

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



Tese

**Avaliação da eficácia e dos potenciais efeitos adversos de diferentes técnicas  
clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro***

**Sandrina Henn Donassollo**

Pelotas, 2015

**Sandrina Henn Donassollo**

**Avaliação da eficácia e dos potenciais efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Dentística, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco

Co-orientadores: Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Prof. Dr. Marcos Britto Correa

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

D676a Donassollo, Sandrina Henn

Avaliação da eficácia e dos potenciais efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios in vivo, in situ e in vitro / Sandrina Henn Donassollo ; Flávio Fernando Demarco, orientador ; Maximiliano Sérgio Cenci, Marcos Britto Correa, coorientadores. — Pelotas, 2015.

101 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Ensaio clínico. 2. Clareamento dental. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Peróxido de carbamida. 5. Genotoxicidade. I. Demarco, Flávio Fernando, orient. II. Cenci, Maximiliano Sérgio, coorient. III. Correa, Marcos Britto, coorient. IV. Título.

Black : D2

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

Sandrina Henn Donassollo

Avaliação da eficácia e dos potenciais efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro*.

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de concentração em Dentística), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/09/2015

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco (Orientador)  
Doutor em 1998 pela Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Rudimar Antônio Baldissera  
Doutor em 2012 pela Universidade Federal de Pelotas

---

Profa. Dra Márcia Pinto Bueno  
Doutora em 2000 pela Universidade de Campinas

---

Profa. Dra. Giana Silveira Lima  
Doutora em 2009 pela Universidade Federal de Pelotas

---

Dr. Gustavo Giacomelli  
Doutor em 2015 pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Suplente)  
Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho (Suplente)

Aos meus pais, Vitor e Maria Luiza,  
as minhas irmãs Sandra e Sabrine, e ao meu  
grande amor, Tiago, dedico este trabalho.

## **Agradecimentos**

**À Deus**, que nos possibilita que tudo se realize. Que nos dá força nos momentos difíceis, que nos guia pelos melhores caminhos, que está sempre ao meu lado, me iluminando e me fortalecendo.

Aos meus pais, **Vitor e Maria Luiza**, que me deram oportunidade de chegar até aqui. Que nos proporcionaram educação, carinho, amor e entenderam a distância e respeitaram nossas escolhas.

As minhas irmãs, **Sandra e Sabine**, pelo companheirismo, pela cumplicidade, e principalmente por compreender que nossos caminhos nos fizeram nos afastarmos fisicamente, mas que nossa amizade e amor não será jamais abalada.

Ao meu **Tiago Donassollo**, que Deus colocou na minha vida para me mostrar quanto amada e cuidada eu poderia ser. Que me acalma, me alegra, me acompanha em todos os momentos. Minha vida é impossível sem você. OBRIGADA meu amor, por tudo.

Ao nosso **Matteo Henn Donassollo**, que neste momento está na “barriga da mamãe” participando e sentindo tudo....é por você meu amor...que ainda nem chegou, mas já é a razão maior para tudo que fizemos....TE AMO!!!!

Aos meus amigos e professores **Maximiliano Sérgio Cenci, Tatiana Pereira Cenci, Marcos Britto Correa, Sandra Tarquino**, pela amizade e pela ajuda de sempre.

Ao meu orientador Prof Dr **Flávio Fernando Demarco**, exemplo de competência e determinação. Meu exemplo de docente!!! Obrigada por me aceitar como orientadora e por me conduzir pelo melhor caminho.

À Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, representada pelo Diretor Geral **Celso Rigo** e Pelo Coordenador **Volnei Presser**, por permitir a realização do ensaio clínico nas dependências da instituição.

À Universidade Federal de Pelotas, na figura do magnífico reitor **Mauro Del Pino**, à Faculdade de Odontologia da UFPel, representada pela **Profa. Dra. Adriana Etges**, e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia/UFPel, representado pelo **Prof. Dr. Maximiliano Cenci**.

À empresa **FGM Produtos Odontológicos** por fornecer todo material neces:  
para o ensaio clínico.

Aos meus alunos **Douglas Ferrari Trento, Verônica Zanella, Cristiane Fabris, Morgana Gagiolla, Sabrina Wilde, Camila Dias, Liara Santos, Lenon Raugust, Gisiane Gonçalves, Gustavo Viera, Vivian Polo, Ícaro kerber, Felipe Badalotti, Priscila Szymanski, Jéssica Raguzzoni, Amanda Deom, Carol Moura, Vinícius Caetano, Vitor Carboni, Letícia Silvestre, Gustavo Vieira, Brunna Moraes, Kely De Carli, Bárbara Rauber, Josiara Souza, Huriel Palhano, Jéssica Dassi, Jéssica Dalbosco, Daniel Schiavo, Caroline Corazza, João Vitor Oliveira, Carol Cirino, Kássia Karilou, Luana Barbieri, Lucas Machado, Daiane Ceolin, Daniel Rizzoto, Eduardo Pistore, Júlia Pagnossat, Eliel Rangel, Letícia Zanco, Letícia Panssoni, Marcela Palavicini, Maurício Rossato, Paula Alves, Vinícius Canali**, pela ajuda no desenvolvimento da parte clínica, pelo comprometimento, pela paciência. Sem vocês, o desenvolvimento da pesquisa não seria possível.

À aluna e amiga **Juliana Uehara**. "Japonesa" agradeço a Deus por ter colocado você em nosso caminho. Você sabe como é especial para nós.....obrigada por tudo, pela ajuda, pela responsabilidade, pelo comprometimento e pelo amor que realiza os trabalhos conosco.

À aluna e amiga **Sumaia Coser**. Su, você acompanhou todos os passos, fez parte de toda organização do estudo clínico, desde o início até o final.....não lembro de nenhum momento ter me "deixado na mão" e lembro de muitos momentos bons que passamos juntas....OBRIGADA POR TUDO SUSU!!!!

Às minhas colegas e amigas **Camila Dias e Priscila Szymanski**, pela parceria, pelo suporte na minha ausência, pela paciência durante nossa convivência no consultório, mas principalmente pela amizade. GURIAS OBRIGADA POR TUDO!!!!

A todos que de alguma forma contribuíram para que isso fosse possível, meu muito obrigada.

*A melhor maneira que a gente tem de fazer possível amanhã alguma coisa que não é possível de ser feita hoje, é fazendo hoje aquilo que hoje pode ser feito. Mas se eu não fizer hoje aquilo que hoje pode ser feito e tentar fazer hoje aquilo que hoje não pode ser feito, dificilmente eu faço amanhã aquilo que hoje não pude fazer.*

*Paulo Freire*

## **Notas Preliminares**

A presente tese foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: 23 de maio de 2015.

O projeto de pesquisa contido nesta tese é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 30 de agosto de 2013, e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Flávio Fernando Demarco, Tatiana Pereira Cenci e Fábio Garcia Lima.

## Resumo

HENN\_DONASSOLLO, Sandrina. **Avaliação da eficácia e dos potenciais efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro***. 2015. 100f. Tese (Doutorado em Odontologia). Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia e os efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro*. O ensaio clínico randomizado objetivou avaliar a eficácia e sensibilidade do clareamento de consultório e caseiro. Para isso, 130 pacientes foram selecionados, divididos em dois grupos e submetidos paralelamente aos dois tratamentos, sendo um placebo. A avaliação da cor foi realizada com espectrofotômetro digital, antes, após e após uma semana da finalização do tratamento. Os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram submetidos à análise estatística pelo teste de Friedman e complementar de Tukey. Para a sensibilidade, uma escala analógica visual com escores variando de 1 (nenhuma sensibilidade) a 5 (sensibilidade severa) foi preenchida diariamente pelos pacientes. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste Mann Whitney e teste de Friedman. As variáveis  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  e  $\Delta E$  foram submetidos ao teste Mann Whitney ( $\alpha=0,05$ ). Ambos apresentaram efeito clareador significativo para os parâmetros  $L^*$  e  $b^*$ . Para as variações de cor, houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  e  $\Delta E$ . O tratamento clareador de consultório gerou maior sensibilidade nas duas primeiras semanas de tratamento e o caseiro na primeira semana. Quando comparados os dois tratamentos, somente no primeiro dia, o tratamento de consultório apresentou maior sensibilidade. A avaliação da genotoxicidade objetivou avaliar a formação de micronúcleos gerada pelos tratamentos. Antes do tratamento, 15, e 45 dias após, amostras da mucosa oral de 10 pacientes de cada grupo foram coletadas, com um *citobrush*. As amostras foram preparadas e fixadas em lâminas histológicas. Um avaliador cego realizou a contagem manual dos micronúcleos em 1000 células por indivíduo e por tempo. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O tratamento clareador de consultório apresentou maior formação de micronúcleos tanto em 15 como em 45 dias. O ensaio *In situ* e *In vitro*, objetivou avaliar o efeito adverso gerado pelo peróxido de hidrogênio 10% e as fitas adesivas clareadoras sobre o esmalte dental humano através de ensaio de microdureza. Para o ensaio *In situ*, 6 voluntários utilizaram um aparelho removível com os espécimes fixados. O tratamento clareador foi aplicado por 1h/dia, permanecendo em boca por 23h. Para o ensaio *In vitro*, os espécimes receberam os mesmos tratamentos, permanecendo em água destilada por 23h à 36,5°C. A avaliação da microdureza foi realizada antes e após o tratamento. Análise estatística foi realizada através de Anova e teste complementar de Tukey. Não houve diminuição significativa da microdureza *In situ*, no entanto, houve redução significativa no ensaio *In vitro*, sendo que as fitas adesivas clareadoras apresentaram redução estatisticamente maior que o gel clareador. Em conclusão, os agentes clareadores foram efetivos na recuperação da cor e exibiram baixo nível de sensibilidade, sendo que o tratamento caseiro apresentou resultado levemente superior e menor genotoxicidade que o realizado em consultório. Ainda, o tipo de estudo parece ser importante na determinação da perda mineral pós-clareamento, não sendo observada redução da dureza para a

condição *In situ*, mas menor dureza foi observada para os espécimes tratados *In vitro*.

**Palavras-chave:** ensaio clínico; clareamento dental; peróxido de hidrogênio; peróxido de carbamida; genotoxicidade; *In situ*; *In vitro*.

## Abstract

HENN\_DONASSOLLO, Sandrina. **Evaluating the efficacy and potential adverse effects of different bleaching techniques using In vivo, In situ and In vitro studies.** 2015. 102f. Thesis (PhD in Dentistry). Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The aim of the study was to evaluate the efficacy and potential adverse effects of different bleaching techniques through In vivo, In situ and In vitro studies. The randomized clinical trial aimed to evaluate the effectiveness and sensitivity of the in-office and at-home bleaching treatment. For this, 130 patients were selected and divided into two groups and subjected to two treatments, being one placebo. The evaluation was performed with digital color spectrophotometer, before, after and one week after the completion of treatment. The parameters L, a\* and b\* were subjected to statistical analysis by Friedman and Tukey test. The variables  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  and  $\Delta E$  were submitted to Mann Whitney test ( $\alpha = 0.05$ ). For sensitivity evaluation, a visual analogue scale with scores ranging from 1 (no sensitivity) to 5 (severe sensitivity) was daily recorded by patients. Data were statistically analyzed by Mann Whitney and Friedman tests. Both treatments showed significant whitening effect for the L \* and b \* parameters. For color variations, was no statistically significant difference in parameters  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  and  $\Delta E$ . The bleaching treatment clinic generated greater sensitivity in the first two weeks of treatment and home in the first week. When comparing the two treatments, only in the first day, the in office treatment showed greater sensitivity than the at-home treatment. The evaluation of genotoxicity aimed to investigate the micronucleus formation generated by the treatments. Prior treatment, 15, and 45 days after bleaching, the oral mucosa samples from 10 patients from each group were collected with a citobrush. Samples were prepared and fixed on slides. A blind examiner performed the manual counting of micronuclei in 1,000 cells per individual and time. Data were tabulated and submitted to the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test. The in-office bleaching treatment produced a higher formation of micronuclei in both 15 and 45 days. The In situ and In vitro testing aimed to evaluate the adverse effect generated by 10% hydrogen peroxide and whitening strips on microhardness of human dental enamel. For In situ assay, six volunteers used a removable appliance with fixed specimens. The bleaching treatment was applied for 1 h / day, remaining in mouth for 23h. For the In vitro assay, the specimens received the same treatments, remaining in water for 23h to 36.5°C. Microhardness readings were performed before and after treatment bleaching protocols. Statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's test. None significant decrease in microhardness was observed In situ; however, a significant reduction of hardness values were observed for In vitro condition, where the whitening strips statistically decreased the values compared to the whitening gel. In conclusion, the at home or in office bleaching protocols were effective in improving color, with a low level of sensitivity response, and the at home treatment produced a slightly better performed and produced lower genotoxicity effect. In addition the type of study was important to evaluate the mineral loss after bleaching treatment, where those specimens treated in situ have not exhibited microhardness decrease, which was only observed In vitro.

**Key-words:** clinical trial; tooth bleaching; hydrogen peroxide; carbamide peroxide; In situ; In vitro.

## Sumário

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                            | <b>13</b> |
| <b>2. Projeto de Pesquisa .....</b>                   | <b>19</b> |
| <b>3. Relatório de Trabalho de Campo .....</b>        | <b>32</b> |
| <b>4. Artigo 1 – Ensaio clínico randomizado .....</b> | <b>34</b> |
| <b>5. Artigo 2 – Avaliação da genotoxicidade.....</b> | <b>55</b> |
| <b>6. Artigo 3 - Ensaio In Situ e In Vitro .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>7. Considerações gerais.....</b>                   | <b>79</b> |
| <b>8. Conclusões.....</b>                             | <b>82</b> |
| <b>Referências .....</b>                              | <b>83</b> |
| <b>Apêndices .....</b>                                | <b>86</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                   | <b>93</b> |

## 1 Introdução

A preocupação com a aparência cresce consideravelmente nos dias atuais influenciando a procura por tratamentos odontológicos que buscam restabelecer a estética perdida ou em alguns casos apenas melhorar o sorriso. Dentes brancos são sinônimos de beleza e podem influenciar diretamente na autoestima, no convívio social e até mesmo na rotina diária dos indivíduos.

A descoloração dental pode ser influenciadas por uma combinação de fatores intrínsecos ou extrínsecos. Manchas intrínsecas estão relacionados com as propriedades do esmalte e dentina, enquanto as manchas extrínsecas estão associada à deposição de pigmentos oriundos da dieta que se depositam na superfície externa do elemento dental (DEMARCO, MEIRELES, MASOTTI, 2009).

Vários são os tratamentos disponíveis para a correção das alterações de cor dos elementos dentais. O clareamento dental é uma das técnicas menos invasivas e mais procuradas atualmente por parte dos pacientes, que além de dentes mais brancos, desejam que sejam o mais rápido possível (MATIS et al., 2013).

Neste contexto, inúmeras técnicas clareadoras estão disponíveis para o tratamento clareador. O clareamento caseiro e o clareamento em consultório são amplamente utilizados na prática odontológica podendo ser realizado separadamente, ou ainda as duas técnicas associadas (BERNARDON et al., 2010).

Além dos tratamentos clareadores acompanhados pelos profissionais, muitos produtos vem sendo comercializados em farmácias e lojas de cosméticos, podendo ser administrados pelo próprio paciente, sem acompanhamento de um cirurgião dentista, são os chamados OTC (*Over-the-counter*). Entre eles, encontram-se dentifrícios, enxaguatórios, goma de mascar, vernizes ou géis, fio e escova dental contendo agente clareador, clareamento com moldeiras adaptadas ao indivíduo podendo inclusive ser ativado por fonte luminosa e as fitas adesivas impregnadas com agente clareador. No entanto, a eficácia desses produtos ainda vem sendo muito discutida (DEMARCO, MEIRELES, MAZOTTI, 2009).

O tratamento clareador caseiro convencional é realizado através da confecção de moldeiras individuais de polietileno, a partir da moldagem prévia das

arcadas dos pacientes e posterior confecção em plastificadora à vácuo utilizando o modelo confeccionado a partir da moldagem. As moldeiras individuais são carregadas com gel a base de peróxido de hidrogênio ou de peróxido de carbamida em concentrações menores que os utilizados no tratamento clareador de consultório. O clareamento dental caseiro é o tratamento mais indicado pelos profissionais (MATIS, COCHRAN, ECKERT, 2009) e inúmeros estudos clínicos tem demonstrado sua efetividade (HASSON, ISMAIL, NEIVA, 2006, MEIRELES et al., 2008, DE LA PEÑA, RALON et al., 2013).

Peróxido de hidrogênio 4% a 10% ou peróxido de carbamida em concentrações que variam de 10% a 35% podem ser utilizados no clareamento caseiro com moldeiras (HAAYWARD et al., 2012). No entanto, o peróxido de carbamida 10% ainda é considerado o padrão ouro para o tratamento de descolorações de dentes vitais (MEIRELES et al., 2010).

O mecanismo de ação do peróxido de carbamida é baseado na sua dissociação em peróxido de hidrogênio e ureia. O peróxido de hidrogênio se degrada em oxigênio e água, sendo ele o responsável pela ação clareadora através da quebra das moléculas de pigmento por meio de um processo de oxidação e/ou redução e posterior eliminação dessas moléculas da estrutura dental por difusão. Enquanto ocorre a degradação do peróxido de hidrogênio, a ureia transforma-se em amônia e dióxido de carbono. A amônia aumenta a permeabilidade da estrutura dental, melhorando a passagem do agente clareador (JOINER, 2006).

A concentração e o tempo de aplicação do agente clareador parece ser um fator determinante no resultado do clareamento dental (MATIS, COCHRAN, ECKERT, 2009). Maiores concentrações tendem a produzirem um efeito clareador maior, no entanto quando menores concentrações forem utilizadas por maior tempo, o efeito torna-se semelhante (JOINER, 2006).

Estudos tem demonstrado que o efeito clareador do peróxido de carbamida 10% e 16% tem sido semelhantes após o mesmo tempo de utilização e nas mesmas condições. As diferentes concentrações apresentaram sensibilidade transitória leve ou não apresentaram, ambas foram bem aceitas pelos pacientes, no entanto houve uma leve tendência ao peróxido de carbamida 10% (MEIRELES et al., 2008). Dados similares também foram encontrados por De La Peña, Ratón (2013), os quais não encontraram diferença entre as concentrações de peróxido de carbamida 10% e 15% testadas.

Baseado nos resultados semelhantes entre diferentes concentrações, autores recomendam a utilização de géis de baixa concentração, como é recomendado pela ADA (*American Dental Association*) e pela SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*) da Comissão Europeia e pela comprovação através de estudos que mesmo baixas concentrações (PC 10%) comparadas com altas concentrações (PC 28%), com tempos diferentes de tratamento, 8h e 20 min respectivamente, apresentam efeito clareador eficaz, no entanto, o de menor concentração foi significativamente maior devido ao maior tempo de contato com a superfície dentária (TURKUN et al., 2010). Dados suportados por Sulieman et al., (2006), que após avaliar diferentes concentrações de peróxido de carbamida (10%, 15%, 20%, 22% e 30%), concluíram que o efeito clareador do PC de 10% é similar ao de 30%, no entanto, o resultado seria mais rápido com o de 30%. Meireles et al., (2012) também observou um resultado clareador semelhante obtido pelas diferentes concentrações testadas (10%, 16% e 37%).

