

INFLUÊNCIA DO GLUCONATO DE CÁLCIO SOBRE A CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA DE UM AGENTE CLAREADOR COM 20% DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

INFLUENCE OF CALCIUM GLUCONATE ON THE TRANS-ENAMEL AND TRANS-DENTINAL CYTOTOXICITY OF A BLEACHING AGENT WITH 20% HYDROGEN PEROXIDE

Carla Caroline de Oliveira DUQUE¹; Diana Gabriela SOARES²; Uxua Ortecho ZUTA³; Maria Luísa de Alencar e Silva LEITE⁴; Ester Alves Ferreira BORDINI¹; Josimeri HEBLING⁵; Carlos Alberto de Souza COSTA⁶

1 - Doutoranda do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

2 - Pesquisador do Departamento de Fisiologia e Patologia, Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB), Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

3 - Mestranda do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

4 - Mestre em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

5 - Professor Titular do Departamento de Ortodontia e Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

6 - Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil

RESUMO

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade de um agente clareador contendo 2% de gluconato de cálcio (GC) sobre células pulpares humanas (HDPs). **Materiais e Métodos:** Discos de esmalte-dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) foram posicionados em compartimentos de forma que a dentina permaneceu imersa em meio de cultura, enquanto que o esmalte foi submetido ao clareamento com géis a 20% de H₂O₂ contendo ou não GC, durante 1x 45, 1x15 ou 1x5 minutos. No controle positivo foi realizado clareamento com 35% de H₂O₂ aplicado por 1x 45 minutos, sendo que no controle negativo nenhum tratamento foi realizado sobre o esmalte. A viabilidade celular (teste do MTT) e a difusão trans-amelodentinária de H₂O₂ (violeta leuco-cristal/peroxidase) foram avaliadas (ANOVA/Tukey $\alpha = 5\%$; n = 8). **Resultados:** Foi observada redução significativa na viabilidade celular em todos os grupos clareados quando comparados

ao controle negativo ($p < 0,05$); no entanto, os grupos expostos aos géis contendo 20% de H₂O₂, com ou sem GC, apresentaram valores de viabilidade celular significativamente superiores ao controle positivo ($p < 0,05$). A redução da viabilidade celular e a difusão de H₂O₂ residual para os grupos clareados com 20% de H₂O₂ foi proporcional ao tempo de contato dos produtos com a superfície dental, sendo que a presença de GC resultou em minimização significativo do efeito tóxico/difusão de H₂O₂ para os protocolos 1x 15 e 1x 5 min ($p < 0,05$). **Conclusão:** A presença de 2% de GC nos géis com 20% de H₂O₂ resulta em redução da difusão de H₂O₂ residual pela estrutura dental e do efeito citotóxico sobre células pulpares humanas, quando o produto é aplicado por curtos períodos sobre a superfície dental.

PALAVRAS-CHAVE: Clareamento dental; Polpa dentária; Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade dental tem sido considerada como problemática central das terapias clareadoras, sobretudo do clareamento de consultório^{1,2}. Sabe-se que o H₂O₂ livre não reagido proveniente dos agentes clareadores é capaz de se difundir pelas estruturas dentais mineralizadas até atingir o tecido pulpar, causando dano oxidativo e reação inflamatória, com consequente ativação de nociceptores³⁻⁷. Por essa razão, terapias clareadoras alternativas têm sido pesquisadas e desenvolvidas para minimizar os efeitos nocivos mediados pelos agentes clareadores de consultório tradicionais sobre o complexo dentino-pulpar^{8,9}.

Dentre essas estratégias, pesquisadores têm proposto o emprego de agentes dessensibilizantes e remineralizantes previamente, durante ou após as terapias clareadoras, como fluoretos, nitrato de potássio e fosfato/gluconato de cálcio¹⁰⁻¹⁴. Já foi demonstrado que géis clareadores contendo cálcio e flúor na sua composição resultam na formação de depósitos minerais na superfície dental após clareamento, o que foi associado a menores alterações na estrutura de esmalte¹⁵⁻¹⁷. Acredita-se que a deposição desta camada mineral durante o clareamento minimize a difusão de H₂O₂ residual para a câmara pulpar^{12,13}. Um interessante estudo clínico randomizado demonstrou que géis

