

**UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PERNAMBUCO**

**EFEITO DOS AGENTES CLAREADORES PERÓXIDO DE  
CARBAMIDA A 10% E 16% NA PRODUÇÃO DE  
SUPERÓXIDO E ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS.**

Daniela Cahú Baptista Oertli

CAMARAGIBE

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PERNAMBUCO**

**EFEITO DOS AGENTES CLAREADORES PERÓXIDO DE  
CARBAMIDA A 10% E 16% NA PRODUÇÃO DE  
SUPERÓXIDO E ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Pernambuco, da Universidade de Pernambuco - UPE, como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia - Área de Dentística.

ORIENTADORA:

**Profª Drª Kattyenne Kabbaz Asfora**

CO-ORIENTADORA:

**Profª Drª Célia Maria Machado Barbosa de Castro**

CAMARAGIBE

2008

## *Dados Curriculares*

### *Daniela Cahú Baptista Oertli*

NASCIMENTO 08.11.71. – RECIFE- PE

|           |  |
|-----------|--|
| FILIAÇÃO  | Walter Baptista Oertli<br>Helena Maria Cahú Baptista Oertli  |
| 1990/1994 | Curso de Graduação em Odontologia<br>Faculdade de Odontologia de Pernambuco- UPE   |
| 1995      | Curso Especialização em Dentística Restauradora, na<br>Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas,<br>Regional de Araraquara – SP    |
| 1997      | Curso Especialização em Endodontia, na<br>Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP/SP  |
| 1998/2001 | Curso de Pós-graduação, área de Dentística<br>Restauradora, Nível de Mestrado, na Faculdade<br>de Odontologia de Araraquara – UNESP/SP |
| 2005/2008 | Curso de Pós-graduação, área de Dentística<br>Restauradora, Nível de Doutorado, na Faculdade<br>de Odontologia de Pernambuco - UPE     |

# Dedicatória

Dedico este trabalho aqueles responsáveis pela minha felicidade:

*Minha família, meu marido, minha filha  
(Marina), minha profissão e meus amigos.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

### *A Deus*

“Agradeço-te, Senhor, por permitires que a minha fé nutrisse os meus ideais mantendo viva a chama do crescimento espiritual e intelectual. E pelas pessoas queridas que me fazem feliz. Agradeço-te cada afeição querida, pela alegria e esperança, pelo entendimento e amor presentes em minha vida”.

### *A meus Pais, Helena e Walter,*

que me ensinaram os verdadeiros valores da vida, tornando-me o ser humano que sou hoje. Em casa, foram os primeiros mestres, ensinando-me os primeiros passos da vida. Agradeço-os por todo amor, carinho, compreensão que me fizeram continuar a lutar pelos meus objetivos, pois a vitória não pertence somente a nós e sim a todos que participam da nossa felicidade.

**Amo muito vocês!!!!**

### *A meu marido Henrique,*

pelo amor, carinho e dedicação expressos em todos os momentos. Participou efetivamente de todo o experimento para que pudesse me ajudar e preocupando-se com todos os detalhes. Amo muito você!!!

***A minha filha Marina,***

luz da minha vida , agradeço pela alegria que me transmite todos os momentos, amo muito você.

***A minhas avós, e minhas irmãs e sobrinhos***

agradeço por todo amor e carinho que vocês me deram e por toda ajuda no decorrer da minha vida profissional.

***À Profa. Dra. Kattyenne Kabbaz Asfora,***

pela sua orientação competente e segura, quando seus ensinamentos eram transmitidos com tanta paciência e respeito.

***À Profa. Dra. Célia Maria Barbosa de Castro,***

pela amizade, pelo carinho, além de sua orientação segura e paciente em todos os momentos. Exemplo de amor e dedicação pela profissão, que a faz uma profissional competente.

À minhas amigas ***Bárbara Seabra,***  
***Roseanne Uchoa, Gabriela Queiroz ,***

pela amizade sincera compartilhada em bons momentos e por estarem sempre presentes em minha vida. Pelo carinho e amor expressos naturalmente.

A meus amigos ***Thaciana, Natália, Bruno e A lice***

pela amizade compartilhada em bons momentos e por ajudarem no experimento.

A meu amigo ***Marcelo Viana,***  
pela sua amizade , atenção e pela prestatividade ao realizar com muita paciência a estatística do trabalho além de me ajudar na interpretação dos resultados.

A meus colegas de trabalho ***Cláudio Heliomar,***  
***Paulo Fonseca, Keila Lira , Fábio***  
***Barbosa, Renata Pedrosa***

pela amizade, incentivo e compreensão compartilhada em muitos momentos.

Aos meus pacientes,  
pela compreensão, paciência e carinho expressos em muitos momentos.



# **A**gradecimentos

À **Faculdade de Odontologia Pernambuco**, da UPE representada pelos Profs. Drs. **Belmiro Cavalcanti do Egito Vasconcelos**(Diretor) e **Maria do Socorro Orestes Cardozo** (Vice-diretora).

Ao **Coordenador geral do programas de Pós-Graduação**, representada pelo Prof. Dr. **Emanuel Sávio de Souza Andrade**

Aos **Professores do Curso de Pós-graduação** em especial os de **Dentística Restauradora**, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao **Prof. França**, por ter cedido animais para a realização do experimento e pela sua atenção.

Ao **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**, do

Departamento de Fisiologia, por ter cedido animais para complementar o experimento

Ao **LIKA(laboratório de Imunopatologia Keizo Azami)** pela disponibilidade da realização da parte experimental deste trabalho.

Aos **colegas** do Curso de Doutorado em **Dentística Restauradora** pela convivência da qual surgiu a amizade. Agradeço pelo companheirismo e pelos bons momentos de que desfrutamos.

