ALEXANDER CASSANDRI NISHIDA

**Análise da permeação de H_2O_2 amelodentinária
através de métodos eletroquímicos**

Versão Corrigida

São Paulo
2013

ALEXANDER CASSANDRI NISHIDA

**Análise da permeação de H_2O_2 amelodentinária
através de métodos eletroquímicos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração em Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nishida, Alexander Cassandri.

Análise da permeação de H_2O_2 amelodentinária através de métodos eletroquímicos / Alexander Cassandri Nishida ; orientador Carlos Eduardo Francci. -- São Paulo, 2013.

110 p. : fig.: graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Permeabilidade dentária. 2. Peróxido de hidrogênio - Odontologia. 3. Clareamento de dente. 4. Eletroquímica - Odontologia. I. Francci, Carlos Eduardo. II. Título.

Nishida AC. Análise da permeação de H₂O₂ amelodentinária através de métodos eletroquímicos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à memória dos meus pais **Jorge** e **Carolina**. Espero que estejam felizes por onde eu estou e onde pretendo chegar. Agradeço muito a educação e o carinho que dedicaram no curto período de tempo que dividimos juntos nessa vida. Não tive como retribuir em vida todo o sacrifício que fizeram por nós. Obrigado pela devoção no amor um pelo outro e por nossa família. Retribuirei chegando mais longe do que vocês jamais sonharam que seria possível para nós. Todo meu amor, para sempre, a vocês. Saudades. Obrigado

Dedico ao meu irmão **Bruno**, meu sangue, minha família, por dividir lágrimas e sorrisos nessa nossa vida tão complicada. Obrigado.

Dedico também a minha namorada **Talita**. Não existem palavras para agradecer pela paciência (muita), compreensão, preocupação, companheirismo... são todas as características que descrevem uma mulher dedicada a alguém que ama. Minhas palavras são muito pouco para descrever o meu agradecimento e sentimento por você. Espero conseguir corresponder a toda essa expectativa. Obrigado. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Obrigado **Deus** por tudo. Nos momentos bons e nos não tão bons, o Senhor esteve comigo. Obrigado por acalmar o meu coração e nunca me deixar pensar em desistir. Obrigado por ser o princípio que move o meu caráter e a força que movimenta a minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. **Carlos Eduardo Francci**. Devo a você a minha dedicação como dentista e a paixão pelo aperfeiçoamento e pelo desafio. O dentista que eu sou hoje é uma influência direta sua e agradeço do fundo do coração pela confiança, pela sinceridade e pelas grandes oportunidades. Mais que um orientador, hoje é um exemplo e um amigo.

Obrigado ao Prof. Dr. **Mauro Bertotti** que gentilmente cedeu seu laboratório, equipamentos, tempo, paciência e orientação para a realização desse trabalho.

Agradeço à **Pollyana Castro**, que compartilhou seu conhecimento, paciência e seu tempo para fazer esses experimentos darem certo. Sem sua ajuda esse trabalho não seria possível.

Ao aluno de graduação do Instituto de Química **Minoru** pela ajuda valiosíssima na confecção das celas e a todos os pós-graduandos e técnicos do LSEME.

Agradeço ao apoio dos meus “irmãos” de orientação, **Lilyan, Maurício, Miname e André**. E especialmente ao **André** por toda colaboração na minha formação na iniciação científica e na pós-graduação. Foi praticamente um orientador. Você já era um professor muito antes do seu emprego meu amigo. Parabéns pela sua humildade e pelo seu sucesso como pesquisador e docente.

Ao técnico **Douglas** da Bioquímica Oral pela ajuda no conhecimento técnico, químico, nas sugestões e pelas risadas.

À **Ana Carolina Romero** e à **Danielle Lima** pela ajuda fundamental na reta final desse trabalho. (Toca a musiquinha Ana...).

Aos **amigos** pós-graduandos do Departamento por dividir esse tempo tão puxado da pós-graduação sempre de bom humor e colaborando para o sucesso coletivo.

Aos Professores do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, **Alyne Simões, Antônio Muench, Fernando Nogueira, Igor Medeiros, Josete Meira, Leonardo Eloy, Paulo Francisco Cesar, Paulo Capel, Roberto Braga, Rosa Helena e Walter Miranda**, meu agradecimento por abrir minha mente para a ciência e pelas inspiradoras e encorajadoras conversas de corredor.

Agradecimentos especiais ao Prof. Dr. **Victor Elias Arana-Chavez** e ao Prof. Dr. **Rafael Y. Ballester** pela sensibilidade e pela ajuda que fez toda a diferença, em um momento de grande indiferença. Mestres e homens que vão além da Ciência.

Agradeço profundamente a uma das pessoas mais importantes do nosso departamento, a secretária **Rosa Cristina**, não só pelos inúmeros socorros, lembretes e ajudas, mas por ser uma fonte de alegria e motivação nos momentos mais difíceis. Obrigado pela amizade.

Agradeço à secretaria **Elidamar** e ao técnico **Antônio Lascala** pela solicitude em todos esses anos de departamento.

Agradeço à **Glauci** da Biblioteca da FOU SP pela atenção e carinho na revisão desta dissertação.

Agradeço aos **amigos da turma 102** da graduação da Faculdade de Odontologia da USP que me fazem tanta falta. Obrigado pelo tempo que passamos juntos, pelas conquistas e pelo amadurecimento.

Aos meus grandes amigos, **Daniel Gallafasi, Geraldo Martini, Allan Masuda, Henri Nakamura, Thiago Bolgueroni, Carol Yamashita, Eliane Kurihara, Alini Leandrino, Nataly Zambrana, Erick Lima, Karina Yanase, Fernanda Anastácio, Fernanda Mantelato, Larissa Maehara, Júlio César, Julius Alberto e Leandro Salebian** pela amizade. Mesmo que não possamos mais conviver tanto tempo juntos, saibam que sinto muitas saudades e sou muito grato por tudo o que já passamos juntos. Nossas lembranças nos unirão para sempre em nossos corações. Obrigado pelas risadas e por partilhar tanta coisa.

Agradeço aos professores do Grupo Free, **Edméa, Marcelo, Adriano, Jair, João, Marcos** por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço especialmente ao Prof. **Hélio Rui Dutra** por todas as oportunidades, por acreditar no meu talento (talvez me dando mais crédito do que eu mereça) e pela amizade.

Agradeço aos amigos do Instituto de Química, **Adriano Wasef, Fernando Dornelas, Ilton de Lima Motta, Luís Cesar Matos, Marcelo Boaventura, Miriam e Thiago Alberto** (em memória) por trazerem boas lembranças do meu tempo de funcionário.

Agradeço à minha madrinha **Salete** e ao meu padrinho **Veríssimo** por todo apoio desde sempre. São padrinhos no sentido real da palavra.

Agradeço ao **Pedro, à Leonor e ao Rogério** por serem uma segunda família. Obrigado por tudo.

Agradeço à família **Cassandri** que não se esquece nunca de mim, mesmo que eu tenha tão pouco tempo para dedicar a ela. **Vó, tios, tias, primos e primas.** Obrigado.

Agradeço à minha batyan **Miyoko** e ao meu dityan **Tadashi Nishida** (em memória), por me ensinarem a valorizar a cultura dos meus antepassados e entender que esforço sempre leva à recompensa.

Agradeço à minha linda afilhada **Beatriz** por tanto carinho.

Agradeço a todos vocês que fizeram e fazem grande diferença na minha vida.

“Para chegar aonde a maioria não chega é preciso fazer algo
que a maioria não faz”.

Autor desconhecido.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém

Tem gente que machuca os outros

Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

Nishida AC. Análise da permeação de H_2O_2 amelodentinária através de métodos eletroquímicos [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013

Existem muitas metodologias utilizadas para tentar analisar a permeação de peróxido de hidrogênio através das estruturas dentárias, porém não conseguem determinar o momento exato em que o peróxido começa a alcançar concentrações detectáveis dentro da câmara pulpar. OBJETIVO: Investigar a viabilidade de um modelo experimental de análise eletroquímica para detecção e mensuração da concentração de peróxido de hidrogênio proveniente de produtos utilizados em tratamento clareador e avaliar a cinética da difusão destes peróxidos através dos tecidos duros dentários. MATERIAIS E MÉTODOS: Foram utilizados 45 dentes incisivos bovinos permanentes mandibulares, cujo preparo envolveu a remoção da face lingual coronária, mantendo-se o esmalte e a dentina vestibulares intactos. Todos os dentes foram fixados em resina acrílica com auxílio de matriz elastomérica quadrangular e organizados segundo os testes: 1: análise eletroquímica e 2: análise espectrofotométrica. Para os testes foram utilizados clareadores à base de peróxido de hidrogênio (HP) e de peróxido de carbamida (CP) e seus respectivos placebos (PHP e PCP). Foram realizados três cronoamperogramas e três voltamogramas para cada uma das amostras. Utilizou-se a mesma cela no experimento eletroquímico e no teste espectrofotométrico, permitindo assim a comparação das metodologias. RESULTADOS: A análise eletroquímica mostrou na 1ª permeação de HP média de 1688,50 segundos quando comparada a 857,70s e a 457,70s da 2ª e da 3ª permeações, respectivamente. Desta forma observa-se que a 1ª permeação representa aproximadamente o dobro e o quádruplo dos valores sequenciais da 2ª e da 3ª permeações. Não foi detectado início de permeação para CP, PHP e PCP. Para o grupo HP há uma relação crescente nas concentrações de moléculas de peróxido de hidrogênio detectadas nas três permeações respectivamente. Entretanto, o crescimento entre a 1ª e 2ª permeação é discreto, quando comparado à 3ª permeação, onde foi detectada maior concentração de moléculas do peróxido de hidrogênio. No grupo CP observam-se médias de $2,96E-02 \mu A$ na 1ª permeação,

3,11E-05 μ A na 2ª permeação e 1,37E-04 μ A na 3ª permeação, havendo diferença entre a 1ª e 3ª permeação ($p = 0,00472$). Todavia, não ocorreram diferenças entre os demais grupos ($p > 0,05$). Quando comparado o método eletroquímico e o método espectrofotométrico, o peróxido de hidrogênio (HP) não demonstrou diferença significativa entre as análises ($p = 0,0826$); todavia o peróxido de carbamida mostrou diferenças entre as duas análises ($p = 0,0093$). CONCLUSÕES: A metodologia eletroquímica é tão eficaz quanto à metodologia consolidada na literatura para a detecção da presença de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar, nos testes com peróxido de hidrogênio 35%. O tempo necessário para que o peróxido de hidrogênio chegasse à câmara pulpar diminuiu a cada aplicação e a penetração do peróxido de hidrogênio aumentou a permeabilidade dos tecidos duros dentais.

Palavras chave: Permeação. Peróxido de Hidrogênio. Peróxido de Carbamida. Clareamento. Eletroquímica.

ABSTRACT

Nishida AC. Analysis of enameldentin permeation of H_2O_2 by electrochemical methods [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013

There are many methods used to analyze the permeation of hydrogen peroxide through the tooth structure, but they cannot determine the exact moment when the peroxide begins to reach detectable concentrations within the pulp chamber. OBJECTIVE: To investigate the feasibility of an experimental model of electrochemical analysis for detection and measurement of the concentration of hydrogen peroxide from products used in bleaching and evaluate the kinetics of diffusion of these peroxides through dental hard tissues. MATERIALS AND METHODS: We used 45 bovine permanent mandibular incisors, whose preparation involved removing the lingual coronary hard tissues keeping intact the vestibular enamel and dentin. All teeth were fixed in acrylic resin with the aid of elastomeric matrix square and organized according to the tests: 1: electrochemical analysis and 2: spectrophotometric analysis. For tests were used based bleaching hydrogen peroxide (HP) and carbamide peroxide (CP) and their respective placebos (PHP and PCP). Three cronoamperograms and three voltammograms were performed for each sample. We used the same cell to the spectrophotometric test, thus allowing comparison of methodologies. RESULTS: The analysis showed the 1st electrochemical permeation HP average of 1688.50 seconds when compared to 857.70s and 457.70s of the 2nd and 3rd permeations respectively. Thus we observe that the 1st permeation is approximately double and quadruple sequential values of the 2nd and the 3rd permeations. Not detected early permeation for CP, PHP and PCP. For Group HP there is a ratio of molecules increasing concentrations of hydrogen peroxide detected in three permeations respectively. However, the growth between the 1st and 2nd permeation is understated when compared to 3rd permeation, where there has been a greater concentration of molecules of hydrogen peroxide. In the CP group were observed averages of $2.96 \text{ E-}02 \mu\text{A}$ in the 1st permeation, $3.11 \text{ E-}05 \mu\text{A}$ in the 2nd permeation and $1.37 \text{ E-}04 \mu\text{A}$ in 3rd permeation, no difference between 1st and 3rd permeation ($p = 0.00472$). However,

there were no differences between the other groups ($p > 0.05$). When compared the electrochemical and spectrophotometric methods, hydrogen peroxide (HP) showed no significant difference between the analysis ($p = 0.0826$), yet the carbamide peroxide showed differences between the two analyzes ($p = 0.0093$). CONCLUSIONS: The electrochemical method is as effective as the consolidated methodology in the literature to detect the presence of hydrogen peroxide in the pulp chamber, in the tests with hydrogen peroxide 35%. The time required for the hydrogen peroxide to reach the pulp chamber decreased to each application and the penetration of hydrogen peroxide increased the permeability of dental hard tissues.

Keywords: Permeation. Hydrogen peroxide. Carbamide peroxide. Bleaching. Electrochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

CP	Peróxido de carbamida
EDTA	Ácido diaminotetracético
HP	Peróxido de hidrogênio
PCP	Peróxido de carbamida placebo
PHP	Peróxido de hidrogênio placebo

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Amperes
Ag	Prata
KCl	Cloreto de potássio
Fe(II)	Ferro 2
Fe(III)	Ferro 3
L	Litros
μ	Micro
m	Mili
M	Mol
n	Nano
V	Volts
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
CH ₆ N ₂ O ₃	Peróxido de carbamida
I	corrente elétrica
s	segundos

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Face pulpar e vestibular da amostra e paquímetro digital mostrando espessura final.....	45
Figura 4.2 - Cella desenvolvida para o teste eletroquímico. A é a seringa carregada com gel clareador. B é o recipiente para o gel durante o teste e C é a saída do gel em excesso injetado. A injeção do gel acontece de modo passivo quando a seringa de saída puxa o ar existente dentro do recipiente B criando um vácuo e injetando para dentro o gel existente em A.....	49
Figura 4.3 - Cella completa montada. A: Sistema de injeção de peróxido, B: Câmara do peróxido; C: Sistema de retirada de ar e sucção de peróxido; D: Amostra com dente; E: “Câmara Pulpar”.....	50
Figura 4.4 - Cella eletroquímica montada com a amostra e os eletrodos em posição para realizar a leitura.....	52
Figura 4.5 - Biopotenciostato Autolab	53
Figura 4.6 - Espectrofotômetro Beckman Coulter.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Grupos amostrais descrevendo os grupos, número de dentes utilizados e substâncias clareadoras às quais foram expostos.....	46
Tabela 4.2 - Composição química dos produtos clareadores utilizados de acordo com dados fornecidos pelo próprio fabricante.....	47
Tabela 4.3 - Instruções do fabricante para manipulação e aplicação dos produtos clareadores.....	48
Tabela 5.1 - Tempo de permeação do Peróxido de Hidrogênio (HP) em segundos medido através da análise eletroquímica.....	65
Tabela 5.2 - Tempo de permeação do Peróxido de Hidrogênio – Placebo (PHP) em segundos durante a análise eletroquímica.....	66
Tabela 5.3 - Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida (CP) em segundos durante a análise eletroquímica.....	67
Tabela 5.4 - Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida - Placebo (PCP) em segundos durante a análise eletroquímica.....	67
Tabela 5.5 - Registro de corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio (HP) durante a análise eletroquímica.....	68

Tabela 5.6 - Registro de Corrente elétrica (i) em Amperes a cada permeação de moléculas de placebo.....	70
Tabela 5.7 - Registro de Corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida.....	72
Tabela 5.8 - Registro de Corrente elétrica (i) em Amperes a cada permeação de moléculas de Peróxido de carbamida – placebo (PCP).....	73
Tabela 5.9 - Concentração de peróxido de hidrogênio a cada permeação.....	75
Tabela 5.10 -Comparação entre as Concentrações finais (mg) das substâncias (Peróxido de Hidrogênio (HP) e Peróxido de Carbamida (CP)).....	77
Tabela 5.11 - Concentrações em mg de peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida durante análise espectrofotométrica.....	79
Tabela 5.12 - Comparação entre as concentrações (mg) do peróxido de hidrogênio (HP) e do peróxido de carbamida (CP) durante a análise espectrofotométrica.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 - Voltamogramas sucessivos com as alíquotas de peróxido de hidrogênio utilizadas para montar a curva de calibração para determinação da concentração final de peróxido de hidrogênio.....	55
Gráfico 4.2 - Curva de calibração para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio nos voltamogramas.....	56
Gráfico 4.3 - Cronoamperograma mostrando adições de alíquotas de peróxido de hidrogênio sucessivas para determinação da concentração final nas leituras de corrente elétrica.....	57
Gráfico 4.4 - Curva de calibração realizada através das leituras dos cronoamperogramas sucessivos.....	58
Gráfico 4.5 - Curva de calibração para determinação das concentrações nas análises espectrofotométricas.....	60
Gráfico 5.1 - Cronoamperogramas mostrando 3 permeações diferentes para uma amostra e o branco.....	63
Gráfico 5.2 - Voltamogramas de 3 permeações de uma mesma amostra sobrepostos e o branco, mostrando aumento no valor da corrente com as permeações.....	64
Gráfico 5.3 - Análise do momento de permeação do Peróxido de Hidrogênio na análise eletroquímica	66
Gráfico 5.4 - Análise do registro de corrente elétrica em função de cada permeação de moléculas de Peróxido de Hidrogênio.....	69

Gráfico 5.5 - Análise do registro de corrente elétrica em função de cada permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio – placebo (PHP).....	71
Gráfico 5.6 - Análise do registro de corrente elétrica em função de cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida.....	73
Gráfico 5.7 - Análise do registro de corrente elétrica em função de cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida – placebo (PCP).....	74
Gráfico 5.8 - Avaliação da concentração (mg) de Peróxido de Hidrogênio (HP) em função do momento de permeação	77
Gráfico 5.9 - Avaliação da concentração (mg) de Peróxido de Carbamida (CP) em função do momento de permeação.....	79
Gráfico 5.10 Comparação entre as Concentrações finais (mg) das substâncias (Peróxido de Hidrogênio (HP) e Peróxido de Carbamida (CP)).....	81
Gráfico 5.11 Comparação entre as concentrações do peróxido de hidrogênio (HP) e do peróxido de carbamida (CP) durante a análise espectrofotométrica.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A mudança cromática da estrutura dentária pode afetar a autoestima do indivíduo, além de transmitir um aspecto envelhecido ao sorriso. Fatores como idade, consumo de alimentos, bebidas de coloração escura, tabagismo e fatores patológicos podem pigmentar os dentes, alterando assim a cor natural dos mesmos. Sabe-se que as origens dessas alterações podem ser intrínsecas, extrínsecas, ou uma combinação de ambas (Kwon et al., 2012d).

Considerando-se as alterações cromáticas no sorriso do paciente, o clareamento dentário é uma terapia econômica e conservadora utilizada para melhorar a estética de dentes escurecidos e vem sendo praticado na Odontologia há mais de 100 anos (Gökay et al., 2005).