com 20 ou 35% de H₂O₂ contendo de 2% de gluconato de cálcio (GC), aplicados por 45 minutos na estrutura dental hígida, resultaram em ausência de relatos de sensibilidade dental em 83,3% e 73,3% dos pacientes, sendo que apenas 6,7% e 10,0% dos participantes apresentaram sensibilidade moderada a intensa, respectivamente¹³. Na ausência de GC, os pacientes submetidos a uma aplicação de 45 minutos de um gel com 35% de H₂O₂ relataram sensibilidade dental em 100% dos casos, sendo 86,7% considerada de moderada a intensa¹¹. Em estudo histopatológico realizado em incisivos inferiores humanos, foi demonstrado que o clareamento por 45 minutos com um gel contendo 35% de H₂O₂ associado a 2% de GC resultou em alterações pulpares menos intensas quando comparados ao gel com 35% H₂O₂ sem GC em sua composição. No entanto, apesar dos efeitos adversos serem menos intensos, áreas de necrose tecidual ainda foram observadas nos grupos expostos ao agente clareador com GC⁶.

Outros pesquisadores demonstraram que a citotoxicidade de agentes clareadores é proporcional à concentração de H₂O₂ no produto e ao tempo de contato com a estrutura dental^{5,7}. Assim, surge a hipótese de que o emprego de géis com baixa dosagem de H₂O₂ contendo GC e aplicados por curtos períodos de tempo na estrutura dental pode ser uma alternativa interessante para o clareamento de dentes com pequena espessura de esmalte e dentina, tal como incisivos, os quais são mais susceptíveis aos efeitos adversos do clareamento dental sobre o complexo dento-pulpar^{7,12}. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária sobre células pulpares humanas de um gel com 20% de H₂O₂ e 2% de GC, de acordo com o protocolo de aplicação sobre a estrutura dental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das amostras

Discos de esmalte/dentina foram obtidos a partir da superfície vestibular de incisivos bovinos (24-30 meses), por meio de uma broca trefina diamantada (Dinser brocas diamantadas Ltda., São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika; Schultz, Joinville, SC, Brasil), de maneira que os discos apresentaram 5,6 mm de diâmetro. A padronização da espessura dos discos foi realizada a partir do desgaste da superfície de dentina com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF; Norton, Saint Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) até a obtenção da espessura de 3,5 mm, com o objetivo de simular incisivos superiores⁵.

Cultura Celular

Células pulpares humanas foram isoladas a partir de 3^o molares de pacientes jovens (18-20 anos) indicados para exodontia, de acordo com aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da faculdade de odontologia de Arararquara, SP, Brasil (CAAE: 6422516.3.0000.5416). O tecido pulpar coletado foi incubado em uma solução de colagenase tipo I (3 mg/mL; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 2 horas para obtenção da cultura primária de células pulpares humanas (HDPCs). Em seguida, as células liberadas foram mantidas em DMEM completo (Dulbecco's modified eagle medium; suplementado com 10% de soro fetal bovino-SFB, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomina, 2 mmol/L glutamina; Gibco,

Grand Island, EUA) por 3 horas, sendo as células aderentes expandidas até obtenção do número necessário para realização do experimento. Células na passagem 5-6 foram semeadas em placas de 96 compartimentos (10.000 células/ compartimento) seguindo de incubação a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas, para obtenção de um padrão de 80% de confluência.