Em relação a longevidade do tratamento clareador vital caseiro, após dois anos de clareamento, houve uma leve alteração de cor quando comparada ao *baseline*, no entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de 10% e 16% (MEIRELES et al., 2010).

Além do tratamento clareador caseiro, o de consultório também tem tido sua popularidade aumentada entre os pacientes. O tratamento clareador vital de consultório é realizado através da aplicação de peróxido de hidrogênio em concentrações que variam de 20 a 38%. A eficácia deste tratamento já está bem determinada na literatura por diversos estudos, não demonstrando diferenças significantes entre as concentrações (MATIS, COCHRAN, ECKERT, 2009; BERNARDON et al., 2010; DA COSTA et al., 2010; REIS et al., 2013; POLYDOROU et al., 2013).

Recentemente um agente clareador a base de peróxido de hidrogênio em duas apresentações 20% e 35% (Whiteness HP Blue - FGM) foi avaliado através de um ensaio clínico randomizado duplo-cego. As duas concentrações testadas apresentaram efeito clareador, não sendo observada diferença significativa entre elas, no entanto, a concentração de 20% foi aplicada por 10 minutos a mais que a de 35%. A grande inovação deste gel, está no fato de necessitar apenas duas sessões para o tratamento clareador. Isso é possível, devido a estabilidade do pH em (8,0-9,0) durante todo procedimento clareador. O pH alcalino favorece a

decomposição e liberação de subprodutos do peróxido de hidrogênio, assim, pode-se afirmar que em meios alcalinos, a efetividade do clareamento tende a ser maior (REIS et al., 2013).

Apesar da literatura sugerir que o clareamento caseiro é mais efetivo que o de consultório (MATIS, COCHRAN, ECKERT, 2009), outros estudos demonstram que ambas técnicas são efetivas, não havendo diferença no efeito clareador (BERNARDON et al., 2010; DA COSTA et al., 2010; TAY et al., 2012). Sendo assim, a escolha da técnica dependeria da preferência do profissional e do paciente (TAY et al., 2012).

No entanto, além do resultado clareador final, outros fatores devem ser considerados na escolha da técnica clareadora ideal. Está bem determinado na literatura que tanto o clareamento caseiro como o de consultório, podem gerar algum tipo de sensibilidade pós operatória. Estudos tem demonstrado que o tratamento a base de peróxido de carbamida 10% pode gerar sensibilidade pós operatória entre 15% e 65% dos pacientes submetidos ao tratamento nos 4 dias após a aplicação do produto. Esses dados variam de acordo com o produto e a concentração do agente utilizado, sendo observado que a sensibilidade é maior no tratamento clareador de consultório, principalmente quando essa for ativada por fonte de luz. Esta sensibilidade pode durar até 39 dias, e, em alguns casos, é tão dolorosa que leva a interrupção do tratamento (GOLDBERG, GROOTVELD, LYNCH, 2010).

A sensibilidade após tratamento clareador pode ser explicada devido ao dinamismo dos fluidos. O oxigênio liberado do peróxido de hidrogênio é capaz de se difundir pelo esmalte e dentina exercendo uma pressão osmótica e vascular sobre a polpa, porém esse mecanismo de sensibilidade ou dor após o clareamento ainda não está bem entendido, mas sabe-se que é um processo transitório e que desaparece após a remoção do agente ou quando algum agente dessensibilizante for aplicado (ARMÊNIO et al., 2008; GOLDBERG, GROOTVELD, LYNCH, 2010).

Além da sensibilidade pós operatória, atualmente a discussão em torno da segurança sobre o uso indiscriminado de agentes clareadores está focada na possibilidade dos componentes utilizados para o clareamento estarem associados a serem potencialmente genotóxicos, podendo assim, produzir lesões orais pré malignas (GOLDBERG, GROOTVELD, LYNCH, 2010).

O peróxido de hidrogênio é uma substância altamente reativa que pode causar danos aos tecidos moles quando exposto por longo período de tempo

(MUNRO et al., 2006). O contato direto com peróxido de hidrogênio induz efeitos genotóxicos em culturas celulares *In vitro* significativamente maior quando comparado a outros agentes clareadores como perborato de sódio e peróxido de carbamida (FERNANDEZ et al., 2010).

Baseado nisso, nos efeitos adversos de sensibilidade e genotoxicidade que os agentes clareadores podem gerar e na presente dúvida de qual técnica clareador é mais efetiva, torna-se necessário a realização de um ensaio clínico randomizado buscando avaliar as duas técnicas mais populares de clareamento de dentes vitais atualmente.

## 1.1 Objetivo Geral

Comparar através de ensaio controlado triplo cego a eficácia do clareamento dental de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% com o clareamento dental caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10% e a microdureza do esmalte dental humano através de ensaio *In vitro* e *In situ* do peróxido de hidrogênio 10% e fitas adesivas clareadoras.

## 1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia das técnicas de clareamento dentário para dentes vitais;
- Comparar a sensibilidade gerada nos pacientes envolvidos no estudo frente às diferentes concentrações de agentes clareadores utilizadas na pesquisa;
- Avaliar a genotoxicidade das diferentes concentrações utilizadas no estudo sobre as células da mucosa oral dos pacientes.
- Avaliar a dureza do esmalte dental humano *In situ* e *In vitro*.

## 1.3 Hipótese

A hipótese nula a ser testada no ensaio clínico randomizado é a de que não há diferença estatisticamente significativa entre o clareamento vital de consultório realizado com peróxido de hidrogênio a 35% e o clareamento vital caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10% na eficácia, sensibilidade, genotoxicidade, assim como, não há diferença na dureza do esmalte dental humano *In situ* e *In vitro*.

## **2 Projeto de Pesquisa**

### Aspectos éticos

O projeto foi encaminhado para aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Cruz Alta (UNICRUZ) e aprovado sob o número 462. 122 (Anexo A).

Os pacientes serão informados da metodologia do estudo através de carta de informação (Apêndice A) e assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B).

### Delineamento do estudo clínico

Os pacientes envolvidos no estudo serão submetidos ao tratamento clareador caseiro utilizando moldeiras e peróxido de carbamida 10% e ao tratamento clareador de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% paralelamente, no entanto, em uma das técnicas será utilizado gel placebo, dependendo do grupo que o indivíduo for alocado.

Grupo Amarelo: os pacientes realizarão o tratamento clareador de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% e paralelamente realizarão o tratamento clareador caseiro com moldeiras utilizando gel placebo.

Grupo Verde: os pacientes realizarão o tratamento clareador de consultório utilizando placebo e paralelamente realizarão o tratamento clareador caseiro com moldeiras utilizando peróxido de carbamida a 10%.

### Materiais e Métodos

#### *Agentes clareadores*

Para o tratamento clareador realizado no consultório (Grupo Amarelo), será utilizado Peróxido de Hidrogênio a 35% - Whiteness HP Blue (FGM Produtos Odontológicos, Brasil).

Para o tratamento clareador caseiro (Grupo Verde), será utilizado Peróxido de Carbamida a 10% - Whiteness Perfect (FGM Produtos Odontológicos, Brasil).

### *Grupos*

Os pacientes selecionados serão divididos em dois grupos de acordo com o produto e técnica utilizados.

Grupo Amarelo: os pacientes realizarão o tratamento clareador de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Blue (FGM Produtos Odontológicos, Brasil) e paralelamente realizarão o tratamento clareador caseiro com moldeiras utilizando placebo.

Grupo Verde: os pacientes realizarão o tratamento clareador de consultório utilizando placebo e paralelamente realizarão o tratamento clareador caseiro com moldeiras utilizando peróxido de carbamida a 10% Whiteness Perfect (FGM Produtos Odontológicos, Brasil).

Os géis placebos serão manipulados com a mesma aparência, consistência e sabor dos ativos, ou o mais similar possível e envasados em embalagens idênticas às dos géis ativos, fornecidas pela empresa.

### *Treinamento do avaliador*

Um aluno da graduação da FASURGS (Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul), que não realizará nenhum tratamento clareador, fará treinamento para realizar o diagnóstico padronizado da cor dentária.

O registro da cor será realizado através espectrofotômetro digital Vita Easyshade® (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 1).



Figura 1- Vita Easyshade®: espectrofotômetro digital utilizado para diagnóstico objetivo da cor.

Dez pacientes voluntários alunos da FASURGS serão selecionados para a realização do exercício clínico de treinamento. O registro de cor será realizado nos incisivos centrais superiores ( $n=40$ ) utilizando o espectrofotômetro digital. A aferição será realizada no terço médio dos elementos, para isso, uma moldeira personalizada será confeccionada contendo um orifício do tamanho do diâmetro da ponteira do espectrofotômetro digital.

O registro será realizado através do posicionamento da ponta ativa no centro do orifício da moldeira. Três leituras serão realizadas e a média será utilizada como a cor do elemento dental.

Um anotador será treinado para transcrever os códigos referentes as cores dos dentes para as fichas padronizadas (Apêndice C). Duas tardes serão necessárias para o treinamento dos envolvidos.

#### *Espectrofotômetro digital*

A leitura da cor realizada pelo espectrofotômetro será baseada no sistema CIEL\*a\*b\* (CIELab), definido pela Comissão Internacional de Iluminação em 1967, que possibilita a percepção das cores em um espaço tridimensional. No sistema CIELab, o L\* representa a luminosidade da cor e varia de 0 (preto) até 100 (branco). O \*a e o \*b representam os eixos cromáticos: a (vermelho ao verde) e b (azul ao amarelo). A diferença total de cor ou a distância entre duas cores será calculada pela fórmula:  $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ .

#### *Treinamento dos aplicadores dos tratamentos clareadores*

Dois professores e dez alunos da disciplina de Dentística da Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul (FASURGS) participarão de treinamento para aplicação da técnica clareadora. Os alunos envolvidos na aplicação participarão de uma aula teórica e posteriormente demonstração da técnica pelos dois professores. Em outro momento, os alunos realizarão o tratamento nos colegas para o treinamento.

### *Recrutamento e seleção dos pacientes*

Cento e trinta pacientes serão selecionados para o estudo. O tamanho da amostra foi calculado baseado em estudo prévio (TAY et al, 2012). Para um poder de 80% e nível de significância de 5%, 108 pacientes seriam necessários. Assim, foram acrescentados mais 20% na amostra para perdas e recusas, obtendo um total de 130 pacientes. Os pacientes serão convidados a participar do estudo através de cartazes fixados nos murais da FASURGS assim como divulgação no site da instituição. Além disso, será realizada a divulgação em rádios e jornais da região de Passo Fundo.

Os interessados em participar do estudo serão agendados para avaliação na Clínica de Dentística da FASURGS.

Para participarem do estudo, os pacientes deverão:

1. Apresentar os dois incisivos centrais superiores com coloração diferente de A1 e B1;
2. Nunca ter realizado clareamento dental;
3. Não apresentar restaurações que envolvam mais de 1/6 da face vestibular nos incisivos centrais superiores;
4. Boa condição de saúde bucal;
5. Boa condição de saúde geral;
6. Idade entre 18 e 40 anos

Serão excluídos do estudo:

1. Pacientes tabagistas;
2. Pacientes com aparelho ortodôntico;
3. Algum dos incisivos centrais superiores com tratamento endodôntico;
4. Dentes com abrasão, erosão ou abfração;
5. Pacientes grávidas ou lactantes.
6. Pacientes com histórico prévio de sensibilidade dentária.

### *Avaliação inicial e randomização*

Após, a aferição objetiva da cor, os pacientes que apresentarem coloração diferente de B1 e A1 serão randomizados através de sorteio em dois grupos de acordo com o tipo de clareamento utilizado.

Para a randomização, 65 envelopes de coloração parda, contendo um cartão amarelo e 65 contendo um cartão verde serão confeccionados. Para cada indivíduo será sorteado um cartão. O sorteio será realizado por um indivíduo não relacionado com a pesquisa.

Após a randomização, os examinadores que irão participar do estudo realizarão a anamnese detalhada (Apêndice D) e profilaxia com pasta profilática para remoção das manchas extrínsecas e em seguida realização do exame clínico completo.

#### *Manipulação dos placebos e identificação dos frascos*

Os placebos serão manipulados em farmácia de manipulação buscando representarem de forma mais similar possível a cor, consistência e viscosidade dos géis clareadores comerciais. Após a manipulação o gel placebo simulando o peróxido de carbamida a 10% será acondicionado em seringas idênticas as do fabricante e identificados pela fita amarela. O gel ativo a base de peróxido de hidrogênio a 35% também receberá a identificação amarela.

O gel placebo simulando o peróxido de hidrogênio a 35% será acondicionado em frasco idêntico ao do fabricante e identificado com uma fita verde. O gel ativo a base de peróxido de carbamida a 10% também receberá a identificação verde.

Este processo será realizado por um indivíduo não diretamente envolvido na pesquisa. Os examinadores, o avaliador da cor e os pacientes não terão conhecimento que um dos tratamentos realizados será placebo. Desta forma será garantido o cegamento triplo da pesquisa.

Os frascos vazios de ambos os géis para o armazenamento dos placebos serão fornecidos pelo fabricante.

#### *Confecção das moldeiras*

Após a randomização dos pacientes, as arcadas superiores e inferiores serão moldadas com alginato (Jeltrate regular set, Dentsply, Delaware), os modelos serão vazados com gesso especial e a moldeira para a realização do clareamento caseiro será confeccionada utilizando placas de vinil de 0,35 mm de espessura (FGM

Produtos Odontológicos, Brasil) em plastificadora a vácuo (Plastivac – P6, Bio-art, Brasil). Os excessos serão recortados para uma melhor adaptação das placas aos tecidos gengivais.

As moldeiras serão provadas pelos pacientes para verificar a adaptação e presença de regiões desconfortáveis.

#### *Aplicação do dessensibilizante*

Todos os pacientes de ambos os grupos receberão a aplicação de nitrato de potássio a 2% (Desensibilize KF 2%, FGM Produtos Odontológicos, Brasil) por 10 minutos, na face vestibular dos dentes a serem clareados anterior a aplicação do tratamento clareador de consultório, seguindo as recomendações do fabricante.

#### *Tratamento clareador de consultório e caseiro utilizando placebo – Grupo amarelo*

##### *- Clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35%*

O clareamento será realizado primeiro na arcada superior e após a finalização da arcada superior, será iniciado na arcada inferior a fim de melhorar a observância da eficácia do clareamento pelo contraste das duas arcadas. Os dentes envolvidos no tratamento serão de segundo pré-molar até segundo pré-molar para ambos os arcos.

Na sessão clínica seguinte, os pacientes do grupo Amarelo receberão tratamento clareador de consultório com peróxido de hidrogênio a 35%.

Para a realização do clareamento de consultório, um afastador labial (Arc Flex - FGM Produtos Odontológicos, Brasil) será utilizado para afastamento de lábios e bochechas. Após, uma profilaxia será realizada com pedra-pomes e água. O isolamento relativo com protetor gengival fotopolimerizável (Top Dam - FGM produtos odontológicos, Brasil) será realizado cobrindo a gengiva marginal e as papilas com uma camada de 3 a 5 mm de largura e máximo 1 mm de espessura. A barreira deverá cobrir aproximadamente 0,5 a 1 mm da superfície dental. O espelho clínico será posicionado de incisal para cervical a fim de observar se há tecido gengival descoberto. Esta etapa será crucial para que se evite contato do peróxido com a gengiva. O protetor gengival será polimerizado por 30 segundos para cada

grupo de 3 dentes. O protetor gengival que se formará será rígido e insolúvel, prevenindo eventual irritação por produtos agressivos.

Em seguida, o peróxido de hidrogênio a 35% será misturado com o espessante através de mecanismo próprio. Uma camada de gel será aplicada sobre toda superfície vestibular dos dentes a serem clareados. A camada de gel deverá ter entre 0,5 a 1 mm de espessura. O gel será aplicado somente nos elementos que aparecem no sorriso (de 2º Pré-molar a 2º Pré-molar do outro arco).

O gel permanecerá sobre a superfície dental por 40 minutos. Com o auxílio de um micro aplicador o gel será movimentado sobre os dentes frequentemente (a cada 5 ou 10 minutos) para liberar eventuais bolhas de oxigênio geradas e renovar o contato do gel com os dentes.

Ao final do tempo recomendado, o gel será aspirado com uma cânula endodôntica ou cirúrgica e os dentes serão lavados com água em abundância. O protetor gengival será removido destacando-o com uma sonda exploradora. Os dentes serão polidos com pasta de polimento (Diamond Excel - FGM produtos odontológicos, Brasil) e discos de feltro (Diamond Flex - FGM produtos odontológicos, Brasil).

Não será realizada aceleração externa com fontes de luz.

Duas aplicações serão realizadas com intervalo de tempo de 7 dias entre as aplicações.

#### *- Clareamento caseiro utilizando placebo*

O paciente será orientado a realizar o tratamento clareador caseiro, no entanto, o gel caseiro utilizado para o grupo Amarelo não terá efeito clareador. Será distribuída para os indivíduos a moldeira superior e uma bisnaga de gel placebo.

Os pacientes receberão instrução de como utilizar o gel clareador por escrito (Apêndice E) e a maneira de aplicação será demonstrada. Os pacientes serão instruídos a utilizar o gel “clareador” por 2 horas, 1 vez ao dia, durante 14 dias.

O paciente e o cirurgião dentista que realizará o tratamento, não serão informados que o gel utilizado no clareamento caseiro será placebo.

*Tratamento clareador de consultório utilizando placebo e caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10% – Grupo Verde*

*- Clareamento de consultório utilizando placebo*

Para a realização do clareamento de consultório utilizando placebo, todos os passos descritos nos item “Clareamento de consultório com Peróxido de Hidrogênio a 35% serão seguidos. No entanto, no lugar do peróxido de hidrogênio a 35% será misturado ao espessante um gel sem efeito clareador, previamente manipulado com as mesmas características de cor e viscosidade.

*- Clareamento de caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10%*

Para a realização do clareamento caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10%, todos os passos descritos no item “*Clareamento caseiro utilizando placebo*” serão seguidos. No entanto, o gel placebo, será substituído por gel a base de peróxido de carbamida a 10%.

*Avaliação clínica pós tratamento clareador*

Após o término e uma semana depois, do tratamento a aferição da cor será realizada pelo mesmo examinador do *baseline* utilizando o espectrofotômetro digital. Se caso os pacientes não comparecerem às consultas, visitas ao domicílio serão realizadas para evitar perdas. A avaliação do clareamento será realizada somente na arcada superior.

Nesta última consulta será iniciado o clareamento inferior seguindo a mesma metodologia do arco superior. No entanto, o clareamento inferior não será avaliado.

*Avaliação do grau de sensibilidade do paciente*

Para avaliar o grau de sensibilidade dentária será entregue ao paciente uma escala contendo os seguintes itens: 1 – nenhuma sensibilidade, 2 – sensibilidade leve, 3 – sensibilidade moderada, 4 – sensibilidade considerável, 5 – sensibilidade severa (MEIRELES et al., 2008) (Anexo B). Os pacientes serão orientados a indicar

o nível de sensibilidade experimentada durante os 14 dias, uma e duas semanas após o término do tratamento.