Todas as terapias clareadoras visam devolver a segurança e a alegria de sorrir, alcançando uma satisfação estética através da remoção de pigmentos. Por essa razão, existem muitos tipos de clareadores no mercado, sendo baseados no peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente ativo, que pode ser aplicado diretamente (Peróxido de Hidrogênio líquido ou em gel), ou produzido a partir de uma reação química do Perborato de Sódio ou do Peróxido de Carbamida (Dahl; Pallensen, 2003).

Para a aplicação do agente ativo, foram desenvolvidas diversas técnicas, dentre elas o clareamento de consultório e o caseiro, ou também chamado de auto aplicação. O primeiro é realizado utilizando peróxido de hidrogênio em diversas concentrações (usualmente 15 a 40%) por períodos não superiores a uma hora (Joiner, 2007).

Já a técnica caseira ou de auto aplicação, utiliza o peróxido de carbamida aplicado através do uso de moldeiras customizadas por períodos de duas a quatro horas (10 a 16% de peróxido de carbamida), mas também podem ser utilizadas baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (4 a 10%) ou concentrações mais altas de peróxido de carbamida (22%) utilizando a técnica de moldeiras por até uma hora. (Joiner, 2007; Minoux; Serfaty, 2008).

A eficácia do clareamento é relacionada com a interação do material clareador com moléculas de pigmento e também com sua habilidade para se difundir através dos tecidos dentais duros devido ao baixo peso molecular das moléculas de peróxido de hidrogênio e seus precursores (Pashley, 1988; Hanks et al., 1993).

Uma das hipóteses mais aceitas teoriza que o clareamento funciona pela clivagem das moléculas de pigmento (cromóforos) presentes nas estruturas dentárias (Rotstein 1996; Kwon et al. 2012c).

De acordo com Kawamoto e Tsujimoto (2004), o $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxil) deve ser a principal substância responsável pelo clareamento. Este radical oxida os anéis complexos das estruturas moleculares dos pigmentos que, por estarem combinadas com as duplas ligações, passam a exibir áreas ricas em elétrons para as quais as moléculas de oxigênio ativo são atraídas.

Então, dadas as considerações, os anéis se tornam moléculas mais simples que podem ser lixiviadas, alterando a reflexão de luz do dente, o que o torna mais claro (Kwon et al., 2012d).

Considerando-se os mecanismos descritos, sabe-se que independente da técnica ou produto usado, o mecanismo de ação dos clareadores é baseado no complexo processo de oxidação com liberação de formas reativas de oxigênio que penetra através dos poros do esmalte e alcança a dentina (Tridwin et al., 2006).

Analisando-se o potencial de penetração do peróxido nas estruturas dentárias, diversos estudos já demonstraram que tanto peróxido de hidrogênio quanto peróxido de carbamida penetram no esmalte e dentina e conseguem entrar na câmara pulpar causando inibição enzimática (Bowles; Thompson, 1986; Cooper et al., 1992; Gökyay et al., 2000a. 2000b).

Pensando-se neste potencial de penetração trans-amelodentinária, diversas metodologias foram utilizadas para tentar analisar a permeação de peróxido de hidrogênio através das estruturas dentárias, como o uso de corantes (Kwon et al., 2012a), a coloração histoquímica (Schiavoni et al., 2006) e o uso de espectroscopia Raman (Silveira et al., 2012). Todavia, a maioria destas metodologias baseou-se no uso de solução tampão de acetato no interior da cavidade pulpar, o que possibilita quantificar o peróxido através da análise de densidade óptica com espectrofotômetro

(Mottola et al., 1970; Pécora et al., 1991; Cooper et al., 1992; Gökyay et al., 2000a, 2000b; Benetti et al., 2004).

Entretanto, considerando-se que essas metodologias não conseguem monitorar continuamente a permeação dos peróxidos, e o momento exato em que os mesmos começam a alcançar concentrações detectáveis dentro da câmara pulpar, existe assim uma lacuna a ser resolvida nos métodos de análises de permeação.

Em química analítica, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que podem gerar informações de maneira simples, rápida e confiável para o monitoramento de espécies químicas, vem evoluindo de maneira acentuada. Para isso, os microeletrodos são utilizados para o monitoramento de uma gama de espécies eletroativas em vários tipos de matrizes e em diversos microambientes (Lowinsohn; Bertotti 2006).

Os microeletrodos (ou ultramicroeletrodos) são sensores químicos com áreas ativas em dimensões micrométricas (Pons; Fleishman, 1987). A análise é realizada utilizando-se uma célula eletroquímica constituída pelo substrato a ser analisado, o microeletrodo (eletrodo de trabalho), o eletrodo de referência (Ag/AgCl), e o eletrodo auxiliar (fio de platina). É essencial que o equipamento seja capaz de fazer medidas de baixas correntes, uma vez que são utilizados microeletrodos (Castro, 2011).

A corrente mensurada no microeletrodo, através de um teste denominado cronoamperograma, será proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio presente na solução durante e após a permeação desta espécie.

Desta forma, o desenvolvimento da metodologia de análise eletroquímica com microeletrodos para monitorar a permeação de peróxidos através do esmalte e da dentina pode melhorar os processos que governam esta permeação bem como, desmistificar o tempo de chegada e concentração do hidrogênio na câmara pulpar após a realização de uma sessão de clareamento, evitando-se assim processos deletérios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecidos dentários

O dente humano é basicamente composto de três tecidos duros: esmalte, dentina e cemento, sendo a coroa composta pelos dois primeiros e a raiz pelos dois últimos.

2.1.1 Esmalte

O esmalte, a estrutura que recobre a coroa dos dentes, é o tecido mais mineralizado do organismo. No período após a erupção do dente o esmalte é acelular e de extrema dureza relacionado ao seu conteúdo 97% inorgânico (fosfato de cálcio – cristais de hidroxiapatita, com quantidade de carbonato, sódio, magnésio, cloreto, potássio e flúor), 1% de material orgânico de natureza proteica (carboidratos e lipídios) e 2% de água (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Embora a cor do esmalte varie do branco-acinzentado ao branco-amarelado, sua estrutura quase exclusivamente cristalina resulta em uma aparência translúcida. Quanto maior o grau de mineralização do esmalte, maior é sua natureza cristalina e, portanto, sua translucidez. Essa característica influencia na cor do dente, pois a translucidez, juntamente com a espessura do esmalte (a espessura máxima é de 2,5 mm na região do vértice das cúspides ou nas bordas incisais), permite ver a cor amarelada da dentina subjacente (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A porção madura do esmalte é constituída por unidades estruturais denominadas prismas e a região periférica é denominada zona interprismática. Entretanto, não há diferença entre o conteúdo mineral dos prismas e da região interprismática, há apenas diferença no que se refere à orientação dos cristais. (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Assim, é possível compreender que ele é um complexo sólido poroso, composto por cristais longos e estreitos de hidroxiapatita envoltos por matriz aquosa e material orgânico. Os arranjos dos cristais do esmalte dão origem a duas categorias de poros: uma correspondente aos espaços entre os cristais individuais nos núcleos dos prismas, e outra referente aos espaços interprismáticos. Os poros maiores estão presumivelmente na região dos espaços interprismáticos e os poros menores estão provavelmente associados aos espaços dentro dos prismas (Maung et al., 2007b).

Deve-se considerar que por ser o tecido mais denso do corpo humano, o esmalte possui uma permeabilidade menor que a dentina, o tecido dentário subjacente. (Bowles; Ugwuneri, 1987).

2.1.2 Complexo dentino-pulpar

A dentina é um tecido mineralizado, avascular, de natureza conjuntiva, sendo composta por 70% mineral, 18% material orgânico e 12% água. Apresenta dureza superior à do osso, porém inferior à do esmalte. Em seu interior não há células, apenas prolongamentos dos odontoblastos pulpares. A presença desses prolongamentos confere à dentina uma estrutura em túbulos, estes, por sua vez, oferecem resiliência para suportar o esmalte e as forças mastigatórias. Eles são formados devido à mineralização da matriz de pré-dentina em volta dos odontoblastos durante a dentinogênese (Pashley, 1985).

A dentina apresenta cor branco-amarelada que é parcialmente observada desde o exterior devido à translucidez do esmalte. É a principal responsável pela cor do dente e sua cor amarelada torna-se mais intensa com o avançar da idade (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Quanto às características dos túbulos dentinários, eles percorrem toda a espessura da dentina, sendo muito ramificados junto ao limite com o esmalte, devido à ramificação dos prolongamentos dos odontoblastos durante a dentinogênese. Os túbulos apresentam percurso em “S” ao longo da dentina, devido ao fato de os

prolongamentos dos odontoblastos recuarem em direção à polpa seguindo um trajeto levemente sinuoso durante a formação dentinária. Na região do limite amelodentinário os túbulos são estreitos ($1\ \mu\text{m}$) e apresentam terminações em “delta” com inúmeras ramificações ($0,5 - 1\ \mu\text{m}$). Já na região da pré-dentina são mais calibrosos ($2,5\ \mu\text{m}$) (Katchburian; Arana-Chavez, 2012)

No entanto, deve se considerar que na região da pré-dentina os túbulos se abrem em leque, ficando mais próximos uns dos outros, desta forma a região mais próxima da polpa (pré-dentina) há cerca de 45.000 túbulos por mm^2 , e 10 a 25.000 na região amelodentinária (Reis et al., 2004; Katchburian; Arana-Chavez, 2012). Esta distribuição radial dos túbulos dentinários e respectiva variabilidade de diâmetro dos mesmos, podem ser relacionadas diretamente com a permeabilidade e difusão trans-amelodentinária dos peróxidos.

Já a polpa é um tecido conjuntivo frouxo formado por células secretoras de proteínas, como o colágeno tipo I, sendo as principais os odontoblastos. Estruturalmente é dividida em duas camadas periféricas, a odontoblástica (adjacente à dentina) e a subodontoblástica. As células das camadas odontoblástica e subodontoblástica apresentam comunicações entre si através de junções intercelulares. A região odontoblástica na parte coronária apresenta corpo celular com forma cilíndrica ($50-60\ \mu\text{m}$), já na porção radicular as células vão diminuindo e se tornando cúbicas. Estas primeiras células são altamente polarizadas e com organelas desenvolvidas que em estado secretor permitem a produção de vesículas com diversas substâncias e sinalizadores celulares (Katchburian; Arana-Chavez, 2012)

2.2 Dentes bovinos x Dentes Humanos

Dentes bovinos são utilizados em pesquisas por suas características estruturais, como o número e o diâmetro dos túbulos dentinários e a radiodensidade do esmalte e da dentina similares aos humanos (Schmalz et al., 2001, Fonseca et al. 2004; Benetti et al., 2004).

Hoje em dia, devido aos avanços da ciência e da tecnologia da Odontologia conservadora e a diminuição de extrações para terapia ortodôntica, há uma grande dificuldade em se obter dentes humanos sadios intactos e sem cáries para estudos *in vitro* (Saleh, 2005), sendo, portanto, fundamental o uso de dentes bovinos.

Os espécimes gerados a partir de dentes humanos são preferidos para estudos *in vitro* e *in situ* para pesquisa odontológica porque permitem testar hipóteses mais próximas da realidade clínica em um substrato relevante. Porém, dentes bovinos têm sido extensivamente utilizados para experimentos em diversos campos da pesquisa odontológica (Adibfar et al., 1992; Buchalla; Attin, 2007; Batista et al., 2013) devido às semelhanças com o esmalte e dentina humanos (Reis et al., 2004; Benetti et al; 2004).

Essas semelhanças, principalmente nas características físico-químicas dos dentes bovinos foram comprovadas por trabalhos como o de Reis et al. (2004), onde mostraram através da microscopia eletrônica de varredura, que a morfologia e disposição dos prismas do esmalte bovino são muito semelhantes ao humano, com a diferença que a quantidade de poros é maior nos dentes bovinos. Na dentina bovina, o diâmetro típico dos túbulos é de 3-5 μm com 20000 túbulos/ mm^2 , enquanto a dentina humana, nas camadas mais externas próximas ao esmalte, tem de 0.5-1.2 μm de diâmetro médio com 10000-25000 túbulos/ mm^2 . Os túbulos das regiões próximas à polpa tem um diâmetro médio de 2,9 μm , ou seja, os túbulos são mais largos e em maior quantidade nas regiões mais profundas da dentina em dentes humanos.

O estudo de Lopes et al. (2009) comparou a natureza tubular de dentina bovina e humana, em diferentes profundidades (superficial, médio e profundo). Nos dentes bovinos, na dentina superficial o diâmetro médio dos túbulos é de 4,21 μm , em dentina média é 3,98 μm e na dentina profunda 3,14 μm , mostrando a natureza contrária dos túbulos de dentina bovina, com diâmetro menor junto à polpa.

Existem algumas desvantagens ao se utilizar dentes humanos para pesquisas *in vitro*, sendo exemplos: (1) difícil obtenção em quantidade e qualidade adequada, uma vez que muitos são extraídos devido a lesões extensas de cáries e outros defeitos; (2) difícil controle de fonte e de idade do dente extraído o que pode levar a grandes variações nas medidas de resultados de um estudo; (3) a área de superfície

relativamente pequena e curva de dentes humanos limitam testes específicos que requerem superfícies planas de espessura uniforme; (4) risco de infecção e (5) questões éticas tem aumentado. Assim, substratos alternativos foram propostos e utilizados em pesquisa odontológica (Yassen et al., 2011)

Em contrapartida, as vantagens para o uso de dentes bovinos incluem: (1) a facilidade de obtenção em grandes quantidades; (2) boas condições e em composição mais uniforme do que dentes humanos; (3) possuem uma superfície mais larga e plana, permitindo espécimes maiores; (4) bem como apresentam menos defeitos e raramente apresentam lesões cariosas (Yassen et al., 2011).

Todavia, há de ser considerado que podem existir diferenças em relação à permeação amelodentinária. De acordo com Camargo et al.(2007), dentes humanos apresentam permeabilidade superior ao peróxido de hidrogênio quando comparados aos dentes bovinos. Além disso, a variabilidade da permeabilidade da dentina bovina é a metade da dentina humana (Schmalz et al., 2001)

2.3 Clareamento Dentário

2.3.1 Definição

O clareamento dentário é uma opção de tratamento econômica e conservadora para melhorar a estética de dentes escurecidos e vem sido praticado na odontologia há mais de 100 anos (Gökay et al., 2005).

2.3.2 Para que serve

É indicado para dentes escurecidos por idade, trauma, tratamento endodôntico, ingestão de alimentos com corantes, tabagismo e dentes naturalmente escurecidos (Haywood, 2000).

A cor do dente predominante é determinada principalmente pela refletância da dentina modificada pela absorção, dispersão, e a espessura do esmalte (Dietschi et al., 2006). Já o conjunto de cores dos dentes é determinado em sua maioria pelas propriedades ópticas da dentina (Minoux; Serfaty, 2008). Pode variar entre as pessoas e entre os dentes presentes na mesma pessoa. Há também variação de cor no mesmo dente (Goodkind; Schwabacher, 1987).

Assim a cor natural dos dentes pode ser modificada por pigmentações intrínsecas e extrínsecas, ou combinação de ambas (Kwon et al., 2012c).

As pigmentações intrínsecas são resultado de mudanças na natureza molecular, na estrutura ou na espessura da dentina e/ou do esmalte, durante a formação dentária ou depois da erupção (Dahl ; Pallensen, 2003). Sua origem pode ser pré-eruptiva (ocorrem durante a morfogênese do dente, induzida por trauma, desordem genética, administração de tetraciclina, distúrbios do sangue ou ingestão de altos níveis de flúor) ou pós-eruptiva (a maioria causada por cárie, trauma com preservação da vitalidade, materiais restauradores, materiais obturadores) (Hattab et al., 1999; Mor et al., 1998)

Já as pigmentações extrínsecas são superficiais e causadas por dieta pigmentante e outros elementos sobre a superfície do esmalte ou junto à película adquirida, podendo ser removido facilmente sem alterar a estrutura do esmalte. (Hattab et al., 1999).

A afinidade dos pigmentos extrínsecos pela superfície dentária determina o tipo de deposição, sendo que entre os tipos de força de atração está a afinidade das manchas da superfície do dente, o que desempenha um papel crítico na deposição de manchas extrínsecas (Plotino et al., 2008).

Os tipos de forças atrativas incluem interações de longo alcance, como a eletrostática e forças de van der Waals e interações de curto alcance, como as forças de hidratação, interações hidrofóbicas, forças dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (Nathoo, 1997)

As alterações de cor causadas pelo envelhecimento é uma combinação de pigmentação extrínseca, diminuição da espessura do esmalte e escurecimento da dentina devido à deposição fisiológica de dentina secundária afetando as propriedades de transmissão de luz do dente (Goldstein; Garber, 1995)

2.4.3 Materiais para clareamento

Existem muitos tipos de clareadores no mercado, eles são baseados no uso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente ativo. Ele pode ser aplicado diretamente (peróxido de hidrogênio líquido ou em gel), ou produzido a partir de uma reação química de degradação do perborato de sódio ou do peróxido de carbamida (Dahl; Pallensen, 2003).

O peróxido de hidrogênio, substância cujas moléculas liberam radicais livres para o processo de clareamento, pode ser empregado diretamente na terapia clareadora de dentes vitais ou não vitais. Ele pode ainda, ser originado por uma molécula precursora, como o peróxido de carbamida, mais comum em clareamento de dentes vitais; ou como o perborato de sódio, utilizado para clareamento de dentes não vitais.

2.4.3.1 Peróxido de hidrogênio

O Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um líquido pálido, mais viscoso que a água e com massa molar de 34.0147g/mol (Merck Index, 2006). Devido ao seu baixo peso molecular ele pode penetrar o esmalte e a dentina e liberar oxigênio que quebra as

duplas ligações dos compostos orgânicos e inorgânicos no interior dos tecidos duros dentais (Feinman et al., 1991).

De maneira a aumentar a facilidade de uso, o clareador existe em diversos tipos de apresentação, mais comumente em forma de líquido viscoso ou gel.

A forma de atuação envolve um poderoso agente de oxidação através da formação de espécies reativas de oxigênio e ânions de peróxido de hidrogênio (Goldstein; Garber, 1995).

Os procedimentos clareadores são possíveis devido à permeabilidade dos tecidos dentais duros e ao baixo peso molecular das moléculas de H_2O_2 e seus precursores (Pashley 1988; Hanks et al., 1993).

Entretanto, os resultados do clareamento dentário são imprevisíveis e alguns autores reportam diferentes taxas de sucesso com resultados variando de 50 a 93%. Essas variações são comumente associadas com a difusão do peróxido de hidrogênio sobre a estrutura dental (Camps et al., 2007).

2.4.3.2 Peroxido de carbamida

O Peróxido de Carbamida ($CH_6N_2O_3$) é um cristal branco sólido que libera oxigênio em contato com água (Brotherton; King, 1994). É o produto mais utilizado para “clareamento caseiro”. Nessa técnica, o gel é aplicado através do uso de moldeiras customizadas. (Wetter et al., 2009).

Em geral, para clareamento caseiro, as concentrações utilizadas de peróxido de carbamida variam entre 10 e 16%. A moldeira carregada com o gel deve ser utilizada durante a noite ou por ao menos 4 horas. Uma alternativa, para diminuir o tempo de uso das moldeiras é empregar altas concentrações de peróxido de carbamida (22%) ou baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (7 a 10%) (Joiner, 2007; Wetter et al., 2009).