Procedimento Experimental

Os discos foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) por meio de dois anéis de silicone, sendo realizado vedamento entre a margem de esmalte dos discos e da CPA com cera # 75. Os conjuntos discos/CPAs foram esterilizados por meio de óxido de etileno, sendo então posicionados em placas de 24 compartimentos (Corning Inc, New York, USA) contendo 1 mL de DMEM sem SFB. A superfície de dentina permaneceu em íntimo contato com o meio de cultura, e a superfície de esmalte foi exposta para realização do procedimento clareador. Um gel clareador com 35% de H₂O₂ (pH 5,0; Whiteness HP 35; FGM, Joinville, FC, Brasil) aplicado por 45 minutos sobre os discos foi empregado como grupo controle positivo, desde que diversos estudos demonstraram o intenso potencial citotóxico deste protocolo sobre HDPCs, seguindo a mesma metodologia empregada no presente estudo^{5,7}. O gel com 20% de H₂O₂ (pH 5,0) foi obtido a partir da diluição do gel empregado no controle positivo em água deionizada, imediatamente antes do procedimento clareador, sendo um gel comercial (pH 9,0; Whiteness HP Blue 20; FGM) contendo 20% de H₂O₂ na fase líquida e um espessante contendo 2% de gluconato de cálcio (GC) selecionado para comparação. Para estes produtos, diferentes períodos de aplicação foram avaliados. Os grupos experimentais estão demonstrados na Tabela 1. Imediatamente após o clareamento, o meio de cultura em contato com a dentina, agora denominado de extrato, foi coletado e aplicado (100 µL) por 1 hora sobre as HDPCs previamente cultivadas.

Tabela 1 - Grupos experimentais

Tratamento	Protocolo de aplicação
-	Sem tratamento (controle negativo)
35% H ₂ O ₂	3 x 15 minutos
20% H ₂ O ₂	1 x 45 minutos
20% H ₂ O ₂	1 x 15 minutos
20% H ₂ O ₂	1 x 5 minutos
20% H ₂ O ₂ + GC	1 x 45 minutos
20% H ₂ O ₂ + GC	1 x 15 minutos
20% H ₂ O ₂ + GC	1 x 5 minutos

Viabilidade celular

Imediatamente após o período de exposição aos extratos, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 4 horas com DMEM suplementado com solução a 5 mg/mL do sal de MTT (metiltetrazolium; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato (PBS) na proporção 10:1. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol acidificado (Sigma-Aldrich), sendo a absorbância da solução resultante mensurada a 570 nm (Synergy H1, Biotek, Winooski, VT, EUA). O valor médio de absorbância do grupo controle negativo (CN) foi considerado como 100% de viabilidade celular.

Quantificação do H₂O₂ nos extratos

Para quantificar a difusão de H₂O₂ através dos discos de esmalte/dentina, imediatamente após o clareamento, uma alíquota do extrato (100 µL) foi transferida para placas de 24 compartimentos contendo 900 µL de uma solução tampão acetato (2 mol/M, pH 4.5), com o objetivo de estabilizar o H₂O₂. Um volume de 500 µL desta solução foi transferida para tubos contendo 100 µL de leucocristal violeta (0,5 mg/ml ; Sigma-Aldrich), 50 µL de uma solução da enzima hoserhardish peroxidase (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) e 2,750 mL de água destilada. A absorvância da solução foi mesurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 596 nm (Synergy H1, Biotek). Os valores de densidade óptica foram convertidos em µg de H₂O₂ por mL de extrato (curva padrão), sendo estes transformados em porcentagem, considerando-se o grupo controle positivo (35% 3x15) como 100% de difusão de H₂O₂ residual.

RESULTADOS

Foi observada redução significativa na viabilidade celular em todos os grupos clareados quando comparados ao controle negativo (p<0,05), conforme demonstrado na Figura 1. No entanto, os grupos clareados com os géis contendo 20% de H₂O₂, com ou sem GC, apresentaram valores de viabilidade celular significativamente superior ao controle positivo (p<0,05). Observou-se que a redução da viabilidade celular para os grupos clareados com 20% de H₂O₂ foi proporcional ao tempo de contato dos produtos com a superfície dental, sendo que a presença de GC resultou em minimização significativa do efeito tóxico apenas para os protocolos 1x 15 e 1x 5 min (p<0,05). Os resultados de difusão de H₂O₂ (Figura 2) corroboram os achados de viabilidade celular, sendo demonstrado que os géis com 20% de H₂O₂ apresentaram difusão significativamente inferior àquela observada para o controle positivo (p<0,05), bem como que a difusão foi proporcional ao tempo de contato do produto com a superfície dental. Valores numéricos de difusão de H₂O₂ significativamente inferiores nos grupos do gel com 20% de H₂O₂ contendo GC em relação aos mesmos protocolos para o gel 20% de H₂O₂ sem CG foram detectados para os protocolos 1x 15 e 1x 5 min (p<0,05).