Os pacientes que apresentarem sensibilidade considerável e severa serão instruídos a entrar em contato com o responsável pelo estudo a fim de retornarem a Clínica da FASURGS para receberem tratamento com gel dessensibilizante.

#### *Análise estatística do tratamento clareador e sensibilidade*

Após a coleta de dados os mesmos serão inseridos no Software STATA 12.2 e analisados por um teste escolhido de acordo com a normalidade dos dados. As diferenças serão consideradas estatisticamente significantes com valor  $p < 0.05$ .

#### Genotoxicidade

##### *Coleta das células*

Vinte pacientes envolvidos no estudo, dez do Grupo Amarelo e dez do Grupo Verde, serão selecionados para a avaliação da genotoxicidade. Será realizada a coleta das células do tecido gengival em três momentos distintos: antes do tratamento clareador (*baseline*), 15 e 45 dias após.

Três coletas serão realizadas para cada paciente, nos três momentos diferentes. A coleta será realizada na gengiva inserida da arcada superior na região de pré molar a pré molar utilizando um *cytobrush* para raspagem.

##### *Preparo das lâminas*

Imediatamente após a coleta, as células serão estocadas em tubos de Falcon contendo 2 ml solução tamponada e 8 ml de água destilada. Em seguida, cada tubo será centrifugado (Phoenix AP 56) a 1000 rpm por 10 minutos e permanecerá em repouso por 30 minutos. Após, o *cytobrush* será removido e o tubo com solução será novamente centrifugado por 10 minutos.

O sobrenadante será removido, permanecendo 1ml no tubo e 9ml de agente fixador (3 partes de metanol - Vetec Química Fina LTDA. RJ – Brasil – e 1 parte de ácido acético - Vetec Química Fina LTDA. RJ - Brasil) será adicionada ao tubo e

misturada a fim de ressuspender o material. Após, será armazenado em temperatura de -20°C (Consul modelo 220L) por 30 minutos. Em seguida, os tubos serão centrifugados por 30 minutos a 30 rpm e fixados. Nova ressuspensão será produzida e o tubo será novamente centrifugado por 30 minutos a 1000 rpm. Novamente o sobrenadante será removido restando 0,5 ml de material no fundo do tubo. Após, 4 gotas serão aplicadas em lâminas histológicas, previamente secas a 37°C. Em seguida, as lâminas serão coradas pela técnica de Feulgen (KHANDELWAL & SOLOMON, 2010), que consiste na fixação das células através da oxidação pelo ácido clorídrico (Vetec Química Fina LTDA. RJ - Brasil) por 1 minuto. As lâminas serão secas e imersas em ácido clorídrico por 10 minutos a uma temperatura de 33°C, em seguida permanecerão em temperatura ambiente por 10 minutos, serão novamente imersas em ácido clorídrico por 5 minutos, lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. Após, o reagente Schiff será aplicado por 2h e 30 minutos em ambiente escuro. O reagente será removido e as lâminas serão imersas em água destilada por 1 minuto, seguida de lavagem e secagem. Após 24h, as lâminas serão imersas em corante Fast Green (Vitrilab) por 10 segundos, e submetidas a 3 lavagens de 10 segundos com álcool (Vetec Química Fina LTDA. RJ - Brazil).

#### *Crítérios de caracterização dos micronúcleos*

O critério de caracterização de micronúcleo será realizado segundo Araújo et al, 2008, que preconiza: (a) deve ter um contorno regular, arredondado ou elíptico e inserido no interior do citoplasma celular; (b) deve ter coloração similar ao núcleo principal; (c) deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) deve estar separado do núcleo, permitindo a identificação clara entre os limites do núcleo e dos micronúcleos.

#### *Teste de contagem dos micronúcleos*

Um avaliador previamente calibrado e cego irá realizar a contagem dos micronúcleos em microscópio óptico ( Olympus CX 21), com aumento de 400X. A determinação da proporção de micronúcleos será realizada mediante a contagem

manual de micronúcleos em 1000 células por isoladas por indivíduo, por tempo, totalizando 300 células por indivíduo.

#### *Análise estatística da genotoxicidade*

Os resultados serão analisados no Programa STATA 12.0 (StataCorp LP, EUA) através de um teste escolhido a partir da normalidade dos dados. Nível de significância  $p < 0,05$  será utilizado.

#### *Avaliação do impacto do clareamento na qualidade de vida dos pacientes*

Para avaliar o impacto do clareamento na qualidade de vida relacionado a saúde bucal, um instrumento previamente validado *Oral Health Impact Profile* (OHIP-14) será utilizado. Um questionário (Anexo C) será aplicado aos participantes antes e após o tratamento clareador. As perguntas que compõem o questionário referem-se a dificuldades apresentadas para desempenhar habilidade rotineiras como: comer, falar, sentir-se preocupado, estressado, realizar tarefas diárias.

Após, todos os dados serão tabulados e submetidos a análise estatística para avaliar o impacto do tratamento clareador na performance diária do paciente.

## 2.1 Cronograma

**Quadro 1.** Cronograma de execução do projeto.

| PERÍODO                            | ATIVIDADE                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Março a dezembro de 2012</b>    | <ul style="list-style-type: none"><li>• Definição do tema</li><li>• Revisão de literatura</li><li>• Redação do projeto</li></ul>                                                       |
| <b>Janeiro de 2013</b>             | <ul style="list-style-type: none"><li>• Submissão ao CEP</li></ul>                                                                                                                     |
| <b>Fevereiro a abril de 2013</b>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Qualificação do projeto</li><li>• Revisão de literatura</li><li>• Treinamento e Calibração da equipe</li><li>• Seleção dos pacientes</li></ul> |
| <b>Maio a julho de 2013</b>        | <ul style="list-style-type: none"><li>• Revisão de literatura</li><li>• Aplicação dos tratamentos clareadores nos pacientes selecionados</li></ul>                                     |
| <b>Agosto de 2013</b>              | <ul style="list-style-type: none"><li>• Tabulação e análise dos dados</li></ul>                                                                                                        |
| <b>Setembro a dezembro de 2013</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Revisão de literatura</li><li>• Redação dos artigos</li><li>• Redação da Tese</li></ul>                                                        |
| <b>Janeiro de 2014</b>             | <ul style="list-style-type: none"><li>• Defesa da Tese</li></ul>                                                                                                                       |
| <b>Fevereiro de 2014</b>           | <ul style="list-style-type: none"><li>• Submissão dos artigos</li></ul>                                                                                                                |

## 2.2 Orçamento

**Quadro 1.** Orçamento previsto para viabilização do projeto.

| Descrição                                                     | Quantidade | Custo (unidade) | Custo (total)      |
|---------------------------------------------------------------|------------|-----------------|--------------------|
| Kit clareamento caseiro com Peróxido de carbamida a 10%       | 75 un      | R\$ 49,90       | R\$ 3.742,50       |
| Kit clareador de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% | 25 un      | R\$ 180,00      | R\$ 4.500,00       |
| Máscara para procedimento                                     | 3 cx       | R\$ 9,00        | R\$ 27,00          |
| Luvras para procedimento                                      | 3 cx       | R\$ 18,00       | R\$ 54,00          |
| Gorros para procedimento                                      | 3 pct      | R\$ 9,00        | R\$ 27,00          |
| Pasta profilática                                             | 1 un       | R\$ 3,50        | R\$ 3,50           |
| Escova de Robinson                                            | 30 un      | R\$ 3,00        | R\$ 90,00          |
| Alginato                                                      | 5 pct      | R\$ 10,00       | R\$ 50,00          |
| Gesso Pedra                                                   | 5 kg       | R\$ 5,00        | R\$ 25,00          |
| Impressões                                                    | 800 un     | R\$ 0,20        | R\$ 160,00         |
| Serviço de revisão do inglês                                  | 2          | R\$ 200,00      | R\$ 400,00         |
| Inscrições em congressos                                      | 5          | R\$ 100,00      | R\$ 500,00         |
|                                                               |            | <b>Total</b>    | <b>R\$ 9579,00</b> |

**Quadro 2:** Equipamentos necessários já disponíveis para pesquisa.

| Descrição                                    | Quantidade | Custo (un)    | Custo (total)        |
|----------------------------------------------|------------|---------------|----------------------|
| Plastificadora à vácuo                       | 1          | R\$ 980,00    | R\$ 980,00           |
| Aparelho fotopolimerizador do tipo LED Raddi | 1          | R\$1350,00    | R\$ 1350,00          |
| Espectrofotômetro Easy Shade                 | 1          | R\$ 14.000,00 | R\$ 14.000,00        |
|                                              |            | <b>Total</b>  | <b>R\$ 16330 ,00</b> |

### 3 Relatório de Trabalho de Campo

O projeto de pesquisa apresentado passou por algumas alterações com o objetivo de melhorar o desenvolvimento da pesquisa. Como pode ser observado pelo cronograma do projeto, houve um retardo no prazo de defesa inicialmente planejado. Isso foi devido ao tempo bem maior do que o inicialmente estimado para incluir toda a amostra necessária para a realização do ensaio clínico. Foram tentadas diferentes estratégias de busca para incrementar a inclusão de pacientes, mas, tendo em vista os critérios de inclusão e exclusão, a amostra total foi difícil de ser obtida. Assim, pelo maior tempo que levou o trabalho de campo, não foi possível incluir na tese a avaliação de longevidade do clareamento após 1 ano e nem a parte referente ao estudo de qualidade de vida. Por conta disso, foi decidido realizar um estudo *In vitro/In situ*, também relacionado a temática de clareamento vital, para explorar diferentes metodologias do assunto, já que tínhamos um estudo clínico, um estudo clínico/laboratorial (genotoxicidade) e acabamos realizando este estudo comparando metodologias *In vitro* e *In situ*. Também optamos por realizar este estudo pois muitos estudos tem mostrando um efeito adverso dos materiais clareadores sobre o esmalte dental com redução da dureza superficial, em decorrência da perda mineral, o que poderia ser a origem da sensibilidade ao clareamento, que era um dos desfechos de nosso estudo clínico. Para este estudo também optamos por empregar as tiras clareadoas, forma de clareamento de autocuidado (*over-the-counter*) que tem se tornado bastante popular e que tem poucos estudos *In situ* avaliando de seu potencial deletério. Acreditamos que esta inclusão na forma de um terceiro artigo foi importante também para o treinamento da doutoranda em diferentes metodologias de estudo de clareamento, pois a doutoranda é docente de uma Faculdade de Odontologia privada, que pretende apresentar proposta de mestrado profissional no futuro e a intenção da doutoranda é poder estar apta a atuar neste programa orientando trabalhos na área de clareamento e estética dental.

Em relação ao título “Ensaio controlado randomizado triplo cego comparando a eficácia, sensibilidade, genotoxicidade e impacto na qualidade de vida de duas

técnicas clareadoras” foi substituído pelo título “Avaliação da eficácia e dos efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro*”, devido a inclusão o ensaio *In situ* e *In vitro* e a remoção da avaliação do impacto na qualidade de vida.

No ensaio de genotoxicidade, houve uma mudança no reagente utilizado para corar as lâminas. O reagente Schiff e o corante Fast Green (Vitrilab) foram substituídos pelo corante May-Grunwald Giemsa (Sigma Aldrich).

#### **4 Artigo 1- Ensaio Clínico Randomizado**

**Randomized clinical trial comparing efficacy and tooth sensitivity of in-office and at-home bleaching**

**Short title: Efficacy and sensitivity of two bleaching techniques**

Sandrina Henn Donassollo<sup>a,b</sup>, Tiago Aurélio Donassollo<sup>b</sup>, Sumaia Coser<sup>b</sup>, Sabrina Wilde<sup>b</sup>,  
Juliana Lays Stolfo Uehara<sup>b</sup>, Marcos Britto Correa<sup>a,c</sup>, Maximiliano Sérgio Cenci<sup>a,c</sup>, Flávio  
Fernando Demarco<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>b</sup> Dental School, Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brazil.

<sup>c</sup> Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas  
R. Gonçalves Chaves 457  
Pelotas, RS, Brazil 96015-560  
Tel/Fax: 32256741 ext. 134

**Corresponding author:**

Flávio Fernando Demarco  
R. Gonçalves Chaves 457  
Pelotas, RS, Brazil 96015-560  
Tel/Fax: 32256741 ext. 134

\*Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Dentistry.

## ABSTRACT

**Objective:** This triple blind randomized clinical trial aimed to compare the efficacy and tooth sensitivity following in-office (35% hydrogen peroxide - HP) or at-home (10% carbamide peroxide – CP) bleaching treatments. **Methods:** 130 volunteers fulfilling the inclusion criteria and presenting tooth color darker than B2 for the central upper incisors were selected to participate, being randomly allocated to treatment groups (n=65): those treated with in-office bleaching and a placebo at-home protocol and those treated with an at-home bleaching treatment and an in-office placebo protocol. Bleaching protocols followed recommendations of manufacturers. Shade evaluations were carried out with a spectrophotometer at baseline, after bleaching and 1-week after bleaching. Tooth sensitivity was daily recorded, for 4-weeks, using a Likert scale varying from 1 (no sensitivity) to 5 (severe sensitivity). Statistical analysis was carried out using non-parametric tests. **Results:** Both treatments produced lighter teeth compared to baseline ( $p < 0.001$ ), being the color improvement maintained during the entire follow-up period. At-home bleaching produced better results in comparison with in-office bleaching for the parameters  $\Delta a^*$  after the bleaching,  $\Delta b^*$  and  $\Delta E$  in both times evaluation. In relation to sensitivity, patients treated with in-office bleaching reported more tooth sensitivity than at-home group only in the first day after bleaching started, without none significant differences in the other periods ( $p > 0.05$ ). **Significance:** In-office or at-home bleaching treatments were both effective in producing whiter teeth, with a slightly better performance for at-home. In-office bleaching produced higher sensitivity than at-home in the first day of the treatment.

**Keywords:** Clinical trial. Tooth bleaching. Hydrogen Peroxide.

## 1. Introduction

Tooth bleaching is the most common aesthetic treatment requested by patients in the dental offices. Many techniques and products are available for tooth bleaching, but at-home bleaching using low concentration gel (10% carbamide peroxide - CP) in a custom-tray is still considered the gold-standard treatment for tooth discoloration in vital teeth (1-3). This treatment has been shown to be effective in produce whiter teeth, with none or mild transient tooth sensitivity and is the most at-home bleaching using 10% CP, well accepted by patients (3). Also, the whitening effect may last for periods up to 2 years without color reversal (4). However, some patients present difficulties in adaptation to at-home protocol, as they prefer not to use a bleaching tray or do not want to wait 2-3 weeks to see the results of the treatment or they may want a faster bleaching effect (5-7). In these cases, in-office bleaching could be an alternative (8).

In-office tooth bleaching is performed using high concentration gel (usually 35% hydrogen peroxide –HP), and it is considered safe, efficient and provides a faster result compared with at-home treatment (9). However, higher levels of tooth sensitivity have been related to in-office bleaching (10,11). The comparison of at home and in office techniques for up to 2 years showed similar results in relation to bleaching effectiveness, but in office technique produced higher levels of sensitivity (8).

Some manufacturers have released products combining strong bleaching agent and agents to prevent tooth sensitivity prior bleaching, such as potassium nitrate. Recently, a new bleaching with 35% hydrogen peroxide, containing potassium nitrate (Withness HP Blue, FGM Dental Products, Brazil) has been marketed and the clinical evaluation of these products demonstrated that the gel produced faster bleaching with none or mild tooth sensitivity (12). However, few studies have been conducted.

The aim of this study was to compare the efficacy and tooth sensitivity produced by in-office and at-home bleaching treatments. The hypothesis to be tested was that both bleaching treatments would produce similar results in relation to efficacy and in-office bleaching would cause higher sensitivity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Trial design

This study was a randomized, triple-blind, clinical trial with an equal allocation rate to receive either one of two treatments. The study developed in the School of Dentistry of the FASURGS, Brazil. This study followed the guidelines published by Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT (13).

The study was approved by Ethics Research Committee of the University of Cruz Alta, Brazil, under number 462.122. The study was carried out the city of Passo Fundo, Southern Brazil. All subjects signed an informed consent form.

### 2.2 Training of examiners

One examiner was trained on shade determination of anterior teeth in 10 subjects using a digital spectrophotometer (Vita Easyshade, Germany). The evaluation was made in the middle third of the upper two central incisors, three times. For this, a custom tray was made. An orifice was developed to standardize the location of the color measuring.

### 2.3 Spectrophotometer evaluation and CIEL\*a\*b\* color system

The CIEL\*a\*b\* color system was adopted for color evaluation in this study. At each evaluation period, the shade of the upper two central incisors was measured three times, with the active point of the instrument at the place determined by custom tray (middle third). The spectrophotometer automatically averaged the parameters evaluated, L\*, a\* and b\*. The L\* represents the lightness. The a\* value is a measure of redness (positive a\*) or greenness (negative a\*). The b\* value is a measure of yellowness (positive b\*) or blueness (negative b\*). The variation between the color coordinates was calculated with the formula:  $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ . Bleaching occurs by increasing the lightness (higher L\*), yellowness reduction (lower b\*) and to a lesser extent by a redness reduction (lower a\*). The CIEL\*a\*b\* color system was defined by the International Commission on Illumination (1967).

### 2.4 Sample size

Sample size calculation was based on a previous study (8) which showed that one week after treatment, the change in tooth color shade from baseline was in average 6.27 with a SD of a 1.5 fot at-home bleaching, while this change was of 5.62 with a SD of 0.9 for the in-

office bleaching technique. Considering 80% power and 5% significance level, 108 patients would be required. So, another 20% were added in the sample for losses and refusals, obtaining a total of 130 patients. The individuals were invited to participate in this study by posters fixers in local colleges and college's websites.

## **2.5 Eligibility Criteria**

The subjects included in this clinical trial were at least 18 years old and having good oral and general health. Furthermore, volunteers needed to have central incisors without restorations on the labial surfaces and to be shade B2 or darker, according to a value-oriented shade guide and never ever done tooth bleaching. Participants were excluded from this study if they were smokers, with braces, had undergone tooth-whitening procedures, were pregnant or lactating, had labial surface restoration on the central incisors, had severe internal tooth discoloration (such as pulpless teeth, fluorosis and tetracycline stains), tooth sensitivity and abrasion, erosion and/or abfraction and recession.

## **2.6 Randomization and blinding**

The 130 participants were randomly allocated into two groups (n=65) according to the bleaching techniques (in-office and at-home) (Fig. 1). For this purpose, the two groups were identified with two different colors: in-office with yellow and at-home with green. A person not involved in the research protocol performed the randomized process using 130 brown envelopes containing 65 yellow papers and 65 green papers. The participants took one envelope, and the person not involved revealed the allocation for other person. Neither participant nor the operator and examiners knew the meaning of the colors, being both blinded to the protocol.

## **2.7 Groups and placebo**

Yellow group received the true in-office treatment with 35% hydrogen peroxide gel (Whiteness HP Blue, FGM Dental Products, Brazil) and underwent a placebo (mock) at-home treatment using custom made trays but using a product similar to at home gel, but formulated without any bleaching agent.

