



## “Decomposição e eficácia de gel clareador a base de ácido hialurônico contendo nanopartículas de dióxido de titânio e peróxido de hidrogênio 3%”

**Palavras-chave:** Clareamento dental, peróxido de hidrogênio, ácido hialurônico, nanopartículas.

**Aluno:** Izabele Gemeli Rigo (UNICAMP - Faculdade de Odontologia de Piracicaba)

**Coorientador:** Marcos Roberto de Lima Benati (UNICAMP - Faculdade de Odontologia de Piracicaba)

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr. Vanessa Cavalli Gobbo (UNICAMP - Faculdade de Odontologia de Piracicaba)

### **Introdução e Justificativa:**

Na técnica de clareamento de consultório o peróxido de hidrogênio comumente utilizado apresenta-se em altas concentrações ( $H_2O_2$ , 25-40%; PH)<sup>1</sup> e ao entrar em contato com a superfície dental se decompõe em espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>2</sup>. A fim de reduzir os efeitos adversos, agentes experimentais têm sido testados, como géis clareadores contendo nanopartículas (NPs) de dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), por esta ser uma molécula quimicamente estável, biocompatível, possuir propriedades antimicrobianas, além de exibir grande potencial de oxidação e capacidade de absorver radiação ultravioleta (UV)<sup>3</sup>. O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero produzido pelos seres humanos, formado pelo ácido glucurônico e N-acetilglicosamina, e tem sido empregado na Odontologia devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade<sup>4</sup>. O desenvolvimento de géis experimentais a base de AH contendo NPs de NF\_ $TiO_2$  (5 wt%) e baixa concentração de PH (3 wt%), seguindo a hipótese de que o gel apresentará potencial remineralizador, capacidade fotocatalítica, aumentando a eficácia das baixas concentrações de PH.

### **Materiais e Métodos:**

Fatores em estudo foram os seguintes tratamentos:

1. Controle negativo – Sem tratamento; 2. Controle comercial - PH 35%/ Sem luz LED violeta; 3. PH 3% com AH/ Sem luz LED violeta; 4. PH 3% com AH/ Com luz LED violeta; 5. PH 3% com AH + 5% NF\_ $TiO_2$ / Sem luz LED violeta; 6. PH 3% com AH + 5% NF\_ $TiO_2$ / Com luz LED violeta

#### **Variáveis respostas**

**Fase 1. Caracterização do gel experimental:** determinação do pH, decomposição dos agentes clareadores (titulação com permanganato de sódio).

**Fase 2. Avaliação de cor:** Parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , índice de clareamento (WID,  $\Delta WID$ ) e alteração de cor ( $\Delta E_{00}$ ) – T0, T1, T2, T3, T4

**Morfologia de Superfície:** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (T4)

**Síntese de nanopartículas de NF\_ $TiO_2$ :** A nanopartícula utilizada foi obtida por meio de reações termosolventes e especificamente produzidas para os agentes clareadores testados<sup>5</sup>. A concentração de NP incorporada ao gel clareador (5 wt%) foi baseada em estudos prévios e demonstraram que das concentrações avaliadas (5, 10, 20, 30, 40 e 50 wt %), 5% foi a mais efetiva<sup>5</sup>.

**Preparo dos géis clareadores experimentais:** O ácido hialurônico (Sigma Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA), biopolímero usado como matriz para os agentes clareadores, foi diluído em água destilada e homogeneizado (Speed mixer, Landrum, SC, EUA) até atingir a viscosidade desejada e estabilizado conforme testes prévios. As NPs de NF\_ $TiO_2$  em álcool foram misturadas por 30s, e a alíquota correspondente à concentração de 5% foi centrifugada. O etanol foi então removido em

quase sua totalidade e as NPs foram adicionadas ao hidrogel e homogeneizadas. O PH (35% Merk) foi diluído na concentração de 3% e adicionado ao hidrogel de AH na proporção de 3:2.

**Determinação do pH:** O pH dos géis clareadores foram mensurados em peagâmetro (Equilam, Diadema, SP, Brasil) acoplado a um potenciômetro (Orion Research Incorporated, Boston, MA) previamente calibrado com padrões de pH 4,0 e 7,0, misturando-se 0,11 g de gel a 10 mL de água deionizada em agitador magnético por 10 min a 20 °C. O peagâmetro determinará os valores de pH nos tempos 0 min e 30 min, referentes ao tempo de contato do gel clareador na superfície dental.