Aos **colegas** do **LIKA** pela convivência e atenção durante o tempo que passamos juntos.

À **Capex**, pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos clareadores dentais a base de peróxido de carbamida a 10% (Whiteness Standart a 10% - FGM) e a 16% (Whiteness Standart a 16% - FGM), em macrófagos alveolares de ratos albinos Wistar, pela produção de óxido nítrico e superóxido. Foram utilizados 24 ratos machos com 90-120 dias, nos quais foi realizado o lavado broncoalveolar para obtenção das células. Posteriormente o lavado foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em meio de cultura (RPMI) contendo soro fetal bovino a 3% e antibióticos. Logo em seguida as células foram para as placas de cultura, e foi dispensado 1ml da suspensão na proporção de  $10^6$  células/ml em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C o sobrenadante foi desprezado, permanecendo apenas células aderidas. Para o preparo dos grupos experimentais 1ml de RPMI foi adicionado. Os grupos testados para avaliação da produção de óxido nítrico (ON) foram: o grupo Controle, LPS, W10 (Whiteness Standart a 10%) e W 16 (Whiteness Standart a 16%). A produção de ON e superóxido nos grupos testados foi avaliada nos períodos de 3 horas e 24 horas Para avaliação da liberação do superóxido os grupos testados foram: Controle, W10, W16. E todos os grupos clareadores foram colocados saliva artificial. Após análise estatística pode-se concluir que: 1) No tempo de 3 horas à produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados com os materiais clareadores W10 e W16 apresentaram citotoxicidade; 2) No que se refere à produção de óxido nítrico no tempo de 24 horas foi visto que, os materiais clareadores W10 e W16 não apresentaram citotoxicidade; 3) O fator tempo na produção de óxido nítrico, pelos macrófagos, influenciou os efeitos dos materiais clareadores tanto no tempo de 3 horas como 24 horas; 4) No tempo de 3 horas e 24 horas à produção de superóxido pelos macrófagos tratados com os materiais clareadores W10 e W16 não apresentaram citotoxicidade.

**PALAVRAS-CHAVES** – Macrófago alveolar, peróxido de carbamida, superóxido, óxido nítrico

## ABSTRACT

This study proposes to evaluate the effect of the dental bleaching carbamide peroxide at 10% (Whiteness a 10% - FGM) and at 16% (Whiteness a 16% - FGM), in alveolar macrophages from Wistar albino rats, by the production of nitric oxide and superoxide. There were used 24 male rats, (90-120 days), at those were performed the bronchoalveolar lavage to obtain the cells. After that, the lavage was centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes. The precipitated was resuspended in culture medium (RPMI) containing fetal bovine serum at 3% and antibiotics. Right after the cells were transferred at culture wells, and was removed 1ml from suspension at the proportion of  $10^6$  cells/ml in each well. After 1h at the incubator at 37°C the nonadherent cells were discarded, remaining only the monolayers. For each prepare of the experimental groups 1ml de RPMI was added. The test groups for the evaluation of the production of the nitric oxide (NO) were: the control group, LPS, W10 (Whiteness at 10%) e W16 (Whiteness at 16%). The NO and superoxide production in the tested groups were evaluated at periods of 3 hours and 24 hours. For the evaluation of the production of superoxide, the test groups were: Control, LPS, W10, W16. And at the bleaching groups it was added artificial saliva. After the statistics analysis it was possible to conclude that: 1) At the time of 3 hours the production of nitric oxide by the macrophages treated with bleaching materials W10 e W16 presented cytotoxicity; 2) and at the time of 24 hours, did not presented cytotoxicity;; 3) The factor time at the production of nitric oxide, influenced the effects of the bleaching materials in both times such as at the time of 3 hours as at 24 hours; 4) At the time of 3 hours and 24 hours the production of superoxide of the macrophages treated with the bleaching agents W10 e W16 did not present cytotoxicity.

**KEY-WORDS** – Alveolar macrophages, carbamide peroxide, superoxide, nitric oxide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 01-CONTROLE X LPS (3h)</b> .....  | 69 |
| <b>Gráfico 02-CONTROLE X W10 (3h)</b> .....  | 70 |
| <b>Gráfico 03-CONTROLE X W16 (3h)</b> .....  | 70 |
| <b>Gráfico 04-CONTROLE X LPS (24h)</b> ..... | 71 |
| <b>Gráfico 05-CONTROLE X W10 (24h)</b> ..... | 72 |
| <b>Gráfico 06-CONTROLE X W16 (24h)</b> ..... | 72 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 01</b> - Material clareador (Whiteness a 10% e 16%).....            | 52 |
| <b>Figura 02</b> - Saliva artificial (Fórmula Ativa - Recife).....            | 53 |
| <b>Figura 03</b> - Ratos albinos tipo Wistar na gaiola de propileno.....      | 54 |
| <b>Figura 04</b> - Obtenção do lavado broncoalveolar.....                     | 55 |
| <b>Figura 05</b> - Lavado broncoalveolar.....                                 | 55 |
| <b>Figura 06</b> - Área de contagem dos macrófagos na câmara de Neubauer..... | 56 |
| <b>Figura 07</b> - Curva padrão.....  | 63 |

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 01** - Composição da saliva.....53
- Quadro 02** - Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 3 horas, organizados em placa de cultura .....58
- Quadro 03** - Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 24 horas, organizados em placa de cultura...58
- Quadro 04** - Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 3 horas, organizados em placa de cultura. ....59
- Quadro 05** - Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 24 horas, organizados em placa de cultura.....60
- Quadro 06** - Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 3 horas e a composição de cada grupo .....61
- Quadro 07** - Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 24 horas e a composição de cada grupo .....61
- Quadro 08** - Construção de curva padrão para dosagem do óxido nítrico.....62
- Quadro 09** - Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 3 horas e a composição de cada grupo .....65
- Quadro 10** - Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 24 horas e a composição de cada grupo .....66