Green group received a mock in-office treatment with a placebo similar the active in-office treatment, but the product used had no bleaching agent. This group underwent the true at-home treatment with 10% carbamide peroxide (Whiteness Perfect, FGM Dental Products, Brazil).

To produce the placebos (mock treatments), the manufacturer (FGM Dental Products, Brazil) provided the tubes without gel. The placebo gel was water-based and it was produced in a Drug store, with the same color and viscosity of the original gel. After, the placebo gel was inserted in the tubes. A person not involved in the study carried out the manipulation and identification.

The chemical characteristics and manufacturers of tested agents were showed in Table 1.

## **2.8 Bleaching procedure**

For all participants, an alginate impression of each subject's maxillary arch was prepared and filled with dental stone. The custom tray was produced using a 1-mm soft vinyl material for the whitening gel. The excess of labial and lingual surfaces was cut 1 mm from the gingival junction. After that, all volunteers received a prophylaxis in all teeth.

After the color evaluation, the subject from the yellow group received in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide. For this, the lips, cheeks and tongue were isolated using lip retractor (Arcflex, FGM, Brazil). The gingival tissue was isolated using a light-cured resin dam (Top Dam, FGM, Brazil). The potassium nitrate desensitizing gel (Desensibilize KF2%, FGM, Brazil) was applied for 10 minutes on the labial surface. After, the bleaching gel was applied to the labial surfaces of teeth for a total of the 40 minutes. In the same session, the participants received the instructions for placebo at-home bleaching. Subjects from green group received a placebo in-office bleaching, and the custom tray was they used the 10% carbamide peroxide gel (Whiteness Perfect, FGM, Brazil). All subjects were instructed to wear the tray with agent for at least 2 hours/day. After, subjects were instructed to remove the tray, wash it and brush their teeth with toothpaste. The subjects were instructed to wear the custom tray for a period of 2h per day, over a 2-week and in-office bleaching treatment was applied twice, 1 week later. The color evaluation was making in baseline, 2 and 3 week after the started the bleaching.

## **2.9 Tooth Sensitivity Data**

Simultaneously to the bleaching, participants were asked to record, on a daily basis, their tooth sensitivity, according to a Likert 5-point scale with the following criteria: 1= none, 2= mild, 3= moderate, 4= considerable and 5= several (4) during 3-week.

## **2.10 Statistical analysis**

Statistical Analysis was performed using Stata 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, US.) Prior to tests data were checked for normality Since normality tests have failed for both color and sensitivity parameters, non-parametrical analysis was performed. Friedman Test followed by Tukey's test was used to analyze differences within treatment groups between different points of follow-up. Differences between groups were assessed using Mann Whitney test

Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

One hundred thirty subjects have completed the study, with 65 volunteers allocated for each group. There was no drop in participants during the evaluation process.

Participants age varied from 18 to 40 years old, with mean (SD) 23.2 (5.8). Seventy-four (56.9%) patients were females. At baseline, treatment groups were balanced for age, gender, profession and education level (Table 2).

Results of the study for  $L^*$ (lightness),  $a^*$  (redness) and  $b^*$ (yellowness), for group treated with 10% carbamide peroxide (at-home) and 35% hydrogen peroxide (in-office) are shown in Tables 3 and 4, respectively.

Considering the effect of at home bleaching during all follow-up (Table 3), there was a significant improvement in color after 1 week for the parameters  $L^*$  and  $b^*$ , which remained for the entire follow-up period, while no significant differences were detected for  $a^*$ . For the in-office group (Table 4) there was only significant difference between pre and post-bleaching periods for the parameter  $b^*$ .

The median values (SD) for  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$  and  $\Delta E^*$  from the at-home and in-office groups are shown in Table 5. No significant difference were observed for  $\Delta L^*$  between groups, soon after bleaching ( $p=0.159$ ) or after 1 week of bleaching conclusion ( $p=0.173$ ). At home bleaching resulted in significant color improvement compared to in office treatment for the parameters  $\Delta b^*$  and  $\Delta E^*$  in both periods evaluated and a better result for  $\Delta a^*$  soon after bleaching conclusion. Overall, at home bleaching showed a slightly color improvement than in office treatment.

The comparison between tooth sensitivity for the two groups is exhibited in Table 6. More sensitivity was reported for the in-office group in relation to at home bleaching only in the first day of evaluation ( $p<0.05$ ). In the other periods evaluated, none significant differences were observed between groups ( $p>0.05$ ). A significant drop in sensitivity reporting was detected in both groups, after bleaching conclusion.

In Table 7, we have the description about the type of sensitivity observed for both groups. Most of the sensitivity observed was classified as mild and occurred during bleaching treatment (1 and 2 weeks). One or 2 weeks after bleaching conclusion, practically there was no more sensitivity reporting. During bleaching procedures, there were few cases of moderate and sporadic cases of severe discomfort, but none individual requested the desensitizing agent to use during the bleaching treatment.

#### **4. Discussion**

The hypothesis tested in the study was rejected, since at-home bleaching showed an overall slightly better result than in office bleaching protocol. Both treatments were effective to whiter the teeth, but more color improvement was observed for 10% carbamide peroxide for most of the parameters evaluated in the short period of follow-up. Also, more sensitivity was reported for in office treatment, but only in the first day of bleaching therapy. Another study comparing this two bleaching protocols, found that both were effective in whitening teeth, but the authors were not able to detect any significant difference between the treatments (8). Also comparing in office (35 and 38% HP) with at home (10 and 20% CP), Basting et al (2012) (11) observed that all protocols were effective to bleach teeth, without differences significant among them. The efficacy of bleaching agents relies on the release of free oxygen, which could break down the pigments present in the tooth structure and as a consequence producing a whitening effect (4). To explain the better result observed for at home bleaching in our study, we could hypothesized that when using 10% carbamide peroxide in the custom tray, despite the lower concentration of bleaching agent compared to 35% hydrogen peroxide, there will be a more constant contact with tooth surface. Some studies have reported that a more concentrated agent used for in office bleaching would produce a faster bleaching effect, but this was not observed in our study. In our study, we used the in office bleaching without the use of a light source to increase the whitening effect. The results from a systematic review and meta-analysis have not demonstrated any significant effect of the use of light unit to improve bleaching effect of high concentration hydrogen peroxide (14). Noteworthy, the present study was conducted only for one week after bleaching conclusion, and these patients are being followed for longer periods to see if there will be differences for treatments when a longer follow-up is observed, instead of this short-term follow-up. Longer periods of evaluation are required to determine the longevity of the treatment and the potential color reversal (4).

The concept of color is difficult to understand, not easy to define, and is often related more to art than science. The digital systems have been used to measure tooth shades. These digital systems express color in three-dimensional specifications and allow for more accurate assessments (15). Studies have reported similar results when compared the visual and spectrophotometer analyses (7, 16-17). Because this, color evaluation in this study was performed with digital spectrophotometer using CIELab system (18).

The CIELab system was scientifically based and useful for calculating color differences in which “L” (Lightness or Brightness or Value), represents the lightness-darkness of a color, “a” represent degree of redness (positive a) and greenness (negative a) and “b” represents degree of blueness (positive b) and yellowness (negative b). The whitening occurs mainly by a yellowness reduction (lower b\*) and an increasing of lightness (higher L\*) (CIE, Commission Internationale de LEclairage 1978). The reduction in b\* has been reported to represent the most important indicator of color change in whitening treatment, since it occurs quicker and to a greater extent than the other components of CIEL\*a\*b\* system (19). In the present clinical trial, a statistically significant difference was observed for b\* parameter after both, at home and in office regimens, when compared with baseline, demonstrating the efficacy of the bleaching effect.

For calculation color change between groups, the  $\Delta E$  was calculated based in CIEL\*a\*b\* system. According to Vichi et al (2011) (19), a  $\Delta E$  value greater than 3.3 is clinically visible and considered perceivable by patients and achieving more than 4.0 units would be considered in the values required for the ADA (20) as efficacy levels. The spectrophotometer data from both groups was able to show differences in almost all parameters after bleaching. Means  $\Delta E$  (SD) of 5.11(2.21) and 6.96(5.26) were observed for the in-office and at-home techniques, respectively. Such findings prove that the bleaching treatment were effective not only to produce a significant color change, but also a clinically relevant change, with a significantly better result for at home protocol. Clinically relevant bleaching effect can produce an improvement in Oral Health Related Quality of Life in individuals with dark teeth underwent bleaching treatments (21).

The color evaluation determined by the spectrophotometer can be considered a strength point of the present study. The spectrophotometer can detect small differences in color at level that not is appreciable by the human eye (19), but the appearance of tooth is not only influenced to the color attributes. Appearance such gloss, opacity, transparency, translucency and optical phenomena such metamerism, opalescence and fluorescence are important characteristics for evaluating color. Like this, the visual assessment using a shade

guide could be interesting. However, when comparing visual analysis of a shade guide and the objective analysis with the spectrophotometer, Meireles et al (2008) (22) found that the visual assessment with guide shade was a valid and reliable method only to differentiate light from dark colors of teeth and it was not accurate to detect small differences in color shades. Also, the evaluation using guide shade is a subjective method that can be influenced by the operator and requires calibration. Thus, the evaluation using the digital spectrophotometer was chosen in this study and can be considered a gold standard method for color detection.

The most common adverse effects in vital bleaching reported by patients is tooth sensitivity (23), with more than 60% of the patients reporting discomfort during vital bleaching therapy (24). This sensitivity has been related to the increased porosity produced by bleaching agents, which allow the penetration of ions and liquid changes into the dentinal tubules that could cause the sensitivity to appear (25). Also, recently it was hypothesized that a chemo sensitive ion channel-TRPA1 could be sensible to a variety of oxidizer compounds including hydrogen peroxide and the activation of intradental nerve activity via TRPA1 is the mechanism of pain decurrent of bleaching treatment (26). Even though there is a high prevalence of sensitivity after bleaching treatment, the degree of sensitivity has mostly been reported to be mild (23). Indeed, in our study, the prevalence of sensitivity in both groups had the peak around the first week during bleaching treatment, where almost 50% in each group had experienced pain, mostly of mild and transitory intensity, as previously reported (8). Subjects treated with in-office bleaching, reported a higher intensity of tooth sensitivity than those individuals who underwent at-home bleaching treatment (8). In our study, when comparing the two bleaching protocols, the only noticeable difference was related to the first day of treatment, when patients from in-office bleaching reported a significantly higher mean of pain. Such finding is in agreement with previous studies that observed for in-office bleaching tooth sensitivity usually occurring within the first 24 hours (7, 27-28). Probably, this effect could be due to the higher concentration level of peroxide, causing more porosity, at least in the first hours and as a consequence provoking more discomfort. However, no significant difference was observed between treatments after these initial results. The peak of pain report was observed following one week of bleaching treatments, with almost 50% of the patients in each group experiencing pain, mostly classified as mild and the discomfort was reduced overtime and sensitivity almost disappeared with the cessation of bleaching treatments. The low sensitivity indices observed in the in-office treatment in this study, can be explained by the use of potassium nitrate as a desensitizing agent before bleaching. The application of potassium nitrate before the bleaching treatment, reduced significantly the sensitivity of the

teeth (29). Indeed results from recent meta-analysis disclosed the beneficial effect of different agents in prevent/treat the bleaching-caused sensitivity (23). It is important to high light that even those patients reporting a more severe degree of discomfort during treatment in this study have not requested to receive treatment for this pain or have requested the interruption of the treatment.

Randomized clinical trials are the best study design to show the efficacy of treatments, especially when they follow the specific guidelines (30). In the present study, we have followed the guidelines for a RCT and the study was reported using the Consort recommendations. Also, the study has an adequate sample size, the randomization was carried out in order to warranty the similarity between groups before treatment starting and the blinding process was able to avoid that volunteers, operators and evaluators could be informed about the treatments, which is really important to prevent bias (30).

The present randomized clinical trial was able to show that both bleaching treatments had efficacy to whiter teeth, with minimum adverse effects. At home bleaching protocol produced better results than in office treatment and this should be taken into account when making the recommendation for vital bleaching therapy. At home bleaching uses less aggressive agents and usually presents a lower cost than in office treatment and when used as recommended by the professional, this treatment seems to be the first choice therapy to treat discolored vital teeth. Indeed, when evaluating the preferences of Brazilian dentists for vital tooth bleaching, Demarco et al (2013) (31) observed that at home bleaching was preferred over in-office therapies and 10% CP was the most selected agent.

## **5. Conclusions**

The results of this study suggested that both techniques, at-home and in-office bleaching, were effective for vital teeth bleaching. However, the 10% carbamide peroxide produced better whitening effect than 35% hydrogen peroxide in the short time evaluation. The tooth sensitivity rates were similar for the two products tested.

## **6. Acknowledgements**

The authors would like to thank FGM Dental Products for the donation of the products used in the research.

## References

1. Matis BA, Cochran MA, Eckert G. Review of the effectiveness of various tooth whitening systems. *Operative Dentistry* 2009; **34**: 230-235.
2. Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Systematic Review* 2006; **18**: 1–43.
3. Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. Efficacy and Safety of 10% and 16% Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial. *Operative Dentistry* 2008; **33**: 606-612.
4. Meireles SS, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. *Journal of Dentistry* 2010; **38**: 956-963.
5. Polydorou O, Wirsching M, Wokewitz M, Hahn P. Three-month evaluation of vital tooth bleaching using light units – a randomized clinical study. *Operative Dentistry* 2013; **38**: 21-32.
6. 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. *Operative Dentistry* 2013; **38**: 386-393.
7. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes G, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Operative Dentistry* 2010; **35**: 3-10.
8. 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. *American Journal of Dentistry* 2012; **25**: 199-204.
9. Giachetti NL, Bertini F, Bambi C, Nieri M, Russo DS. Randomized Clinical Trial Comparing At-Home and In-Office Tooth Whitening Techniques: A Nine-Month Follow-up. *Journal of the American Dental Association* 2010; **141**: 1357-1364.
10. Bonafe E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *Journal of dentistry* 2013; **41**: 363 – 369.
11. Basting RT, Amaral FL, França FM, Flório FM. Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents. *Operative Dentistry* 2012; **37**: 464-73.
12. 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. *Operative Dentistry* 2013; **38**: 386-393.
13. Schulz KF, Altman D, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *British Medical Journal* 2010; **340**: 698-702.
14. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* 2012; **40**: 644-653.
15. Joiner, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *Journal of Dentistry* 2006; **34**: 412-419.
16. Meireles SS, Heckmann SS, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. A double blind randomized clinical trial of at-home tooth bleaching using two carbamide peroxide

- concentrations: 6-month follow-up. *International Journal of Dentistry* 2008; **36**: 878-884.
17. Da Costa JB, Mcpharlin R, Paravina RD, Ferracane JL, Wang M. Comparison of at-home and in-office tooth whitening using a novel shade guide. *Operative Dentistry* 2010; **35**: 381-388.
  18. International Commission Illumination (CIE). Recommendation on uniform color spaces, color difference equations and psychometric color terms. 1978; **15**.
  19. Vichi A, Louca C, Corciolani G, Ferrari M. Color related to ceramic and zirconia restorations. A review. *Dental Materials* 2011; **27**: 97-108.
  20. American Dental Association (2206) ADA). Acceptance Program Guidelines Dentist dispensed home-used tooth-bleaching products ADA Council on Scientific Affairs. Retrieved online Jun 20, 2015 from:  
[http://www.ada.org/ada/seal/standards/guide\\_home\\_bleach.pdf](http://www.ada.org/ada/seal/standards/guide_home_bleach.pdf).
  21. Meireles SS, Goettems ML, Dantas RV, Bona AD, Santos IS, Demarco FF. Changes in oral health related quality of life after dental bleaching in a double-blind randomized clinical trial. *Journal of Dentistry* 2014; **42**: 114-121.
  22. Meireles SS, Demarco FF, dos Santos Ida S, Dumith Sde C, Bona AD. Validation and reliability of visual assessment with a shade guide for tooth-color classification. *Operative Dentistry* 2008; **33**: 121-126
  23. Wang Y, Gao J, Jiang T, Liang S, Zhou Y, Matis BA. Evaluation of the efficacy of potassium nitrate and sodium fluoride as desensitizing agents during toothbleaching treatment-A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* 2015; **43**: 913-923.
  24. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Medical Hypotheses* 2010; **74**: 835-840.
  25. Demarco FF, Meireles SS, Sarmiento HR, Dantas RV, Botero T, Tarquinio SB. Erosion and abrasion on dental structures undergoing at-home bleaching. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry* 2011; **18**: 45-52.
  26. Markowitz K. A new treatment alternative for sensitive teeth: a desensitizing oral rinse. *Journal of Dentistry* 2013; **41**: 2-11.
  27. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *Journal of the American Dental Association* 2009; **140**:1245-1251.
  28. Charakorn P, Cabanilla LL, Wagner WC, Foong WC, Shaheen J, Pregitzer R, Schneider D. The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. *Operative Dentistry* 2009; **34**: 131-135.
  29. Palé M, Mayoral JR, Llopis J, Valles M, Basilio J, Roig M. Evaluation of the effectiveness of an in-office bleaching system and the effect of potassium nitrate as a desensitizing agent. *Odontology* 2014; **102**: 203-210.
  30. Sarkis-Onofre R, Cenci MS, Demarco FF, Lynch CD, Fleming PS, Pereira-Cenci T, et al. Use of guidelines to improve the quality and transparency of reporting oral health research. *Journal of Dentistry* 2015; **43**: 397-404.
  31. Demarco FF, Conde MC, Ely C, Torre EN, Costa JR, Fernández MR, Tarquinio SB. Preferences on vital and nonvital tooth bleaching: a survey among dentists from a city of southern Brazil. *Brazilian Dental Journal* 2013; **24**: 527-31.

## Tables

Table 1. Bleaching agents tested, their chemical characteristics and manufacturers.

| Group     | Bleaching agent | Chemical characteristics                                                                                                       | Manufacturers | Application technique             |
|-----------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| At-home   | White Perfect   | 10% Carbamide Peroxide<br>Nitrate potassium<br>Sodium fluoride                                                                 | FGM           | 120min per day<br>for 14 days     |
| In-office | White HP Blue   | 35% Hydrogen Peroxide<br>Thickeners<br>Violet Pigment<br>Neutralizing agents<br>Calcium Gluconate<br>Glycol<br>Deionized Water | FGM           | 40min per<br>application<br>twice |

Table 2. Demographic characteristics according to different treatment groups.

| Variables       | Categories             | In-office  | At-home    |
|-----------------|------------------------|------------|------------|
| Gender          | Male                   | 32 (49%)   | 24 (37%)   |
|                 | Female                 | 33 (51%)   | 41 (63%)   |
| Age (years)     | $\leq 20$              | 27 (41.6%) | 22 (33.8%) |
|                 | 21-22                  | 7 (10.8%)  | 12 (18.4%) |
|                 | 23-24                  | 12 (18.4%) | 9 (13.9%)  |
|                 | 25-26                  | 6 (9.2%)   | 7 (10.8%)  |
|                 | $\geq 27$              | 13 (20%)   | 15 (23.1%) |
| Education level | Middle and high school | 23 (35,4%) | 22 (33,8%) |
|                 | Complete college       | 10 (15,4%) | 16 (24,6%) |
|                 | Incomplete college     | 32 (49,2%) | 27 (41,6%) |
| Profession      | Student                | 35 (53,8%) | 34 (52,3%) |
|                 | Liberal professions    | 23 (35,5%) | 24 (36,9%) |
|                 | Public server          | 7 (10,7%)  | 7 (10,8%)  |

Table 3. Comparison of different color coordinates of CIEL\*a\*b\* system for at home bleaching patients group at different times.

| Tooth color parameters | Median (25;75 percentiles) |                       |                       |
|------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                        | Baseline                   | After bleaching       | After 1 week          |
| L                      | 84.15 (80.45;86.35) A      | 83.45 (81.43;87.10) B | 85.20 (82.38;87.45) B |
| a                      | -1.70 (-2.20;-1.20) A      | -1.85 (-2.13;-1.45) A | -1.90 (-2.20;-1.45) A |
| b                      | 14.38 (13.03;16.45) A      | 10.10 (8.48; 13.20) B | 10.20 (8.50;12.80) B  |

Different letters represent differences between medians ( $p < 0.050$ ). Friedman Test followed by Tukey test for all pairwise comparisons.