**Decomposição dos agentes clareadores:** O agente clareador foi avaliado quanto à decomposição, no tempo inicial (0) e após 30 min de aplicação do agente clareador. Uma alíquota do clareador (0,01 g) foi pesada e diluída em ácido sulfúrico concentrado (20 mL). A concentração do PH nesta solução foi determinada pelo método da titulação do permanganato de potássio, o qual é baseado na oxi-redução que quantifica a concentração de PH na solução, em titulador automático (HI902C1-02, Hanna Instruments, Texas, EUA) por meio de um eletrodo (HI 3131B, Hanna Instruments). Para avaliar o volume de PH na solução, a solução de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$  : 0,2 g  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  + 250 mL  $\text{H}_2\text{O}$  + 15 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foi gotejada automaticamente na alíquota diluída em velocidade pré-determinada, até que a cor violeta seja observada. A alteração de cor corresponde ao ponto de equivalência, no qual todo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é consumido. No aparelho, a quantidade conhecida de  $\text{KmnO}_4$  e de agente clareador foi adicionado à fórmula:  $C = V \times C_f \times 1,701 \times 100/m$  ( $C = \text{H}_2\text{O}_2$  concentração (w/w);  $V =$  volume de  $\text{KmnO}_4$  adicionados durante a titulação;  $C_f =$  fator de correção para a solução de permanganato de potássio 0,1 N; e  $m =$  massa do agente clareador em miligramas).

**Preparo e Pigmentação dos corpos de prova:** Blocos de esmalte bovinos ( $n=70$ ) livres de trincas e defeitos do esmalte foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais. Antes das análises, os dentes foram pigmentados com solução de chá preto (*Camelia Sinensis*), de acordo com o método modificado de Sulieman et al. (2003)<sup>6</sup> (2g de chá preto diluídos em 100 mL de água destilada por 5 min). Os corpos de prova foram mantidos por 12 horas na solução sob agitação contínua em temperatura ambiente e foram armazenados em saliva artificial (1,5 mM de Ca; 0,9 mM de  $\text{PO}_4$  e KCl 150 mM em solução tampão tris 20 mM, pH 7,0), de acordo com protocolo baseado em Viana et al. (2021)<sup>7</sup> por 7 dias para estabilização da cor até o início dos tratamentos, em estufa a 37 °C. Os espécimes foram aleatoriamente divididos nos grupos experimentais: PH 35% (comercial) (Whiteness HP Maxx, FGM), PH 3% (experimental com AH) e PH 3% + 5% NF\_TiO<sub>2</sub>, com e sem aplicação de luz.

**Protocolo Clareador com e sem uso da luz LED violeta:** Com luz: Os géis clareadores foram aplicados na superfície vestibular do esmalte durante 30 min com aplicação única durante a sessão. O LED violeta foi irradiado imediatamente após a aplicação do gel. Esse procedimento foi repetido por 20 ciclos de 1 min, com intervalo de 30 s entre as irradiações. Em seguida, o gel foi retirado com um sugador de alta potência e lavado abundantemente com água deionizada. Esse protocolo foi realizado em 3 sessões com intervalo de 7 dias. Sem luz: Os géis clareadores foram aplicados na superfície vestibular do esmalte durante 30 min com aplicação única durante a sessão. Em seguida, o gel foi retirado com um sugador de alta potência e lavado abundantemente com água deionizada. Foram realizadas 3 aplicações com intervalo de 7 dias entre as sessões.

**Avaliação de cor:** Para análise de alteração de cor, utilizou-se espectrofotômetro manual (Vita Easysshade, Vita-Zahanfabrik, Alemanha), fixado em suporte. As leituras foram realizadas em triplicata no tempo inicial ( $T_0$ ) e após o tratamento clareador ( $T_f$  e  $T_{14}$ ). O corpo de prova, foi apoiado sobre uma cerâmica branca e a mesma sobre um dispositivo de elevação tipo Jack que garantiu a aproximação da ponta leitora do espectroscópio. A média dos parâmetros  $L^*$  (0: preto e 100:branco),  $a^*$  ( $+a^*$ : vermelho;  $-a^*$ :verde), e  $b^*$  ( $+b^*$ : amarelo e  $-b^*$ :azul) foram obtidos e avaliados após pigmentação ( $T_0$ ), 24 h após cada aplicação do gel clareador ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ) e após 14 dias da finalização dos tratamentos ( $T_4$ ), quando os dentes permaneceram em saliva

artificial. A alteração de cor pelo sistema CIEDE 2000 ( $\Delta E_{00}$ ) e o índice de clareamento ( $\Delta WID$ ) foram determinados.

**Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):** Os espécimes foram selecionados e analisados quanto à morfologia (MEV) 14 dias após a última sessão de clareamento (T4) (JEOLJSM, 6460LV, Tokyo, Japão). Após os tratamentos, os espécimes foram lavados em banho ultrassônico (Ultra Cleaner, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 10 min e secas por 24h em estufa de secagem. Após a secagem, foram revestidas com carbono e submetidas ao sistema automático de análise de imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - JEOL-JSM, 6460LV, Tóquio, Japão), operando a 15kV em modo a vácuo (45 Pa), para aquisição de imagens com aumento de 1500x.

**Análise estatística.** Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Após, foram realizados testes paramétricos e não paramétricos, utilizando o software estatístico SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## Resultados e Discussão

**Análise de cor:** Houve diferença estatística na alteração de cor ( $p > 0,05$ ), nos parâmetros  $\Delta E_{00}$  (Tabela 1) e o  $\Delta WID$  (Tabela 2), entre os grupos experimentais sem o uso de luz LED e grupo controle (PH 35%). A irradiação LED aumentou significativamente o  $\Delta E_{00}$  e o  $\Delta WID$ , para todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Houve diferenças significativas entre os grupos irradiados com LED violeta ( $p < 0,05$ ), sendo que o PH 35% promoveu maior  $\Delta E_{00}$  que os grupos PH 3% não irradiados ( $p < 0,05$ ). O maior desempenho do gel comercial, pode ser explicado pela alta concentração de peróxido de hidrogênio, que promove uma grande alteração de cor, e associado a luz, esses valores podem ser ainda maiores<sup>8</sup>. Não houve diferenças estatísticas entre Estes resultados indicam que luz LED violeta aumenta a eficácia do PH 3% em espessante AH, independente da presença ou não de NPs. Com a aplicação de luz, os grupos PH 3% e PH 3% + NF\_TiO<sub>2</sub> exibem  $\Delta E_{00}$  e  $\Delta WID$  semelhantes ao PH 35%.

**Tabela 1.** Médias e desvios-padrões de  $\Delta E_{00}$ , calculado após 14 dias do protocolo clareador

	SEM LUZ	COM LUZ
PH 3%	5,17 (1,55)Ab*	7,63 (1,52)Aa
PH 3% + NF_TiO <sub>2</sub>	5,08 (2,42)Ab*	6,79 (1,90)Aa
<b>PH 35%: 8,28 (2,62)</b>		

Letras maiúsculas comparam médias entre as linhas (NPs). Letras minúsculas comparam médias entre as colunas (fator luz), segundo ANOVA dois fatores e post hoc de Tukey. Asteriscos indicam diferença com grupos controle (PH 35% comercial sem luz), segundo o teste de Dunnet ( $\alpha = 5\%$ ).

**Tabela 2.** Médias e desvios-padrões de Delta WID, calculado após 14 dias do protocolo clareador

	SEM LUZ	COM LUZ
PH 3%	6,12 (5,75) Ab*	13,26 (7,66) Aa
PH 3% + NF_TiO <sub>2</sub>	4,54 (9,95) Ab*	12,18 (9,43) Aa
<b>PH 35%: 14,27 (7,44)</b>		

Letras maiúsculas comparam médias entre as linhas (fator NPs). Letras minúsculas comparam médias entre as colunas (fator luz), segundo ANOVA dois fatores e post hoc de Tukey. Asteriscos indicam diferença com grupos controle (PH 35% comercial sem luz), segundo o teste de Dunnet ( $\alpha = 5\%$ ).

**Titulação dos agentes clareadores combinado aos géis experimentais:** A concentração média nos grupos experimentais foi de 2,53% a 3,05% e no grupo controle foi de 27,7%. Entre os grupos irradiados com luz, o grupo sem NPs apresentou a maior concentração de PH, apresentando diferença estatística apenas com o grupo experimental que continha 2,59% em T0, e 3,05% (em T30) ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatística na concentração do PH 35% em relação a todos os grupos experimentais, tendo em vista que o gel comercial possui concentração muito maior de PH (35%), independente do tempo analisado ( $p > 0,05$ ).