DISCUSSÃO

Já é bem demonstrado na literatura que géis clareadores dentais que apresentam elevadas concentrações de H₂O₂ em sua composição promovem danos irreversíveis ao tecido pulpar^{3,4,6}. Desta maneira, inúmeras pesquisas têm sido realizadas para estabelecer novos parâmetros para o clareamento dental de consultório, técnica indicada a ser realizada sob a supervisão do cirurgião-dentista⁸. Para o aperfeiçoamento da técnica, novas formulações e protocolos de aplicação têm sido propostos, tais como a redução da concentração do gel e do tempo de exposição do mesmo com a estrutura dental^{5,6}, individualização do protocolo clareador de acordo com a espessura do substrato de esmalte e dentina⁷, associação com agentes dessensibilizantes e remineralizantes^{10,12,14,17}, bem como a adição de ativadores químicos ao gel clareador¹⁸. Dentre as alternativas testadas, foi demonstrado que géis clareadores de consultório contendo GC promovem minimização da sensibilidade dental relatada pelos pacientes^{12,13}, bem como dos efeitos tóxicos sobre o complexo dentino-pulpar⁶. Porém, os efeitos adversos em incisivos humanos ainda foram considerados intensos para o protocolo recomendado pelo fabricante

(40-50 minutos) para os géis contendo 35% ou 20% de H₂O₂ e 2% de GC6. Desta forma, no presente estudo buscou-se avaliar os efeitos biológicos de um gel clareador contendo 20% de H₂O₂ e 2% de GC sobre células pulpares humanas (HDPCs) de acordo com o tempo de aplicação do produto sobre a superfície dental.

Conforme demonstrado por Soares et al.⁵ (2014), no presente estudo observou-se uma relação tempo-concentração dependente nas terapias clareadoras em relação a difusão trans-amelodentinária de H₂O₂, bem como sobre a citotoxicidade frente as HDPCs. Para o gel com 20% de H₂O₂, observou-se minimização do efeito tóxico em torno de 1,6 vezes quando o tempo de contato foi reduzido de 45 para 15 minutos, e de em torno de 2,5 vezes para o tempo de 5 minutos. Este efeito foi mais pronunciado para o gel com 20% de H₂O₂ contendo GC, sendo em torno de 2,0 e 2,8 vezes para os protocolos 1x 15 e 1x 5 min, respectivamente, em relação ao protocolo 1x 45 min. Em comparação com o protocolo 35% 1x 45 min, redução em torno de 4,5, 7,3 e 11,5 vezes na toxicidade foi observada para os protocolos 20% 1x 45, 1x 15 e 1x 5 min, respectivamente, enquanto que este efeito foi em torno de 5,9, 11,9 e 16,3 vezes para os protocolos 20%+GC 1x 45, 1x 15 e 1x 5 min, respectivamente. Assim, pode-se inferir que a presença de GC no gel clareador promoveu uma minimização do efeito tóxico do gel com 20% de H₂O₂, sendo este efeito mais pronunciado quando o produto foi aplicado por curtos períodos sobre a estrutura dental. Esta redução no efeito citotóxico pode ser correlacionada

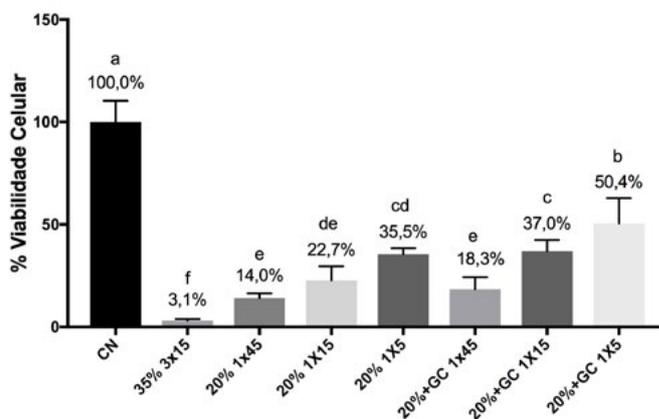


Figura 1 - Gráfico de barras representativo da média (valores numéricos) e desvio-padrão da porcentagem de viabilidade celular. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Tukey; p<0,05).

