L. P., Lima, S. N. L., Sousa, N. C. F., Araújo, M. C., Pereira, D. M. S., Mendes, S. J. F., ... Fernandes, E. S. (2019). Hydrogen peroxide-based products alter inflammatory and tissue damage-related proteins in the gingival crevicular fluid of healthy volunteers: a randomized trial. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40006-w>
- Costa, C. deSouza, & Huck, C. (2006). Cytotoxic Effects and Biocompatibility of Bleaching Agents Used in Dentistry: a Literature Review. *Robrac*, 15(39), 3–14.
- Daniel, C. P., Soares, D. G. S., Andreetta, M. R. B., Hernandes, A. C., Hebling, J., & Costa, C. A. S. (2011). Efeitos de Diferentes Sistemas de Clareamento Dental Sobre a Rugosidade e Morfologia Superficial do Esmalte e de uma Resina Composta Restauradora Effects of Different Tooth Bleaching Systems on the Roughness and Superficial Morphology of Enamel and a Rest, 20(52), 7–14.

- Da Costa, J., McPharlin, R., Hilton, T., Ferracane, J., & Wang, M. (2012). Comparison of Two At-home Whitening Products of Similar Peroxide Concentration and Different Delivery Methods. *Operative Dentistry*, 37(4), 333–339. <https://doi.org/10.2341/11-053-c>
- Dantas, C. M. G., Vivan, C. L., Ferreira, L. S., Freitas, P. M. de, & Marques, M. M. (2010). In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Brazilian Oral Research*, 24(4), 460–466. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242010000400015>
- De Almeida, L. C. A. G., Soares, D. G., Azevedo, F. A., de Gallinari, M. O., de Costa, C. A. S., dos Santos, P. H., & Briso, A. L. F. (2015). At-home bleaching: Color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Brazilian Dental Journal*, 26(4), 378–383. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300380>
- De Almeida, L. C. A. G., Soares, D. G., Gallinari, M. O., de Souza Costa, C. A., dos Santos, P. H., & Briso, A. L. F. (2015). Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clinical Oral Investigations*, 19(3), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1285-3>
- De Oliveira Duque, C. C., Soares, D. G., Basso, F. G., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2014). Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clinical Oral Investigations*, 18(6), 1631–1637. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1147-4>
- Demarco, F. F., Meireles, S. S., & Masotti, A. S. (2009). Esthetic Dentistry Over-the counter whitening agents: a concise review § Esthetic Dentistry. *Braz Oral Res*, 23, 64–70. <http://www.scielo.br/pdf/bor/v23s1/10.pdf>
- Engle, K., Hara, A. T., Matis, B., Eckert, G. J., & Zero, D. T. (2010). Erosion and Abrasion of Enamel and Dentin Associated With At-Home Bleaching. *The Journal of the American Dental Association*, 141(5), 546–551. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2010.0227>
- Faraoni-Romano, J. J., Da Silveira, A. G., Turssi, C. P., & Serra, M. C. (2008). Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: Effect

- on dental microhardness and roughness. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 20(6), 395–402. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2008.00216.x>
- Fernandes, A. M. M., Vilela, P. G. F., Valera, M. C., Bolay, C., Hiller, K. A., Schweikl, H., & Schmalz, G. (2018). Effect of bleaching agent extracts on murine macrophages. *Clinical Oral Investigations*, 22(4), 1771–1781. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2273-1>
- Franchi, G.J. (1950). A practical technique for bleaching discolored crowns of young permanent incisors. *J. Dent. Child.* 20, 68–69.
- Godinho, J. et al. (2014). Effect of bleaching gel in Ca, P and Zn content in tooth enamel evaluated by micro-EDXRF. Elsevier, Volume 337, pp. 78-82.
- Goldberg, M., Grootveld, M. & Lynch, E. (2010). Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: A review. *Clinical Oral Investigations*, 14(1), pp.1–10.
- Greenwall-Cohen, J., Francois, P., Silikas, N., Greenwall, L., Le Goff, S., & Attal, J. P. (2019). The safety and efficacy of “over the counter” bleaching products in the UK. *British Dental Journal*, 226(4), 271–276. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0011-6>
- Haywood, V.B., Heymann, H.O. (1989). Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 20, 173–176.
- Haywood, V.B. (1992). History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int.* 23, 471–488.
- Haywood, V.B., Leech, T., Heymann, H.O., Crumpler, D., Bruggers, K. (1990). Nightguard vital bleaching: effects on enamel surface texture and diffusion. *Quintessence Int.* 21, 801–804.
- Hilton, T., Ferracane, J., & Broome, J. (2013). *Summitt’s Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (4.a ed.). Hanover Park, Illinois: Quintessence Publishing Company.