Table 4. Comparison of different color coordinates of CIEL\*a\*b\* system for in office bleaching patients group at different times.

| Tooth color parameters | Median (25;75 percentiles) |                       |                        |
|------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|
|                        | Baseline                   | After bleaching       | After 1 week           |
| L                      | 83.75 (82.15;85.75) A      | 86.25 (83.65;88.00) B | 84.70 (82.40;87.50) A  |
| a                      | -1.78 (-2.15;-1.25) A      | -1.65 (-2.05;-0.80) A | -1.68 (-2.20; -1.25) A |
| b                      | 14.60 (11.55;16.55) A      | 12.43 (9.50;14.80) B  | 11.45 (9.65;13.55) B   |

Different letters represent differences between medians ( $p < 0.050$ ). Friedman Test followed by Tukey test for all pairwise comparisons.

Table 5. Comparison of in office and home bleaching by different color coordinates of CIEL\*a\*b\* system.

| Tooth color parameters | Evaluation period     | In Office bleaching | At Home bleaching | P value       |
|------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| $\Delta L$             | Soon After bleaching  | 1.73 (3.29)         | 0.79 (3.99)       | 0.159*        |
|                        | 1 week-post bleaching | -0.14 (6.50)        | 0.91 (5.36)       | 0.173*        |
| $\Delta a$             | Soon After bleaching  | 0.33 (1.54)         | -0.09 (1.42)      | <b>0.014*</b> |
|                        | 1 week-post bleaching | -0.13 (1.67)        | -0.13 (1.25)      | 0.176*        |
| $\Delta b$             | Soon After bleaching  | -2.16 (2.68)        | -3.55 (5.89)      | <b>0.003*</b> |
|                        | 1 week-post bleaching | -2.99 (2.59)        | -4.25 (4.19)      | <b>0.037*</b> |
| $\Delta E$             | Soon After bleaching  | 5.11 (2.21)         | 6.96 (5.26)       | <b>0.020*</b> |
|                        | 1 week-post bleaching | 5.98 (5.41)         | 7.30 (4.57)       | <b>0.009*</b> |

\* Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Mann Whitney test was applied for statistical comparison.

Table 6. Means (SD) values for weekly tooth sensitivity and degrees of tooth sensitivity reported by volunteers in different treatment groups.

| Treatment | First day         | 1 week            | 2 weeks            | 1 week<br>after    | 2 week<br>after    |
|-----------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| In-office | 1.57 (0.84)<br>Aa | 1.24 (0.36)<br>Aa | 1.31 (0.43)<br>Aa  | 1.07 (0.27)<br>Ab  | 1.00 (0.00)<br>Ab  |
| At-home   | 1.20 (0.51)<br>Ba | 1.37 (0.53)<br>Ab | 1.31 (0.54)<br>Aab | 1.02 (0.13)<br>Aac | 1.02 (0.13)<br>Aac |

Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Mann Whitney test and Friedman test were applied for statistical comparison.

\* Different uppercase letters indicate differences between groups in each time of evaluation.

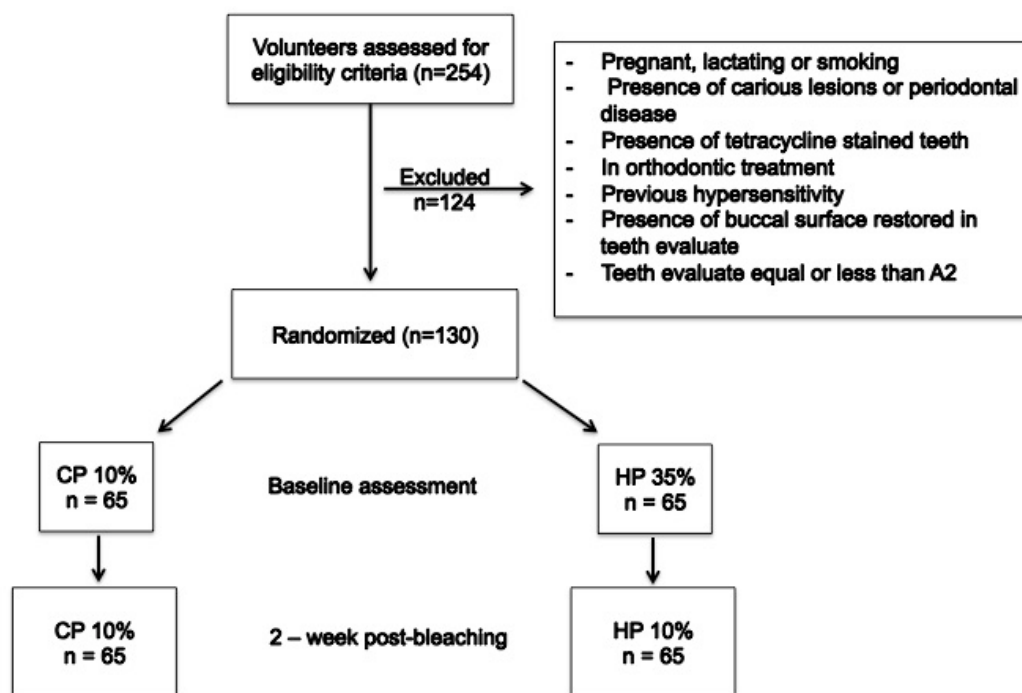
\*\*Different lowercase letters indicate differences between different periods of evaluation within each treatment group.

Table 7. Degrees of tooth sensitivity reported by volunteers in different treatment groups.

|           | Degree       | First day  | 1 week     | 2 weeks    | 1 week<br>after | 2 week<br>after |
|-----------|--------------|------------|------------|------------|-----------------|-----------------|
| At-home   | None         | 55 (84.6%) | 31 (47.7%) | 38 (58.5%) | 62 (95.4%)      | 63 (96.9%)      |
|           | Mild         | 7 (10.8%)  | 23 (35.4%) | 19 (29.2%) | 3 (4.6%)        | 2 (3.1%)        |
|           | Moderate     | 3 (4.6%)   | 5 (7.7%)   | 7 (10.8%)  | -               | -               |
|           | Considerable | -          | 5 (7.7%)   | -          | -               | -               |
|           | Severe       | -          | 1 (1.5%)   | 1 (1.5%)   | -               | -               |
| In-office | None         | 41 (63.1%) | 34 (52.3%) | 34 (51.4%) | 60 (92.3%)      | 65 (100%)       |
|           | Mild         | 13 (20%)   | 21 (32.4%) | 21 (31.4%) | 3 (4.6%)        | -               |
|           | Moderate     | 10 (15.4%) | 09 (13.8%) | 6 (10%)    | 2 (3.1%)        | -               |
|           | Considerable | -          | -          | 4 (7.2%)   | -               | -               |
|           | Severe       | 1 (1.5%)   | 1 (1.5%)   | -          | -               | -               |

## Figures

Fig. 1 – Flow-chart of the trial.



## 5 Artigo 2 - Avaliação da Genotoxicidade

### Genotoxic potential of in-office and at home bleaching agents

Sandrina Henn Donassollo<sup>a</sup>, Tiago Aurélio Donassollo<sup>b</sup>, Juliana Lays Stolfo Uehara<sup>c</sup>, Marcos Britto Correa<sup>d</sup>, Maximiliano Sérgio Cenci<sup>d</sup>, Flávio Fernando Demarco<sup>d</sup>

<sup>a</sup> PhD Student, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>b</sup> Associate Professor, Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brazil.

<sup>c</sup> Undergraduate Student in Dentistry, Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brazil.

<sup>d</sup> Professor, Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas

R. Gonçalves Chaves 457

Pelotas, RS, Brazil 96015-560

Tel/Fax: 32256741 ext. 134

#### Corresponding author:

Flávio Fernando Demarco

R. Gonçalves Chaves 457 – 507

Pelotas, RS, Brazil 96015-560

Tel/Fax: 32256741 ext. 134

\*Artigo formatado segundo as normas do periódico *Brazilian Dental Journal*

## SUMMARY

While dental bleaching has been reported as the most common aesthetic treatment requested for patients in dental office, some adverse effects have been described, including the potential for develop premalignant lesions. The aim of this study was to evaluate the genotoxic response using a micronucleus (MN) assay, after the application of two different products and techniques. Twenty volunteers were selected from an ongoing clinical trial, where two bleaching protocols were used: in-office 35% hydrogen peroxide and at-home 10% carbamide peroxide. The treatments were performed according to manufacturers instructions. For the micronucleus assay, cells from the marginal gingiva were collected immediately before the first application (baseline), 15 days and 45 days after baseline. The cells were placed on a histological slide, stained by GIEMSA. To determine the MN presence, 1,000 cells were counted per slide for each patient and for each period of time. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze the results. In office treatment with 35% hydrogen peroxide showed higher genotoxicity than 10% carbamide peroxide ( $p<0.05$ ). Higher genotoxic effect was observed for in-office treatment after 15 days, decreasing at 45days after baseline. In conclusion, in office treatment resulted in a higher genotoxic effect when compared to at-home bleaching treatment.

**Keywords:** Tooth Bleaching, Genotoxicity, Micronucleus Assay, Hydrogen Peroxide, Carbamide Peroxide.

## INTRODUCTION

Dental appearance is gaining more importance in society. Vital tooth bleaching is the most common aesthetic treatment requested by patients. Many techniques and products are available for tooth bleaching (1,2,3). The at-home bleaching using custom-tray is the most frequently recommended. However, some patients do not adapt well to this protocol or do not prefer to use a bleaching tray for 2-3 weeks. In this case, in-office bleaching is the best alternative (4,5,6,7).

At-home and in-office bleaching are usually carried out with 10% carbamide peroxide and 35% hydrogen peroxide, respectively. While these bleaching protocols can effectively improve tooth color, some adverse effects have been reported to both treatments. Tooth sensitivity is the most frequent adverse effect observed for patients undergoing vital bleaching (8).

Also, some reports have highlighted the potential to develop premalignant lesions (9). In relation to the whitening products that have been associated with an increased risk of oral cancer, DNA strand breaks, genotoxicity and cytotoxicity are those containing hydrogen peroxide, which generate reactive hydroxyl radicals that can oxidize lipid and produce oxidative deoxyribonucleic acid (DNA) damage (8,10). Noteworthy, hydrogen peroxide is also produced as a consequence of carbamide peroxide breakdown. Nevertheless, the concentration of hydrogen peroxide seems to be important when disclosing the genotoxic response.

When bleaching treatments are properly done, the chances to generate genotoxic or mutagenic response are reduced. However, the repetitive use of bleaching product containing high peroxide concentration or extensive bleaching times could increase the hazardous effect (8), especially when these peroxide agents are associated with another mutagenic products, such as alcohol and tobacco (11).

The collection of exfoliated cells from the oral cavity holds great promise as a minimally invasive method for monitoring populations exposed to genotoxic agents (12).

Thus, the aim of this study was to evaluate *in vivo* the genotoxic effect of two bleaching agents (10% carbamide peroxide and 35% hydrogen peroxide) in gingival epithelial cells of patients undergoing tooth whitening.

## MATERIAL AND METHODS

### Tooth Bleaching

The Ethics Research Committee from the University of Cruz Alta, Brazil, approved this study (# 462.122). Based on pre-established criteria, 20 volunteers from the city of Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil, were randomly selected from an ongoing triple-blind randomized clinical trial (RCT). The RCT was comparing the efficacy and tooth sensitivity produced by two different bleaching techniques, in-office bleaching protocol using 35% hydrogen peroxide (Whiteness HP Blue, FGM Dental Products, Joinville, Santa Catarina, Brazil) and at-home bleaching using 10% carbamide peroxide (Whiteness Perfect, FGM Dental Products, Joinville, Brazil). To participate in the study, all subjects signed an informed consent form.

More details about the RCT methodology could be found elsewhere (13). In summary, the subjects included in the RCT needed to be at least 18 years old and they should present good oral and general health. Also, the volunteers should have central incisors with a color B2 or darker, determined by the spectrophotometer (Easy Shade, VITA, Bad Säckingen, Baden-Württemberg, Germany). Participants were excluded from this study if they were smokers, were braces, had undergone tooth-whitening procedures, were pregnant or lactating, had labial surface restoration on the central incisors, had severe internal tooth discoloration (such as pulpless teeth, fluorosis and tetracycline stains), tooth sensitivity and tooth with abrasion, erosion and abfraction. In the RCT, 130 participants were randomly allocated into two groups (n=75) according to the bleaching techniques (in-office and at-home).

In order to warranty blinding for volunteers and for evaluators the two groups were submitted to an effective bleaching treatment and to a mock bleaching treatment. Briefly, the volunteers allocated to the in-office bleaching protocol, after having the gingival tissue isolated using a light-cured resin dam (Top Dam, FGM Dental Products, Joinville, Santa Catarina, Brazil), received a 40-minutes treatment with 35% hydrogen peroxide in the dental office. In the same session, the participants received the instructions for at-home bleaching. However, the at-home bleaching was carried out with a placebo gel. The subjects from the at-home bleaching received in-office bleaching with placebo in a protocol similar to the first group, and the at-home treatment with a tray and 10% carbamide peroxide gel (Whiteness Perfect, FGM, Brazil). All subjects were instructed to wear the tray with agent for at least 2 hours, over a 2-week interval, which was similar to the recommended for the mock at-home treatment in the first group.

### Cytology and Micronucleated (MN) assay

Cells from the gingival margin were collected with cytological brushes (Vagispec, Adlin Plásticos Ltda, Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brazil) in three moments (before bleaching–baseline, 15 and 45 days after performing the treatments). Brushes containing cells were transferred to a centrifuge tube containing phosphate-buffered saline, with pH = 6.8 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The tube were centrifuged for 10min at 1,000 rpm and after that fixed with methanol (Vetec, Xerém, Brazil) and acetic acid (3:1) (Synth, Diadema, Brazil). Hydrolysis was performed using 1 N HCL (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) at 60°C for 10min. The slides were stained using Giemsa (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA).

To determine the MN presence, 1,000 cells were counted per slide for each patient and for each period of time. A trained and blinded examiner evaluated the presence of MN in an optical microscope (Olympus CX 21, São Paulo, São Paulo, Brazil) under 400x magnification.

The MV were characterized according to the following criteria: (a) regular contour; round or elliptical, and inside the cell cytoplasm; (b) similar color to the principal nucleus; (c) less than one-third of the diameter of the nucleus; (d) completely separated from the nucleus, allowing clear identification between the nucleus and MN limits.

The data were subject to statistical analysis using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, with SPSS software (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA). The statistical significance was established with  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Twenty patients enrolled in the randomized clinical trial were selected for the genotoxicity study. Ten patients were randomly selected from in-office protocol and 10 from at-home protocol. No loss was observed during follow-up.

There was formation of micronucleated cells in both bleaching tested. Table 1 shows the mean and median micronucleated cell over the follow-up period. At baseline, both groups were similar and few micronucleated cells were observed in the in-office group, without statistical difference from at-home group. The mean and median at the 15 and 45 days follow-ups were greater for the in-office group (35% HP) compared to at-home group (10% CP), with statistical difference between groups ( $p < 0.05$ ).

Table 1 also shows that the values for in office group decreased from the 15 days to the 45 days ( $p < 0.05$ ), indicating a significant drop in the presence of micronucleated cell rate,

but the values after 45 days were still higher than baseline. For the at-home treatment the values did not significantly change during the different periods evaluated.

## DISCUSSION

The overall result observed in this study is that in-office bleaching treatment produced a genotoxic effect on gingival cells when compared to at-home bleaching protocol. The genotoxicity of dental bleaching has been reported as a potential adverse effect (9,11). In this study, both bleaching treatment exhibited the presence of micronucleus (MN), but for 10% carbamide peroxide there was none significant difference between baseline and the other periods observed. These findings are not in agreement with the results observed for other study (9), which observed a moderate level of cell damage when evaluating micronucleous formation after using 10% or 16% carbamide peroxide, at the day 15. After these periods, the authors observed a decrease in genotoxic effect with at-home protocols, with values similar to the baseline, in accordance with the results observed in our study. The genotoxic effect has been related to the presence of hydrogen peroxide, which discloses a mutagenic potential, especially when present in high concentration (14,15,16,17). Noteworthy, 10% carbamide peroxide breaks down during bleaching treatment and release hydrogen peroxide at a concentration around 3% (18), which is a concentration significantly lower that the observed for in-office bleaching protocols using over 30% hydrogen peroxide concentration.

Indeed, a clear genotoxic effect was detected when using the in-office protocol with 35% hydrogen peroxide. The detrimental effect was at the highest peak after 15 days and decreased overtime. The micronucleous formation decreased in the period after 45 days, but it was still higher than the baseline values. These results corroborate those observed previous reports when hydrogen peroxide was tested, where the micronucleus frequency was higher and statistically more significant than other bleaching agents, including carbamide peroxide (17).

The genotoxic effects of hydrogen peroxide are the results of the formation of free radicals which can damage a number of intracellular structures and the literature suggests that the higher the concentration, the greater side effects are expected (8) which may explain the results showed in this study. For safety reasons, vital bleaching with low agent concentrations and minimal amount are preferred. Carbamide peroxide could be the best choice, avoiding prolonged and concentrated exposures (9,17).

The frequency of micronucleus cells in this study was expected because the damage due to the use of bleaching agents that leads to MN formation takes place in the basal layer of

the epithelial tissue, where cells undergo mitosis (9,19). After 45 days, the micronucleus frequency decreases significantly in this study. This fact can be explained because the rapid turnover of epithelial tissues brings the cells to the surface, where they exfoliate. The turnover time of the epithelium is the time needed for a cell to divide and pass through the entire epithelium. It ranges from 10 to 12 days (9,19,). Then after 45 days of starting treatment, the cells were 30 days without contact with the gel, with time needed for exfoliation and formation of new cells, showed the regenerative potential of human buccal mucosal tissue. Considering the significant decline in micronuclei frequency after 45 days the observed effects could not be indicated as biologically relevant.

The genotoxicity assay is an important form of evaluates the effect of bleaching agents about oral mucosa. The presence of micronucleus cells has been associated with genetic defects, accelerated ageing, oral cancer risk and exposure to genotoxic agents (12).