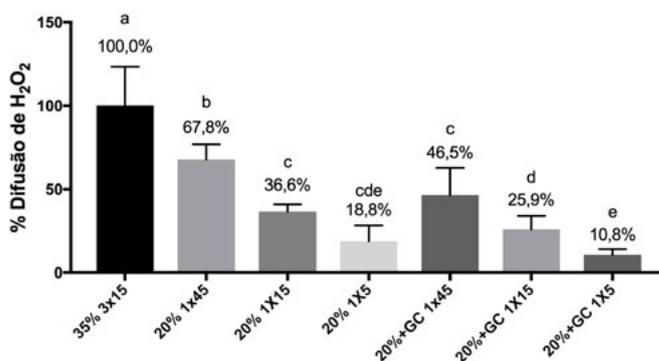


Figura 2 - Gráfico de barras representativo da média (valores numéricos) e desvio-padrão da porcentagem de difusão de peróxido de hidrogênio. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Tukey; p<0,05).

com uma menor difusão de H_2O_2 pela estrutura dental para o gel contendo GC em relação ao produto de mesma concentração de H_2O_2 , porém, sem GC na sua composição.

Em estudo recente, Roderjan et al.⁶ (2015) realizaram avaliação de sensibilidade dental, eficácia clareadora e alterações histopatológicas do tecido pulpar, em dentes submetidos ao clareamento com um gel contendo 35% de H_2O_2 e 2% de GC em sua composição. Neste estudo, foi possível observar que a presença de GC não interferiu com a eficácia clareadora; no entanto, apenas 20% dos pacientes clareados com o gel com GC relataram sensibilidade dental, enquanto que 100% dos pacientes expostos ao gel com mesma concentração de H_2O_2 , porém sem GC na sua composição, relataram este fenômeno clínico. Em relação às análises histopatológicas, foi observado no protocolo de clareamento convencional (gel com 35% de H_2O_2 ; 3x 15 ou 1x 45 min) uma extensa área de necrose de coagulação na polpa coronária em 90% dos incisivos inferiores, associada à deposição de dentina reparadora. Entretanto, 60% dos incisivos inferiores clareados com o gel contendo 2% de GC apresentaram áreas de necrose/dentina reparadora, as quais foram descritas como menos extensas, enquanto que 30% dos dentes apresentaram deposição de dentina reacional associada à inflamação moderada do tecido pulpar⁶.

Além dos danos ao tecido pulpar, sabe-se que as alterações estruturais no conteúdo mineral do esmalte dental que advém das terapias clareadoras¹⁹ resultam em um quadro erosão na superfície de esmalte, tornando-o mais poroso, facilitando, assim, a difusão de H_2O_2 pela estrutura dental^{20,21}. De acordo com Pinto et al.²² (2017), formulações de agentes clareadores contendo cálcio mantêm os níveis desta molécula constante no esmalte ao longo do procedimento clareador. Por apresentar cálcio de forma saturada e, conseqüentemente, um pH básico, estes agentes clareadores promovem a deposição mineral sobre a superfície de esmalte bem como a incorporação de hidroxiapatita, o que leva a redução da susceptibilidade do esmalte à erosão^{17,22}. O GC é um composto com elevada alcalinidade e baixa solubilidade, sendo amplamente utilizado em terapias de reposição de cálcio^{23,24}. Sugere-se que a interação do H_2O_2 com GC durante o clareamento resulta na precipitação de cálcio na sua forma mineral na superfície de esmalte, bem como promove manunção de um pH alcalino no gel clareador, reduzindo a permeabilidade da estrutura dental durante o clareamento¹². Torres et al.²⁵ (2014), demonstraram que a efetividade do H_2O_2 em oxidar substratos orgânicos é proporcional ao pH da solução, sendo observado pico de efetividade no pH 8,0 a 9,0. Este efeito tem sido associado ao aumento na formação de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) em pH alcalino, as quais efetivamente promovem o clareamento dental^{25,26}.