Em contato com a saliva o peróxido de carbamida, que é um precursor do peróxido de hidrogênio, é decomposto em uréia e H_2O_2 . Uma solução de peróxido

de carbamida a 10% origina 3.35% de peróxido de hidrogênio e 6,65% de uréia. Essa proporção pode ser observada para praticamente todas as concentrações de peróxido de carbamida (Fasanaro, 1992).

A uréia produz amônia e dióxido de carbono, contribuindo para a manutenção do pH alcalino, que potencializa a ação do agente clareador (Sun, 2000). Mas pode causar alguns efeitos colaterais benéficos porque isso tende a aumentar o pH da solução (Haywood, 1992).

Os produtos baseados em peróxido de carbamida frequentemente contêm carbopol ou base de glicerina, o que diminui a velocidade de liberação do peróxido de hidrogênio. Isso aumenta o tempo de contato do peróxido de hidrogênio com os dentes, tornando este clareador mais efetivo por um maior período de tempo.

É uma técnica consagrada, considerada segura, de baixo custo e efetiva, especialmente em dentes sem pigmentações severas ou quando a velocidade do tratamento não é prioridade (Wetter et al., 2009; Minoux; Serfaty, 2008).

2.4.4 Como funciona

De acordo com Kawamoto e Tsujimoto (2004), os agentes clareadores devem ter baixo peso molecular de maneira que penetrem no esmalte e na dentina, total ou parcialmente, para que clivem os pigmentos.

A eficácia do clareamento é relacionada com a interação do material clareador com as moléculas de pigmento e sua habilidade para se difundir através da estrutura dentária. Entretanto, o mecanismo do clareamento ainda não é totalmente entendido e explicado.

Uma das hipóteses mais aceitas teoriza que o clareamento funciona pela clivagem das moléculas de pigmento (cromóforos) presentes nas estruturas dentárias em duas diferentes etapas. A primeira é a interação do agente clareador com as moléculas de pigmento na superfície do dente e a segunda o movimento de difusão dos agentes clareadores dentro da estrutura dentária para interagir com as

moléculas de pigmento mais profundas. O resultado dessa combinação resultaria na mudança de cor final do dente após o clareamento (Kwon et al., 2012b).

Nessa teoria, o funcionamento da terapia consiste no oxigênio e nos radicais hidroxil quebrados das moléculas de peróxido de hidrogênio. De acordo com o estudo de Kawamoto e Tsujimoto (2004), o $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxil) seria a principal substância responsável pelo clareamento.

Estes radicais degradariam e oxidariam os anéis complexos das estruturas moleculares dos pigmentos que combinadas com as duplas ligações exibiriam áreas ricas em elétrons, para as quais as moléculas de oxigênio ativo seriam atraídas. Os anéis se tornariam moléculas mais simples, as quais seriam eliminadas, alterando assim a reflexão de luz do dente (Kwon et al., 2012a).

A segunda etapa, que considera a difusão e o movimento do agente clareador, foi explorada por diversos pesquisadores (Bowles; Ugwuneri 1987; Cooper et al., 1992; Gökyay et al. 2000a; 2000b; Kwon et al., 2012a; 2012b; 2012c; 2012d). Ela considera que os tecidos dentais duros seriam significativamente permeáveis a fluidos, e o maior fluxo de fluidos no esmalte acontece nos espaços interprismáticos. Então, quando o peróxido de hidrogênio for aplicado sobre a superfície do dente, ele se difundiria pelo esmalte, pela dentina, atingindo inclusive a câmara pulpar.

Além disso, altas concentrações de H_2O_2 por longos períodos de aplicação aumentam o dano à dentina, tanto intertubular, quanto peritubular. O mesmo estudo relatou que H_2O_2 e $\bullet\text{OH}$ não danificam o tecido inorgânico do dente, mas danificam outras substâncias como o tecido orgânico e os componentes construtivos da dentina, que foram perdidos e dissolvidos (Kawamoto, Tsujimoto, 2004).

Sabe-se que o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) é tóxico, uma forma de oxigênio ativo e um radical livre. Ele danifica tecidos de conexão, membranas celulares, DNA e outros tecidos. Além disso, ataca cadeias de proteínas e induz a decomposição de substâncias orgânicas, que podem ser os cromóforos (Kawamoto, Tsujimoto, 2004).

Esta consideração levou a uma segunda e mais recente hipótese que coloca o clareamento como consequência, não da clivagem de cromóforos, mas de uma

alteração da estrutura da dentina, a partir da oxidação de sua matriz orgânica (Eimar et al., 2012).

De acordo com esse estudo, o conteúdo orgânico do esmalte tem uma influência menor na cor geral do dente, já que os agentes clareadores não afetariam de maneira significativa os conteúdos orgânicos e inorgânicos do esmalte. O efeito de branqueamento seria devido à oxidação das estruturas das matrizes orgânicas transparentes em materiais opacos esbranquiçados. O mesmo autor ainda argumenta que os cromóforos indicados como culpados pelas pigmentações dos dentes, estariam em quantidade extremamente pequenas para causar alguma alteração de cor e, ainda assim, análises de FTIR ou Espectroscopia Raman nunca foram capazes de determiná-los no esmalte (Jiang et al., 2007; Eimar et al., 2012).

Porém, essa mesma espectroscopia Raman (Silveira et al. 2012) utilizando comprovou pela primeira vez que após a terapia clareadora, o oxigênio é incorporado ao esmalte dentário, confirmando teorias passadas não demonstradas.

Então, independente da técnica ou do produto usado, o mecanismo de ação dos clareadores seria baseado no processo complexo de oxidação com liberação de formas reativas de oxigênio que penetra através dos poros dos prismas do esmalte e alcança a dentina (Tredwin et al., 2006).

Ambas as hipóteses para explicar o funcionamento do clareamento baseiam-se na permeação de peróxido de hidrogênio através das estruturas dentárias e sua chegada até a dentina. Baseados nisso, diversos estudos foram conduzidos de maneira a entender como ocorrem e as influências dessas permeações.

2.5 Permeabilidade dentária

2.5.1 Penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar

A estrutura do dente é semipermeável e tem sido demonstrado que moléculas solúveis em água, de baixo peso molecular, penetram facilmente a partir da superfície externa dos dentes na cavidade pulpar por meio de espaços interprismáticos e intercristalinos do esmalte e através dos túbulos dentinários da dentina (Kwon et al., 2012a).

Os fatores que influenciam a penetração da superfície dental até a câmara pulpar são: altas concentrações de peróxido de hidrogênio, calor, período de aplicação, ativação por luz e túbulos dentinários largos em dentes jovens (Benetti et al., 2004; Camargo et al., 2007) .

Por causa do baixo peso molecular do peróxido de hidrogênio, ele consegue penetrar através do esmalte, promovendo aumento da porosidade e perda de substâncias da matriz do esmalte como resultado da oxidação dos radicais livres (Hegedüs et al., 1999).

Os espaços de difusão do esmalte são ocupados por uma rede macromolecular de material orgânico que dita a permeabilidade do esmalte. O tamanho dos poros no esmalte é variável, na faixa de 10–100Å°, bem como, a difusão neste tecido mostra uma grande variação em um mesmo dente, indicando caminhos anisotrópicos ou preferenciais, o que confirma que o esmalte não tem uma estrutura de poros homogênea (Maung et al., 2007a; Ying et al., 2004).

É sabido que os peróxidos promovem a desproteinização. Isso explica a perda de material mineral associado às proteínas do esmalte, que contribuem para a ocorrência de danos microestruturais e possíveis mudanças na microdureza (Arruda et al., 2012).

Na dentina, os processos de difusão podem ser definidos como complexos e multifatoriais (Outhwaite et al., 1976). O fluxo de difusão de um soluto como o iodo ou peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à superfície de área de dentina exposta e inversamente proporcional à espessura da mesma dentina.

Quando se estuda a permeabilidade de estruturas dentárias, deve-se levar em consideração que pelo menos duas forças podem agir contra o fluxo de difusão para a polpa: a pressão osmótica dos géis e a pressão pulpar positiva, que é de dentro para fora do dente. Pashley (1984) mostrou que a pressão do fluido pulpar é capaz de reduzir a difusão de íons dramaticamente na presença ou ausência de *smear layer*.

A *smear layer* ou lama dentinária, é uma fina estrutura amorfa de 1 a 5 micrometros composta de material orgânico (tecido pulpar, microrganismos) e material inorgânico (debris de dentina) criada pela instrumentação do tecido dentário. Ela pode ser incorporada em até 40 micrometros de profundidade nos túbulos dentinários e se tornar um *smear plug*. A presença da *smear layer* na superfície dentinária pode potencialmente reduzir a permeabilidade, reduzindo a passagem de moléculas de clareador através dos túbulos dentinários, reduzindo assim sua efetividade (Horn et al., 1998).

Porém, Mello et al. (2008), mostrou que soluções de EDTA ou de ácido fosfórico podem promover uma boa remoção do *smear layer* e abrir os túbulos dentinários

Ainda assim, a dentina não é permeável para todas as moléculas. Normalmente, a difusão é inversamente proporcional ao peso da molécula. As moléculas pequenas difundem-se mais rápido que as moléculas grandes. Entretanto, algumas interagem com a dentina mineral e com o conteúdo dos túbulos. Isso modifica sua difusão, independente do tamanho da molécula. Além disso, a dentina jovem é cinco vezes mais permeável que a dentina velha (Camps et al., 2010).

O aspecto de difusão do peróxido de hidrogênio através da dentina foi investigado e por considerar o comportamento do dente semelhante ao de uma membrana, sugere-se que esta segue a segunda lei de difusão de Fick. Segundo essa lei a difusão é proporcional à área de superfície, coeficiente de difusão e concentração. É também, inversamente proporcional à distância de difusão (Pashley, 1985).

A segunda lei de Fick é enunciada a seguir:

$$J_s = A.D. \frac{C}{\Delta X}$$

Onde:

J_s - representa o fluxo de difusão do soluto (mol/s),

A - a área da superfície disponível para difusão (m²);

D - o coeficiente de difusão (m²/s);

C - a concentração (mol/m³) e ΔX a distancia de difusão (m)

A análise desta lei permite concluir que a difusão só deveria parar quando a concentração do soluto fosse equivalente dos dois lados (Bowles; Ugwuneri, 1987, Camps et al., 2007).

Muitos estudos têm indicado que tanto as moléculas de peróxido de hidrogênio originadas de géis de H₂O₂, quanto de peróxido de carbamida são capazes de penetrar o esmalte e a dentina, sendo esta última muito mais permeável devido a sua morfologia (Hanks et al., 1993, Hannig et al., 2011) podendo chegar até atingir os tecidos pulpare (Bowles; Ugwuneri, 1987; Cooper et al., 1992; Benetti et al., 2004).

2.5.2 Consequências da penetração de peróxido na câmara pulpar

A penetração dos peróxidos na câmara pulpar pode causar inibição enzimática (Gökay, 2000a).

De acordo com Bowles e Thompson (1986), muitas enzimas vitais da polpa sofrem inibição de suas atividades normais em algum grau por pequenas concentrações de peróxido de hidrogênio. E em concentrações próximas de 2.5% as enzimas são completamente inativadas).

Cooper et al. (1992) mostraram que a concentração das moléculas de peróxido de hidrogênio originárias de peróxido de carbamida que alcançam a polpa são significativamente menores que o originado do gel de peróxido de hidrogênio. Ainda demonstraram que a taxa de difusão não é proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio.

Esta consideração demonstra que a concentração final encontrada na câmara não é diretamente proporcional à sua concentração original. Além disso, o carbopol, um importante componente dos géis clareadores usados nas terapias caseiras atua como um agente espessante, retardando a degradação do peróxido de carbamida, o que permite a liberação gradual e continua do peróxido de hidrogênio sobre os tecidos dentários. Este fato evita danos pulpares e periodontal, além de manter a eficácia do gel clareador por um longo período (Haywood; Heymann 1989).

Por outro lado, Benetti et al. (2004) fizeram um estudo comparativo utilizando peróxido de carbamida de 10 e 35%, sendo os valores de concentração de peróxido de hidrogênio encontrados dentro da câmara pulpar significativamente maiores para os peróxidos mais concentrados.

2.6 Metodologias de detecção de permeação

2.6.1 Metodologias de análise de permeação de peróxido de hidrogênio em estruturas dentárias.

Diversas metodologias foram utilizadas para tentar analisar a permeação de peróxido de hidrogênio através das estruturas dentárias como o uso de corantes (Kwon et al., 2012a), testes de coloração histoquímica (Schiavoni et al., 2006) e espectroscopia Raman (Silveira et al., 2012).

Todavia, a maioria destas metodologias baseou-se em solução tampão de acetato no interior da cavidade pulpar, o que é utilizado para estabilizar e quantificar

o peróxido através da análise de densidade óptica com espectrofotômetro (Mottola et al., 1970; Cooper et al., 1992; Gökyay et al., 2000b; Benetti et al., 2004).

Dentro deste panorama metodológico, deve ser considerado que essas metodologias não conseguem monitorar continuamente a passagem de hidrogênio no momento exato em que o peróxido começa a alcançar concentrações detectáveis dentro da câmara pulpar.

2.6.2 A Metodologia Eletroquímica

O peróxido de hidrogênio pode ser determinado por volumetria, espectrofotometria, fluorimetria, quimiluminescência, cromatografia e por métodos eletroquímicos. Com exceção dos eletroquímicos, os métodos citados são vulneráveis a espécies interferentes, apresentam morosidade no tocante ao preparo de amostra e geralmente requerem o uso de reagentes de preços elevados. As propostas fazendo uso de técnicas eletroquímicas demonstram, por outro lado, boas seletividade e sensibilidade (limite de detecção da ordem de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$), amplo intervalo de determinação e rápida resposta do eletrodo; além disso, não sofrem interferências em função da coloração das amostras como em métodos espectrofotométricos (Pécora et al, 1991; Mattos et al., 2003).

Em química analítica, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que podem gerar informações de maneira simples, rápida e confiável para o monitoramento de espécies químicas, vem evoluindo de maneira acentuada. Para isso, os microeletrodos são utilizados para o monitoramento de uma gama de espécies eletroativas em vários tipos de matrizes e em diversos microambientes (Lowinsohn; Bertotti 2006).

Os microeletrodos (ou ultramicroeletrodos) são sensores químicos com áreas ativas em dimensões micrométricas (Pons; Fleishman, 1987). A característica que determina o comportamento eletroquímico de um eletrodo é o transporte de massa do seio da solução até a superfície do dispositivo. Quando o potencial em um eletrodo é mudado de uma condição onde não há reação eletródica para outra, em

que uma corrente (catódica ou anódica) é observada e a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo se torna zero. Assim, o gradiente de concentração se desenvolve até certa distância da superfície do eletrodo em direção ao seio da solução. O pequeno tamanho dos eletrodos pode propiciar a sua utilização para a exploração de domínios microscópicos (pequenos volumes de amostra) (Lowinsohn; Bertotti 2006).

A análise é realizada utilizando-se uma célula eletroquímica constituída pelo substrato a ser analisado, o microeletrodo (eletrodo de trabalho), o eletrodo de referência (Ag/AgCl), e o eletrodo auxiliar (fio de platina). É essencial que o equipamento seja capaz de fazer medidas de baixas correntes, uma vez que são utilizados microeletrodos (Castro, 2011).

Esse tipo de análise é conduzida com os eletrodos imersos em uma solução contendo um eletrólito suporte apropriado. Eletrólito é uma substância que, quando dissolvida em um dado solvente, produz uma solução com uma condutividade elétrica maior que a condutividade do solvente. As características desejadas para um eletrólito são: alta solubilidade, alto grau de ionização e ser estável química (espécies químicas não reagirem com outras espécies presentes na solução [eletroativas ou não]) e eletroquimicamente (implica em admitir que o eletrólito não seja oxidado nem reduzido eletroliticamente em toda a faixa de potencial de interesse a que as interfaces em estudo forem submetidas) no solvente a ser empregado (Agostinho; Villamil, 2004).

Em sistemas eletroquímicos, a utilização de um eletrólito suporte, confere ao sistema uma série de propriedades: mantêm os coeficientes de atividade praticamente constantes, o número de transporte da espécie eletroativa praticamente igual à zero, diminui a espessura da dupla camada elétrica, mantém a viscosidade, o coeficiente de difusão e o número médio de ligantes (no caso de ser o ânion um complexante) constantes, além de incrementar a condutividade em meios de solventes polares, tanto orgânicos quanto inorgânicos (Agostinho; Villamil, 2004).

Para esse tipo de análise são realizados basicamente dois testes eletroquímicos. O primeiro é um amperograma, o teste em que é aferida a corrente elétrica entre eletrodos. Nesse teste, um dos reagentes é o analito, por exemplo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a corrente medida é proporcional à sua

concentração (Harris, 2010). Como esse teste é realizado continuamente durante o período de análise (que tem um tempo pré-determinado) para realizar a mensuração de uma corrente, ele é chamado de cronoamperograma.

Ele foi utilizado para determinar o momento em que o microeletrodo começa a detectar a passagem do peróxido de hidrogênio, através da determinação de um valor de corrente crescente

O segundo tipo de teste é o voltamograma. Ele é um conjunto de técnicas onde durante um processo eletroquímico, se observa uma relação entre o potencial elétrico e a corrente. Ele é um gráfico da corrente contra o potencial do eletrodo de trabalho, mostrando que o valor da corrente é proporcional à concentração de um analito, como o peróxido de hidrogênio, na solução (Harris, 2010).

Então, a corrente mensurada no microeletrodo será proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio presente na solução durante e após a permeação desta espécie.

Essa metodologia não destrutiva, permite além da análise eletroquímica a repetição posterior do teste utilizando a mesma metodologia ou a análise ultraestrutura por métodos como a microscopia eletrônica de varredura.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade de um modelo experimental de análise eletroquímica, avaliar a cinética da difusão dos peróxidos e estabelecer uma relação entre a concentração do peróxido de hidrogênio com o seu tempo de difusão e concentração pulpar.

3.2 Objetivos Específicos

Quantificar a concentração do peróxido de hidrogênio na câmara pulpar após a realização do tratamento clareador e o tempo de permeação nos tecidos dentários, a partir da avaliação da hipóteses:

- 1) Se a metodologia de análise eletroquímica permite a avaliação da quantidade de peróxido que se difunde através dos tecidos dentários e se esse método é comparável com a metodologia clássica de espectrofotometria.
- 2) Se a metodologia eletroquímica permite avaliar com precisão o momento em que o peróxido começa a chegar à câmara pulpar a partir de sua difusão nos tecidos duros dentais e se esse tempo varia com as aplicações seguintes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados 45 dentes incisivos bovinos permanentes mandibulares, sem fraturas visíveis, conforme análise em um estereomicroscópio em 25 aumentos (Olympus SZ61, Tokyo, Japan).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram excluídos dentes com falhas no esmalte, trincas ou fraturas, hipoplasias, ou alterações morfológicas.

4.3 Preparo das amostras

Todos os dentes tiveram os tecidos moles periodontais removidos com instrumento Le Cron e suas raízes foram cortadas na junção esmalte-cementária utilizando-se um disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) e sob refrigeração por água.

Também tiveram o tecido pulpar removido com auxílio de limas endodônticas # 80. As coroas tiveram a face lingual removida com lixas d'água de granulação 180 (Norton, T223), mantendo-se o esmalte e a dentina vestibulares preservados. Os dentes foram submetidos à profilaxia com pedra-pomes e água.

Cada um dos dentes foi posicionado no centro de um molde quadrado confeccionado com material de moldagem elastomérico nas medidas de 60x60x4mm (largura, comprimento e altura), onde foram fixados com resina acrílica de maneira que as faces vestibular e pulpar ficassem absolutamente isoladas umas

das outras. Esta condição impedia a permeação de qualquer material por qualquer via que não fosse através de estrutura dental.