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 01</b> - Estatística descritiva do óxido nítrico no tempo de 3 horas.....  | 68 |
| <b>Tabela 02</b> - Estatística descritiva do óxido nítrico no tempo de 24 horas..... | 71 |
| <b>Tabela 03</b> - Estatística descritiva do superóxido no tempo de 3 horas.....     | 73 |
| <b>Tabela 04</b> - Estatística descritiva do superóxido no tempo de 24 horas.....    | 73 |



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

W10 = Whiteness a 10%

W16 = Whiteness a 16%

ON= Óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>-</sup>= Superóxido

LBA= Lavado broncoalveolar

MA= Macrófagos alveolares

RPMI 1640 =

hs= horas

ml= Milímetro

Kg= Quilograma

µl= microlitro

U= unidade internacional

CO<sub>2</sub> = Dióxido de carbono

LPS = Lipolissacarídeo

mM= milimol

nm= nanômetro

DP= Desvio padrão

± + mais ou menos

% por cento

ANOVA= Análise de variância

° = Grau

C= Celsius

pH= potencial hidrogênionico

mg= miligrama

PMA= acetato miristato de forbol

SOD= superóxido dismutase

NaNO<sub>2</sub> = Nitrato de sódio

R1C1= controle negativo sem tratamento exposto por 3 horas

R2C2= um grupo controle positivo (LPS) exposto por 3 horas

R3W10= o peróxido de carbamida a 10% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 3 horas

R4W16 = o peróxido de carbamida a 16% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 3 horas

R5C1= controle negativo sem tratamento exposto por 24 horas

R6C2= controle positivo (LPS) exposto por 24 horas

R7W10= o peróxido de carbamida a 10% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 24 horas

R8W16 = o peróxido de carbamida a 16% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 24 horas

R2W10= o peróxido de carbamida a 10% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 3 horas

R<sub>3</sub>W16 = o peróxido de carbamida a 16% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 3 horas

R4 C 1 = controle negativo sem tratamento exposto por 24 horas

R5W10= o peróxido de carbamida a 10% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 24horas

R6 W16= o peróxido de carbamida a 16% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 24 horas

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO  |    |
| ABSTRACT  |    |
| 1. INTRODUÇÃO   | 30 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA                                      | 33 |
| 2.1. Macrófagos e a produção de superóxido e óxido nítrico    | 34 |
| 2.2. Material clareador                                       | 38 |
| 2.3. Citotoxicidade   | 41 |
| 3. PROPOSIÇÃO   | 49 |
| 3.1. Objetivo Geral   | 49 |
| 3.2. Objetivos Específicos                                    | 49 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS  | 51 |
| 4.1. Considerações éticas                                     | 52 |
| 4.2. Localização do estudo                                    | 52 |
| 4.3. Material clareador dental                                | 52 |
| 4.4. Saliva artificial  | 53 |
| 4.5. Animais e dieta  | 54 |
| 4.6. Obtenção dos macrófagos do lavado broncoalveolar (LBA)   | 55 |
| 4.7. Cultura de macrófagos alveolares (MA)                    | 56 |
| 4.8. Condições experimentais e preparo das placas de cultura  | 57 |
| 4.8.1. Óxido nítrico  | 57 |
| 4.8.2. Superóxido   | 59 |
| 4.9. Estudo das células (macrófagos) do lavado broncoalveolar | 60 |
| 4.9.1. Produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares    | 60 |
| 4.9.2. Análise da produção de superóxido                      | 64 |
| 5. RESULTADOS   | 67 |
| 6. DISCUSSÃO  | 75 |
| 7. CONCLUSÕES   | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                    | 84 |
| ANEXOS  | 91 |

## 1. INTRODUÇÃO

A imunidade é a resistência natural ou adquirida de um organismo vivo, a um agente infeccioso ou tóxico (CHANDRA,1997). O sistema imune é responsável pelo mecanismo de defesa orgânico (KIM et al., 2003). Diante do agente agressor, o Sistema Imune desencadeia uma resposta coletiva e coordenada chamada resposta imune.

O mecanismo de defesa orgânico inclui a imunidade natural e a imunidade específica. A imunidade natural é constituída por barreiras físico-químicas (pele e as membranas mucosas); moléculas circulantes (complemento); células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos); células Natural Killer-NK e citocinas (Cs), derivadas de macrófagos (interferon-alfa, interferon-beta, fator de necrose tumoral – TNF, etc). Esses elementos inatos atuam como a primeira linha de proteção e retardam o estabelecimento da manifestação infecciosa (CHANDRA, 1997).

Os componentes da imunidade natural são inatos e não são influenciados por contato prévio com o agente infeccioso, no entanto, a imunidade específica é adquirida, e apresenta especificidade e memória, sendo chamada de adaptativa, por direcionar os mecanismos da imunidade natural para as vias de entrada dos agentes agressores, tornando mais capazes de eliminá-los (PEAKMAN; VERGANI, 1999). A imunidade específica acrescenta aos elementos da imunidade natural, os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, relacionados à imunidade humoral, e os linfócitos T, que determinam à imunidade celular. Há algumas propriedades que diferenciam a imunidade específica da não específica tais como: especificidade, diversidade, memória, auto-regulação e discriminação entre próprio e não-próprio. E no organismo a imunidade específica e não específica atuam conjuntamente na defesa (CHANDRA, 1997).