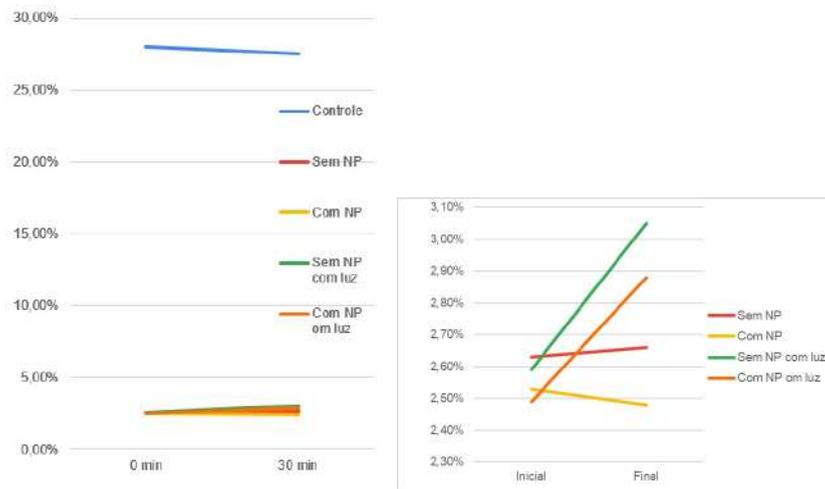


Figura 3. a) Concentração de PH nos géis clareadores no tempo inicial (0 min) e final (40 min); b) Concentração dos géis experimentais.

**Análise de pH dos géis:** Após a incorporação do PH 3% ao gel contendo AH, o pH manteve-se 5,9 e 7,3, e após 30 minutos observou-se diminuição no valor de pH em função do tempo, para todos os grupos. O comportamento de pH permaneceu estável independente do período e não houve diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ). O gel comercial manteve o pH estável (7,1) e não apresentou diferença estatística com os demais grupos.

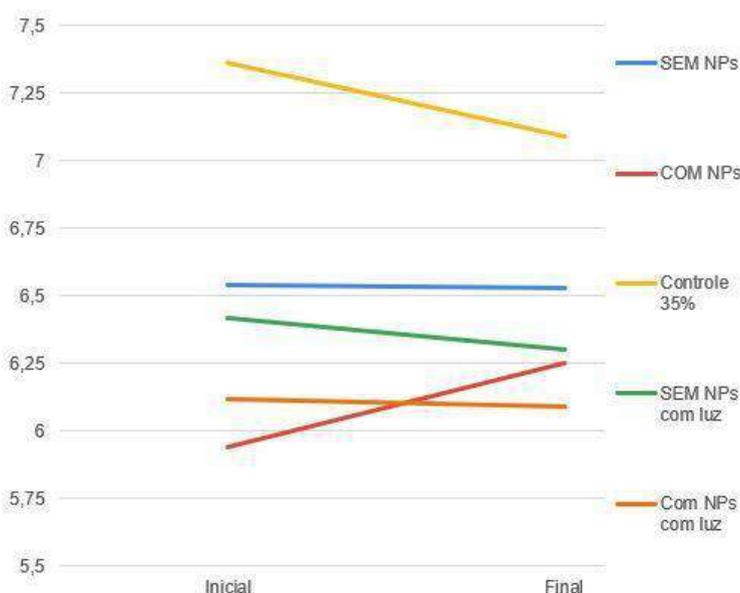
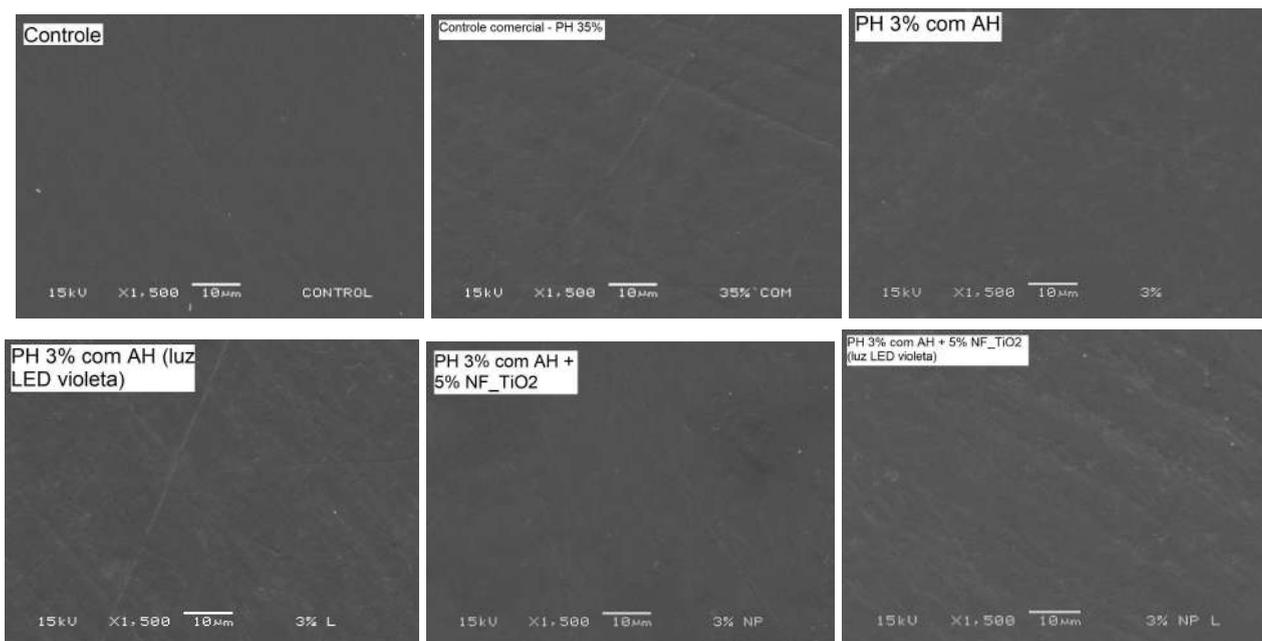