Para padronizar a posição do dente no molde, foi utilizada uma matriz, que consistia em um pedaço de acetato de retroprojeto nas mesmas dimensões do molde, com duas retas cruzadas em X a partir dos vértices, sendo o dente posicionado exatamente no cruzamento das retas.

Após a polimerização da resina, os espécimes tiveram as faces regularizadas com lixas e o esmalte da face vestibular sofreu um polimento para alcançar a espessura final das amostras de 3,5 mm, sendo 1,3 de esmalte e 2,2 de dentina aproximadamente (Soares et al., 2011) medidos com um paquímetro digital (Mitutoyo Sul América, São Paulo, SP, Brasil) (figura 4.1).

Figura 4.1 – Face pulpar e vestibular da amostra e paquímetro digital mostrando espessura final.

Todas as amostras foram lavadas em cuba ultrassônica com água destilada, por 15 minutos a 25° C, e, posteriormente, foram limpas em solução de 0.5M EDTA 5%, pH 7,2, por 30 segundos em cada face, com o objetivo de remover a *smear-layer* formada pela preparação (Soares et al., 2011). Depois de lavadas em água destilada novamente elas foram armazenadas em álcool 70 para impedir o crescimento bacteriano e estabilizar membranas biológicas dentro dos túbulos dentinários com o mínimo de mudança das estruturas anatômicas (Hanks et al., 1989).

Uma semana antes do experimento eles foram lavados e armazenados em água destilada. De maneira a padronizar a área que sofreria ação do clareador, um pedaço de fita adesiva (Durex, 3M Internacional, EUA) de 4x4mm foi colocado sobre a superfície vestibular do esmalte, uma camada de esmalte de unha incolor foi

aplicada e após a secagem o adesivo foi retirado deixando uma área livre com esmalte dentário exposto.

4.4 Grupos amostrais

As amostras foram organizadas em dois grupos, de acordo com os testes a serem realizados: grupo 1 para a análise eletroquímica e o grupo 2 para análise espectrofotométrica, conforme a tabela 4.1.

Tabela 4.1- Testes e grupos amostrais descrevendo o, número de dentes utilizados e substâncias clareadoras às quais foram expostos

Grupo 1 - Análise Eletroquímica			
Sub-Grupo	Dentes (n)	Produto	Composto ativo
1,1	10	Whiteness HP	Peróxido de Hidrogênio 35%
1,2	5	Whiteness Perfect 22	Peróxido de Carbamida 22%
1,3	5	Whiteness HP Placebo	Placebo
1,4	5	Whiteness Perfect 22 Placebo	Placebo
Grupo 2 - Análise Espectrofotométrica			
Sub-Grupo	Dentes (n)	Produto	Composto ativo
2,1	5	Whiteness HP	Peróxido de Hidrogênio 35%
2,2	5	Whiteness Perfect 22	Peróxido de Carbamida 22%
2,3	5	Whiteness HP Placebo	Placebo
2,4	5	Whiteness Perfect 22 Placebo	Placebo

Os grupos foram submetidos às exposições com diferentes produtos clareadores e seus respectivos placebos, sendo todos os géis fabricados pela FGM (FGM – Produtos Odontológicos Ltda., SC, Brasil).

As composições químicas de cada um dos produtos estão descritas na tabela 4.2 a seguir.

Tabela 4.2 - Composição química dos produtos clareadores utilizados de acordo com dados fornecidos pelo próprio fabricante.

Composição química dos géis utilizados		
Produto		Composição
Whiteness HP Peróxido de Hidrogênio 35%		Espessantes Neutralizantes Glicol (solvente) Cálcio (Gluconato) Pigmento Insolúvel
	Fase Espessante	
	Fase Peróxido	Peróxido de Hidrogênio 50% *
Whiteness HP Placebo		Espessantes Neutralizantes Glicol (solvente) Cálcio (Gluconato) Pigmento Insolúvel
	Fase Espessante	
	Fase Peróxido	Água deionizada Ácido Fosfórico (para baixar o pH aos níveis que a fase peróxido apresenta)
Whiteness Perfect Peróxido de Carbamida 22%		Espessante (Carbopol) Neutralizantes (Hidróxido de Cálcio) Glicerol (veículo) Estabilizantes
	Fase Espessante	
	Fase Peróxido	Peróxido de Carbamida 22%
Whiteness Perfect Placebo		Espessante (Carbopol) Neutralizantes (Hidróxido de Cálcio) Glicerol (veículo) Estabilizantes
	Fase Espessante	
	Fase Peróxido	Água deionizada

* Neste caso a proporção entre a fase espessante e a de peróxido (30% em massa de espessante para 70% em massa de peróxido a 50%) é calculada para que a concentração final seja de 35%.

Os géis foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante, listadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Instruções do fabricante para manipulação e aplicação dos produtos clareadores

Instruções do Fabricante para manipulação e aplicação
Whiteness HP (Peróxido de Hidrogênio 35%) e Whiteness HP Placebo
<p>1- Retire o clareador da embalagem observando as recomendações de segurança</p> <p>2 - Agite vigorosamente o frasco de espessante para que seja homogeneizado seu conteúdo. Falha na homogeneização do espessante pode resultar em um gel de baixa viscosidade (insuficiente)</p> <p>3- Segure os frascos na vertical, abra as tampas com cuidado.</p> <p>4- Utilizando o recipiente de mistura que acompanha o kit, misture a fase Peróxido (fase 1) com a fase Espessante (fase 2), na proporção de 3 gotas de Peróxido para 1 gota de Espessante. Para a linha de sorriso (20 dentes) geralmente 21 gotas de peróxido para 7 gotas de Espessante são suficientes.</p> <p>5- Com o auxílio de pincel ou espátula cubra totalmente a superfície a ser clareada, a camada de gel deverá ter entre 0.5 e 1 mm de espessura</p>
Whiteness Perfect 22 (Peróxido de Carbamida 22%) e Whiteness Perfect Placebo
<p>1- Pressione o êmbulo da seringa e aplique o gel clareador nos rebaixas da moldeira. Geralmente uma pequena gota por dente é suficiente para os cobrir</p> <p>2 - Encaixe a moldeira nos dentes e pressione levemente para os envolver com gel</p>

4.5 Métodos

A metodologia utilizada para esta análise foi desenvolvida especialmente para esse trabalho e todos os experimentos envolvendo análise eletroquímica foram realizadas no Instituto de Química da USP (IQ-USP), Laboratório de Sensores Eletroquímicos de Métodos Eletroanalíticos (LSEME) sob supervisão do Prof. Dr. Mauro Bertotti, responsável pelo laboratório e colaborador na metodologia.

Os microelétrodos utilizados foram confeccionados de acordo com a metodologia descrita por Castro (2011). Todos eles tiveram seu funcionamento analisado previamente aos testes realizando-se voltamogramas cíclicos em soluções de ferricianeto de potássio em meio de cloreto de potássio. Eles mostram o potencial de oxirredução do $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, que gera um perfil sigmoidal conhecido.

As amostras foram posicionadas na cela desenvolvida pelo Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA – USP), através de esquema idealizado pelo nosso grupo de pesquisa, baseado na análise de dispositivos

utilizados por Hanks et al. (1993) e Outhwaite et al. (1974), que pode ser observado na figura 4.2.

Figura 4.2 – Cella desenvolvida para o teste eletroquímico. A é a seringa carregada com gel clareador. B é o recipiente para o gel durante o teste e C é a saída do gel em excesso injetado. A injeção do gel acontece de modo passivo quando a seringa de saída puxa o ar existente dentro do recipiente B criando um vácuo e injetando para dentro o gel existente em A

A porção da cela onde as amostras foram fixadas tem uma entrada e uma saída para o peróxido. A entrada se encontra na região mais baixa da câmara e a saída na parte mais alta, garantindo assim, o contato por completo do gel clareador com a amostra.

Esse sistema de injeção com a entrada e saída foi idealizado para que o peróxido só entrasse em contato com o esmalte dentário após o sistema inteiro com a amostra já ter sido montado e iniciada a leitura (figura 4.3)

Figura 4.3 - Cella completa montada. A: Sistema de injeção de peróxido; B: Câmara do peróxido; C: Sistema de retirada de ar e sucção de peróxido; D: Amostra com dente; E: "Câmara Pulpar"

Portanto, todas as leituras partiram de um momento zero real, representado pelo momento em que o gel clareador foi injetado na câmara. Esse método ainda permitiu a saída do ar da câmara pela região mais alta e, garantindo assim o preenchimento correto do espaço do gel.

Além disso, o excesso de gases gerado na câmara B pode extravasar para o sistema C sem que houvesse o perigo de acúmulo de gases liberados pelo peróxido de hidrogênio no sistema. Após o posicionamento da amostra, a cela que representava a câmara pulpar foi preenchida com o eletrólito suporte, 500 µl de solução de cloreto de potássio ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) borbulhado por 10 minutos em argônio, para retirar o oxigênio que pudesse interferir na leitura.

O microeletrodo foi posicionado no local determinado para a leitura através do sistema de posicionamento piezoelétrico. Este deslocava o microeletrodo nas direções x, y e z, com velocidade constante na ordem de micrômetros/segundo. Após o microeletrodo ser colocado na posição determinada, ele foi afastado 10µm acima da superfície da dentina, sendo esta distância padronizada para todas as amostras.

Em teste prévio realizado com um grupo de 5 dentes, com leituras em 5 pontos diferentes da face pulpar, determinou-se um ponto ideal de leitura, que era o ponto onde ocorria o maior valor de leitura encontrado.

Esse ponto coincidiu em quatro das cinco amostras com a região mais central da amostra, o que fez sentido uma vez que é a região com menor espessura de esmalte devido a anatomia convexa das faces vestibulares dos dentes bovinos. Após o posicionamento da amostra a região determinada como de maior permeabilidade foi marcada com uma circunferência com marcador permanente, cujo centro era o ponto de leitura, para assim garantir que a leitura fosse realizada sempre no mesmo local em todas as permeações.

Antes do início do teste foi realizado um voltamograma, isto é, uma leitura do potencial elétrico, do KCl dentro da “câmara pulpar” para garantir que não haveria resposta ao potencial elétrico aplicado previamente ao teste. Este foi considerado o “branco”, o KCl puro sem permeação, ou seja, um valor de leitura que foi descontado

de todas as leituras realizadas para que fosse obtido o valor real do potencial gerado pela leitura do H_2O_2 .

Os testes foram realizados com um tempo de leitura de 3600s (1 hora, tempo médio de uma sessão de clareamento de consultório e tempo recomendado de utilização do peróxido de carbamida 22%), permitindo assim a comparação dos clareadores com outros experimentos realizados na literatura.

Uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos foi utilizada, sendo o eletrodo de trabalho um microeletrodo (fabricado de acordo com a metodologia criada no LSEME (Castro, 2011)). Foi utilizado ainda um eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$, construído como descrito por Pedrotti et al. (1996), e o eletrodo auxiliar, um fio de platina. A figura 4.4 mostra a disposição dos eletrodos na cela.

Figura 4.4 - Cella eletroquímica montada com a amostra e os eletrodos em posição para realizar a leitura

Assim, um biopotenciostato (Autolab PGSTAT 30 – EcoChemie- Nova Zelândia), foi empregado para controlar os potenciais aplicados tanto no microeletrodo quanto no eletrodo de referência. Foi considerado essencial que o

equipamento fosse capaz de fazer medidas de várias correntes, uma vez que são utilizados microeletrodos (figura 4.5)

O computador controla o posicionamento do microeletrodo nos três eixos cartesianos, através de sistema de posicionamento de alta precisão. Ele é composto por um motor de passo e uma cerâmica piezoelétrica. Através do software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System -GPES for Windows - version 4.9.006., Eco Chemie – Nova Zelândia) é realizada aquisição e o processamento dos dados nas leituras realizadas pelo microeletrodo.

Figura 4.5 - Biopotenciostato Autolab

O teste de leitura de permeação, denominado cronoamperograma, uma vez que mede a corrente em função do tempo, era iniciado com o tempo 0s. A injeção passiva do gel clareador na cela foi iniciada depois de passados 50 segundos do início do teste para estabilização da leitura do eletrodo no líquido. A entrada do gel era consequência da aspiração do ar presente no sistema pela seringa C. Após a realização da leitura durante o tempo de 3600s, o eletrodo foi retirado da cela e o líquido da câmara pulpar artificial foi coletado com uma micropipeta, colocado em um béquer onde foi realizada a mensuração da concentração total de peróxido de

hidrogênio que permeou durante o tempo do experimento. Não foram realizadas trocas do gel durante o tempo determinado.

Essa leitura, chamado de voltamograma, teve o valor do “branco”, o valor do potencial na solução de KCl antes da permeação, subtraído do valor lido para que se chegasse ao resultado final.

Essas leituras serão repetidas três vezes com os mesmos parâmetros na mesma amostra totalizando três leituras para avaliar o aumento da permeabilidade após a aplicação de géis clareadores. Após a realização dos experimentos, as amostras foram lavadas em água destilada por 5 minutos e depois armazenadas em água destilada até o ensaio seguinte. Todos os dados enviados ao computador foram tratados no software Origin Pro 8 (Origin Lab- EUA).

4.6 Quantificação da concentração de peróxido

Os valores lidos na solução de KCl coletada após os experimentos de permeação foram comparados com uma curva de calibração. Ela foi construída com concentrações de peróxido de hidrogênio (a partir de uma solução de H_2O_2 a 30%) pré-determinadas, adicionadas em solução de 0,5 ml KCl 0,1 mol/L. Cada adição alterava a concentração da solução, alterando assim o valor do potencial elétrico lido. As adições realizadas foram de 5 μL , 50 μL e 253 μL de solução de 10mM de H_2O_2 , 80 μL e 250 μL de solução de 200mM de H_2O_2 , 500 μL de solução de 500mM de H_2O_2 e 400 μL e 1000 μL de solução de 1000mM de H_2O_2 . Foram nove adições realizadas e após cada uma delas, a concentração de peróxido de hidrogênio passavam a ser 0,01mM, 0,109mM, 0,5855mM, 1,89mM, 4,85mM, 13,7mM, 54,4mM, 114,6mM e 245mM respectivamente. A cada adição era realizado um voltamograma. Esses voltamogramas sucessivos, expressados no gráfico 4.1 geravam uma curva de leitura para comparação com o voltamograma de KCl.

Gráfico 4.1 – Voltamogramas sucessivos com as alíquotas de peróxido de hidrogênio utilizadas para montar a curva de calibração para determinação da concentração final de peróxido de hidrogênio

A construção da curva gera uma equação da reta que permite que todos os valores lidos sejam inseridos na equação e assim transformados de valores de corrente em valores de massa de peróxido de hidrogênio.

Gráfico 4.2 – Curva de calibração para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio nos voltamogramas

A utilização dos valores de corrente das curvas obtidas em cada voltamograma, descontado o valor do branco, para cada uma das leituras de permeação, tanto para peróxido de hidrogênio quanto para peróxido de carbamida permite determinar a concentração da massa de peróxido de hidrogênio durante o experimento, utilizando-se a equação gerada pela curva de calibração. Os valores encontrados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

Da mesma maneira, foi criada uma curva através do cronoamperograma com a adição sucessiva de alíquotas de peróxido de hidrogênio, com auxílio de uma micropipeta, à solução de KCl 0,1 M L⁻¹ a aproximadamente 75 segundos cada, os valores das adições foram 0,01mM, 0,1mM, 0,5mM, 1,5mM, 3,0mM, 10mM, 50mM, 100mM e 300mM de H₂O₂ 30%.

Gráfico 4.3 – Cronoamperograma mostrando adições de alíquotas de peróxido de hidrogênio sucessivas para determinação da concentração final nas leituras de corrente elétrica

Assim foi criada uma curva de calibração para o cronoamperograma, e a partir dessa gerada uma equação. Os valores de corrente lidos no cronoamperograma substituem o X na equação, e essa resulta em um valor de concentração de peróxido de hidrogênio. Os valores convertidos foram tabulados e submetidos à análise estatística.

Gráfico 4.4 – Curva de calibração realizada através das leituras dos cronoamperogramas sucessivos.

4.7 Análise Espectrofotométrica

Utilizando-se a mesma cela utilizada no experimento eletroquímico, realizou-se o teste de mensuração de permeação através do método espectrofotométrico. Esse teste foi utilizado como um método de validação da nova metodologia eletroquímica, uma vez que foram utilizadas amostras preparadas da mesma maneira e os mesmos produtos. A metodologia utilizada foi a descrita por Souza (1997), e utilizada em trabalhos de Rotstein et al. (1996) e Camps et al. (2007) que é uma variação da metodologia clássica de mensuração de permeação de peróxido de

hidrogênio de Mottola et al. (1970). A distribuição dos grupos, dentes e produtos clareadores segue a ordem descrita na tabela 4.1.

Para a quantificação do peróxido de hidrogênio liberado utilizou-se procedimento espectrofotométrico baseado na reação entre Fe(II) e H₂O₂ em meio ácido, formando-se Fe(III), de acordo com a seguinte reação química:

Em meio contendo excesso de íons tiocianato (SCN⁻), forma-se quantitativamente o complexo avermelhado de fórmula Fe(SCN)₃⁻⁶ e a concentração deste pode ser monitorada espectrofotometricamente em comprimento de onda apropriado (480nm). Uma vez que o sinal de absorbância é proporcional à concentração do complexo Fe(SCN)₃⁻⁶ pode-se indiretamente determinar a concentração de H₂O₂ nas soluções de estudo, supondo-se que a reação entre Fe(II) e H₂O₂ ocorra estequiometricamente.

Primeiramente, estabeleceu-se uma curva de calibração, onde valores de absorbância de soluções de concentrações de H₂O₂ conhecida foram medidos em 480 nm. O comprimento de onda foi selecionado a partir do espectro de absorbância do complexo Fe(SCN)₃⁻⁶ utilizando-se o valor correspondente à máxima sensibilidade.

Gráfico 4.5: Curva de calibração para determinação das concentrações nas análises espectrofotométricas

As soluções de referência utilizadas na construção da curva de calibração foram preparadas em seis balões volumétricos de 25ml. A estes balões foram adicionados 2ml de solução de sulfato ferroso 0,1mol/l e 2ml de solução de tiocianato de potássio 2mol/l. Em seguida, alíquotas de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%) 0,1M L⁻¹ foram adicionados aos seis balões de forma que a concentração analítica em H₂O₂ correspondesse a 0,5, 2,5, 5, 10, 20 e 30 µM, respectivamente. Para a construção da curva de calibração, os valores de absorbância referentes às soluções padrão de H₂O₂ foram devidamente corrigidos, subtraindo-se o sinal de absorbância medido para as soluções preparadas sem o analito de interesse (H₂O₂), denominadas “branco”.

Foram realizadas três leituras, correspondentes a cada uma das exposições às substâncias clareadoras, para cada uma das amostras da mesma maneira que utilizado na metodologia eletroquímica. A solução da câmara pulpar foi então pipetada e colocada em cubetas para a leitura no espectrofotômetro (DU 800 Spectrophotometer Califórnia, EUA). Os valores obtidos em cada uma das leituras são colocados na equação gerada pela curva padrão e essa permite determinar o

valor da concentração de peróxido de hidrogênio dentro da solução na cavidade pulpar.

Figura 4.6 - Espectrofotômetro Beckman Coulter

Avaliação dos dados

Todos os testes foram analisados com auxílio do programa BioEstat 5.0 e os gráficos e tabelas elaborados no Office Excel, Microsoft, EUA, 2010.