No sistema imune há células de alto poder fagocitário, destacando-se entre elas os macrófagos, derivados da migração dos monócitos sanguíneos para o tecido, que aparecem no tecido conjuntivo ou no parênquima de algum órgão, e

atuam principalmente na fagocitose (SIBILLE; REYNOLDS, 1990). Os macrófagos têm um papel central no sistema imune, sobretudo, como reguladores da homeostase e efetores nas infecções, tumores e ferimentos, antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B (CELADA; NATHAN, 1994). Os macrófagos agem como células processadoras e apresentadoras de antígenos e são importantes na fase de indução de inflamação e reorganização e reparo dos tecidos (SIBILLE; REYNOLDS, 1990).

Os macrófagos podem existir em três formas: (1) células que revestem cavidades serosas tais como os espaços alveolares e no tecido conjuntivo que são os histiócitos; (2) macrófagos em tecidos fixos como as células de Kupffer no fígado e (3) macrófagos ativados, respondendo a um processo inflamatório. Quando os macrófagos são ativados eles aumentam o tamanho, expressam mais antígeno na superfície e possuem atividades secretórias e pró-inflamatórias. Os macrófagos funcionam como principais células garis do corpo. Estas células secretam enzimas, oxigênio reativo  $O_2^-$ , óxido nítrico e mediadores lipoderivados, como as prostaglandinas. Esses produtos são microbicidas e controlam a propagação de infecção, mas podem também lesar tecidos normais próximos à infecção (PEAKMAN; VERGANI, 1999).

O macrófago se presta bem ao estudo de biocompatibilidade de substâncias odontológicas, pois participam na resposta inflamatória e no sistema imune, protegendo o organismo contra os agentes agressores (RASQUIN, 1998). Os estudos de biocompatibilidade caracterizam-se por avaliar o potencial agressor ou citotóxico das substâncias testadas (CHANDRA, 1997).

Várias técnicas de clareamento dental têm sido utilizadas por anos com diferentes produtos. O peróxido de hidrogênio inicialmente utilizado em abscessos alveolares para irrigação, é um dos materiais mais indicados para o clareamento dental. Em 1989 foi desenvolvida a técnica de clareamento caseiro, a qual permite que a substância clareadora aplicada pelo paciente através da moldeira, onde se coloca o produto clareador por um tempo determinado. Os materiais utilizados para este tipo de tratamento é o peróxido de carbamida de 10 a 16% ou peróxido

de hidrogênio de 2 a 10% (HANKS, 1993).

O clareamento dental em dentes polpados, com peróxido de carbamida a 10% na forma de gel, divulgada por Haywood e Heymann em 1989, tem sido bastante difundida, pois permite bons resultados, de uma forma menos invasiva e menos onerosa que os tratamentos protéticos (MORATO; DUARTE; ALBUQUERQUE, 1998).

O mecanismo de ação do peróxido de carbamida no meio bucal é variável devido ao efeito das peroxidases salivares, e da instabilidade do material. A concentração a 10% se dissocia em 3,6% de peróxido de hidrogênio e 6,4% em uréia (MONDELLI, 1998).

Apesar de sua facilidade e bons resultados o clareamento dental não é um tratamento inócuo, podendo acarretar alguns efeitos indesejáveis como: hipersensibilidade dental, irritação gengival, náuseas e possíveis efeitos carcinogênicos nos tecidos (SIMONSEN, 1990; STRASSLER et al. 1992; PIEROLI, 2003). Ainda, ANDERSON et al. (1999) descreveram alterações pulpares, e CHRISTENSEN (1991) relatou modificações na superfície de esmalte dos materiais restauradores.

Um dos problemas acarretados pelos agentes clareadores é a possibilidade de causar alterações celulares, pois os peróxidos sempre causaram preocupação devido à formação de radicais livres, e seu potencial de mutação celular, é devido principalmente ao uso inadequado sem o conhecimento do dentista (MONDELLI, 2003). Em estudo *in vitro* da biocompatibilidade dos agentes clareadores em macrófagos observou-se que tanto o peróxido de hidrogênio a 30% e o peróxido de carbamida a 10% provocam danos irreversíveis nas células (ASFORA, 2000 e ASFORA, 2005).

Esse trabalho propõe avaliar *in vitro* a citotoxicidade duas concentrações de materiais clareadores, empregados pela técnica do clareamento caseiro supervisionado com intervalo de tempo de 3 e 24 horas através da produção de superóxido e óxido nítrico em macrófagos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. MACRÓFAGOS E A PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO E ÓXIDO NÍTRICO**

ADAMS; HAMILTON (1984) revisaram a literatura sobre os macrófagos e relataram que a capacidade funcional dos macrófagos está relacionada com três aspectos: constituintes intracelulares fundamentais para o metabolismo da célula, ingestão e degradação de material estranho; capacidade de reconhecer e interagir com vários receptores específicos, na sua superfície e habilidade em sintetizar e secretar grande variedade de produtos moleculares

SIBILLE; REYNOLDS (1990) realizaram uma revisão sobre as características e função dos macrófagos e PMN (polimorfonucleares) e sua interação com a inflamação. Concluíram que os macrófagos e os PMN são os maiores componentes da reação inflamatória e imunológica. Os macrófagos apresentam em suas membranas, receptores de superfície para ligações com diversas substâncias e secreção dos produtos. Ainda têm papel importante no processo inflamatório devido à liberação de radicais de oxigênio e enzimas proteolíticas, assim influenciando no processo de dano e reparo pela liberação de citocinas.

DE LA FUENTE et al. (1991) relataram que a fagocitose desenvolvida pelos macrófagos é o início do conjunto das atividades biológicas de toda resposta imunológica. Esta é constituída por várias etapas: aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes e produção de superóxido.

RASQUIN (1998) avaliou a interação dos macrófagos com cimentos obturadores que foram: Sealapex, Top Seal, Procanal, Sealer 26 e Endomethazone. Avaliou a citotoxicidade através da resposta celular bioquímica. Como parâmetro foi verificado o teor de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico liberados após o contato de culturas de macrófagos peritoneais com os cimentos solubilizados, sob leitor ELISA. E pela quantificação da liberação destes pode-se determinar o grau de agressão/estímulo aos macrófagos.