- Ic, S. (n.d.). Novas regras da União Europeia aplicáveis ao branqueamento dentário.
- ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (2009).
- ISO 10993- Parte: “Preparação de amostras e materiais de referência” (2009).
- Joiner, A. (2006). The bleaching of teeth: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, Volume 34, pp. 412-419.
- J.S., C., T.J., B., & W.H., B. (1992). Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *Journal of Endodontics*, 18(7), 315–317. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L22972922>
- Kashima-Tanaka, M., Tsujimoto, Y., Kawamoto, K., Senda, N., Ito, K., & Yamazaki, M. (2003). Generation of free radicals and/or active oxygen by light or laser irradiation of hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 29(2), 141–143. <https://doi.org/10.1097/00004770-200302000-00013>
- Kirk, E. (1889). The chemical bleaching of teeth. *Dent. Cosmos* 31, 273–283.
- Kurzmann, C., Verheyen, J., Coto, M., Kumar, R. V., Divitini, G., Shokoohi-Tabrizi, H. A., ... Agis, H. (2019). In vitro evaluation of experimental light activated gels for tooth bleaching. *Photochemical & Photobiological Sciences*. <https://doi.org/10.1039/c8pp00223a>
- Leite, T. C., Regina, K., & Dias, H. C. (2010). Efeitos dos agentes clareadores sobre a polpa dental: revisão de literatura, 203–208.
- Leonard RH Jr, Bentley C, Eagle JC, Garland GE, Knight MC, Phillips C. (2001). Nightguard vital bleaching: A long-term study on efficacy, shade retention, side effects, and patients’ perceptions. *J Esthet Restor Dent* ; 13:357–369.
- Lewinstein, I., Hirschfeld, Z., Stabholz, A., & Rotstein, I. (1994). Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin.

Journal of Endodontics, 20(2), 61–63. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81181-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81181-7)

Lima, A. F., Ribeiro, A. P. D., Soares, D. G. S., Sacono, N. T., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2013). Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(5), 1319–1325. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.762992>

Li, Y., & Greenwall, L. (2013). Safety issues of tooth whitening using peroxide-based materials. *British Dental Journal*, 215(1), 29–34. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.629>

Nutting, E., 1976. A new combination for bleaching teeth. *Dent. Clin. North Am.* 10, 655–662.

Ordem dos Médicos Dentistas. (2013). [Em linha]. Disponível em <http://www.omd.pt/branqueamento/legislacao>

Pecora, J.D., Cruzfilho, A.M., Sousaneto, M.D., Silva, R.G. (1994). In vitro action of various bleaching agents on the microhardness of human dentin. *Braz. Dent. J.* 5, 129–134.