As medidas de corrente elétrica consideradas no tempo e concentração foram comparadas entre cada permeação das moléculas (1^a, 2^a e 3^a) através da Análise de Variância (ANOVA) com teste auxiliar Tukey quando encontradas desigualdades entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$)

Para a comparação das concentrações finais entre peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida a cada período (1^a, 2^a e 3^a), foi utilizado o teste de Kruskal Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Amostra

O estudo utilizou um (n) de 5 espécimes para cada grupo, estabelecido previamente ao início do estudo, conforme o número de variáveis adotado. Todavia, no decorrer do experimento, observou-se que em virtude da variação do comportamento químico, a substância peróxido de hidrogênio apresentou um elevado erro padrão, sendo necessário aumentar apenas neste grupo o (n) para 10, com a finalidade de se obter maior homogeneidade da amostra. Este fato não interferiu na análise dos resultados, uma vez que foi adotado o mesmo critério para todas as avaliações envolvendo o peróxido de hidrogênio (HP) na análise eletroquímica.

Para a observação da semelhança ($p > 0,05$) entre as permeações, foram consideradas letras iguais maiúsculas (de A a C).

5.2 Cronoamperograma e Voltamograma

Para cada espécime foram realizados três cronoamperogramas para determinar o tempo necessário para a permeação das moléculas de clareadores através dos tecidos duros dentários. O gráfico 5.1 ilustra a sobreposição do branco, e o resultado de três permeações para um mesmo espécime.

Gráfico 5.1 – Cronoamperogramas mostrando 3 permeações diferentes para uma mesma amostra e o branco

Ao fim de cada cronoamperograma, foi realizado um voltamograma para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio presente na solução ao fim da permeação. O gráfico 5.2 sobrepõe 3 voltamogramas para uma mesma amostra e o branco.

Gráfico 5.2- Voltamogramas de 3 permeações de uma mesma amostra sobrepostos e o branco, mostrando aumento no valor da corrente com as permeações

Os valores aferidos a partir dos gráficos dos cronoamperogramas e voltamogramas estão transcritos e analisados nas tabelas e gráficos a seguir.

5.3 Tempo de permeação

A tabela 5.1 refere-se à análise eletroquímica e apresenta o tempo do início da permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio detectáveis de cada amostra nas diferentes exposições (1ª permeação, 2ª permeação e 3ª permeação), sendo o tempo final de exposição padronizado em 3600 segundos.

A comparação entre os tempos em cada período de permeação foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e o teste de contrastes (Tukey), demonstrando que o tempo da 1ª permeação foi diferente da 2ª permeação ($p=0.0053$) e da 3ª permeação ($p=0.00027$), todavia a 2ª e 3ª permeações foram semelhantes entre si ($p>0,05$).

Tabela 5.1 – Tempo de permeação do peróxido de hidrogênio (HP) em segundos medido através da análise eletroquímica

Tempo de permeação do peróxido de hidrogênio (HP) em segundos					
Espécime	Tempo inicial	Tempo inicial de permeação (segundos)			Tempo Final
		1 ^a permeação	2 ^a permeação	3 ^a permeação	
1	0	2023	1117	686	3600
2	0	2009	1392	480	3600
3	0	1836	1129	975	3600
4	0	2217	855	458	3600
5	0	1157	788	336	3600
6	0	521	397	259	3600
7	0	702	458	121	3600
8	0	2812	687	316	3600
9	0	1145	931	366	3600
10	0	2462	824	580	3600
Média	0	1688,50	857,70	457,70	3600
DesvPad	0	766,86	305,36	242,97	3600
ErroPad	0	242,68	96,63	76,89	3600

O gráfico 5.3 demonstra a queda do tempo de permeação das moléculas de peróxido de hidrogênio após cada exposição durante a análise eletroquímica. A 1^a permeação apresentou média de 1688,50 segundos (28 minutos) quando comparada a 857,70s (14 minutos) e a 457,70s (7 minutos) da 2^a e 3^a permeações, respectivamente. Desta forma se observa que a 1^a permeação representa aproximadamente o dobro e o quádruplo dos tempos da 2^a e 3^a permeações.

Gráfico 5.3 – Análise do momento de permeação do Peróxido de Hidrogênio na análise eletroquímica

A tabela 5.2 apresenta os dados de permeação do peróxido de hidrogênio – placebo (PHP), demonstrando que até o tempo final (3600 segundos) o eletrodo não detectou qualquer atividade de moléculas de peróxido de hidrogênio.

Tabela 5.2 – Tempo de permeação do Peróxido de Hidrogênio – placebo (PHP) em segundos durante a análise eletroquímica

Tempo de permeação do Peróxido de Hidrogênio Placebo (PHP) em segundos					
Espécime	Tempo inicial	Tempo inicial de permeação			Tempo Final
		1 ^a permeação	2 ^a permeação	3 ^a permeação	
1	0	0	0	0	3600
2	0	0	0	0	3600
3	0	0	0	0	3600
4	0	0	0	0	3600
5	0	0	0	0	3600
Média	0	0,00	0,00	0,00	3600
DesvPad	0	0,00	0,00	0,00	3600
ErroPad	0	0,00	0,00	0,00	3600

Na tabela 5.3 observa-se a permeação do peróxido de carbamida (CP) durante a análise eletroquímica, em que também não foi possível detectar moléculas de peróxido de hidrogênio até o tempo final da análise de 3600 segundos.

Tabela 5.3 – Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida (CP) em segundos durante a análise eletroquímica

Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida (CP)					
Espécime	Tempo inicial	Tempo inicial de permeação			Tempo Final
		1 ^a permeação	2 ^a permeação	3 ^a permeação	
1	0	0	0	0	3600
2	0	0	0	0	3600
3	0	0	0	0	3600
4	0	0	0	0	3600
5	0	0	0	0	3600
Média	0	0,00	0,00	0,00	3600
DesvPad	0	0,00	0,00	0,00	3600
ErroPad	0	0,00	0,00	0,00	3600

Da mesma maneira o grupo peróxido de carbamida – placebo (PCP) também não foi capaz de permitir a detecção de moléculas de peróxido de hidrogênio (tabela 5.4) durante a análise eletroquímica.

Tabela 5.4 – Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida - Placebo (PCP) em segundos durante a análise eletroquímica

Tempo de permeação do Peróxido de Carbamida – Placebo (PCP)					
Espécime	Tempo inicial	Tempo inicial de permeação			Tempo Final
		1 ^a permeação	2 ^a permeação	3 ^a permeação	
1	0	0	0	0	3600
2	0	0	0	0	3600
3	0	0	0	0	3600
4	0	0	0	0	3600
5	0	0	0	0	3600
Média	0	0,00	0,00	0,00	3600
DesvPad	0	0,00	0,00	0,00	3600
ErroPad	0	0,00	0,00	0,00	3600

5.2 Corrente elétrica

A tabela 5.5 mostra a corrente (i) estabelecida pela detecção de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada permeação da substância na análise eletroquímica. Ocorreram diferenças entre os valores médios de corrente elétrica (i) entre a 1ª e 2ª, e entre a 1ª e 3ª permeação ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre a 2ª e a 3ª permeação ($p > 0,05$).

Tabela 5.5 – Registro de corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio (HP) durante a análise eletroquímica

Primeiro momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio)			
Espécime	Corrente (i) de leitura	Branco	Corrente (i) A
1	2.20E-08	2.17E-09	1.99E-08
2	4.23E-09	1.58E-09	2.65E-09
3	5.28E-09	4.45E-10	4.83E-09
4	1.38E-09	4.47E-10	9.33E-10
5	2.52E-09	1.53E-09	9.88E-10
6	4.04E-09	1.45E-09	4.10E-10
7	2.75E-09	1.53E-09	1.22E-09
8	6.32E-09	1.71E-10	6.15E-09
9	1.23E-09	1.58E-10	1.07E-09
10	2.21E-09	1.51E-09	7.00E-10
Média	5.20E-09	1.10E-09	3.89E-09
DesvPad	6.13E-09	7.18E-10	5.95E-09
ErroPad	1.94E-09	2.27E-10	1.88E-09
Segundo momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio)			
1	1.15E-08	2.17E-09	1.15E-08
2	7.06E-09	1.58E-09	5.48E-09
3	5.08E-09	4.45E-10	4.63E-09
4	6.12E-08	4.47E-10	6.08E-08
5	2.20E-09	1.53E-09	6.68E-10
6	5.24E-09	1.45E-09	3.79E-09
7	9.50E-08	1.53E-09	9.35E-08
8	9.26E-09	1.71E-10	9.09E-09
9	3.35E-08	1.58E-10	3.33E-08
10	2.04E-08	1.51E-09	1.89E-08
Média	2.50E-08	1.10E-09	2.42E-08
DesvPad	3.05E-08	7.18E-10	3.05E-08

ErroPad	9.65E-09	2.27E-10	9.64E-09
Terceiro momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio)			
1	1.72E-08	2.17E-09	1.51E-08
2	8.10E-08	1.58E-09	7.95E-08
3	2.02E-09	4.45E-10	1.57E-08
4	4.44E-07	4.47E-10	4.44E-07
5	6.13E-09	1.53E-09	4.60E-09
6	5.73E-08	1.45E-09	5.59E-08
7	8.56E-08	1.53E-09	8.41E-08
8	2.81E-09	1.71E-10	2.64E-09
9	3.31E-08	1.58E-10	3.29E-08
10	2.77E-09	1.51E-09	1.26E-09
Média	7.32E-08	1.10E-09	7.36E-08
DesvPad	1.34E-07	7.18E-10	1.34E-07
ErroPad	4.25E-08	2.27E-10	4.23E-08

No gráfico 5.4 pode se observar que para o peróxido de hidrogênio os valores médios aferidos de corrente elétrica (amperes) é crescente sendo a 1ª permeação - $3,89\text{E-}09$, a 2ª permeação $2,42\text{E-}08$ e a 3ª permeação $7,36\text{E-}08$, todavia a comparação entre cada permeação demonstrou diferenças significativas entre a 1ª e a 2ª ($p=0.05$) permeação; e entre a 1ª e a 3ª permeação ($p=0,05$). Não houve diferença entre a 2ª e a 3ª permeação ($p>0.05$).

Gráfico 5.4 - Análise do registro de corrente elétrica (i) em função de cada permeação de moléculas de Peróxido de Hidrogênio

Quanto ao peróxido de hidrogênio – placebo (PHP) a tabela 5.5 mostra médias de valores de corrente elétrica (amperes) negativos, o que demonstra que os valores foram inferiores ao valor do branco (corrente da solução KCl, sem H_2O_2). Este fato sugere valor nulo de permeação de moléculas de peróxido, ou seja, permeação de moléculas não detectada.

Tabela 5.6 – Registro de corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas

Primeiro momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio - Placebo)			
Espécime	Corrente (i) de leitura	Branco	Corrente (i) A
1	2,56E-10	2,73E-09	-2,47E-09
2	1,47E-10	4,58E-09	-4,43E-09
3	1,41E-10	5,89E-09	-5,75E-09
4	1,44E-10	3,83E-09	-3,69E-09
5	1,48E-10	1,60E-09	-1,45E-09
Média	1,67E-10	3,73E-09	-3,56E-09
DesvPad	4,97E-11	1,65E-09	1,67E-09
ErroPad	2,22E-11	7,38E-10	7,47E-10
Segundo momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio - Placebo)			
1	1,66E-10	2,73E-09	-2,56E-09
2	1,71E-10	4,58E-09	-4,41E-09
3	1,05E-10	5,89E-09	-5,79E-09
4	2,71E-10	3,83E-09	-3,56E-09
5	1,61E-10	1,60E-09	-1,44E-09
Média	1,75E-10	3,73E-09	-3,55E-09
DesvPad	6,00E-11	1,65E-09	1,67E-09
ErroPad	2,68E-11	7,38E-10	7,46E-10
Terceiro momento de permeação (Peróxido de Hidrogênio - Placebo)			
1	1,25E-10	2,73E-09	-2,61E-09
2	1,07E-10	4,58E-09	-4,47E-09
3	1,10E-10	5,89E-09	-5,78E-09
4	2,50E-10	3,83E-09	-3,58E-09
5	3,51E-10	1,60E-09	-1,25E-09
Média	1,89E-10	3,73E-09	-3,54E-09
DesvPad	1,08E-10	1,65E-09	1,73E-09
ErroPad	4,84E-11	7,38E-10	7,74E-10

No gráfico 5.5 observa-se a negatividade dos valores de corrente para peróxido de hidrogênio – placebo (PHP), o que sugere inexistência de corrente elétrica e permeação de moléculas.

Ainda é possível observar semelhança das médias de valores de corrente elétrica a cada permeação, não havendo qualquer relação crescente ou decrescente entre cada permeação.

Gráfico 5.5 - Análise do registro de corrente elétrica (i) em função de cada permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio – placebo (PHP)

A mesma situação descrita anteriormente se estabelece na tabela 5.6, cujas correntes elétricas mostradas para o peróxido de carbamida (CP) tanto na 1ª, 2ª ou 3ª permeações são negativas, podendo, portanto serem consideradas nulas.

Tabela 5.7 – Registro de corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida

Primeiro momento de permeação (Peróxido de Carbamida)			
Espécime	Corrente (i) de leitura	Branco	Corrente (i) A
1	3,99E-10	1,42E-09	-1,02E-09
2	3,87E-10	3,45E-09	-3,06E-09
3	1,06E-10	3,04E-09	-2,93E-09
4	8,48E-11	1,58E-09	-1,50E-09
5	3,36E-10	1,60E-09	-1,26E-09
Média	2,63E-10	2,22E-09	-1,96E-09
DesvPad	1,55E-10	9,51E-10	9,68E-10
ErroPad	6,90E-11	4,25E-10	4,32E-10
Segundo momento de permeação (Peróxido de Carbamida)			
1	4,86E-10	1,42E-09	-9,34E-10
2	8,10E-10	3,45E-09	-2,64E-09
3	1,99E-10	3,04E-09	-2,84E-09
4	9,07E-10	1,58E-09	-6,73E-10
5	1,20E-10	1,60E-09	-1,48E-09
Média	5,04E-10	2,22E-09	-1,71E-09
DesvPad	3,52E-10	9,51E-10	9,84E-10
ErroPad	1,57E-10	4,25E-10	4,39E-10
Terceiro momento de permeação (Peróxido de Carbamida)			
1	2,04E-10	1,42E-09	-1,22E-09
2	2,13E-10	3,45E-09	-3,24E-09
3	5,59E-10	3,04E-09	-2,48E-09
4	5,52E-10	1,58E-09	-1,03E-09
5	5,59E-10	1,60E-09	-1,04E-09
Média	4,17E-10	2,22E-09	-1,80E-09
DesvPad	1,91E-10	9,51E-10	1,01E-09
ErroPad	8,52E-11	4,25E-10	4,49E-10

No gráfico 5.6 observa-se que as médias de corrente elétrica a cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida foi negativa e semelhante,

sendo $-1,96\text{E-}09$, $-1,71\text{E-}09$ e $-1,80\text{E-}09$, para 1ª, 2ª e 3ª permeação, respectivamente.

Gráfico 5.6 - Análise do registro de corrente elétrica (i) em função de cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida

Quanto à análise da corrente elétrica de peróxido de carbamida – placebo (PCP) ela também demonstra valores relativos e médias negativas, sendo $-5,08\text{E-}09$ A, $-4,92\text{E-}09$ e $-4,92\text{E-}09$ para a 1ª, 2ª e 3ª permeação (tabela 5.7).

Tabela 5.8 – Registro de corrente elétrica (i) em amperes a cada permeação de moléculas de Peróxido de Carbamida – placebo (PCP)

Primeiro momento de permeação (Peróxido de Carbamida - Placebo)			
Espécime	Corrente (i) de leitura	Branco	Corrente (i) A
1	6,06E-10	6,16E-09	-5,55E-09
2	6,52E-10	6,16E-09	-5,51E-09
3	9,32E-10	5,10E-09	-4,17E-09
4	6,24E-10	5,10E-09	-4,48E-09
5	9,25E-10	6,36E-09	-5,44E-09
Média	7,48E-10	5,78E-09	-5,08E-09
DesvPad	1,76E-10	6,12E-10	7,87E-10
ErroPad	7,88E-11	2,73E-10	3,51E-10
Segundo momento de permeação (Peróxido de Carbamida - Placebo)			

1	9,81E-10	6,16E-09	-5,18E-09
2	9,59E-10	6,16E-09	-5,20E-09
3	7,31E-10	5,10E-09	-4,37E-09
4	8,32E-10	5,10E-09	-4,27E-09
5	7,33E-10	6,36E-09	-5,63E-09
Média	8,47E-10	5,63E-09	-4,92E-09
DesvPad	1,38E-10	6,12E-10	4,74E-10
ErroPad	6,18E-11	2,73E-10	2,12E-10
Terceiro momento de permeação (Peróxido de Carbamida - Placebo)			
Espécime	Corrente (i) de leitura	Branco	Corrente (i) A
1	8,35E-10	6,16E-09	-5,33E-09
2	9,16E-10	6,16E-09	-5,24E-09
3	9,16E-10	5,10E-09	-4,18E-09
4	9,32E-10	5,10E-09	-4,17E-09
5	8,44E-10	6,36E-09	-5,52E-09
Média	8,89E-10	5,81E-09	-4,92E-09
DesvPad	4,68E-11	6,12E-10	6,37E-10
ErroPad	2,09E-11	2,73E-10	2,84E-10

No gráfico 5.7 observa-se semelhança entre as médias dos valores de corrente elétrica (amperes), porém negatividade dos valores sugerindo não detecção de moléculas de peróxido de hidrogênio na substância.

Gráfico 5.7 - Análise do registro de corrente elétrica (i) em função de cada permeação de moléculas de peróxido de carbamida – placebo (PCP)

5.3 Concentração final de peróxido de hidrogênio

A tabela 5.9 apresenta os valores relativos de voltamograma, branco, corrente, além da concentração (mg/L).

As médias das concentrações em cada permeação mostram $1.14\text{E-}04$ para 1ª permeação, $1.62\text{E-}04$ para a 2ª e $1.64\text{E-}03$ para a 3ª permeação.

A análise de variância demonstrou diferenças ($p=0.013$) entre as médias de concentração entre a 1ª e 3ª permeação, e entre a 2ª e 3ª permeação, e não mostrou diferenças entre a 1ª e 2ª permeação.