SEGURA et al. (1999) compararam *in vitro* o efeito da clorexidina a 0,12% e o hipoclorito de sódio a 5,25% utilizados como solução irrigadora endodôntica na aderência dos macrófagos peritoneais em tubos plásticos. Os autores observaram que o preparo biomecânico dos canais radiculares utilizando hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorexidina a 0,12% como solução irrigadora deve-se ter cautela no periápice, pois, ambos reduzem a adesão do macrófago e podem modular as reações inflamatórias nos tecidos periapicais.

WATTANAPAYUNGKUL et al. (1999) propuseram determinar a degradação do peróxido de carbamida 10% na primeira hora de uso e o efeito de película na degradação do peróxido de carbamida *in vivo*. Para este foi selecionado 15 pessoas para a realização do clareamento caseiro com o uso do material clareador por 0,5, 2,5, 50, 10.0, 20.0, 40.0 e 60.0 minutos sobre duas condições: (1) os pacientes receberam a profilaxia antes do clareamento; (2) foi feita a profilaxia nos pacientes para a remoção da película aderida ao dente. Em cada intervalo de tempo 3 tipos de amostras foram coletadas: a) a amostra do gel foi removida com uma espátula da moldeira na região anterior; b) a amostra remanescente do gel na placa; c) o remanescente do gel no dente. Durante o tempo do experimento a saliva era eliminada em um beker para determinar a



quantidade de peróxido. Os autores concluíram que a película não afetou a degradação do peróxido de carbamida. A degradação foi exponencial exceto durante os 5 minutos, quando a degradação foi muito maior. A saliva coletada revelou uma média de 2.1 mg de peróxido de carbamida na primeira hora de clareamento.

De CASTRO et al. (2000) propuseram determinar *in vitro* a cinética da produção de superóxido pelos macrófagos alveolares, ativados com PMA e ainda estudaram os efeitos do estresse. Foram utilizados ratos tipo Wistar machos estressados ou não e foi visto o nível plasmático de corticosterona. Foi visto que o grupo controle apresentou maior nível de superóxido que o grupo estressado em todos os intervalos de tempo. A exposição *in vitro* dos macrófagos alveolares a um glicocorticóide sintético por 40 minutos inibiu o superóxido. Assim, foi visto que a situação de estresse aumenta o nível plasmático de corticosterona e diminui a produção de superóxido em macrófagos alveolares após a simulação com PMA. O superóxido é um potente microbicida e sua redução pode causar a perda da atividade microbicida dos macrófagos alveolares.

LEONARDO et al. (2000) avaliaram a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS, Apexit, Sealer 26) e um a base de óxido de zinco e eugenol (Fillcanal) verificando as mudanças morfológicas nos macrófagos peritoneais no período de 12, 24, 48 e 72 horas. Observou-se que o cimento endodôntico Fillcanal foi mais citotóxico seguido pelo CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex. E foi visto que as modificações que ocorrem nos macrófagos são na cadeia respiratória e síntese protéica.

PORTO (2006) avaliou o impacto da desnutrição neonatal e do treinamento físico moderado em mecanismos de defesa de ratos adultos. Ratos machos tipo Wistar foram amamentados por mães que receberam dieta

experimental durante a lactação, contendo 17% de proteína (grupo nutrido) ou 7% de proteína (desnutrido). Após o desmame, todos foram recuperados com dieta normoprotéica (Labina). Aos 60 dias, metade dos animais de cada grupo foi submetida a treinamento físico, constituindo-se os grupos: Nutrido; Nutrido treino, Desnutrido e Desnutrido treino. Vinte quatro horas após o último treino, realizaram-se coletas de sangue para contagem total e diferencial de leucócitos e na sexta semana, realizou-se lavado broncoalveolar no pulmão dos ratos para o isolamento dos macrófagos, empregados para avaliação da taxa de fagocitose e produção de óxido nítrico. Os resultados demonstraram que a desnutrição precoce, por ocorrer em período crítico da formação dos sistemas de homeostase, como o imune, mesmo após a recuperação, pode alterar a resposta do hospedeiro frente aos estímulos nocivos. Assim, o treinamento físico moderado fortalece o sistema imune, promovendo benefícios à saúde.

MELO et al. (2007) investigaram o efeito da endotoxemia sobre o recrutamento celular para o pulmão e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar (n=24), com idade entre 90 e 120 dias, divididas em dois grupos: controle e endotoxêmico foi submetido à injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo na dose de 1mg/Kg de peso corporal. Após 24 horas, coletou-se o sangue para contagem total e diferencial de leucócitos e dosagem de óxido nítrico. Além do sangue, coletou-se o lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial dos leucócitos e, a partir de macrófagos isolados deste lavado, realizaram-se as seguintes dosagens: superóxido, óxido nítrico e superóxido dismutase. A endotoxemia aumentou a contagem total de leucócitos e o número de neutrófilos em sangue periférico e lavado broncoalveolar. Ainda aumentou a produção de superóxido sem modificar a liberação de óxido nítrico e superóxido dismutase. Esses resultados sugerem que a endotoxemia induz resposta inflamatória no pulmão. Contudo não altera a atividade oxidante-antioxidante em ratos adultos. Tal fato potencializa a resposta contra agentes infecciosos pelo hospedeiro, mas

também pode contribuir na patogênese de injúria pulmonar.