Plotino, G., Buono, L., Grande, N. M., Pameijer, C. H., & Somma, F. (2008). Nonvital Tooth Bleaching: A Review of the Literature and Clinical Procedures. *Journal of Endodontics*, 34(4), 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.12.020>

Potočnik, I., Kosec, L., & Gašperšič, D. (2000). Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *Journal of Endodontics*, 26(4), 203–206. <https://doi.org/10.1097/00004770-200004000-00001>

Procedimientos, M. D. E. P. Y. (2019). Manual de productos y procedimientos. <https://www.ultradent.com/es>

Ronaldo Hirata. (2017). *Shortcuts in Esthetic Dentistry*

- Sasaki, R. T., Arcanjo, A. J., Flório, F. M., & Basting, R. T. (2009). Micromorphology and microhardness of enamel after treatment with home-use bleaching agents containing 10% carbamide peroxide and 7.5% hydrogen peroxide. *Journal of Applied Oral Science*, *17*(6), 611–616. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000600014>
- Silveira, J. (2015). Efeitos do Peróxido de Hidrogénio nos Tecidos Dentários. Tese de doutoramento em Medicina Dentária. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.
- Soares, D. G., Pastana, J. V., de Oliveira Duque, C. C., Dias Ribeiro, A. P., Basso, F. G., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2014). Influence of adhesive restorations on diffusion of H₂O₂ released from a bleaching agent and its toxic effects on pulp cells. *The Journal of Adhesive Dentistry*, *16*(2), 123–128. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a30688>
- Soares, D. G., Ribeiro, A. P. D., Lima, A. F., Sacono, N. T., Hebling, J., & Costa, C. A. de S. (2013). Effect of fluoride-treated enamel on indirect cytotoxicity of a 16% carbamide peroxide bleaching gel to pulp cells. *Brazilian Dental Journal*, *24*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302161>
- Soares, D. G., Basso, F. G., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2014). Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: Effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *Journal of Dentistry*, *42*(2), 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
- Soares, D. G., Ribeiro, A. P. D., da Silveira Vargas, F., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2013). Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clinical Oral Investigations*, *17*(8), 1901–1909. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0883-1>
- Soares, D. G. S., Ribeiro, A. P. D., Sacono, N. T., Coldebella, C. R., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2011). Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *International Endodontic Journal*, *44*(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01810.x>

- Soares, F. F. et al. (2008). Clareamento em Dentes Vitais: Uma Revisão Literária. *Revista Saúde.com*, 4(1), pp.72–84.
- SR Kwon, PW Wertz, DV Dawson, DS Cobb, and G Denehy. (2013). The Relationship of Hydrogen Peroxide Exposure Protocol to Bleaching Efficacy. *Operative Dentistry*, 38(2), 177-185. <https://doi.org/10.2341/11-351-L>
- Sulieman, M. (2004). An overview of bleaching techniques: I. History, chemistry, safety and legal aspects. *Dental Update*, 31(10), 608–10, 612–4, 616. <https://doi.org/10.12968/denu.2004.31.10.608>
- Tam, L. E., Kuo, V. Y., & Noroozi, A. (2007). Effect of prolonged direct and indirect peroxide bleaching on fracture toughness of human dentin. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 19(2), 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2007.00075.x>
- Tam, L. E., Lim, M., & Khanna, S. (2005). Effect of direct peroxide bleach application to bovine dentin on flexural strength and modulus in vitro. *Journal of Dentistry*, 33(6), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.022>
- Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K. A., & Schweikl, H. (2002). Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, 18(4), 318–323. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00056-2](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00056-2)
- Vieira, A. C., Dourado, V. C., Santos, L. C. S., Oliveira, M. C. S., Silva, I. S. N., Almeida, I. O., ... Souza, M. L. (2015). Reações adversas do clareamento de dentes vitais. *Odontologia Clinico-Científica (Online)*, 14(4), 809–812. http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882015000400006%0Ahttp://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882015000400006&lng=pt
- VITRAL, J. C. de A. (2009). Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(3), 359–365. <https://doi.org/10.4034/1519.0501.2008.0083.0018>

Vogel, R. (1975). Intrinsic and extrinsic discoloration of the dentition. (A literature review). *Journal of Oral Medicine*, 30(4), 99-104.

Watts, A., & Addy, M. (2001). Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *British Dental Journal*, 190(6), 309–316.
<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800959a>

Zalkind, M., Arwaz, J. R., Goldman, A., & Rotstein, I. (2006). Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. *Dental Traumatology*, 12(2), 82–88.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00102.x>