Figura 4. Variação do pH de acordo com o tempo. Tempo inicial 0 e tempo final 30 minutos.

**Microscopia eletrônica de varredura (MEV):** As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura, sugerem que o PH 3% não causou alterações na superfície do esmalte. Nota-se que a superfície do esmalte manteve-se íntegra após o tratamento, sem áreas de desmineralização ou rugosidades.



**Figura 5.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

## Conclusões

Géis clareadores experimentais contendo 3% de HP, com ou sem a adição de NF\_TiO<sub>2</sub>, irradiados com a luz LED violeta, exibiram potencial de clareamento semelhante a 35% HP, e apresentaram pH próximo à neutralidade, independente da adição de NF\_TiO<sub>2</sub> ou irradiação com luz LED violeta. A incorporação de NPs não influenciou a decomposição do 3% HP e nenhum dos géis avaliados promoveram alterações significativas na superfície do esmalte clareado.

## Referências

1. Kury M, Perches C, da Silva DP, André CB, Tabchoury CPM, Giannini M, Cavalli V. Color change, diffusion of hydrogen peroxide, and enamel morphology after in-office bleaching with violet light or nonthermal atmospheric plasma: An in vitro study. *J Esthet Restor Dent.* 2020 Jan;32(1):102-112.
2. Pinto A, Bridi EC, Amaral F, França F, Turssi CP, Pérez CA, Martinez EF, Flório FM, Basting RT. 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):308-318.
3. Bortolatto JF, Trevisan TC, Bernardi PSI, Fernandez E, Dovigo LN, Loguercio AD, et al. A novel approach for inoffice tooth bleaching with 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> and LED/laser system—a controlled, tripleblinded, randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016;31(3):437-44.
4. Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G, Pandis L, Brun P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells.* 2020;9(7):1743.
5. Esteban Florez FL, Trofimov AA, Ievlev A, Qian S, Rondinone AJ, Khajotia SS. Advanced characterization of surface-modified nanoparticles and nanofilled antibacterial dental adhesive resins. *Sci Rep [Internet].* 2020;10(1):1-12
6. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J Dent.* 2003;31(6):415-22.
7. Viana ÍEL, Weiss GS, Sakae LO, Niemeyer SH, Borges AB, Scaramucci T. Activated charcoal toothpastes do not increase erosive tooth wear. *J Dent.* 2021 Jun; 109:103677.
8. Kury M, Wada EE, Silva DPD, Tabchoury CPM, Giannini M, Cavalli V. Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190720. doi:10.1590/1678-7757-2019-0720.