Bleaching protocols using at-home or in-office therapies have been demonstrated to be effective in whiter discolored or dark teeth (6,8,20). The adverse effects tend to be minimal when properly used and when avoiding prolonged or repetitive use. However, clinicians should be aware in relation to the possible misuse of bleaching treatments for patients, especially when considering the large availability of bleaching products, especially those over-the-counter products, where the patient can easily buy and use these products, which can increase the risk of health damages (1). Therefore, agencies responsible for the release of these products in the market should inform the potential detrimental effect with the product overuse and clinicians should aware the patients to perform bleaching treatment under professional supervision, preferring low concentration agents for the proper time, which certainly can reduce the potential for hazardous effect.

## CONCLUSIONS

Despite the limitations of the present study, it can be concluded that:

In office treatment with 35% hydrogen peroxide produced a greater genotoxic effect when compared to at-home treatment with 10% carbamide peroxide. The effect tends to be reduced overtime, after bleaching cessation.

## RESUMO

O clareamento dental tem sido relatado como o tratamento estético mais comum solicitado por pacientes em consultório dentário. No entanto, alguns efeitos adversos têm sido demonstrados, entre eles, o potencial para desenvolver lesões pré-malignas. O objetivo deste estudo foi avaliar a genotoxicidade através de ensaio de micronúcleo (MN) de dois tratamentos clareadores. Vinte pacientes foram selecionados a partir de um ensaio clínico randomizado, no qual foram utilizados dois protocolos de clareamento: de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% e caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10%. Os tratamentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio de micronúcleo, células da gengiva marginal foram coletadas antes do tratamento clareador (*baseline*), 15 dias e 45 dias após o início do tratamento. As células preparadas e colocadas em uma lâmina histológica, após coradas com a técnica de GIEMSA. Para determinar a presença MN, 1000 células foram contadas por lâmina para cada paciente e para cada período de tempo. Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para analisar os resultados. O tratamento clareador de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% mostrou maior genotoxicidade quando comparado com o tratamento clareador caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10% após 15 dias de tratamento, diminuindo após 45 dias. Baseado nisso, pode-se concluir que o tratamento clareador de consultório resultou em um maior efeito genotóxico quando comparado com o clareamento clareador caseiro.

## REFERENCES

1. Demarco FF, Meireles SS, Masotti. Over-the-counter whitening agents: a concise review. *Braz Oral Res* 2009; 23: 64-70.
2. Da Costa JB, Mcpharlin R, Paravina RD, Ferracane JL, Wang M. Comparison of at-home and in-office tooth whitening using a novel shade guide. *Oper Dent* 2010; 35: 381-388.
3. Mondelli RFL, Azevedo JFDG, Francisconi AC, Almeida M, Ishikiriana SK. Comparative clinical study of the effectiveness of different dental bleaching methods – two year follow-up. *J Appl Oral Sci* 2012; 20: 435-443.
4. Matis BA, Cochran MA, Eckert G. Review of the effectiveness of various tooth whitening systems. *Oper Dent* 2009; 34: 230-235.
5. Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 18: CD006202.
6. Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. Efficacy and safety of 10% and 16% carbamide peroxide tooth-whitening gels: a randomized clinical trial. *Oper Dent* 2008; 33: 606-612.
7. 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: 199-204.
8. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully CBE. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J* 2006; 200: 371-376.
9. Almeida AF, Torre EN, Selayaran MS, Leite M, Demarco FF, Loguercio AD et al. Genotoxic potential of 10% and 16% carbamide peroxide in dental bleaching. *Braz Oral Res* 2015; 29: 1-7.
10. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 301-315.
11. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Investig* 2010; 14:1-10.
12. Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Burgaz S et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay – a first stage in the HUMN<sub>XL</sub> project initiative. *Mutagenesis* 2009; 24: 295-302.
13. Henn\_Donassollo S. Avaliação da eficácia e dos efeitos adversos de diferentes técnicas clareadoras através de ensaios *In vivo*, *In situ* e *In vitro*. Tese. 2015

14. Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncol* 2006; 42: 668-674.
15. Klaric E, Par M, Profeta I, Kopjar N, Rozgaj R, Kasuba V et al. Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10: 209-215.
16. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects – a review. *Quintessence Int* 2008; 39: 645-659.
17. Fernández MR, Carvalho RV, Ogliari FA, Beira FA, Etges A, Bueno & M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. *Int Endod J* 2010; 43: 102-108.
18. Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. Efficacy and Safety of 10% and 16% Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial 6-month follow-up. *J Dent* 2008; 36: 878-884.
19. Tadin A, Galic N, Mladinic M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D. Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clin Oral Investig* 2014; 18: 87-96.
20. 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: 386-393.
21. Polydorou O, Wirsching M, Wokewitz M, Hahn P. Three-month evaluation of vital tooth bleaching using light units – a randomized clinical study. *Oper Dent* 2013; 38: 21-32.

Table 1. Number of micronucleated cell (MN) of different point of time for two bleaching: in-office and at home. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test.

|           | Baseline       |             | 15 days        |               | 45 days        |               |
|-----------|----------------|-------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|           | Mean<br>(SD)   | Median      | Mean<br>(SD)   | Median        | Mean<br>(SD)   | Median        |
| Bleaching |                |             |                |               |                |               |
| In-office | 0.20<br>(0.63) | 0 <b>Aa</b> | 4.90<br>(3.28) | 4.5 <b>Ab</b> | 1.40<br>(1.43) | 1.5 <b>Ac</b> |
| At-home   | 0.0<br>(0.0)   | 0 <b>Aa</b> | 1.10<br>(1.85) | 0 <b>Ba</b>   | 0.20<br>(0.42) | 0 <b>Ba</b>   |

\* Different capital letters in the same column are indicating statistically difference between different treatments in the same time ( $p < 0.05$ ).

\*\*Different lower letters in the same line are indicating statistically difference between times in the same bleaching treatment.

## 6 Artigo 3 - Ensaio In situ e In vitro

Title: In situ and In vitro effects of two bleaching treatments on human enamel hardness

Short title. In vitro and in situ Hardness of bleached enamel.

Sandrina Henn\_Donassollo<sup>a</sup>, Cristiane Fabris<sup>b</sup>, Morgana Gagliola<sup>b</sup>, Ícaro kerber<sup>b</sup>, Vinícius Caetano<sup>b</sup>, Vitor Carboni<sup>b</sup>, Mabel Miluska Suca Salas<sup>c</sup>, Tiago Aurélio Donassollo<sup>c</sup>, Flávio Fernando Demarco<sup>d</sup>

a PhD Student, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

b Undergraduate Student in Dentistry, Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brazil.

c Associate Professor, Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brazil.

d Professor, Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas

R. Gonçalves Chaves 457

Pelotas, RS, Brazil 96015-560

Tel/Fax: 32256741 ext. 134

### Corresponding author:

Flávio Fernando Demarco

R. Gonçalves Chaves 457 – 507

Pelotas, RS, Brazil 96015-560

Tel/Fax: 32256741 ext. 134

\*Artigo formatado segundo as normas do periódico *Brazilian Dental Journal*.

## Summary

The aim of this study was to evaluate in vitro and in situ the effects of two bleaching treatments on human enamel surface microhardness. Sixty enamel slabs obtained from recently extracted thirty molars were used. The specimens were polished under water cooling using grit sandpaper. The enamel samples were randomly divided in four groups, treated with 10% Hydrogen Peroxide (HP) or Whitening Strips (WS) containing 10% Hydrogen Peroxide, using two conditions in vitro or in situ model. For in situ condition, six volunteers were selected and wore an intra-oral appliance containing enamel slabs, while for in vitro condition the specimens were kept in deionized water after the bleaching protocols. The bleaching treatments were applied one hour daily during 14 days. Similar amounts of bleaching agents were used in the two conditions. Before and after bleaching treatments, microhardness was carried out. Statistical analysis (ANOVA and Tukey tests) showed that in the in situ condition there was no statistically significant microhardness reduction in the bleached enamel ( $p>0.05$ ). Significant decrease in hardness was observed for enamel slabs bleached with both treatments in the in vitro condition ( $p<0.05$ ). Regarding the bleaching agents, in situ results showed no difference between HP and WS, while in vitro, WS produced the lowest hardness value. It would be concluded that there was none deleterious effect on enamel, produce by any of the bleaching protocols used in the in situ model. The reduction of hardness was only seen in vitro.

Keywords: Tooth Bleaching. Hardness. Hydrogen Peroxide. In situ. In vitro.

## INTRODUCTION

Nowadays, there is a high demand in dental offices for treatments that improve the aesthetic appearance (1). Facial aesthetics harmony has been associated with perfect smiles and satisfaction with dental appearance. In this context, tooth colour plays an important role in the perceptions of aesthetics and satisfaction with dental appearance (2,3). Tooth bleaching has become a popular treatment, with a large variability of commercial presentations that could be applied in the dental office, at-home under the supervision of the dentist or using over-the-counter (OTC) products without professional supervision (4).

Vital tooth bleaching is a non-invasive treatment that can be used to improve tooth colour. Depending on the kind of product and application used, the colour improvement could be clinically relevant and can be maintained even after long periods (up to two years) (2,4). Usually the bleaching treatments are well accepted by patients (5), and could have a positive impact in the individuals' oral health quality of life (2). While there is some sound scientific evidence regarding the effectiveness from at-home and in office treatments, the over-the-counter products, despite their increased application, still present little evidence in relation to their bleaching effect, except for hydrogen containing bleaching strips (4,6).

One of the potential adverse effect related to vital bleaching, is the occurrence of hypersensitivity (6), which depends from the bleaching concentration used. Usually, sensitivity is mild to moderate but transitory, and could be treated with remineralizing agents or by the interruption of the treatment (7). Sensitivity might have a negative impact in the patients (2). The sensitivity observed during bleaching treatment has been related to the mineral removal, resulting in increased porosity on the enamel surface and subsurface (8). The decrease in enamel hardness has been used frequently as an indicator of the mineral loss following bleaching procedures (9). Most of the in vitro studies demonstrated a significant reduction in the enamel hardness (10,11). However, few studies simulated the conditions observed in the oral cavity, and in such conditions the decrease in hardness could hardly be seen, due to the remineralizing effect from human saliva (9).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the microhardness of human enamel using in vitro and in situ models and two different bleaching protocols (at home and OTC products). The hypothesis to be tested was that when bleaching protocols were performed under in situ conditions in the oral cavity, the harmful effect of mineral loss would not be observed, despite the bleaching protocol.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethical Aspects

The Ethics Research Committee of the University of Cruz Alta, Brazil approved this clinical trial (protocol number 462.123). Based on pre-established criteria, six volunteers agreed to participate during the in situ part and signed an informed consent term. Human teeth were obtained from the bank of teeth and consent terms for donations were also obtained.

### Preparation of the enamel specimens

Thirty recently extracted third molars were used in this study. The extraction was performed for orthodontic reasons. All teeth were examined under magnification (40x) to detect defects in the surface. The crowns of the selected tooth were cut at the CE-junction and the pulp was removed. The crowns were sectioned longitudinally from the middle third of buccal and lingual surfaces ( $5\text{mm}^2 \times 5\text{mm}^2 \times 2\text{mm}^2$ ) (9).

Sixty enamel slabs were obtained. The samples were embedded in 1% chloramine and stored at 5°C until their use. Before the hardness measure, all specimens' surfaces were prepared. The specimens were included in a metallic matrix and the enamel surface was polished under water-cooling with decreasing grit sandpapers (400, 600 and 1200) to obtain flat standardized enamel surfaces for 40 seconds.

### Initial measurements

The Knoop microhardness test was used. Before bleaching treatments, the hardness of the samples was obtained using a micro hardness-testing machine (Buehler, Model 1600, Lake Buff, IL, USA). Three indentations were made on each specimen using a 50g loading for 10 seconds. Each indentation was performed in a distance of 100µm between them to guarantee any interfering between each indentation.

Then, the enamel slabs were randomly assigned to four different groups (n=15) considering the type of condition (in situ or in vitro condition) and the bleaching agent used (10% hydrogen peroxide gel – HP – or 10% Hydrogen peroxide in strips – WS). Composition and details of the bleaching agents used in the study are described in Table 1.

### In situ conditions

Six undergraduate dental students were volunteers for the In situ experiment. Previously, full-arch maxillary impressions and stone cast models based in the impressions were obtained. Six intra-oral acrylic appliances were prepared and thirty enamel slabs were

randomly allocated and included in these appliances as follow: three appliances with four specimens and three appliances with six specimens each.

The volunteers were instructed to remove the appliances from the oral cavity once a day to perform the bleaching outside the oral cavity. The enamel slabs were covered with 0.05ml of 10% hydrogen peroxide (HP) and with a piece of 5mm by 5mm of whitening strips (WS) for one hour. After this period, the bleaching gel or the strips was removed from enamel surface and the volunteers placed the appliances again in their oral cavities, for more 23 hours to simulate clinical conditions. The bleaching protocols were conducted during 14 days.

#### In vitro conditions

The enamel slabs received the application of 0.05ml from either 10% HP gel or WS, which remained in place for one hour. After the removal of the bleaching agent, in the next 23 hours, the enamel slabs were individually placed in containers with deionized water. The bleaching protocols were performed for 14 days.

#### Final measurements

Twenty-four hours after bleaching conclusion in the conditions tested, the enamel slabs were removed from the appliances or the containers and were again included and fixed in acrylic resin matrices previously confectioned. The bleached enamel surfaces were submitted to Knoop microhardness test using the same protocol for initial measurements.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Sigma Stat 3.5 statistical software package (Informer Technologies, Inc, San Jose, California). Equality of variance ( $p > 0.05$ ) was first performed to see if the values showed a normal distribution. Mean values were obtained for each specimen considering the three measurements taken. Three factors were under investigation: study method (in vitro and in situ), time (before and after bleaching) and type of bleaching product (10% HP or WS). The analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used. An addition Tukey post-hoc test was carried out to identify differences among the groups. All analyses were carried out with a confidence level of 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

Knoop hardness values exhibited a normal distribution in the study. In Table 2 the results from hardness measurements considering the different conditions tested are observed. In the in situ condition, no significant statistical difference in enamel hardness, for both bleaching protocols was observed. Significant decrease in enamel hardness was only observed for those specimens treated with HP or WS in the in vitro condition ( $p < 0.05$ ). Comparing the two bleaching protocols (HP or WS), only in the in vitro condition a lower hardness was observed for WS compared to the enamel treated with HP. The results from the in situ model showed no statistical difference between any of the bleaching protocols.

## DISCUSSION

The hypothesis tested in the present study was confirmed. Despite the bleaching protocol (10% HP gel or 10% HP whitening strips) no significant difference in the enamel hardness was observed, different from the in vitro condition that showed a significant decrease of hardness in both bleaching agents.

Previous reports have demonstrated that the use of hydrogen peroxide or carbamide peroxide over enamel surface produced a decrease in hardness, when applied in vitro (12,13). In this in vitro condition, bleaching agents can significantly alter the enamel surface, and the composition could also be modified, due to the removal of some components such as calcium and phosphate, and as a consequence, the hardness could be reduced (13,14). In opposite, when the peroxide agents are applied in conditions resembling the oral cavity, like in situ methods, usually the decrease in hardness is reduced or avoided due to the human saliva action, and even with the mineral loss, there will occur the remineralization effect of saliva (9,15). Recently a study (16) showed that microhardness decreased immediately after the bleaching, however after seven days of bleaching, regardless the type of treatments, microhardness values were the same. The study sustained the importance of the remineralizing potential of saliva (16). Saliva protects from desmineralization by the presence of the salivary pellicle, providing calcium and phosphorous, the buffer capacity capable to neutralize the environment and due to its clearance potential (17). In situ studies showed that the salivary pellicle formed over enamel could protect the enamel surface within a period of 3 minutes from citric acid and reduce the effects of erosive acids for two hours (18,19). Thus, it was speculated that the presence of the salivary pellicle could be responsible for the lack of changes on enamel microhardness (15), demonstrating that the loss of mineral tissue observed in vitro following bleaching treatments are not prone to happen in clinical situation. Other in

situ studies corroborate our findings, where enamel hardness was not affected by acidic challenge in the presence of saliva (15,20).

The type of bleaching agent and the concentration of these agents could also affect the bleaching efficacy and the potential adverse effect (2). Hydrogen peroxide is a stronger bleaching than carbamide peroxide. In the present study the same concentration of hydrogen peroxide was used, but different methods of applications: HP gel and whitening strips. Whitening strips are an OTC method easy to use and less expensive than at home or in office methods, presenting some efficacy in tooth color recovering (21) and these are some of the reasons for their growing popularity (4). Few studies have investigated microhardness of enamel after the use of hydrogen peroxide strips and the results demonstrated any deleterious effect on the enamel microhardness (22,23). In the present study, when applied in situ, there was none difference in enamel hardness between those enamel slabs bleached with 10% HP gel of 10% HY WS. In the in vitro condition, a higher decrease in hardness was observed for WS group compared to HP gel group. One previous study has showed that enamel microhardness after the application of 10% carbamide peroxide gel and 6.5% hydrogen peroxide strips was significantly reduced in vitro (24).

These results can be explained due to the presence de calcium in the 10% HP gel (White Class). The manufacturer suggests that calcium is intended to minimize the enamel demineralization process. Studies have reported that adding calcium in the bleaching agents prevents changes in enamel hardness and morphology without reducing bleaching efficacy, in vitro (25).

Some limitations should be considered. The difference between products is one of these points to be highlighted. The 10% HP (White Class-FGM), besides hydrogen peroxide in its composition, has also potassium nitrate, sodium fluoride and calcium. The white strips do not present calcium and this can influence the results. Other fact is that samples were storage in deionised water on the vitro essay. However, the study of Parreira et al, found no different microhardness results using saliva or distillate water in vitro (12).

This study highlights the importance of study design in the evaluation of adverse effects following bleaching treatments. It seems that the results pointing for adverse effects on enamel surface after bleaching observed by in vitro studies should be considered with caution, since the in situ models have demonstrated that they could not occur in the clinical condition.

Within the limitations of this study it would be concluded that there is none deleterious effect of bleaching protocols using 10% HP or WS when using a model that simulate the oral cavity and reduction of hardness could only see in vitro.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in situ* os efeitos de dois tratamentos de clareamento na microdureza de esmalte humano. Foram utilizados sessenta blocos de esmalte obtidos de trinta molares recentemente extraídos. Os espécimes foram polidos sob refrigeração com água usando lixas. As amostras de esmalte foram divididas aleatoriamente em quatro grupos e tratadas com 10% de peróxido de hidrogênio (HP) ou fitas de clareamento (WS) contendo 10% de peróxido de hidrogênio, testadas em duas condições experimentais *in vitro* ou *in situ*. Em relação ao ensaio *in situ*, seis voluntários foram selecionados e usaram um aparelho intra-oral contendo blocos de esmalte, enquanto que para a condição *in vitro*, os espécimes foram mantidos em água deionizada após os protocolos de clareamento. Os tratamentos clareadores (HP ou WS) foram aplicadas durante uma hora / dia durante 14 dias. Quantidades semelhantes de agentes de clareamento foram usadas nas duas condições. Antes e após os tratamentos de clareamento, a medida de microdureza foi realizada em 50g por 10s. A análise estatística (ANOVA e teste de Tukey) mostrou que, na condição *in situ* não houve redução estatisticamente significativa na microdureza do esmalte clareado ( $p > 0,05$ ). Diminuição significativa na dureza foi observada nos blocos de esmalte clareados, em ambos os tratamentos, na condição *in vitro* ( $p < 0,05$ ). Em relação aos agentes de clareamento, os resultados *in situ* não mostraram nenhuma diferença entre a HP e WS, enquanto que *in vitro*, WS produziu o menor valor de dureza. Conclui-se que não houve nenhum efeito deletério na dureza do esmalte, em nenhum dos protocolos de clareamento ao usar um modelo que simula a cavidade oral. A diminuição da dureza foi observada somente na condição *in vitro*.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the TWAS /CNPQ (process 83903402087/ 190268/2010-7) for the full-Time Postgraduate Fellowship provided to one of the co-author.