## **2.2. MATERIAL CLAREADOR**

LEONARD et al. (1994) avaliaram *in vivo* a mudança do pH de uma solução clareadora a base de peróxido de carbamida a 10% com pH 4.7 (Proxigel), durante o clareamento. As mudanças do pH foram verificadas dentro da moldeira, na placa bacteriana e saliva no começo e no final do clareamento caseiro (durante 2 horas). Os resultados demonstraram que o pH do material clareador aumentou significativamente durante o clareamento e que este também influenciou o nível do pH da placa bacteriana que também aumentou. Ainda foi visto que em 75% dos pacientes o pH crítico (5.5), o qual é necessário para causar a desmineralização do esmalte durou apenas 5 minutos e o pH manteve-se elevado por 2 horas.

LEONARD et al. (1998) propuseram avaliar *in vitro* as diferenças na mudança de cor, em dentes extraídos durante duas semanas aplicando o peróxido de carbamida a 5%, 10% ou 16% contendo carbopol. Foram selecionados 110 dentes recém extraídos isentos de cárie e restauração. Foram divididos em quatro grupos que eram: solução salina, 5%, 10% ou 16% por 8 horas seguindo as instruções do fabricante. Os autores concluíram que em 2 semanas não houve diferença estatisticamente significativa na mudança de cor entre 5%, 10% e 16% de peróxido de carbamida. No entanto, a mudança de cor ocorreu mais rapidamente no grupo em que foi utilizado peróxido de carbamida a 16% que 10% e 5% na primeira semana, e na segunda semana a mudança foi mais rápido no grupo em que foi aplicado peróxido de carbamida a 16 e a 10% que o grupo em que foi aplicado peróxido de carbamida a 5%. Porém, na terceira semana os valores do grupo de menor concentração aproximaram aos valores dos outros grupos.

MORATO et al. (1998) realizaram uma revisão da literatura para avaliar as indicações do peróxido de carbamida, bem como seu mecanismo de ação e sua biocompatibilidade com os tecidos bucais. Concluíram que o diagnóstico da alteração de cor é essencial para obter um prognóstico e um plano de tratamento adequado. E o uso correto respeitando as indicações impede que o clareador atue prejudicialmente nos tecidos dentários e no periodonto de proteção, podendo ocorrer apenas em alguma paciente sensibilidade, a qual é rapidamente eliminada com a utilização dos fluoretos.

PIMENTA; PIMENTA (1998) realizaram uma revisão de literatura ressaltando os riscos e benefícios da técnica de clareamento caseiro com peróxido de carbamida, e ainda as indicações, limitações e conhecimentos fundamentais. Os autores concluíram que o peróxido de carbamida na concentração de 10-15% contendo carbopol, é considerado um produto seguro e eficaz.

MATIS et al. (1999) propuseram determinar a degradação do gel clareador peróxido de carbamida a 10%, *in vivo*. Esta degradação foi indicada pela concentração do agente ativo remanescente. As moldeiras foram colocadas em 15 pacientes em 6 diferentes intervalos de tempo que variavam de 15 minutos até 10 horas. Quando as moldeiras eram removidas 3 amostras foram coletadas de cada paciente. Os autores concluíram que a degradação do peróxido de carbamida é biexponencial, na moldeira e no dente a degradação acelerou durante a primeira hora. Ainda foi visto que o agente ativo do gel clareador fica disponível por mais 10 horas. Após 2 horas, mais de 50% do agente ativo mantém disponível e 10% após 10 horas.

PRICE et al. (2000) determinaram o pH de 26 produtos para o clareamento dental. E verificaram que os produtos indicados para o clareamento caseiro tiveram uma média de 6.48. O material que apresentou o pH mais básico testado foi o Natural White-rapid White foi 11.13 e o mais ácido foi o Opalescence Extra com pH 3.67.

CARDOSO et al. (2007) realizaram um estudo *in vitro* observando a influência do tempo de aplicação do peróxido de carbamida a 10% no resultado da cor dos dentes, através do espectrofotômetro. Trinta pré-molares extraídos foram envolvidos neste estudo, divididos aleatoriamente em 3 grupos. O tempo de aplicação diário do agente clareador variou em: GI-1h; GII- 2h; e GIII- 8h. O clareamento dental foi realizado com peróxido de carbamida a 10% (Whiteness Standard 10%, FGM) durante 15 dias. A determinação da cor dos espécimes foi realizada antes e após o tratamento clareador através do espectrofotômetro. Concluiu-se que o tempo de aplicação de 8 horas deve ser substituído pelo de 1h ou 2h, pela similaridade na mudança de cor dos três grupos.

### 2.3.CITOTOXICIDADE

MARTIN et al. (1968) realizaram um estudo em cães para avaliar a resposta celular após a aplicação da solução de peróxido de hidrogênio (1%) diluída em água destilada, no tecido gengival. Os cães eram saudáveis não apresentando doenças na boca e a área da aplicação da solução foi a mandíbula, na região de incisivos. O peróxido de hidrogênio foi deixado na gengiva nos intervalos de 6, 12, 24, e 48 horas, posteriormente foi realizado biópsias da gengiva. Os autores observaram que a resposta celular é semelhante a uma reação inflamatória aguda. E que no tempo de 48 horas resultou na destruição das células epiteliais.

HANKS et al. (1992) propuseram a realização de um estudo que teve como objetivo: (1) determinar a citotoxicidade de diluições de peróxido de hidrogênio a 30% em cultura de fibroblastos; (2) mensurar a difusão do peróxido de hidrogênio dos agentes clareadores na dentina *in vitro*; (3) determinar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio pela exposição na dentina. Os autores concluíram que a citotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(peróxido de hidrogênio) foi influenciada tanto pela concentração, quanto pelo tempo em contato com as células.