Tabela 5.9 – Concentração (mg) de peróxido de hidrogênio a cada permeação

Concentração (mg/L) de peróxido de hidrogênio após a 1ª Permeação				
Espécime	Voltamograma (A)	Branco (A)	Corrente (i) A	Concentração (mg/L)
1	4.70E-08	2.17E-09	4.48E-08	1.48E-04
2	4.86E-08	1.58E-09	4.70E-08	1.58E-04
3	8.74E-09	4.45E-10	8.30E-09	1.80E-05
4	1.60E-08	4.47E-10	1.56E-08	1.50E-05
5	1.66E-09	1.53E-09	1.30E-10	5.50E-05
6	8.73E-09	1.45E-09	7.28E-09	2.20E-05
7	8.93E-08	1.53E-09	8.78E-08	3.24E-04
8	2.69E-08	1.71E-10	2.67E-08	6.60E-05
9	6.26E-08	1.58E-10	6.24E-08	2.27E-04
10	3.72E-08	1.51E-09	3.57E-08	1.06E-04
Média	3.47E-08	1.10E-09	3.36E-08	1.14E-04
DesvPad	2.78E-08	7.18E-10	2.77E-08	1.02E-04
ErroPad	8.80E-09	2.27E-10	8.76E-09	3.22E-05
Concentração (mg/L) de peróxido de hidrogênio após a 2ª Permeação				
1	1.59E-07	2.17E-09	1.57E-07	6.55E-04
2	2.69E-08	1.58E-09	2.53E-08	5.90E-05
3	6.84E-08	4.45E-10	6.80E-08	2.52E-04
4	3.60E-08	4.47E-10	3.56E-08	1.06E-04
5	9.66E-09	1.53E-09	8.13E-09	1.90E-05
6	1.21E-08	1.45E-09	1.07E-08	7.00E-06
7	5.45E-08	1.53E-09	5.30E-08	1.85E-04
8	4.58E-08	1.71E-10	4.56E-08	1.51E-04

9	9.47E-08	1.58E-10	9.45E-08	1.30E-05
10	5.28E-08	1.51E-09	5.13E-08	1.77E-04
Média	5.60E-08	1.10E-09	5.49E-08	1.62E-04
DesvPad	4.43E-08	7.18E-10	4.43E-08	1.92E-04
ErroPad	1.40E-08	2.27E-10	1.40E-08	6.08E-05
Concentração (mg/L) de peróxido de hidrogênio após a 3ª Permeação				
1	5.27E-07	2.17E-09	5.25E-07	2.32E-03
2	1.38E-06	1.58E-09	1.38E-06	6.19E-03
3	6.78E-07	4.45E-10	6.78E-07	3.01E-03
4	1.04E-07	4.47E-10	1.04E-07	4.14E-04
5	4.21E-08	1.53E-09	4.06E-08	1.28E-04
6	3.74E-08	1.45E-09	3.60E-08	1.07E-04
7	8.16E-07	1.53E-09	8.14E-07	3.63E-03
8	2.52E-08	1.71E-10	2.50E-08	5.80E-05
9	1.25E-07	1.58E-10	1.25E-07	5.10E-04
10	2.03E-08	1.51E-09	1.88E-08	3.00E-05
Média	3.76E-07	1.10E-09	3.74E-07	1.64E-03
DesvPad	4.63E-07	7.18E-10	4.63E-07	2.10E-03
ErroPad	1.46E-07	2.27E-10	1.46E-07	6.63E-04

Há uma relação crescente na concentração (mg/L) de moléculas de peróxido de hidrogênio detectadas na 1ª, 2ª e 3ª permeação respectivamente. Entretanto, o crescimento entre a 1ª e a 2ª permeação é discreto, quando comparado à 3ª permeação, onde foi detectada maior concentração de moléculas do peróxido de hidrogênio (Gráfico 5.8)

Gráfico 5.8 – Avaliação da concentração (mg/L) de Peróxido de Hidrogênio (HP) em função do momento de permeação

Quanto à concentração do grupo peróxido de carbamida (CP) observam-se médias de $2,96E-02$ na 1ª permeação, $3,11E-05$ na 2ª permeação e $1,37E-04$ na 3ª permeação, havendo diferença entre a 1ª e a 3ª permeação ($p = 0,0233$) e entre a 2ª e a 3ª permeação ($p = 0,0257$), não havendo diferença entre a 1ª e a 2ª permeação ($p = 0,5624$)

Tabela 5.10 – Concentração (mg/L) de peróxido de carbamida a cada permeação

Concentração (mg/L) de peróxido de carbamida após a 1ª Permeação				
Espécime	Voltamograma (A)	Branco (A)	Corrente (A)	Concentração (i) mg
1	9.90E-09	1.42E-09	8.48E-09	1.69E-05
2	4.53E-09	3.45E-09	1.08E-09	5.05E-05
3	8.04E-09	3.04E-09	5.00E-09	3.27E-05
4	9.76E-09	1.58E-09	8.18E-09	1.83E-05
5	7.26E-09	1.60E-09	5.66E-09	2.97E-05
Média	7.90E-09	2.22E-09	5.68E-09	2.96E-05
DesvPad	2.19E-09	9.51E-10	2.99E-09	1.36E-05
ErroPad	6.94E-10	3.01E-10	9.46E-10	4.29E-06

Concentração (mg/L) de peróxido de carbamida após 2ª Permeação				
1	2.32E-08	1.42E-09	2.18E-08	4.36E-05
2	6.54E-09	3.45E-09	3.09E-09	4.14E-05
3	9.35E-09	3.04E-09	6.31E-09	2.68E-05
4	1.35E-08	1.58E-09	1.19E-08	1.37E-06
5	1.74E-09	1.60E-09	1.40E-10	4.22E-05
Média	1.09E-08	2.22E-09	8.65E-09	3.11E-05
DesvPad	8.11E-09	9.51E-10	8.54E-09	1.79E-05
ErroPad	2.57E-09	3.01E-10	2.70E-09	5.68E-06
Concentração (mg/L) de peróxido de carbamida após a 3ª Permeação				
1	3.19E-08	1.42E-09	3.05E-08	8.30E-05
2	5.94E-08	3.45E-09	5.60E-08	1.99E-04
3	1.00E-08	3.04E-09	6.96E-09	2.38E-05
4	6.57E-08	1.58E-09	6.41E-08	2.36E-04
5	4.57E-08	1.60E-09	4.41E-08	1.45E-04
Média	4.25E-08	2.22E-09	4.03E-08	1.37E-04
DesvPad	2.24E-08	9.51E-10	2.26E-08	8.58E-05
ErroPad	7.08E-09	3.01E-10	7.14E-09	2.71E-05

Há uma relação crescente na concentração (mg) de moléculas de peróxido de hidrogênio detectadas na 1ª, 2ª e 3ª permeação de peróxido de carbamida respectivamente. Entretanto, semelhante ao observado no grupo Peróxido de Hidrogênio, o crescimento entre a 1ª e a 2ª permeação é discreto, quando comparado à 3ª permeação de peróxido de carbamida, onde foi detectada maior concentração de moléculas de peróxido de hidrogênio (Gráfico 5.9)

Gráfico 5.9 – Avaliação da concentração (mg) de Peróxido de Carbamida (CP) em função do momento de permeação

5.3 Comparação entre as concentrações finais

A comparação entre as concentrações finais (mg) detectadas para peróxido de hidrogênio (HP) e de carbamida (CP) mostra em ambos uma média maior na 3ª permeação $2.14\text{E-}03$ e $1.37\text{E-}04$, respectivamente. Apenas na 3ª permeação ocorreu diferença significativa entre os grupos ($p=0.0472$).

Tabela 5.11 – Comparação entre as concentrações finais (mg) de peróxido de hidrogênio e de peróxido de carbamida

Comparação entre as concentrações finais (mg) 1ª permeação		
Espécime	Concentração Peróxido de Hidrogênio (mg)	Concentração Peróxido de Carbamida (mg)
1	1.48E-04	1.69E-05
2	1.58E-04	5.05E-05
3	1.80E-05	3.27E-05
4	1.50E-05	1.83E-05
5	5.50E-05	2.97E-05

Média	7.88E-05	2.96E-05
DesvPad	6.96E-05	1.36E-05
ErroPad	2.20E-05	4.29E-06
Comparação entre as concentrações finais (mg) 2ª permeação		
1	6.55E-04	4.36E-05
2	5.90E-05	4.14E-05
3	2.52E-04	2.68E-05
4	1.06E-04	1.37E-06
5	1.90E-05	4.22E-05
Média	2.18E-04	3.11E-05
DesvPad	2.60E-04	1.79E-05
ErroPad	8.21E-05	5.68E-06
Comparação entre as concentrações finais (mg) 3ª permeação		
1	2.32E-03	8.30E-05
2	6.19E-03	1.99E-04
3	3.01E-03	2.38E-05
4	4.14E-04	2.36E-04
5	1.28E-04	1.45E-04
Média	2.41E-03	1.37E-04
DesvPad	2.44E-03	8.58E-05
ErroPad	7.73E-04	2.71E-05

No gráfico 5.10 observa-se a equivalência entre os valores médios de concentração para peróxido de hidrogênio e para peróxido de carbamida tanto na 1ª quanto na 2ª permeação, não existindo diferença entre os grupos ($p=0,551$).

Gráfico 5.10 – Comparação entre as concentrações finais (mg) das substâncias (Peróxido de Hidrogênio (HP) e Peróxido de Carbamida (CP))

5.4 Análise Espectrofotométrica

Tabela 5.12 - Concentrações em mg de peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida durante análise espectrofotométrica, realizada durante 3600 segundos.

Concentração (mg) após 1ª Permeação				
Peróxido de hidrogênio			Peróxido de carbamida	
Espécime	Leitura Espectro	Concentração (i) mg	Leitura Espectro	Concentração (i) mg
1	0.1808	7.09E-05	-0.2215	0.00E+00
2	0.1865	7.40E-05	-0,2141	0.00E+00
3	0.1593	5.90E-05	-0,2203	0.00E+00
4	0.1876	7.50E-05	-0,1948	0.00E+00
5	0.2075	8.65E-05	-0,2241	0.00E+00
Média	0.18434	7.31E-05	-2.22E-01	0.00E+00
DesvPad	0.01725697	9.84E-06		0.00E+00
ErroPad	0.005461066	3.12E-06		0.00E+00
Concentração (mg) após 2ª Permeação				

1	0.1871	7,44e-05	0,0789	1,50e-05
2	0.2179	9.13E-05	0,0665	8.20E-06
3	0.1894	7.60E-05	0,0816	1.70E-05
4	0.1931	7.80E-05	0,0527	6.60E-06
5	0.2286	9.70E-05	0,0623	5.90E-06
Média	0.20322	8.56E-05		9.43E-06
DesvPad	0.018794334	1.02E-05		5.14E-06
ErroPad	0.005947574	3.23E-06		1.63E-06
Concentração (mg) após 3ª Permeação				
1	0.3848	1,83e-04	0,1217	3.8E-05
2	0.2859	1.29E-04	0,1273	4.20E-05
3	0.3901	1.90E-04	0,1284	4.20E-05
4	0.2783	1.20E-04	0,0814	1.60E-05
5	0.2916	3.00E-04	0,0895	2.10E-05
Média	0.32614	1.85E-04		3.03E-05
DesvPad	0.056197891	8.29E-05		1.37E-05
ErroPad	0.017784143	2.62E-05		4.34E-06

A tabela 5.12 relaciona os valores das concentrações em miligramas tanto do peróxido de hidrogênio quanto do peróxido de carbamida (CP) nas 3 permeações durante a análise espectrofotométrica. Em relação ao peróxido de hidrogênio (HP) houve diferença significativa entre a 1ª e a 3ª permeação ($p=0,0089$) e entre a 2ª e a 3ª permeação ($p=0,029$). Já quanto ao peróxido de carbamida, ocorreram diferenças significativas entre todas as permeações ($p<0,05$).

Gráfico 5.11 – Comparação entre as concentrações (mg) do peróxido de hidrogênio (HP) e do peróxido de carbamida (CP) durante a análise espectrofotométrica

Quando comparado o método eletroquímico (tabela 5.11) e o método espectrofotométrico (tabela 5.12), o peróxido de hidrogênio (HP) não demonstrou diferença significativa entre as análises ($p = 0,0826$) contrariando o peróxido de carbamida que mostrou diferenças entre as duas análises ($p = 0,0093$).

No gráfico 5.11 observa-se a comparação dentro da análise espectrofotométrica entre o peróxido de hidrogênio e o peróxido de carbamida a cada permeação. Na primeira permeação observa-se que não houve permeação perceptível de moléculas de peróxido de carbamida, diferente de peróxido de hidrogênio ($p < 0.05$). Em contrapartida, na 2ª e na 3ª permeação, HP foi semelhante, assim como CP ($p = 0,5750$ e $p = 0,5501$).

6 DISCUSSÃO

Estudos clássicos sobre clareamento dentário como de Kawamoto; Tsujimoto (2004) afirmam que o sucesso do clareamento se deve ao baixo peso molecular do peróxido de hidrogênio e está diretamente relacionado com a penetração do tecidos duros dentários pelos agentes clareadores. Bowles e Ugwuneri (1987) foram os primeiros a mostrar níveis significativos de peróxido de hidrogênio. Reações celulares como processos inflamatórios são comuns, embora a maioria dos estudos considerem essas reações reversíveis quando adequados agentes clareadores e técnicas são utilizados (Camargo et al., 2007).

Entre os problemas possivelmente causados pela penetração ativa do peróxido de hidrogênio estão a sensibilidade dentinária, inibição de enzimas pulpares, sensibilidade dentária e reabsorção radicular externa (Camargo et al., 2007; Almeida et al., 2012; Kwon et al., 2012b, 2012c)

O objetivo deste estudo foi validar um novo método, através de técnicas eletroquímicas que permitiria determinar o tempo necessário para essa passagem e a concentração de peróxido de hidrogênio encontrado no interior da câmara pulpar ao fim de uma sessão de terapia clareadora.

Diversos métodos estão disponíveis para avaliação do conteúdo de peróxido de hidrogênio em micro volumes, incluindo técnicas de fluorimetria, luminescência, nanotecnologia, cromatografia líquida de alta performance e a peroxidase que mimetiza o comportamento de complexos metálicos.

Diversos autores (Bowles; Ugwuneri, 1987; Pécora et al., 1991; Cooper et al., 1992, Gökay et al.2000a) já apresentaram variações da técnica apresentada por Mottola et al. em 1970. Esse método permite quantificar as moléculas de peróxido que entram na câmara pulpar, mas possui limitações. Entre as mais importantes, o fato de não poder realizar continuamente a medição a ponto de colocar com precisão o tempo que leva para que o peróxido penetre na câmara pulpar. A metodologia mais próxima desse objetivo foi descrita por Kwon et al. (2012d). Ela apresenta como deficiência a necessidade constante de pipetar a solução pulpar para a qual o peróxido permeia, o que altera de maneira significativa a concentração

de peróxido detectada, seja por degradação do peróxido na solução seja por diminuição da concentração a cada vez que ela é pipetada.

O estudo descrito nesta dissertação busca desenvolver uma metodologia que permitisse não só aferir rapidamente a quantidade de peróxido que chega à câmara pulpar (sabendo-se que o peróxido de hidrogênio é extremamente reativo e se degrada com facilidade, mesmo após a permeação) mas também determinar em tempo real o início da chegada de moléculas de peróxido dentro da câmara pulpar.

Foi demonstrado que tanto o grupo submetido ao clareamento com gel contendo peróxido de carbamida, quanto o do peróxido de hidrogênio sinalizam penetração do peróxido dentro da cavidade pulpar. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores (Hanks et al., 1993; Gökay et al., 2000b; Kwon et al., 2012a, 2012b, 2012c, 2012d) que verificaram que quantidades significantes de peróxido conseguem se difundir através das estruturas dentárias após aplicação do gel clareador, fator comprovado através do nosso estudo espectrofotométrico, utilizando metodologia descrita anteriormente por diversos autores (Rotstein et al., 1991; Souza, 1997; Camps et al., 2007).

6.1 Sobre as amostras

Alguns estudos que analisaram a permeação em dentes, criaram espessuras aleatórias como discos de 0,5 mm de espessura de dentina (Hanks et al., 1993). Diversos trabalhos que analisam permeação com dentes bovinos preparam os dentes para que alcançassem uma espessura compatível com dentes humanos anteriores (Harris; Hicks, 1998; Sulieman et al., 2005; Soares et al., 2011). Neste estudo foram criadas amostras com 3,5mm (1,3mm de esmalte e 2,2mm de dentina aproximadamente) com dentes bovinos que são comparáveis com os descritos para os dentes humanos (0,9 a 1,05 mm de esmalte e 2,33 dentina) (Harris; Hicks, 1998, Sulieman et al., 2005).

Ao analisar a difusão de peróxidos, tem-se que observar que o diâmetro dos túbulos dentinários humanos é menor que o dos bovinos (Hannig et al., 2011). Na

escolha dos dentes, aqueles que possuísssem sinais de desgaste mecânico por mastigação ou parafunção foram excluídos uma vez que podem induzir a formação de dentina terciária ou reacionária, que apresenta túbulos desorganizados e obliterados. Essas mudanças podem afetar a permeabilidade e afetar suas propriedades físicas e químicas (Prati, 1994; Rodrigues et al., 2009) diminuindo ainda mais a penetração do peróxido de hidrogênio, que já é menor para dentes bovinos do que para dentes humanos (Camargo et al., 2007)

Assim, a alta penetração nos dentes humanos pode ser explicada pela espessura mais fina da camada de dentina. Fator controlado nesse estudo através da padronização prévia das amostras, para a espessura de dentina e mínima intervenção sobre a superfície de esmalte, como exemplificado pelo trabalho de Outhwaite et al. (1976).

Além disso, outra vantagem do uso de dentes bovinos, a variabilidade da permeabilidade em dentina bovina é a metade da de dentina de origem humana (Schmalz et al., 2001). A razão é a janela estreita para a extração dos dentes bovinos comparada com a grande variação quando se trata da idade de pacientes humanos. Benetti et al. (2004) demonstraram que a difusão através de dentina jovem é duas vezes mais rápida que em dentina velha. A difusão em dentina mais velha pode ser reduzida por túbulos dentinários mais estreitos e pelos depósitos intratubulares que aumentam a possibilidade de interação entre as moléculas difundidas e o conteúdo dos túbulos. Pashley (1985) descreve a variação da condutância hidráulica da dentina humana com um índice maior que 300%.

Portanto, quando se busca uma padronização, um coeficiente menor é desejável. Além disso, a dificuldade atual em captar dentes humanos em boas condições, a burocracia dos comitês de ética, e a diminuição da disponibilidade dessas amostras em biobancos levou a escolha dos dentes bovinos nesse estudo.

Nosso estudo utilizou uma amostragem total de 45 amostras, sendo para o grupo HP (n=10) e para os grupos CP, PCP e PHP (n=5), tanto na análise espectrofotométrica quanto na análise eletroquímica. A escolha dessa distribuição está de acordo com a literatura uma vez que já foram realizados testes clássicos de permeação com n variando entre 5 e 15 (Hanks et al., 1993; Gökay et al., 2000a; Gökay et al., 2005).

A distribuição não homogênea entre os grupos não interferiu na análise dos resultados, uma vez que foi adotado o mesmo critério para todas as análises envolvendo o peróxido de hidrogênio (HP). Além disso, deve ser ressaltado que os grupos PCP e PHP não apresentaram valores de detecção de moléculas de peróxido de hidrogênio, sendo portanto os seus valores homogêneos. Deve ser também considerado que a análise dos resultados, demonstrou valores com erro padrão e discrepâncias proporcionais entre os grupos não havendo portanto necessidade de modificações desse n.

6.2 Sobre o tempo

O tempo escolhido para o teste foi baseado no tempo médio recomendado para aplicação dos clareadores presentes no mercado. Os géis clareadores utilizados nesse estudo, Whiteness HP (Peróxido de Hidrogênio 35%) e Whiteness Perfect 22 (Peróxido de carbamida 22%) tem um tempo recomendado de uso de 45 minutos e 1 hora respectivamente de acordo com a bula do Whiteness HP, 2013 e a bula do Whiteness Perfect 22, 2013 (FGM, Joinville, SC, Brasil, 2012). O estudo de Matis (2007), relaciona o tempo como fator determinante para o sucesso do clareamento em detrimento da concentração. Por isso o tempo foi padronizado para produtos diferentes. Além disso, o software Gpes, que realiza a transcrição gráfica da leitura realizada pelo microeletrodo no método eletroquímico tem uma limitação de tempo máxima por análise de 4000 segundos para o teste de cronoamperograma.