## REFERENCES

1. Poonam. Dental Aesthetics and patient satisfaction, a hospital based survey. Arch Oral Sci Res. 2011;1-3.
2. Meireles SS, Santos IS, Bona AD, Demarco FF. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. J Dent. 2010;38:956-963.
3. Spear FM, Kokich VG, Mathews DP. Interdisciplinary management of anterior dental esthetics. J Am Dent Assoc. 2006;137:160-169.
4. Demarco FF, Meireles SS, Masotti AS. Over-the-counter whitening agents: a concise review. Braz Oral Res. 2009;23 Suppl 1:64-70.
5. Tsubura S, Yamaguchi R. Clinical evaluation of a new bleaching product "Polanight" in a Japanese population. Odontology. 2005;93:52-55.
6. Swift EJ, Jr., Heymann HO, Wilder AD, Jr., Barker ML, Gerlach RW. Effects of duration of whitening strip treatment on tooth color: a randomized, placebo-controlled clinical trial. J Dent. 2009;37 Suppl 1:e51-56.
7. Armenio RV, Fitarelli F, Armenio MF, Demarco FF, Reis A, Loguercio AD. The effect of fluoride gel use on bleaching sensitivity: a double-blind randomized controlled clinical trial. J Am Dent Assoc. 2008;139:592-597.
8. Demarco FF, Meireles SS, Sarmiento HR, Dantas RV, Botero T, Tarquinio SB. Erosion and abrasion on dental structures undergoing at-home bleaching. Clin Cosmet Investig Dent. 2011;3:45-52.
9. Justino LM, Tames DR, Demarco FF. In situ and in vitro effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. Oper Dent. 2004;29:219-225.
10. Borges AB, Zanatta RF, Barros AC, Silva LC, Pucci CR, Torres CR. Effect of hydrogen peroxide concentration on enamel color and microhardness. Oper Dent. 2015;40:96-101.
11. Silva AF, Demarco FF, Meereis CT, Cenci MS, Piva E. Light-activated bleaching: effects on surface mineral change on enamel. J Contemp Dent Pract. 2014;15:567-572.
12. Parreiras SO, Vianna P, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. Effects of light activated in-office bleaching on permeability, microhardness, and mineral content of enamel. Oper Dent. 2014;39:E225-230.

13. Salomao D, Santos D, Nogueira R, Palma-Dibb R, Geraldo-Martins V. Acid demineralization susceptibility of dental enamel submitted to different bleaching techniques and fluoridation regimens. *Oper Dent*. 2014;39:E178-185.
14. Ferreira Sda S, Araujo JL, Morhy ON, Tapety CM, Youssef MN, Sobral MA. The effect of fluoride therapies on the morphology of bleached human dental enamel. *Microsc Res Tech*. 2011;74:512-516.
15. Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jiang T, et al. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: an in situ vs. in vitro study. *J Dent*. 2012;40 Suppl 1:e26-34.
16. Borges AB, Guimaraes CA, Bresciani E, Ramos CJ, Borges AL, Rocha Gomes Torres C. Effect of incorporation of remineralizing agents into bleaching gels on the microhardness of bovine enamel in situ. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15:195-201.
17. Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:88-99.
18. Hannig M, Fiebiger M, Guntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch. Oral Biol*. 2004;49:903-910.
19. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Investig*. 2003;7:158-161.
20. Sa Y, Wang Z, Ma X, Lei C, Liang S, Sun L, et al. Investigation of three home-applied bleaching agents on enamel structure and mechanical properties: an in situ study. *J Biomed Opt*. 2012;17:035002.
21. Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006:Cd006202.
22. Duschner H, Gotz H, White DJ, Kozak KM, Zoladz JR. Effects of hydrogen peroxide bleaching strip gels on dental restorative materials in vitro: surface microhardness and surface morphology. *J Clin Dent*. 2004;15:105-111.
23. White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner HJ, Gotz H. Effects of Crest Whitestrips bleaching on surface morphology and fracture susceptibility of teeth in vitro. *J Clin Dent*. 2003;14:82-87.
24. Soldani P, Amaral CM, Rodrigues JA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010;30:203-211.
25. Alexandrino L, Gomes Y, Alves E, Costi H, Rogez H, Silva C. Effects of a bleaching agent with calcium on bovine enamel. *Eur J Dent*. 2014;8:320-325.

Table 1 – Characteristics of the bleaching agents tested.

| Group | Bleaching agent | Chemical characteristics                                                 | Manufacturers | Application technique |
|-------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------|
| 1     | White Class     | Hydrogen Peroxide 10%<br>Calcium<br>Nitrate potassium<br>Sodium fluoride | FGM           | 60min per day         |
| 2     | White Strips    | Hydrogen Peroxide 10%                                                    | Oral B        | 60min per day         |

Table 2. Means (SD) of micro hardness (KHN) pre and post bleaching for different conditions and different products.

| Conditions      | Pre                   | Bleaching | Post                  | Bleaching | Pre                   | Bleaching | Post                  | Bleaching |
|-----------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|                 | Hydrogen Peroxide     |           | Hydrogen Peroxide     |           | Whitening Strips      |           | Whitening Strips      |           |
|                 | Mean (KHN) $\pm$ SD   |           | Mean (KHN) $\pm$ SD   |           | Mean (KHN) $\pm$ SD   |           | Mean (KHN) $\pm$ DP   |           |
| <i>In Situ</i>  | 244.17 $\pm$ 37.88 Aa |           | 247.05 $\pm$ 31.11 Aa |           | 240.37 $\pm$ 36.18 Aa |           | 244.17 $\pm$ 37.88 Aa |           |
| <i>In Vitro</i> | 238.97 $\pm$ 51.85 Aa |           | 213.41 $\pm$ 34.24 Bb |           | 217.55 $\pm$ 32.63 Aa |           | 187.78 $\pm$ 34.28 Bc |           |

\*Different upper letters in the same column indicated statistically difference between In situ and In vitro ( $p < 0.05$ ).

\*\*Different lower letters in the same line indicated statistically difference between bleaching agents in the same assay ( $p < 0.05$ ).

## 7. Considerações gerais

Neste estudo procuramos abordar uma série de investigações relacionadas ao clareamento de dentes vitais, utilizando-se diferentes materiais e diferentes modelos de estudos (*In vitro*, *In situ* e ensaio clínico).

A primeira pergunta colocada foi se existiria diferenças em termos de eficácia e sensibilidade dentinária produzidas pelo tratamento clareador no consultório (In-office) utilizando-se agentes com alta concentração, peróxido de hidrogênio a 35% ou utilizando o tratamento caseiro com moldeiras (at-home) utilizando peróxido de carbamida a 10%. Para responder a esta pergunta foi realizado um estudo clínico randomizado, seguindo os *guidelines* recomendados pelo CONSORT. Este tipo de estudo é o mais apropriado para testar dois diferentes tratamentos, pois os grupos são randomicamente alocados aos dois tratamentos, o que garante que os grupos se encontram com características similares no *baseline*, sendo as potenciais diferenças observadas decorrentes do efeito dos tratamentos. O estudo foi triplo cego, sendo que nem os operadores, examinadores ou pacientes sabiam qual o tratamento estavam sendo alocados, o que garante maior confiabilidade dos achados. Neste ECR foi possível observar que os dois tipos de clareamento vital, tanto aquele aplicado no consultório quanto aquele aplicado em casa com o uso de moldeiras, foram eficazes em produzir um efeito clareador nos dentes tratados, sendo este resultado amparado por trabalhos prévios. Para avaliação, utilizamos a verificação objetiva da cor dental, através do espectrofotômetro, o qual permite uma melhor determinação da mudança de cor em decorrência do uso dos agentes clareadores. Quando comparados os dois tratamentos, o tratamento caseiro apresentou desempenho levemente superior ao observado para o clareamento de consultório. Esse resultado poderia estar relacionado a uma liberação mais contínua do agente clareador, tendo em vista que o agente foi aplicado diariamente por duas semanas o que possibilitaria melhor efeito.

Quando avaliada a sensibilidade, que tem sido considerada o efeito adverso mais frequente ao clareamento, foi observado que em torno de ..% dos pacientes reportaram sensibilidade, a qual foi predominantemente leve, sendo observada diferenças entre os dois tratamentos apenas no primeiro dia, com sensibilidade mais

acentuada para o tratamento de consultório, provavelmente em decorrência da maior concentração do gel, a qual poderia causar maior remoção de conteúdo mineral e consequente aumentando a porosidade superficial e permeabilidade dentinária, levando a maior sensibilidade. Também tem sido reportado que os peróxidos empregados no clareamento dental poderiam ativar receptores específicos, o que poderia ser o causador da sensibilidade seguindo o clareamento. No entanto, nenhum dos pacientes avaliados neste RCT solicitou a interrupção do tratamento clareador em decorrência da sensibilidade e não houve a necessidade de tratamento com agentes remineralizantes ou anti-inflamatórios, mostrando que a sensibilidade observada foi leve e de caráter transitório. Ainda é importante ressaltar que o efeito desmineralizante produzido pelos agentes clareadores parece ser mais observado em estudos *in vitro* do que em estudos *in situ*, quando a saliva reverte este potencial efeito adverso.

É importante destacar que nosso estudo avaliou o efeito apenas inicial dos tratamentos clareadores, ou seja poucos dias após concluídos os procedimentos. Tem sido relatado que existe a possibilidade de reversão da cor, seguindo o clareamento, o qual seria devido a ingestão de alimentos e bebidas com corantes que poderiam levar a novo escurecimento dental. No entanto, acompanhando por até dois anos o clareamento com peróxido de carbamida a 10% ou 16%, Meirelles et al. (2010) não observaram diferenças significantes na cor em relação ao *baseline*, demonstrando a estabilidade de cor do tratamento até pelo menos 2 anos. Também merece destaque que o clareamento em dentes vitais tem mostrado impacto positivo na qualidade de vida relacionado a saúde bucal dos indivíduos submetidos a este procedimento (Meireles et al., 2014).

Outro potencial efeito adverso relatado em relação ao clareamento dental, seria a possibilidade de ocorrência de lesões potencialmente malignas, as quais seriam decorrentes da ação dos peróxidos / radicais livres sobre os tecidos moles, especialmente quando associados a algum outro agente reconhecidamente carcinogênico, tais como o fumo ou o álcool. Tem sido relatado que os radicais livres poderiam levar a danos a estrutura genética das células, o que poderia ser o desenvolvedor deste efeito lesivo. Para tal, tem sido realizado o teste de genotoxicidade para avaliar este potencial de alteração celular. Pacientes randomicamente selecionados de nosso estudo clínico randomizado foram, ao longo do estudo, submetidos ao processo de coleta das células de mucosa bucal, tendo

sido observado através do teste de micronúcleo que um maior potencial genotóxico foi observado para os pacientes submetidos ao tratamento clareador no consultório, quando comparado com o clareamento vital. Essa diferença foi observada 15 dias após o início do tratamento clareador, tendo reduzido ao final do tratamento. A potencial causa do maior dano celular observado com o peróxido de hidrogênio poderia ser devida a maior concentração de peróxidos observados para o clareamento em consultório, o que poderia levar ao dano celular. Porém, como observado em nosso estudo este efeito parecer ser transitório.

O uso de tratamentos clareadores com agentes de auto-cuidado (*over the counter*) tem aumentado muito nos últimos anos, sendo que o clareamento com fitas clareadoras parece ser o mais efetivo em termos da efetividade da ação clareadora. No entanto, esse maior efeito conseguido com estas fitas poderia estar vinculado a um maior grau de desmineralização da superfície dentinária, como tem sido observado em alguns estudos *in vitro*. Porém, como foi anteriormente demonstrado por Justino et al. (2004) os resultados observados em estudos de clareamento *in vitro* parecem não acontecer quando se simula uma condição mimetizando o ambiente clínico, como por exemplo em estudos *in situ*. De fato, quando observamos em nosso terceiro estudo, foi possível observar que efeitos deletérios na superfície dentária foram apenas observados quando se utilizou uma condição *in vitro*. No entanto, quando se empregou o modelo *in situ*, nenhuma modificação significativa foi detectada em termos da dureza superficial. Essa falta de efeito deletério poderia estar associado ao efeito remineralizante da saliva sobre a estrutura dental, o que não acontece na situação *in vitro*. Deste modo, este estudo demonstra que o tipo de estudo pode significativamente influenciar na observação de achados seguindo o clareamento caseiro, e o emprego de fitas adesivas clareadoras parece um procedimento clínico de baixa complexidade, com baixo potencial deletério e com resultado efetivo.

## 8 Conclusões

Considerando-se os 3 diferentes estudos realizados para o desenvolvimento deste tese, foi possível observar que:

No ECR para avaliar a efetividade e a sensibilidade de duas técnicas clareadoras, foi possível observar que tanto o clareamento caseiro quanto o clareamento no consultório foram efetivos em melhorar a cor dos elementos dentários clareados, sendo que quando comparados os diferentes tratamentos, uma resposta ligeiramente superior em termos de efetividade foi observada para o tratamento em casa. Além disso, a sensibilidade foi na sua maioria leve e distribuída entre os dois grupos (consultório e caseiro).

Em relação a genotoxicidade, o tratamento de consultório a base de peróxido de hidrogênio a 35%, gerou formação de micronúcleos significativamente maior que o caseiro, sendo que, demonstrou uma redução significativa após a interrupção do tratamento.

Outro efeito importante observado, foi a capacidade de remineralização salivar, demonstrada através da diminuição da dureza do esmalte dental humano quando aplicado o tratamento clareador *In vitro* e a manutenção da mesma dureza do esmalte antes de clareado, quando realizado ensaio *In situ*, ou seja, quando houve o contato com a saliva.

## Referências

American Dental Association. Council on Scientific Affairs (2010). Treatment considerations for dentists and their patients. Retrieved online Jul 10, 2013 from [http://www.ada.org/sections/about/pdfs/hod\\_whitening\\_rpt.pdf](http://www.ada.org/sections/about/pdfs/hod_whitening_rpt.pdf)

ARMÊNIO, R. V.; FITARELLI, F.; ARMÊNIO, M. F.; DEMARCO, F. F.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. The effect of fluoride gel use on bleaching sensitivity: a double-blind randomized controlled clinical trial. **The Journal of the American Dental Association**, v.139, n.5, p.592-597, May. 2008.

BERNARDON, J. K.; SARTORI, N.; BALLARIN, A.; PERDIGÃO, J.; LOPES, G.; BARATIEIRI, L. N. Clinical Performance of vital bleaching techniques. **Operative dentistry**, v.35, n.1, p.3-10, 2010.

DA COSTA, J. B.; MCPHARLIN, R.; PARAVINA, R. D.; FERRACANE, J. L.; WANG M. Comparison of at-home and in-office tooth whitening using a novel shade guide. **Operative dentistry**, v.35, n.4, p.381-388, 2010.

DE LA PEÑA, V. A.; RATÓN, M. L. Randomized Clinical Trial on the Efficacy and Safety of Four Professional At-home Tooth Whitening Gels. **Operative dentistry**, v.39, n.1, p.136-143, 2013.

DEMARCO, F.F.; MEIRELES, S.S.; MASOTTI, A.S. Over-the-counter whitening agents: a concise review. **Brazilian oral research**, v.23, n.1, p.64-70, 2009.

European Commission (2007) Health & Consumer Protection. Directorate General. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products. Retrieved online Jul 10, 2013 from [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_122.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_122.pdf)

FERNANDEZ, M. R.; CARVALHO, R. V.; OGLIARI, F. A.; BEIRA, F. A.; ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **International Endodontic Journal**, v.43, p.102–108, 2010.

GOLDBERG, M.; GROOTVELD, M.; LYNCH, E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. **Clinical oral investigations**, v.14, p.1–10, 2010.

GOMES, A.S.; ABEGG, C.; FACHEL, J.M.G. Relationship between oral clinical conditions and daily performances. **Brazilian oral research**, v.23, n.1, p.76-81, 2009.

HASSON, H.; ISMAIL, A.I.; NEIVA, G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.18, n. 4, CD006202, 2006.

HAYWARD, R.; OSMAN, Y.; GROBLER, S. R. A Clinical Study of the Effectiveness of a Light Emitting Diode System on Tooth Bleaching. **The Open Dentistry Journal**, v.6, p.143-147, 2012.

JOINER, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p.412- 419, 2006.

KHANDELWAL S., SOLOMON M.C. Cytomorphological Analysis of Keratinocytes in Oral Smears from Tobacco Users and Oral Squamous Cell Carcinoma Lesions — A Histochemical Approach. **International Journal Oral Science**. v.2, n.1, p.45–52, 2010.

KOSSATZ, S.; DALANHOL, A. P.; CUNHA, T.; LOGUERCIO, A.; REIS, A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. **Operative dentistry**, v. 36, n.3, p. 251-257, 2011.

MATIS, B. A.; COCHRAN, M. A.; ECKERT, G. Review of the effectiveness of various tooth whitening systems. **Operative dentistry**, v. 34, n.2, p.230-235, 2009.

MATIS, B. A.; MATIS, J. I.; WANG, Y.; MONTEIRO, S.; AL-QUNAIAN, T. A.; MILLARD, R. Labeled vs actual concentration of bleaching agents. **Operative dentistry**, v. 38, n. 3, p. 334-343, 2013.

MEIRELES, S. S.; HECKMANN, S. S.; LEIDA, F. L.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. Efficacy and Safety of 10% and 16% Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial. **Operative dentistry**, v. 33, n. 6, p. 606-612, 2008.

MEIRELES, S. S.; FONTES, S. T.; COIMBRA, L. A. A.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. Effectiveness of different carbamide peroxide concentrations used for tooth bleaching: an in vitro study, **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n.2, p. 186-191, 2012.

MEIRELES, S. S.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. **Journal of Dentistry**, v. 38, n.12, p. 956-963, 2010.

MUNRO, I. C.; WILLIAMS, G .M.; HEYMANN, H. O.; KROES, R. Use of Hydrogen Peroxide-Based Tooth Whitening Products and its Relationship to Oral Cancer. **Journal of esthetic and restorative dentistry**, v.18, n.3, p.119-125, 2006.

PERES, K. G.; PERES, M. A.; ARAUJO, C. L. P.; MENEZES, A. M. B; HALLAL, P. C. Social and dental status along the life course and oral health impacts in adolescents: a population-based birth cohort. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 22, n.7, p. 95, 2009.