DAHL; BECKER (1995) realizaram um estudo para avaliar a toxicidade aguda, em ratos, pela administração oral do peróxido de carbamida a 10 % com doses de 5,15 e 50 mg/kg comparando-os com o material clareador a base de peróxido de carbamida na dose de 150 mg e 500 mg, o qual corresponde a 15 e 50 mg de peróxido de carbamida. Os animais foram submetidos a doses variadas do produto via lavagem estomacal e após 1 hora ou 24 horas o animal

foi sacrificado para análise microscópica do estômago e esôfago. Após a avaliação histológica foi visto que após 1 hora as lesões eram bem visíveis e pareciam cicatrizar depois de 24 horas. Também verificou que as ulcerações na mucosa gástrica foram mais pronunciadas na administração do material clareador, justificado pela presença do carbopol, que torna o material mais viscoso sendo dificultada sua degradação, aumentando sua aderência aos tecidos e retardando a liberação de oxigênio.

TIPTON et al. (1995a) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito do peróxido de carbamida contido nos clareadores dentais em fibroblastos gengivais; verificando a viabilidade, morfologia, proliferação e produção de fibronectina e colágenos. Foi verificado que o peróxido de carbamida provoca alterações morfológicas e até morte dos fibroblastos, ainda diminui a proliferação e produção de colágeno e fibronectina. Os autores ressaltam que um estudo *in vivo* pode ter resultados diferentes devido aos mecanismos de defesa específicos e não específicos da mucosa oral e a ação das enzimas.

Com o intuito de verificar se as enzimas da saliva que são a lactoperoxidase (LP) e mucina protegem os fibroblastos dos efeitos dos clareadores, TIPTON et al. (1995b) avaliaram a viabilidade, proliferação, produção de fibronectina e colágeno tipo I nestas células em contato com o clareador (0,05% de White & Brite). Os autores concluíram que a toxicidade do material clareador é devido à liberação de peróxido de hidrogênio, e que é reduzida pelas enzimas presentes na saliva e/ou tecidos orais que o degradam.

CURTIS et al. (1996) analisaram o efeito do peróxido de carbamida a 10%

nos tecidos moles e na gengiva, no período de 1, 2, e 6 semanas de tratamento clareador caseiro(noturno) aplicado por 8 horas durante 2 semanas. Foi utilizado índice gengival, de placa e mucosa oral para verificar o grau de agressão. Os autores verificaram que não houve alterações significativas nos tecidos moles.

Em relação aos danos oxidativos dos peróxidos, FLOYD (1997) ressaltam que a degradação do oxigênio causa estresse oxidativo nos sistemas biológicos aeróbicos, que podem ser de diferentes magnitudes. O dano ao tecido não depende somente da magnitude, mas também, da capacidade de defesa do tecido. Portanto é importante ter cautela na administração dos clareadores dentais, que são radicais livres de oxigênio associados aos peróxidos porque esta associação pode determinar condições patológicas.

LEONARD et al. (1997) determinaram os fatores de risco para o desenvolvimento de sensibilidade dentária e irritação gengival associadas com o clareamento caseiro. Os fatores de risco foram: sexo, idade, resposta alérgica, solução clareadora, número de vezes que a solução clareadora é trocada durante o dia. Este estudo foi feito com 64 participantes utilizando o Proxigel ou o Gly-oxide sendo aplicados de duas formas: (1) somente à noite ou durante o dia sem trocar a solução e (2) aplicação durante o dia ou a noite trocando a solução pelo menos uma vez e cada aplicação teve o tempo de 6 a 8 horas. Os autores concluíram que não existe relação estatística entre idade, sexo, alergia, solução clareadora no desenvolvimento dos efeitos colaterais de sensibilidade dentária e irritação gengival. E nos pacientes que trocaram a solução clareadora mais de uma vez apresentaram mais efeitos colaterais que aqueles que não trocaram a solução.



LI (1997) realizou uma revisão da literatura sobre os materiais clareadores. O autor verificou que os agentes clareadores mais usados são o peróxido de hidrogênio e carbamida. O autor ressalta os efeitos tóxicos dos peróxidos, que ocorrem devido a formação de radicais livres de oxigênio, os quais têm sido observados em várias reações fisiológicas e patológicas com possíveis danos as proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Porém, as informações sobre genotoxicidade e carcinogenicidade destes clareadores ainda não são conclusivas.

KOULAOUZIDOU et al. (1998) avaliaram o efeito citotóxico de um agente clareador a base de peróxido de carbamida a 10% (Colgate Platinum) comparando-o com o peróxido de hidrogênio em fibroblastos no período de incubação de 24hs e 72hs. Os resultados demonstraram que ambos os agentes clareadores foram citotóxicos aos fibroblastos, porém, o novo material foi menos citotóxico. E ressaltaram que a citotoxicidade foi influenciada pelo tempo de ação do clareador às células.

MATIS et al. (1998) realizaram um estudo clínico para determinar a eficiência e segurança do material clareador peróxido de carbamida à 10% (Opalescence) comparando com o placebo. Para isso foram selecionados 60 pacientes e divididos em dois grupos e foram feitas mensurações da cor no período de 1, 2, 3, 6, 12 e 24 semanas pela escala de cor, fotografias e o colorímetro. Pode-se concluir que, o agente testado foi efetivo e fisiologicamente aceitável, apresentando regressão de cor na quarta semana para os incisivos e na décima para os caninos, porém não houve retorno à cor inicial.

A segurança do clareamento caseiro tem sido questionada assim, TAM

(1999) realizou uma revisão da literatura para verificar os efeitos adversos do clareamento caseiro nos tecidos orais bem como os riscos sistêmicos. Entre os riscos foram avaliados: a sensibilidade dentária, alterações morfológicas do esmalte, redução da adesão à resina, problemas com o material restaurador, irritação gengival e riscos sistêmicos após longo período. Pode-se concluir que, o contato do clareador nos tecidos moles pode ocasionar irritação gengival e segundo a autora o efeito do peróxido de carbamida no corpo humano ainda é desconhecido e o potencial carcinogênico é controverso, sugerindo cautela na administração e devendo ser evitados em crianças, grávidas, lactentes e pacientes com patologias orais.