6.3 Sobre a metodologia

Eletrodos para detecção de peróxidos já foram utilizada em outros campos, como detecção de peróxido de hidrogênio em alimentos e em tecidos vivos (Mattos et al., 2003). Esse estudo foi pioneiro ao utilizar uma metodologia para monitoramento da permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio não descrita anteriormente na literatura odontológica. O uso da metodologia eletroquímica permitiu uma análise detalhada dos processos de permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar.

Na técnica, o microeletrodo posicionado na câmara pulpar, sobre a superfície de dentina em meio de KCl (que não descreve qualquer corrente elétrica), realiza leituras contínuas durante o período de tempo determinado. Uma vez que a concentração de moléculas de peróxido de hidrogênio atinge um mínimo detectável, o microeletrodo é sensibilizado e começa a medir o sinal da corrente elétrica. Esse sinal é proporcional à quantidade de moléculas de peróxido que começa a permear o dente através daquele ponto. As leituras realizadas durante os 3600 segundos de cada análise de permeação são transcritos em um gráfico, o cronoamperograma, que descreve o sinal de corrente elétrica em amperes em função do tempo. O gráfico 5.1 mostra a sobreposição dos 3 cronoamperogramas de permeação da amostra 1 de peróxido de hidrogênio (HP).

O gráfico mostra o início da permeação das moléculas de peróxido de hidrogênio e o aumento da sua concentração com o passar do tempo. A análise desses gráficos com o programa Origin Pro 8 permite detectar o ponto em que ocorre alteração em relação ao valor do branco e determinar o momento em que se iniciou a passagem das moléculas. Os valores de tempo dessa permeação foram transcritos na tabela 5.1.

Essa detecção foi realizada através da alteração da linearidade gráfica da leitura do eletrodo. A alteração na leitura de corrente elétrica na permeação indicava o início da chegada das moléculas à câmara pulpar. O tempo médio de detecção da permeação de moléculas nas amostras expostas ao HP foi de 1688 s

(aproximadamente 28 minutos) na 1ª permeação; 857s na 2ª permeação (14 minutos) e 457s na 3ª permeação (aproximadamente 7 minutos) (tabela 5.1)

Então se observa para o grupo HP uma média entre as três permeações correspondente a aproximadamente 16 minutos. Esses valores estão de acordo com o estudo de Benetti et al. (2004); que mensuraram o tempo de permeação de peróxido de hidrogênio com média de início de detecção em 15 minutos.

Ainda sobre os dados da tabela 5.1, o tempo médio necessário para o início da detecção das moléculas de peróxido de hidrogênio diminui a cada exposição do dente ao peróxido de hidrogênio. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Schiavoni et al. (2006), que demonstraram um aumento de permeabilidade do esmalte após exposição dele ao peróxido de hidrogênio. De acordo com Dezotti et al. (2002) e Palo et al. (2012) os produtos clareadores aumentam a permeabilidade das estruturas dentárias.

Uma justificativa plausível para o maior tempo necessário para iniciar as permeações através das estruturas duras dentárias é a presença de estruturas orgânicas na região mais superficial do esmalte, como proteínas salivares e outros inibidores que são grandes demais para penetrar nas camadas mais profundas (Ying et al., 2004). Uma vez que o clareador cliva essas moléculas e vence o obstáculo por ela representado, as permeações subsequentes tendem a acontecer mais rapidamente e a permeabilidade deve aumentar (Rotstein et al., 1991) .

Como descrito no manual de instruções do clareador à base de peróxido de hidrogênio utilizado nesse estudo (Whiteness HP 35%, FGM, Joinville, SC, Brasil), o tempo de exposição ao gel clareador por sessão clareadora é de 15 minutos para cada aplicação do gel, podendo chegar até 45 minutos com trocas do gel. Essa indicação de 15 minutos para cada aplicação está de acordo com os resultados encontrados nesse estudo, uma vez que se encontrou uma média de 16 minutos para chegada das moléculas de peróxido de hidrogênio a cada aplicação neste estudo.

Dessa forma, é possível inferir que o fabricante, senão determina o tempo de aplicação do gel de maneira empírica, conhece o estudo de Benetti et al. (2004) sobre o tempo médio de chegada das moléculas à câmara pulpar e utiliza esse

tempo como referência para o tempo de cada aplicação do gel clareador sobre a superfície dentária. Utilizando o tempo de referência de 15 minutos, supõe-se que o procedimento seja seguro uma vez que não permitiria a chegada de moléculas à câmara pulpar, mesmo que estudos como o de Young et al. (2012) indiquem que o tempo de permeação pelo esmalte e dentina varie entre 10 e 30 minutos em temperatura ambiente. Entretanto, ao indicar as demais aplicações do gel, o fabricante desconsidera o efeito cumulativo do peróxido de hidrogênio na estrutura dentária.

Este efeito cumulativo deve-se à permanência de moléculas ativas de peróxido de hidrogênio e seus subprodutos ($\bullet\text{OH}$, oxigênio e outros radicais livres) dentro da estrutura dentária por períodos de 10 a 14 dias após a terapia clareadora (Lima et al., 2010; Silveira et al., 2012) fato que não é considerado pelo fabricante na medida em que indica novas aplicações do gel com a mesma duração (15 minutos) desconsiderando que parte das moléculas e subprodutos do peróxido foram incorporados à superfície do esmalte e permaneceram na estrutura dental levando a um efeito cumulativo (Eimar et al., 2012).

Além disso, o aumento de permeabilidade das estruturas dentárias pela aplicação de peróxido de hidrogênio (Schiavoni et al., 2006) diminui o tempo médio necessário para a chegada dessas moléculas a cada permeação (gráfico 5.3) o que também deveria ser considerado pelos fabricantes de clareadores dentais, se tais dados obtidos forem confirmados em dentes humanos, com pressão intrapulpar simulada, expostos à saliva entre uma aplicação e outra.

Deve se considerar que nesse estudo os dentes não foram armazenados em saliva mas em água destilada, entre uma aplicação e outra do gel clareador. Assim como trabalhos *in vitro* anteriores (Cooper et al., 1992; Gökay et al., 2005; Schiavoni et al., 2006) a opção por não armazenar os dentes em saliva foi motivada para que os fatores remineralizantes da saliva não interferissem no monitoramento das permeações e configurassem assim mais uma variável que poderia interferir no estudo da permeação do peróxido de hidrogênio, alvo dessa investigação.

Ainda quanto o tempo de permeação, as tabelas 5.2, 5.3 e 5.4 demonstram que não foi possível detectar permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio

para os grupos CP, PHP e PCP, em nenhuma das permeações. Nessas análises, o valor das leituras do cronoamperograma é igual ao branco.

No grupo CP, o produto utilizado foi o peróxido de carbamida. Essa substância dissocia-se em peróxido em ureia, amônia, dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio (Rotstein et al., 1992). Neste experimento, na leitura através do microeletrodo para o cronoamperograma, não foi detectada permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio. Uma explicação possível, seria a baixa quantidade de peróxido de hidrogênio, uma vez que a quantidade desta substância no gel de peróxido de carbamida é cerca de 1/3 de sua concentração (Cooper et al., 1992; Gökyay et al., 2000a; 2000b).

Por isso, na busca de sensibilizar o microeletrodo utilizou-se peróxido de carbamida em uma das concentrações mais altas disponíveis no mercado odontológico, 22%, o que representa aproximadamente 7% de peróxido de hidrogênio. Mesmo com essa concentração, não houve registro de permeação para o grupo CP, possivelmente o microeletrodo não teve sensibilidade suficiente para detectar as moléculas de peróxido que permearam a estrutura dental (Castro, 2011).

Uma possibilidade para resolver esse problema, seria a construção de um microeletrodo com um raio menor (foi utilizado um de 10 μ m), porém, deve-se considerar que o microeletrodo é construído utilizando-se uma fibra de platina pré-fabricada, aquecida, cortada e posteriormente polida em um bulbo de vidro. O tipo de fibra e o RG (relação entre raio da parte isolante e raio da fibra) são fatores que podem influenciar na precisão de leitura (Castro, 2011).

Outros possíveis fatores que influenciariam a não detecção do peróxido de hidrogênio originado do gel de peróxido de carbamida seriam a viscosidade do gel e a sua penetrabilidade, menores que o do gel de peróxido de hidrogênio (Schiavoni et al., 2006).

Os grupos placebo, representados por PHP (peróxido de hidrogênio placebo) e PCP (peróxido de carbamida placebo) foram cedidos pelo fabricante, exatamente com a mesma composição dos géis comerciais (tabela 3.2) exceto pelo composto peróxido de hidrogênio que não foi acrescentado a esses produtos. Portanto, as permeações não deveriam registrar nenhum sinal de peróxido de hidrogênio nas

câmaras pulpares, o que está de acordo com os resultados aferidos, tanto para o método eletroquímico quanto para o método espectrofotométrico.

Os valores de corrente elétrica mensurados pelo microeletrodo, que representam a quantidade de moléculas que atravessaram a estrutura dental e entram na câmara pulpar no ponto onde o microeletrodo está posicionado, estão representados na tabela 5.5 e gráfico 5.4.

A corrente mensurada foi crescente o que demonstra que a permeação de peróxido de hidrogênio pelas estruturas dentárias não é constante, contrariando estudos anteriores (Hannig et al., 2011; Kwon et al., 2012d). Estes autores, em estudos *in vitro* utilizando a metodologia de análise espectrofotométrica, verificaram que a penetração de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar durante uma hora de clareamento seria constante. Essas informações da literatura contrastam com os resultados encontrados neste estudo, uma vez que os resultados demonstraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio permeada exibe um crescimento conforme as aplicações do clareador (gráfico 5.4).

As leituras de corrente elétrica realizadas nas amostras de HP mostram um crescimento da ordem de aproximadamente duas vezes da 1ª para a 2ª permeação e de quatro vezes da 1ª para a 3ª permeação, sendo desiguais as correntes consideradas ($p=0,013$). Este fato pode possivelmente ser relacionado com o aumento de permeabilidade das estruturas dentárias em cada permeação de peróxido (Camargo et al., 2007; Rodrigues et al., 2009)

Os valores de corrente elétrica foram negativos para as leituras nos grupos CP, PHP e PCP. O valor negativo se deve a leitura elétrica para esses grupos ser igual ou menor que a leitura do branco. Nos grupos PHP e PCP isso era esperado uma vez que não existe peróxido de hidrogênio na composição dos géis placebo. No grupo CP, como explicado anteriormente, apesar da presença de peróxido de hidrogênio na composição do gel de peróxido de carbamida, não houve leitura pois as correntes geradas devem estar em um limiar abaixo do valor mínimo ao qual o microeletrodo responde.

Os valores de corrente detectados para o grupo HP foram baixos, uma vez que representavam as primeiras moléculas da permeação do peróxido de hidrogênio

que sensibilizaram o microeletrodo. Para realização das comparações, optou-se por utilizar o valor de corrente em amperes (A) ao invés de convertê-los para concentração em miligramas, uma vez essa conversão não seria possível devido à curva de calibração utilizada, que não abrangeria valores tão baixos (tabelas 5.5, 5.6 e 5.7).

A concentração final de peróxido de hidrogênio foi calculada através do valor do voltamograma realizado após o período de 3600 segundos. O voltamograma (gráfico 5.2) é a leitura do potencial elétrico na solução de 500 µl de KCl após a permeação. O KCl puro, sem nenhuma permeação, apresenta um potencial, o branco. Ele é descontado do valor lido após a permeação de peróxido de hidrogênio. Portanto, todo o valor dessa diferença é atribuído como sendo peróxido de hidrogênio permeado para a câmara pulpar. Utilizando a curva de calibração e a equação descritos no material e métodos, os valores de potencial lidos nos voltamogramas foram convertidos para valores de massa em gramas.

Assim, a tabela 5.8 apresenta todos os valores de concentração da permeação de peróxido de hidrogênio anteriormente citados, correlacionando-os. No grupo HP, o peróxido de hidrogênio apresenta uma relação crescente de concentração entre as 3 permeações. O crescimento da concentração de peróxido alcança o seu valor mais alto na 3ª permeações e é discreto entre a 1ª e a 2ª permeações. Esse aumento da concentração pode ser relacionado com o aumento da permeação das estruturas dentárias causadas pelas exposições prévias ao peróxido de hidrogênio.

A média dos maiores valores de concentração encontrados na 3ª permeação foi de $1,64 \times 10^{-3}$ mg, ou seja, 1,64 µg. De acordo com Bowles e Ugwuneri (1987) a quantidade necessária para causar inibição enzimática pulpar é por volta de 50.000 µg (50mg). Isso indica que os valores máximos de concentração de peróxido de hidrogênio encontrados nesse estudo seriam incapazes de causar danos à polpa. Porém o uso de dentes in vitro, sem a pressão pulpar e a presença de fluido dentinário, que vem da polpa para a superfície externa (Suliman et al., 2005) provavelmente permitiria que as moléculas de clareadores penetrassem o dente mais rapidamente que em condições clínicas e possivelmente em quantidades maiores (Gökay et al., 2004)

Vários fatores como tempo de contato, pressão pulpar positiva, e pressão osmótica dos géis (Hanks et al., 1993) e aplicação de calor durante o procedimento clareador (Bowles; Ugwuneri, 1987) podem influenciar a penetração pulpar por peróxidos.

A permeação de peróxido de carbamida (CP) apresentou um comportamento semelhante ao apresentado na permeação de peróxido de hidrogênio (tabela 5.9 e gráfico 5.7) em que a 1ª e a 2ª permeações foram semelhantes e a 3ª com um valor maior e diferente das duas anteriores.

Thitinantapan et al. (1999) reportou que a penetração pulpar de diferentes peróxidos comerciais de mesma concentração em etiqueta é diferente. Cooper et al. (1992) mostrou que a concentração das moléculas de peróxido de hidrogênio originário de peróxido de carbamida que alcançam a polpa é significativamente menor que o originário do gel de peróxido de hidrogênio, e que a taxa de difusão não é proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio. Isso indica que a penetração do peróxido de hidrogênio é multifatorial e sujeita a diversas variáveis que podem influenciar nos resultados finais.

Apesar dos valores do grupo HP demonstrarem uma permeação superior ao grupo CP, isso não significa que a eficácia do clareamento será superior. Estudos clínicos demonstram que o uso de peróxido de carbamida de 10 a 16% é mais eficaz do que o uso de peróxido de hidrogênio a 35% nas terapias clareadoras (Maireles et al., 2012). Apesar dos resultados aqui encontrados mostrarem uma penetração mais efetiva do peróxido de hidrogênio que poderia ser causada pela concentração de peróxido efetiva ser mais elevada no grupo HP, Cooper et al. (1992) mostrou que mesmo em concentrações efetivas de peróxido iguais, peróxido de carbamida e peróxido de hidrogênio não apresentam a mesma permeação. Essa observação provavelmente é devido ao aspecto do gel, ao carbopol ou ao escoamento ou pressão osmótica dos géis, que no caso do peróxido de carbamida é maior.

Ao comparar as concentrações encontradas nas 3 permeações para HP e CP, ambos apresentam valores de permeação superiores na última exposição ao respectivo gel. Os valores de permeação de peróxido de hidrogênio para o grupo HP (peróxido de hidrogênio 35%) são muito superiores comparados ao grupo CP (peróxido de carbamida 22% $\approx$ peróxido de hidrogênio 7%). Isso corresponde ao

encontrado no estudo de Hanks et al. (1993) o qual mostra que a concentração de peróxido de hidrogênio detectado na câmara pulpar é diretamente proporcional à concentração original do clareador aplicado sobre o dente.

Além disso, Ritter et al. (2002) ao comparar a permeação do peróxido de hidrogênio e do peróxido de carbamida verificaram que 12 vezes mais peróxido de hidrogênio alcança a polpa comparado com a mesma quantidade de peróxido de carbamida, o que é compatível com os resultados encontrados.

Foram adotadas precauções com a padronização das amostras, como espessura do esmalte, espessura da dentina, área de esmalte exposta ao agente clareador e o tempo de exposição tentando tornar a concentração a única variável que influenciaria na permeação através da estrutura dentária.

Outro fator importante a ser considerado na preparação das amostras é a presença da smear layer. A smear layer ou lama dentinária, pode ser definida como o material que é produzido sempre que a dentina é cortada ou raspada. Esse material misto, composto por matriz orgânica, material mineral e outros materiais advindos do preparo aderem fortemente à superfície da dentina.

Uma vez que os dentes foram preparados através do uso de lixas, o uso do condicionamento da superfície de dentina na preparação das amostras é necessário devido à obliteração dos túbulos dentinários causada pela smear layer. Essa obliteração causa uma alteração de permeabilidade considerável. (Prati, 1994). O estudo de Pashley e Depew (1986) demonstrou que a permeabilidade da dentina na presença da smear layer é de apenas 6% da e dentina que sofreu condicionamento ácido.

Muitos estudos buscam entender os mecanismos e comportamento de penetração do peróxido de hidrogênio nas estruturas dentárias (Gökay et al., 2000a; Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Kwon et al., 2012a,b,c,d) porém apresentam diferentes protocolos, diferentes tipos de dentes; e a maneira como os estudos são conduzidos e analisados acaba por dificultar a sua comparação.

A maioria dos estudos de permeação de peróxido de hidrogênio considera a metodologia de Mottola et al.(1970). Esse estudo pioneiro guiou a maioria dos artigos relacionados anteriormente. Nele é realizada uma avaliação

espectrofotométrica que quantifica as moléculas de peróxido de hidrogênio através da mudança de cor da solução.

Por isso, optou-se nesse estudo por realizar uma contraprova ao método eletroquímico utilizado, realizando a já consagrada metodologia espectrofotométrica para efeito de comparação à nova metodologia.

De acordo com os resultados da metodologia espectrofotométrica (tabela 5.12) quando comparado ao método eletroquímico (tabela 5.09), o peróxido de hidrogênio (HP) não demonstrou diferença significativa entre as análises ($p = 0,0826$) contrariando o peróxido de carbamida que mostrou diferenças entre as duas análises ($p = 0,0093$). A explicação para isso se deve à dificuldade de detectar as permeações iniciais de peróxido de carbamida que são extremamente discretas. Os valores de leitura espectrofotométrica na 1ª permeação do peróxido de carbamida ficaram abaixo do valor do branco, e por isso na conversão resultaram em valor negativo. Como não existe um valor negativo para massa, foi atribuído a essa permeação o valor zero. Além disso, os valores detectados apresentaram discrepâncias de um método para o outro, fato não observado no peróxido de hidrogênio.

Tanto para a análise espectrofotométrica quanto para a análise eletroquímica, houve um aumento significativo da concentração de peróxido de hidrogênio entre as permeações. Isso demonstra o aumento da permeabilidade das estruturas dentárias com o uso de clareadores.

É importante ressaltar que o peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente é instável. As soluções utilizadas devem estar sempre abrigadas de luz e os clareadores comerciais sempre guardados refrigerados. Apesar do uso de estabilizantes adicionados aos produtos odontológicos comerciais, mesmo o peróxido de carbamida que é um precursor do peróxido de hidrogênio, durante o teste com a solução espectrofotométrica, mostrou grandes quantidades de peróxido de hidrogênio livre. Essa liberação constante de moléculas leva a crer que as concentrações de peróxido de hidrogênio presentes quando se inicia o uso dos produtos provavelmente não deve ser a mesma decorrido algum tempo, e essa degradação deve ser considerada de maneira que não interfira nos resultados. Por essa razão, optou-se por realizar as permeações de maneira seguida (1ª, 2ª e 3ª

permeação para cada amostra), para diminuir a variabilidade que poderia surgir da degradação do peróxido para uma mesma amostra.