No presente estudo, foi demonstrado que a difusão de H_2O_2 residual pela estrutura dental foi menor no gel contendo GC em comparação ao produto de mesma concentração do princípio ativo. Pode-se sugerir que este efeito tenha sido decorrente da precipitação mineral na superfície de esmalte, o qual minimizou a difusão de H_2O_2 pela estrutura dental, conforme demonstrado por Furlan et al.¹⁷ (2017). Por outro lado, o pH alcalino do produto pode ter interferido, em um mecanismo envolvendo formação mais intensa de EROs²⁵, reduzindo, portanto, a quantidade de H_2O_2 residual capaz de se difundir pelo esmalte e dentina, desde que o pH do gel contendo GC foi de 9,0 enquanto que o gel sem GC apresentou pH de 5,0. No entanto, apesar da presente investigação

ter demonstrado que a presença do cálcio em terapias clareadoras seja capaz de reduzir a citotoxicidade trans-amelodentinária via redução da difusão de H_2O_2 residual, é importante considerar que a aplicação do gel sobre a superfície de dental por de 45 minutos representa risco de toxicidade para as células pulpares, independente de sua associação com 2% de GC. A redução da toxicidade foi mais efetiva quando a modificação do protocolo de aplicação sobre a superfície dental, onde períodos mais curtos, entre 5-15 minutos por sessão clareadora apresentam-se como alternativas promissoras. No entanto, já foi demonstrado que a eficácia clareadora é negativamente influenciada pela redução do tempo de contato de agentes clareadores na estrutura dental⁵. Por outro lado, foi recentemente demonstrado que protocolos de clareamento baseados em baixas concentrações de H_2O_2 e reduzido tempo de contato são capazes de promover clareamento dental similar ao protocolo tradicional no mesmo período de tempo, quando aplicados sobre substrato dental delgado, como incisivos inferiores⁷. Assim, pode-se considerar que o produto clareador com 20% de H_2O_2 e 2% de GC aplicado por curtos períodos de tempo na estrutura dental apresenta-se como uma alternativa promissora para o clareamento de dentes com reduzida espessura de esmalte/dentina. No entanto, estudos adicionais são necessários para comprovar a eficácia clareadora e segurança biológica destes protocolos alternativos quando aplicados em situações clínicas.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a presença de gluconato de cálcio a 2% em géis com 20% de H_2O_2 é capaz de minimizar a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 residual pela estrutura dental, bem como o efeito citotóxico sobre células pulpares humanas, quando o produto é aplicado por curtos períodos (5 a 15 minutos) sobre a superfície dental. Desta forma, a partir deste estudo *in vitro*, podemos sugerir que a presença de cálcio no agente clareador é uma alternativa clínica interessante visando à redução da toxicidade sobre o complexo dentino-pulpar e, conseqüentemente, do quadro doloroso da sensibilidade dental *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos 2016/10928-9; 2015/21770-4) e ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (Processos 442336/2014-4 e 303599/2014-6) pelo suporte financeiro para realização da presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

01. Almeida LCAG, Costa CAS, Riehl H, Santos PH, Sundfeld RH, Briso ALF. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam*. 2012; 25(1): 3-8.
02. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2012; 25(4): 199-204.
03. Souza CCA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109: e59-e64.
04. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Souza CCA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B*. 2014; 4:178-85.

05. Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza CCA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42(2): 185-98.
06. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Souza CCA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.
07. Oliveira DCC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza CCA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2017. doi: 10.1007/s00784-017-2049-7.
08. Soares DG, Hebling J, Souza CCA. Human Pulpal Responses to Peroxides. In: Perdigão J (ed.). *Tooth Whitening.* 1 ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 81-97.
09. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, Souza CCA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *Int Endod J.* 2016b; 49(1): 26-36.
10. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent.* 2011a; 36(1): 12-7.
11. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent.* 2011b; 36(6): 590-6.
12. Kossatz S, Martins G, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associates with use of a calcium-containing in-office bleaching gel. *J Am Dent Assoc.* 2012; 143(12): e81-7.
13. Reis A, Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2013; 38(4): 386-93.
14. Loguercio AD, Tay LY, Herrera DR, Bauer J, Reis A. Effectiveness of nano-calcium phosphate paste on sensitivity during and after bleaching: a randomized clinical trial. *Braz Oral Res.* 2015; 29(1): 1-7
15. Costa SMU, Araújo NC, Borges BC, Sales Wda S, Sobral AP. Impact of remineralizing agents on enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(2): 343-8.
16. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Loguercio AD, Hebling J, Costa CA. Mineral loss and morphological changes in dental enamel induced by a 16% carbamide peroxide bleaching gel. *Braz Dent J.* 2013; 24(5): 517-21.
17. Furlan IS, Bridi EC, Amaral FLBD, França FMG, Turssi CP, Basting RT. Effect of high- or low-concentration bleaching agents containing calcium and/or fluoride on enamel microhardness. *Gen Dent.* 2017; 65(3): 66-70.
18. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza CCA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(6): 1631-7.
19. Lima DA, Aguiar FH, Pini NI, Soares LE, Martin AA, Liporoni PC, et al. In vitro effects of hydrogen peroxide combined with different activators for the in-office bleaching technique on enamel. *Acta Odontol Scand.* 2015; 73(7): 516-2.
20. Hunter ML, Westb NX, Hughesb JA, Newcombec RG, Addyb M. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent.* 2000; 28(4): 265-70.
21. Hughes JA, West NX, Parker DM, Braak VDMH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent.* 2000; 28(2): 147-52.
22. Pinto A, Bridi EC, Amaral F, França F, Turssi CP, Pérez CA, et al. Enamel Mineral Content Changes After Bleaching With High and Low Hydrogen Peroxide Concentrations: Colorimetric Spectrophotometry and Total Reflection X-ray Fluorescence Analyses. *Oper Dent.* 2017; 42(3): 308-18.
23. Danilich MJ, Gervasio D, Marchant RE. Activity of free and immobilized glucose oxidase: electrochemical study. *Ann Biomed Eng.* 1993; 21(6): 655-68.
24. Bao J, Koumatsu K, Furumoto K, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. *Biochem Eng J.* 2004; (22)1: 33-41.
25. Torres CR, Crastechini E, Feitosa FA, Pucci CR, Borges AB. Influence of pH on the effectiveness of hydrogen peroxide whitening. *Oper Dent.* 2014; 39(6): E261-8.
26. Young N, Fairley P, Mohan V, Jumeaux C. A study of hydrogen peroxide chemistry and photochemistry in tea stain solution with relevance to clinical tooth whitening. *J Dent.* 2012; 40(Suppl 2): e11-6.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the cytotoxicity of a bleaching agent containing 2% calcium gluconate (CG) on human pulp cells (HD-PCs). **Materials and Methods:** Enamel-dentin disks adapted in artificial pulp chambers (CPAs) were placed in compartments so that dentin remained immersed in culture medium, while the enamel was subjected to bleaching with 20% H₂O₂ gels containing or not CG for 1x 45, 1x15 or 1x5 minutes. In the positive control, bleaching was performed with 35% H₂O₂ applied for 1x 45 minutes, and in the negative control no treatment was performed on the enamel. Cell viability (MTT test) and trans-enamel and trans-dentinal diffusion of H₂O₂ (leuco-crystal violet / peroxidase) were evaluated (ANOVA / Tukey $\alpha = 5\%$, n = 8). **Results:** A significant reduction in cell viability was observed in all bleached groups when compared to the negative control (p

<0.05); However, groups exposed to gels containing 20% H₂O₂, with or without CG, had significantly higher values of cell viability than the positive control (p <0.05). The reduction of cell viability and the diffusion of residual H₂O₂ to the bleached groups with 20% H₂O₂ was proportional to the contact time of the products with the dental surface, and the presence of CG resulted in a significant minimization of the toxic /diffusion effect of H₂O₂ For the 1x15 and 1x5min protocols (p <0.05). **Conclusion:** The presence of 2% GC in gels with 20% H₂O₂ results in reduction of residual H₂O₂ diffusion by dental structure and cytotoxic effect on human pulp cells when the product is applied for short periods on the dental surface.

KEYWORDS: Tooth bleaching; Dental pulp; Cytotoxicity.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Endereço: Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903,
Brasil.

E-mail: casouzac@foar.unesp.br

Telefone: +55(16) 3301-6477