POLYDOROU, O.; WIRSCHING, M.; WOKEWITZ, M.; HAHN, P. Three-month evaluation of vitak tooth bleaching using light units: a randomized clinical study. **Operative dentistry**, v. 38, n. 1, p. 21-32, 2013.

REIS, A.; KOSSATZ, S.; MARTINS, G.; LOGUERCIO, A. D. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. **Operative dentistry**, v. 38, n. 4, p. 386-393, 2013.

SULIEMAN, M.; MACDONALD, E.; REES, J. S.; NEWCOMBE, R. G. ADDY M. Tooth Bleaching by Different Concentrations of Carbamide Peroxide and Hydrogen Peroxide Whitening Strips: An In Vitro Study. **Journal of esthetic and restorative dentistry**, v.18, n. 2, p. 93-100, 2006.

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. *American Journal of Dentistry* 2012; **25**:199-204.

TÜRKÜN, M.; CELIK, E.U.; ALADAG, A.; GÖKAY, N. One-Year Clinical Evaluation of the Efficacy of a New Daytime At-Home Bleaching Technique. **Journal of esthetic and restorative dentistry**, vol.22, n.2, p.139–148, 2010.

## **Apêndices**

**Apêndice A - Carta de informação ao paciente**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Pós Graduação em Odontologia  
Área de Concentração em Dentística**

**Carta de Informação ao Paciente**

O presente estudo será realizado para avaliação do clareamento vital caseiro com moldeiras utilizando peróxido de carbamida a 10% e o clareamento vital de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35%. Ambos os tratamentos são amplamente utilizados no clareamento de dentes com alteração de cor e foram amplamente estudados não demonstrando nenhum risco à integridade do ser humano.

Sendo assim, concordo em participar do estudo e autorizo os examinadores a fazer diagnóstico, planejamento, fotografias, moldagens e realizar o tratamento, além de avaliações planejadas nesta pesquisa em minha pessoa.

Concordo também que a documentação referente aos exames efetuados e quaisquer outras informações concernentes ao planejamento de diagnóstico e/ ou tratamento, constituem propriedade exclusiva dessa Faculdade, à qual dou plenos direitos de uso para fins de ensino e divulgação, respeitando os respectivos códigos de ética.

Passo Fundo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

Documento N°: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

**Apêndice B – Termos de consentimento ético para pesquisa em seres humanos.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Pós Graduação em Odontologia  
Área de Concentração em Dentística**

**Termo de consentimento livre e esclarecido**

**Autorização para Pesquisa Clínica e Execução de Tratamento**

Projeto: Ensaio controlado randomizado triplo cego comparando a eficácia, sensibilidade, genotoxicidade e impacto na qualidade de vida de duas técnicas clareadoras.

Responsável: Doutoranda Sandrina Henn Donassollo

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

FICHA N°: \_\_\_\_\_

Por este instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) \_\_\_\_\_, portador(a) da cédula de identidade nº \_\_\_\_\_ SSP/\_\_\_\_\_, após leitura da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(a) profissional(is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvida a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Passo Fundo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo estudo

## Apêndice C – Ficha clínica

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**Pós Graduação em Odontologia**  
**Área de Concentração em Dentística**

## Ficha para avaliação da cor dos dentes

Ficha n<sup>o</sup>:

Nome do paciente:

Grupo:

| Dentes | Avaliação objetiva da cor |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |
|--------|---------------------------|----|----|----|----|-----------------------------|----|----|----|----|-----------------------------|----|----|----|----|
|        | Baseline<br>___/___/___   |    |    |    |    | Após 14 dias<br>___/___/___ |    |    |    |    | Após 21 dias<br>___/___/___ |    |    |    |    |
|        | Vita                      | 3D | L* | a* | b* | Vita                        | 3D | L* | a* | b* | Vita                        | 3D | L* | a* | b* |
| 11     |                           |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |
| 21     |                           |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |
| Média  |                           |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |                             |    |    |    |    |

**Apêndice D – Ficha de dados pessoais e anamnese**

**FICHAS DE DADOS PESSOAIS E ANAMNESE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Pós Graduação em Odontologia  
Área de Concentração em Dentística**

Fichas de Dados Pessoais e Anamnese

Ficha nº: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Grupo: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: (   )

Profissão: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Endereço Residencial: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Tel. Residencial: (   ) \_\_\_\_\_ Tel. Celular: (   ) \_\_\_\_\_

Nome de um parente ou amigo: \_\_\_\_\_

Endereço deste: \_\_\_\_\_

Telefone deste: (   ) \_\_\_\_\_

**QUESTIONÁRIO DE SAÚDE**

| <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> |                                                     |
|------------|------------|-----------------------------------------------------|
|            |            | Esta sob tratamento médico?                         |
|            |            | Teve ou tem problemas cardíacos?                    |
|            |            | Teve ou tem tuberculose ou outro problema pulmonar? |
|            |            | É diabético?                                        |
|            |            | É alérgico ou sensível a algum medicamento?         |
|            |            | Teve ou tem problemas com anestesia?                |
|            |            | Está atualmente tomando algum medicamento?          |
|            |            | Tem hemorragia após extrações dentárias?            |
|            |            | Tem tido desmaios ou tonturas?                      |
|            |            | Gestante ou lactante?                               |
|            |            | Sua gengiva sangra quando escova os dentes?         |

OBSERVAÇÕES:

---



---



---

**QUESTIONÁRIO DE PESQUISA**

| <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> |                                                                                                      |
|------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | É fumante? Qual é a frequência/ dia?                                                                 |
|            |            | Toma com frequência, líquidos que contem corantes, como vinho tinto, coca-cola, chá mate, café, etc? |
|            |            | Apresenta dentista na família?                                                                       |
|            |            | Submetido a algum tratamento clareador nos últimos três anos?                                        |
|            |            | Está sob tratamento ortodôntico?                                                                     |
|            |            | Apresenta histórico de sensibilidade dentária prévia?                                                |
|            |            | Consumo de água mineral?                                                                             |
|            |            | Aplicação de flúor tópico na infância? Quantas vezes? (        )                                     |
|            |            | Escova os dentes diariamente? Quantas vezes? (        )                                              |
|            |            | Utiliza o fio dental para higiene bucal?                                                             |
|            |            | Ingere alimentos ou temperos que soltam corantes, como açafrão, beterraba, cenoura e etc.?           |

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, declaro, para a realização deste estudo, serem verdadeiras minhas declarações. Assumo os riscos de quaisquer eventuais problemas durante a execução de meu tratamento, decorrente de minha negligência ou omissão de fornecer as informações acima.

Passo Fundo, \_\_\_\_\_de \_\_\_\_\_de 2013

---

Assinatura do paciente

## Apêndice E – instruções a serem seguidas durante o tratamento

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA Pós Graduação em Odontologia Área de Concentração em Dentística

#### Instruções a serem seguidas durante o tratamento

- 1) Para a realização do tratamento clareador, é importante que a *higiene oral* seja realizada com frequência e de forma adequada. Escove os dentes corretamente e **NÃO ESQUEÇA** de usar o fio dental.
- 2) O clareamento caseiro deverá ser feito durante a noite. O resultado do tratamento clareador depende de sua **colaboração**.
- 3) Preencha a **moldeira** de clareamento dispensando uma pequena quantidade de gel (**gota**) na região correspondente à parte de frente dos seus dentes. Você irá utilizar um gel clareador à base de peróxido de carbamida (10%).
- 4) Posicione a moldeira carregada com gel, segurando-a com as duas mãos, sobre os dentes a serem clareados. Remova o **excesso** do gel das margens da moldeira com o dedo ou uma gaze. Se necessário, expectore o excesso do produto.
- 5) Permaneça com a moldeira em posição durante o **tempo** recomendado pelo seu dentista: **2h durante o período da noite** 14 dias.
- 6) Remova a moldeira da boca, escove-a por dentro e por fora. Seque a moldeira e coloque a na **caixa de proteção**.
- 7) **LEMBRE-SE:** não faça a ingestão de alimentos ou bebidas durante o uso da moldeira.
- 8) Após o clareamento, **enxágue** a boca com água e higienize seus dentes como de costume. Em caso de sensibilidade, evite escovar os dentes imediatamente após o clareamento.
- 9) Se ocorrer sensibilidade nos seus dentes ou irritação da gengiva, entre em contato imediatamente (**Sandrina 54 9138 9858**). Se os sintomas persistirem, interrompa o tratamento até a próxima consulta.
- 10) **EVITE ingerir alimentos com corante** (cenoura, beterraba, etc.) café, chás, vinho tinto, chimarrão e bebidas à base de cola em excesso.
- 11) **NÃO FUME**. Caso contrário, o clareamento pode não ser satisfatório.

## **Anexos**

## Anexo A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE DE CRUZ  
ALTA - UNICRUZ/RS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Ensaio controlado randomizado triplo cego comparando a eficácia, genotoxicidade e citotoxicidade de diferentes técnicas clareadoras

**Pesquisador:** Sandrina Henn

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 18393213.2.0000.5322

**Instituição Proponente:** COMPLEXO DE ENSINO SUPERIOR ESPECIALIZADA NA AREA DE SAUDE

**Patrocinador Principal:** COMPLEXO DE ENSINO SUPERIOR ESPECIALIZADA NA AREA DE SAUDE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 462.122

**Data da Relatoria:** 16/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

Vários produtos estão disponíveis no mercado para a realização de tratamento clareador em dentes vitais. O peróxido de carbamida em concentrações que variam de 10% a 22% e o peróxido de hidrogênio em concentração de 4% a 35% são os mais utilizados atualmente (DEMARCO FF et al, 2009). O clareamento dental caseiro através da utilização de moldeiras pode ser realizado com peróxido de hidrogênio 4% a 10% ou peróxido de carbamida em concentrações que variam de 10% a 35% (HAAYWARD R ET AL, 2012). No clareamento de consultório pode ser utilizado peróxido de hidrogênio 35% a 38% (MONDELLI RFL et al 2011) ou peróxido de carbamida em concentrações que variam de 35% a 44% (HAAYWARD R ET AL, 2012).

Tanto a técnica clareadora de consultório quanto a caseira demonstraram ser efetivas em diversos estudos, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre a coloração dentária obtida

**Endereço:** Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 - Caixa Postal 858

**Bairro:** Campus Universitário Prédio

**CEP:** 98.020-290

**UF:** RS

**Município:** CRUZ ALTA

**Telefone:** (55)3322-1618

**E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ  
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 462.122

(MONDELLI  
RFL et al 2011).

Sensibilidade dentária e irritação gengival são efeitos comuns relatados pelos pacientes, no entanto, eles tendem a desaparecer logo após a interrupção do tratamento clareador ou quando algum agente desensibilizante for aplicado (ARMÊNIO et al 2008).

Atualmente a discussão em torno da segurança sobre o uso indiscriminado de agentes clareadores está focada na possibilidade dos componentes utilizados para o clareamento estarem associados serem potencialmente genotóxicos, podendo assim, produzir lesões orais pré malignas (NAIK ET AL., 2006; TREDWIN et al., 2006, MUNRO et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio é uma substância altamente reativa que pode causar danos aos tecidos moles quando exposto por longo período de tempo (NAIK et al, 2006). O contato direto com peróxido de hidrogênio induz efeitos genotóxicos em culturas celulares e em bactérias in vitro. Tredium et al, 2006 sugerem que se evite o contato do peróxido de hidrogênio com tecidos moles e sempre que possível se utilize doses baixas do agente. O peróxido de carbamida 10% quando aplicado sucessivamente pode promover efeitos citotóxicos graves. Assim, a aplicação diária de agentes de clareamento caseiros pode aumentar danos à polpa dentária (LIMA AF et al, 2013). Em relação ao possíveis danos causados a estrutura dentária, inúmeros estudos avaliam o efeito dos agentes clareadores sobre a estrutura do esmalte em laboratório. No entanto, os efeitos da remineralização realizadas pela saliva não são avaliados nestes estudos laboratoriais. A presença da saliva é fundamental após o tratamento clareador pois pode prevenir a desmineralização ocasionada pelo gel clareador (JUSTINO LM, TAMES DR, DEMARCO FF, 2004). Neste sentido, somente avaliações laboratoriais são ineficientes, sendo necessário que estudos in situ também sejam realizados a fim de simular com maior efetividade e avaliar o papel da saliva na remineralização do esmalte

**Endereço:** Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Múa, Km 5.6 - Caixa Postal 858  
**Bairro:** Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290  
**UF:** RS **Município:** CRUZ ALTA  
**Telefone:** (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ  
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 462.122

clareado.

peróxido de hidrogênio a 35% com o clareamento dental caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10%.

Para isso, 150 pacientes serão

selecionados, divididos em dois grupos e submetidos ao clareamento de consultório e ao caseiro com

moldeiras simultaneamente. No entanto, um

deles será com gel placebo: Grupo 1: os pacientes realizarão o tratamento clareador de consultório

utilizando peróxido de hidrogênio a 35% e

simultaneamente realizarão o tratamento clareador caseiro com moldeiras utilizando gel placebo. Grupo 2:

os pacientes realizarão o tratamento

clareador de consultório utilizando placebo e simultaneamente realizarão o tratamento clareador caseiro

com moldeiras utilizando peróxido de

carbamida a 10%. A avaliação da cor será verificada por um único examinador previamente calibrado

utilizando espectrofotômetro digital antes, e

após a conclusão do tratamento clareador. Antes de iniciar o clareamento, 15, 30 e 45 dias após o início,

será coletada amostra da mucosa oral,

com auxílio de um citobrush, de 20 pacientes de cada grupo envolvidos no estudo para avaliação da

genotoxicidade através do teste de formação de

micronúcleos. A citotoxicidade dos agentes será realizada com linhagens celulares imortalizadas de

fibroblastos de camundongos 3T3/NIH. O teste

colorimétrico MTT (brometo 3-(4,5 dimetiltiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio). Dois questionários serão

entregues aos pacientes para avaliação da

sensibilidade dentária e da aceitabilidade dos tratamentos. O grau de sensibilidade dentária será registrado

diariamente em escala analógica visual

com escores variando de 1 (nenhuma sensibilidade) a 5 (sensibilidade severa). A aceitabilidade

**Endereço:** Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Múa, Km 5.6 - Caixa Postal 858  
**Bairro:** Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290  
**UF:** RS **Município:** CRUZ ALTA  
**Telefone:** (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ  
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 462.122

será

avaliada através de questionário com perguntas relacionadas a facilidade de uso, sabor e satisfação, através de escores variando de 1 (concordo) a 5 (discordo). Ensaio in situ e in vitro também serão realizados para avaliar a influência do gel clareador no esmalte dental humano. Os dados do ensaio controlado, da genotoxicidade, citotoxicidade, ensaio in situ e in vitro serão analisados a fim de verificar a normalidade da distribuição e submetidos a Anova One Way e teste de Tukey considerando-se o valor de  $p0,05$  como estatisticamente significativo. Os resultados da sensibilidade e aceitabilidade serão submetidos a teste de qui-quadrado.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Comparar através de ensaio controlado triplo cego a eficácia do clareamento dental de consultório utilizando peróxido de hidrogênio a 35% com o clareamento dental caseiro utilizando peróxido de carbamida a 10%.

##### **Objetivo Secundário:**

- Avaliar a eficácia das técnicas de clareamento dentário para dentes vitais;
- Comparar a sensibilidade gerada nos pacientes envolvidos no estudo frente às diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas na pesquisa;
- Avaliar qual técnica e concentração apresentará maior aceitabilidade por parte dos pacientes envolvidos na pesquisa;
- Avaliar a genotoxicidade das diferentes concentrações utilizadas no estudo sobre as células da mucosa oral dos pacientes envolvidos no estudo
- Avaliar a citotoxicidade das diferentes concentrações utilizadas no estudo sobre uma linhagem celular de fibroblastos de rato.
- Avaliar in vitro e in situ o efeitos adversos do peróxido de carbamida 10% e do peróxido de

**Endereço:** Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Múa, Km 5.6 - Caixa Postal 858  
**Bairro:** Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290  
**UF:** RS **Município:** CRUZ ALTA  
**Telefone:** (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ  
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 462.122

hidrogênio 35%

sobre o esmalte humano, através da análise da dureza, perda de cálcio e análise morfológica da superfície.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Sensibilidade dentária.

Benefícios:

Clareamento dental.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

adequados

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequados

**Recomendações:**

adequados

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CRUZ ALTA, 20 de Novembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Adalberto Fernandes Falconi**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Múa, Km 5.6 - Caixa Postal 858  
**Bairro:** Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290  
**UF:** RS **Município:** CRUZ ALTA  
**Telefone:** (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br

**Anexo B** – Ficha para avaliação do grau de sensibilidade dentária do paciente

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**Pós Graduação em Odontologia**  
**Área de Concentração em Dentística**

Ficha nº:

|                   |   |   |   |   |   |        |  |
|-------------------|---|---|---|---|---|--------|--|
| Nome do paciente: |   |   |   |   |   | Grupo: |  |
| Escores           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |        |  |

|                          | 1ª Semana de tratamento |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 1º dia                  | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | 7º dia |
| Sensibilidade<br>Escores |                         |        |        |        |        |        |        |

|                          | 2ª Semana de tratamento |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 1º dia                  | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | 7º dia |
| Sensibilidade<br>Escores |                         |        |        |        |        |        |        |

|                          | 3ª Semana de tratamento |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 1º dia                  | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | 7º dia |
| Sensibilidade<br>Escores |                         |        |        |        |        |        |        |

|                          | 4ª Semana de tratamento |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 1º dia                  | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | 7º dia |
| Sensibilidade<br>Escores |                         |        |        |        |        |        |        |

**Anexo C – Questionário para avaliação do impacto do clareamento na qualidade de vida dos pacientes**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

( ) Inicial ( ) Final

| SATISFAÇÃO E PROBLEMAS BUCAIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |          |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|
| <b>Problemas com dentes, boca e maxilares (ossos da boca) e seus tratamentos podem afetar o bem-estar e a vida diária das pessoas e suas famílias. Para cada uma das seguintes questões, por favor, escolha as opções de respostas que melhor descreve as suas experiências. Considere toda sua vida, desde o nascimento até agora, quando responder cada pergunta. Após cada pergunta ler as opções:</b><br><b>(1) nunca, (2) quase nunca, (3) às vezes (de vez em quando), (4) com frequência, (5) com muita frequência, (9) não sei</b> |          |   |   |   |   |   |   |
| 1. Você teve problemas para falar alguma palavra?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | [OHIP1]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 2. você sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [OHIP2]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 3. você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | [OHIP3]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 4. você se sentiu incomodada ao comer algum alimento?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [OHIP4]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 5. você ficou preocupado/a?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [OHIP5]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 6. você se sentiu estressado/a?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [OHIP6]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 7. sua alimentação ficou prejudicada?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [OHIP7]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 8. você teve que parar suas refeições?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | [OHIP8]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 9. você encontrou dificuldade para relaxar?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [OHIP9]  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 10. você se sentiu envergonhado/a?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | [OHIP10] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 11. você ficou irritado/a com outras pessoas?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | [OHIP11] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 12. você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | [OHIP12] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 13. você sentiu que a vida, em geral, ficou pior?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | [OHIP13] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |
| 14. você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | [OHIP14] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 9 |