Apesar da indicação do tempo de uso do clareador Whiteness HP de 15 minutos e até 2 trocas subsequentes, a metodologia apresenta uma limitação para nova injeção de clareadores dentro do sistema. Se isso fosse realizado é possível que a pressão negativa dentro da câmara induzisse artificialmente a entrada de peróxido na câmara pulpar. Porém, o estudo de Kwon et al. (2012d) mostrou que a quantidade de peróxido de hidrogênio que penetra na câmara pulpar não é significativamente alterada pelas trocas de gel durante uma sessão de terapia clareadora. Portanto, a limitação do método não influencia negativamente esse trabalho. Assim como no trabalho de Kwon et al. (2012b), o gel de peróxido não fica em contato direto com o ar e isso diminui a desidratação e o contato com a luz ou oxigênio que poderiam acelerar a degradação do gel.

Os resultados que demonstram um aumento do número de moléculas que chegam à polpa a cada aplicação do clareador servem como um alerta ao cenário atual que a terapia clareadora vive. A disponibilidade no mercado de agentes clareadores baseados em peróxido de hidrogênio em enxaguatórios bucais, fitas clareadoras e os clareadores de uso profissional, que em teoria, só poderiam ser aplicados em consultório nas suas diversas concentrações mostram que a saúde pulpar é ameaçada pela banalização do clareamento sem acompanhamento profissional e a repetição contínua de protocolos clareadores de maneira indiscriminada buscando alcançar melhores resultados clareadores (Buchalla et al, 2007).

Mesmo que existam mecanismos fisiológicos que dificultem o fluxo de solutos para a câmara pulpar, a exposição repetida e contínua de agentes clareadores pode ser prejudicial para a vitalidade dentária (Soares et al., 2011). Um possível mecanismo de como a polpa protege a si mesma do dano pelo peróxido de hidrogênio é através da quebra enzimática da molécula pela peroxidase e pela catalase. Alguns trabalhos (Bowles; Burns, 1992; Anderson et al., 1999) mostram que as células pulpares produzem hemioxigenase I, uma importante enzima defensiva contra as condições do estresse oxidativo, especialmente encontrado em odontoblastos e em células endoteliais subjacentes às áreas de esmalte clareado.

Outras reações ao processo deletério causado pelas moléculas de peróxido é o demonstrada por Lee et al. (2006), onde ocorreu um aumento da dentina reacional produzida pelos odontoblastos, isso diminuiria os danos histológicos e a sensibilidade causada pela terapia.

Ao comparar o método eletroquímico com o método espectrofotométrico, os resultados foram semelhantes para o peróxido de hidrogênio e apresentaram diferenças para o peróxido de carbamida. Isso provavelmente se deve aos valores negativos das leituras de peróxido de carbamida apresentadas pelas primeiras leituras espectrofotométricas discretas. Quando se considera o uso do método espectrofotométrico associado ao de reação entre ferro e H_2O_2 em meio saturado por tiocianato, devemos considerar que a amostra ficará submetida pelo lado pulpar à solução que sofre alteração cromática devido à ação da solução para o teste. Isso pode impedir uma repetição sem interferência para aquela amostra, mostrando mais uma vantagem do método eletroquímico onde a amostra permanece sem alterações após o teste.

Se esses valores forem extrapolados para a clínica diária, deve-se ficar atento com o tempo das terapias clareadoras, uma vez que o trabalho de Seale; Wilson, (1985) mostrou que a severidade da resposta pulpar parece associada com a duração do tempo de tratamento (mais tempo, dano mais severo). Semelhante ao reportado por Matsui et al. (2009), que alerta para os danos causados na estrutura do esmalte gerados pelo tempo prolongado com produtos clareadores, além da possibilidade de induzir à formação de dentina reacionária que poderia reverter os efeitos do clareamento.

Além disso, é necessário alertar a sociedade de que o clareamento dentário é uma terapia na qual o cirurgião dentista, aplica uma droga que deve ter um efeito sobre as estruturas dentárias (Almeida et al., 2012). Produtos para auto-aplicação atualmente no mercado com acesso irrestrito da população leiga, possuem em suas formulações peróxido de hidrogênio a 10%. Já foi demonstrado em estudos (Gökay et al., 2004, 2005) utilizando a metodologia espectrofotométrica que mesmo esses produtos permitem a liberação de moléculas de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar. O uso indiscriminado de clareadores tem levado a uma falta de predictibilidade de resultados e falta de estabilidade na cor final. Isso tem levado a

uma sobredose do uso de clareadores, resultado em efeitos indesejados, como desmineralização dentária e sensibilidade, irritação gengival e danos a materiais restauradores (Almeida et al., 2012)

Tendo em vista os resultados deste estudo e algumas considerações como: 1- a demonstração da falta de relação entre a quantidade de hidrogênio que penetra da câmara pulpar e a capacidade de mudança de cores da estrutura dentária (Kwon et al. 2012d); 2- a dependência da concentração original de peróxido para a penetração de moléculas na câmara pulpar (Cooper et al., 1992); 3- a correlação entre eficácia e longevidade do clareamento pela comprovação de este não ser afetado pelo aumento da concentração dos agentes clareadores (Meireles et al., 2010; Almeida et al., 2012) e 4- a recomendação da ADA (American Dental Association. 2006) para utilização de clareadores com peróxido de carbamida a 10% como único meio seguro, torna-se prudente recomendar aos fabricantes que utilizem concentrações de peróxido de hidrogênio mais baixas, períodos mais curtos de aplicação de gel e que ,o cirurgião dentista procure utilizar protocolos de clareamento baseados em evidências científicas.

7 CONCLUSÕES

Dadas as limitações desse estudo, podemos concluir que:

- 1) Nos testes com peróxido de hidrogênio 35%, a metodologia eletroquímica foi tão eficaz quanto a metodologia consolidada na literatura para a detecção da presença de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar.
- 2) A mensuração realizada pelo cronoamperograma permite identificar o momento em que as moléculas de peróxido de hidrogênio alcançam uma concentração capaz de sensibilizar o microeletrodo. Porém, não foi eficaz para detectar o momento de início de permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio originadas do peróxido de carbamida.
- 3) Nos testes com peróxido de hidrogênio 35%, o tempo necessário para que o peróxido de hidrogênio chegasse à câmara pulpar diminuiu a cada aplicação de peróxido de hidrogênio para a mesma amostra.
- 4) A penetração do peróxido de hidrogênio aumentou a permeabilidade dos tecidos dentários e consequentemente aumentou a permeação de moléculas de peróxido de hidrogênio originado do peróxido de hidrogênio e do peróxido de carbamida

REFERÊNCIAS¹

Adibfar A, Steele A, Torneck CD, Titley KC, Ruse D. Leaching of hydrogen peroxide from bleached bovine enamel. *J Endod*. 1992 Oct;18(10):488-91.

Agostinho SML, Villamil RFV. O Eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Quim Nova*, 2004 27(5):813-17.

Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML, Briso AL. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012 Jun;32(3):303-9.

American Dental Association. Dentist-dispensed home-use tooth bleaching products 2006. [citada em 20 fev 2013]. Disponível on line em: http://www.ada.org/sections/scienceAndResearch/pdfs/guide_home_bleach.pdf

Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999 Apr;25(4):247-50.

Arruda AM, dos Santos PH, Sundfeld RH, Berger SB, Briso ALF. Effect of Hydrogen Peroxide at 35% on the Morphology of Enamel and Interference in the De-mineralization Process: An In Situ Study. *Oper Dent*. 2012; 37(5):518-25.

Batista GR, Arantes PT, Attin T, Wiegand A, Torres CR. Effect of chemicalactivation of 10% carbamide peroxide gel in tooth bleaching. *Eur J Esthet Dent*. 2013 Spring;8(1):104-17.

Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004 Feb;37(2):120-4.

Bowles WH, Thompson LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod* 1986;12:108-12.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp Chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. J Endod. 1987;13(8):375-77

Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. J Endod. 1992 Nov;18(11):527-34.

Brotherton BJ, King B. Encyclopedia of inorganic chemistry. 2nd Edition, John Wiley & Sons; 1994. 1120p

Bula do Whiteness HP, 2013: [Citada em 01/01/2013] Disponível on line em: <http://www.fgm.ind.br/site/produtos.php?prd=5&lng=pt> American Dental Association.

Bula do Whiteness Perfect, 2013 : [Citado em 01/01/2013] Disponível on line em <http://www.fgm.ind.br/site/produtos.php?prd=2&lng=pt>

Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser-- a systematic review. Dent Mater. 2007 May;23(5):586-96.

Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. J Endod. 2007;33:1074-77

Camps J, de Franceschi H, Idir F, Roland C, About I. Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. J Endod. 2007 Apr;33(4):455-9.

Camps J, Pommel L, Aubut V, About I. Influence of acid etching on hydrogen peroxide diffusion through human dentin. Am J Dent. 2010 Jun;23(3):168-70.

Castro PS. Fabricação de microelétrodos para aplicações em microscopia eletroquímica de varredura. [Dissertação] São Paulo : Universidade de São Paulo, Instituto de Química 2011

Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. J Endod. 1992 Jul;18(7):315-7.

Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching—a critical review of the biological aspects. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14:292–304.

Dezotti MS, Souza MH Jr, Nishiyama CK. Evaluation of pH variation and cervical dentin permeability in teeth submitted to bleaching treatment. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Jul-Sep;16(3):263-8.

Dietschi D, Rossier S, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. *Quintessence Int.* 2006 Jul-Aug; 37(7): 515-26

Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure *J Dent.* 2012 Dec;40 Suppl 2: 25-33

Fasanaro TS. Bleaching teeth: History, chemicals, and methods used for common tooth discolorations. *J Esthet Dent.* 1992 May-Jun;4(3):71-8.

Feinman RA, Madray G, Yarborough D. Chemical, optical, and physiologic mechanisms of bleaching products: A review. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1991 Mar;3(2):32-6.

Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GA, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004 Nov;49(11):919-22.

Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000a Feb;26(2):92-4.

Gökay O, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000b May;27(5):428-31.

Gökay O, Müjdecı A, Algn E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004 Dec;30(12):887-9.

Gökay O, Müjdecı A, Algn E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):516-20.

Goodkind RJ, Schwabacher WB. Use of a fiber-optic colorimeter for in vivo color measurements of 2830 anterior teeth. *J Prosthet Dent.* 1987 Nov;58(5):535-42.

Goldstein RE, Garber DA. Complete Dental Bleaching. Quintessence Publishing Co, Chicago; 1995.

Hanks CT, Diehl ML, Craig RG, Makinen PK, Pashley DH. Characterization of the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol. J Oral Pathol Med. 1989 Feb;18(2):97-107.

Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. J Dent Res. 1993 May;72(5):931-8.

Hannig C, Weinhold HC, Becker K, Attin T. Diffusion of peroxides through dentine in vitro with and without prior use of a desensitizing varnish. Clin Oral Investig. 2011 Dec;15(6):863-8.

Harris EF, Hicks JD. A radiographic assessment of enamel thickness in human maxillary incisors. Arch Oral Biol. 1998 Oct;43(10):825-31.

Harris DC. Quantitative Chemical Analysis., 8th Edition. W. H Freeman and Company; 2010. 361p.

Hattab FN, Qudeimat MA, al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent. 1999;11(6):291-310.

Haywood VB. History, safety and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. Quintessence Int. 1992; 23(7): 471-88

Haywood VB. Current status of nightguard vital bleaching. Compend Contin Educ Dent Suppl. 2000;(28):S10-7; quiz S48.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int. 1989 Mar;20(3):173-6.

Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. J Dent. 1999 Sep;27(7):509-15.

Horn DJ, Hicks ML, Bulan-Brady J. Effect of smear layer removal on bleaching of human teeth in vitro. *J Endod*. 1998 Dec;24(12):791-5.

Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. *J Dent Res*. 2007 Nov;86(11):1040-5.

Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent*. 2007 Dec;35(12):889-96. Epub 2007 Oct 26.

Katchburian E, Arana-Chavez, VE. *Histologia e Embriologia Oral: correlações clínicas*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

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

Kwon SR, Wertz PW, Li Y, Chan DC. Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin: confocal laser microscopy observation. *Int J Cosmet Sci*. 2012a Feb;34(1):97-101.

Kwon SR, Li Y, Oyoyo U, Aprecio RM. Dynamic model of hydrogen peroxide diffusion kinetics into the pulp cavity. *J Contemp Dent Pract*. 2012b Jul 1;13(4):440-5

Kwon S, Wertz P, Dawson D, Cobb D, Denehy G. The Relationship of Hydrogen Peroxide Exposure Protocol to Bleaching Efficacy. *Oper Dent*. 2012c Jul 7. [Epub ahead of print]

Kwon SR, Oyoyo U, Li Y. Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: An in vitro study. *J Dent*. 2012d Dec 20. [Epub ahead of print]

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2006 Jan;22(1):39-46.

Lima AF, Fonseca FM, Cavalcanti AN, Aguiar FH, Marchi GM. Effect of the diffusion of bleaching agents through enamel on dentin bonding at different depths. *Am J Dent*. 2010 Apr;23(2):113-5.

Lopes MB, Sinhoreti MA, Gonini Júnior A, Consani S, McCabe JF. Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Braz Dent J*. 2009;20(4):279-83.

Lowinsohn D, Bertotti M. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments. *Quim Nova*. 2006; 29(6):1318-25.

Matis BA, Cochran MA, Franco M, Al-Ammar W, Eckert GJ, Stropes M. Eight in-office tooth whitening systems evaluated in vivo: a pilot study. *Oper Dent*. 2007 Jul Aug;32(4):322-7.

Mattos IL, Shiraishi, KA, Braz, AD, Fernandes, JR. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Quím Nova*. 2003; 26(3):373-80

Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):67-72.

Maung NL, Wohland T, Hsu CY Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser (Part 1)--FRAP. *J Dent*. 2007a Oct;35(10):787-93.

Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er: YAG laser (Part 2). Organic Matrix. *J Dent*. 2007b Oct; 35(10): 794-9.

Meireles SS, Santos IS, Della Bona Á, Demarco FF. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. *J Dent*. 2010 Dec;38(12):956-63

Meireles SS, Fontes ST, Coimbra LA, Della Bona Á, Demarco FF. Effectiveness of different carbamide peroxide concentrations used for tooth bleaching: an in vitro study. *J Appl Oral Sci*. 2012 Mar-Apr;20(2):186-91.

Mello I, Robazza CR, Antoniazzi JH, Coil J. Influence of different volumes of EDTA for final rinse on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Nov;106(5):e40-3.

Merck Index. 14th edition. Merck & Co Inc. Whitehouse Station, NJ, USA; 2006.

Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. Quintessence Int. 2008 Sep;39(8):645-59.

Mondelli RF, Azevedo JF, Francisconi AC, Almeida CM, Ishikiriama SK. Comparative clinical study of the effectiveness of different dental bleaching methods - two year follow-up. J Appl Oral Sci. 2012 Jul-Aug;20(4):435-43.

Mor C, Steinberg D, Dogan H, Rotstein I. Bacterial adherence to bleached surfaces of composite resin in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Nov;86(5):582-6.

Mottola HA, Simpson BE, Gorin G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leucocrystal violet and peroxidase as catalyst. Anal Chem 1970; 42:410-1

Nathoo SA. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. J Am Dent Assoc. 1997 Apr;128 Suppl:6S-10S.

Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. J Dent Res. 1974 Nov-Dec;53(6):1503.

Outhwaite WC, Livingston MJ, Pashley DH. Effects of changes in surface area, thickness, temperature and post-extraction time on human dentine permeability. Arch Oral Biol. 1976;21(10):599-603.

Palo RM, Palo I, Bonetti-Filho MC, Valera CHR, Camargo SEA, Camargo C Moura-Netto C, Pameijer, Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide. Oper Dent. 2012; 37(6), 660-4

Pashley DH. The smear layer: physiological considerations. Oper Dent 1984; Suppl 3: 13-29.

Pashley DH. Dentin –predentin complex and its permeability. J Dent Res. 1985 Apr;64 Spec No:613-20.

Pashley DH, Depew DD. Effects of the Smear Layer, Copalite, and Oxalate on Microleakage. Oper Dent. 1986; 11: 95-102.

Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J*, 1988 Mar;21(2):143-54.

Pécora JD, Souza Neto MD, Costa WF. Apresentação de um método químico que revela "in vitro" a passagem de peróxido de hidrogênio a 30 por cento através da dentina radicular. *Rev Paul Odontol*, 1991, 2: 34-5.

Pedrotti JJ, Angnes L, Gutz IGR. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. *Electroanalysis* 1996, 8, No. 1: 673-675

Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F. Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. *J Endod* 2008 Apr;34(4):394-407.

Pons S, Fleischmann M. The behavior of microelectrodes. *Analyt Chem*, 1987; 59(24):1391-9.

Prati C. What is the clinical relevance of in vitro dentine permeability tests? *J Dent*. 1994 Apr;22(2):83-8.

Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SR. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent*. 2004 Summer;6(2):117-21.

Ritter AV, Leonard RH Jr, St Georges AJ, Caplan DJ, Haywood VB. Safety and stability of nightguard vital bleaching: 9 to 12 years post-treatment. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(5):275-85.

Rodrigues LM, Vansan LP, Pécora JD, Marchesan MA. Permeability of different groups of maxillary teeth after 38% hydrogen peroxide internal bleaching. *Braz Dent J*. 2009;20(4):303-6.

Rotstein I, Torek Y, Lewinstein I. Effect of bleaching time and temperature on the radicular penetration of hydrogen peroxide. *Endod Dent Traumatol*. 1991 Oct;7(5):196-8.

Rotstein I, Lehr Z, Gedalia I. Effect of bleaching agents on inorganic components of human dentin and cementum. *J Endod*. 1992 Jun;18(6):290-3.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod.* 1996 Jan;22(1):23-5.

Saleh FK Variations in human and bovine surface enamel acid etching patterns and resin penetration: a scanning electronic microscopy in vitro study. *Leban Sci J*,2005, 6(2):13-26

Schiavoni RJ, Turssi CP, Rodrigues AL Jr, Serra MC, Pécora JD, Fröner IC. Effect of bleaching agents on enamel permeability. *Am J Dent.* 2006 Oct;19(5):313-6.

Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod.* 2001 Jan;27(1):23-30.

Seale NS, Wilson CF. Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent.* 1985 Sep;7(3):209-14.

Silveira JM, Longelin S, Mata AD, Carvalho ML Identification of oxygen in dental enamel following tooth bleaching using confocal micro Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc.* 2012; 43(8):1089–93

Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J.* 2011 Feb;44(2):116-25.

Souza AS. Avaliação in vitro da difusão do peróxido de hidrogênio e do hidróxido de cálcio, quando da realização da clareamento intra-coronário. [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo , Faculdade de Odontologia; 1997.

Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J.* 2005 Jul 9;199(1):37-40 .

Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000 Oct;44(4):831-50.

Thitinanthapan W, Satamanont P, Vongsavan N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent.* 1999;11(5):259-64

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J*. 2006 Apr 8;200(7):371-6.

Wetter NU, Branco EP, Deana AM, Pelino JE. Color differences of canines and incisors in a comparative long-term clinical trial of three bleaching systems. *Lasers Med Sci*. 2009 Nov;24(6):941-7

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth indental research: a review of literature. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):273-82.

Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix onporosity changes in human enamel. *J Dent*. 2004 Jan;32(1):41-6.

Young N, Fairley P, Mohan V, Jumeaux C. A study of hydrogen peroxide chemistry and photochemistry in tea stain solution with relevance to clinical tooth whitening. *J Dent*. 2012 Dec;40 Suppl 2:e11-6.