ASFORA (2000) realizou um estudo *in vitro* de biocompatibilidade, sendo avaliadas a aderência e a morfologia celular em macrófagos de ratos tratados com clareadores dentais. Foram testados: Perborato de sódio, Peróxido de hidrogênio a 30%, Peróxido de carbamida a 10% (manipulado), Peróxido de carbamida a 10% e a 16% (comercial). Os macrófagos foram obtidos através do lavado peritoneal. O índice de aderência foi obtido através da incubação em estufa biológica por 15 e 30 minutos, os tubos continham suspensão de células e RPMI (controle) ou alíquota do clareador testado, nas diluições: 1:10, 1:100 e 1:1000. O índice de aderência foi calculado pela contagem das células não aderidas/ml. E as alterações morfológicas foram vistas através da leitura em lamínulas circulares coradas após adesão das células e tratamento com cada clareador. Foi visto que o perborato de sódio, o peróxido de hidrogênio e o peróxido de carbamida a 10%(comercial) aumentaram o índice de aderência em todas as diluições. O peróxido de carbamida a 16% (comercial) apenas na diluição de 1:1000, não elevou o índice de aderência. O peróxido de carbamida a 10% (manipulado) elevou o índice de aderência apenas na diluição de 1:10. O aumento do índice de aderência e o dano celular proporcionado, por agentes clareadores, caracterizam o potencial agressor. E alteração morfológica está

relacionada à elevação do índice e do aumento da concentração do produto.

SANTOS et al. (2000) observaram a liberação de superóxido em macrófagos tratados com peróxido de carbamida utilizado em clareamento. Os ratos machos foram estimulados com caseinato. Após 4 dias foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com soro fisiológico obtendo-se 7,4 ml de lavado que foi logo em seguida centrifugado. As células foram lavadas com soro fisiológico e ressuspendidas em meio de cultura (RPMI). Da suspensão os macrófagos foram separados por adesão ( $10^6$  células/ml RPMI), em seguida, tratados com peróxido de carbamida (20  $\mu$ l em  $2 \times 10^6$  de células/ 2ml RPMI durante 20 minutos) e estimulados com PMA. Após, amostras do sobrenadante de cultura foram coletadas às 0,1,2,3, e 4h, para a espectrofotometria do grau de redução do ferro-citocromoc/nmol de  $O_2^-$  formado. A produção de  $O_2^-$  foi calculada após a conversão das absorvâncias em nmol de  $O_2^-$  / min. Os autores verificaram que somente após 4 horas o peróxido de carbamida diminuiu a liberação de superóxido comparado ao grupo controle, assim constatando que seria desnecessário usar o produto por mais de três horas.

PIEROLI et al. (2000) estudaram o efeito da aplicação tópica de agentes clareadores a base de peróxido de carbamida com e sem carbopol, em hamsters, associados ou não ao DMBA que é um indutor experimental carcinogênico, para verificar o efeito indutor do material clareador ao câncer bucal. Os produtos foram aplicados na borda lateral da língua com três aplicações por semana durante 20 semanas. Os autores concluíram que o peróxido de carbamida à 10% com e sem carbopol, quando utilizado sozinho, não provocou qualquer alteração displásica, porém a combinação com o DMBA aumentou a incidência de lesões malignas.

CHAVES (2005) avaliou clínica e citologicamente pacientes submetidos à técnica de clareamento dental supervisionado utilizando-se peróxido de carbamida a 10% (Whiteness – FGM). Foram selecionados 32 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 40 anos, que apresentavam dentes com vitalidade e alteração de cor, sendo indicado o tratamento clareador. Destes pacientes, 20 foram selecionados aleatoriamente para serem submetidos a 3 coletas citológicas na mucosa gengival, a primeira realizada 1 dia antes do tratamento clareador, a segunda 1 dia após o término do clareamento e a terceira 30 dias após a segunda. Foi realizado exame clínico, primeira coleta citológica, seleção de cor, obtenção das moldeiras e o material clareador foi entregue aos pacientes para serem utilizados 4 horas/dia durante 4 semanas. A irritação gengival ocorreu em 31,2% dos pacientes, decrescendo ao longo das quatro semanas. Os resultados indicaram que o peróxido de carbamida a 10% por quatro semanas foi efetivo do ponto de vista estético. As alterações clínicas verificadas limitaram-se ao tempo de uso da substância clareadora.

FERREIRA et al. (2005) avaliaram a genotoxicidade de quatro agentes clareadores dentais, Insta-Brite (Bisco), Karisma (DFL), Opalescence (Ultradent) e Whiteness (FGM), todos a 10%, amplamente utilizados pela população e por profissionais. Verificaram o efeito dos clareadores dentais sobre a molécula de DNA. Para tanto, quarenta amostras de DNA de plasmídeo pUC-9.1 (200ng) foram incubados com duas diferentes concentrações destes agentes clareadores por 60 minutos. Na análise dos resultados do tratamento do DNA isolado de plasmídeo pUC-9.1 constatou-se que os produtos testados foram capazes de promover alteração da mobilidade eletroforética. Esse efeito foi mais intenso para o Insta-Brite e menor importância para o Karisma. Esse achado reforça a potencialidade genotóxica para os clareadores dentais, indicando-se desta forma, que sua utilização deve ser controlada objetivando menos riscos.

ALONSO ; BALBOA (2006) avaliaram a eficácia clínica dos materiais clareadores de uso caseiro e a possibilidade de efeitos adversos. Foi avaliado um gel de 3,5% de peróxido de hidrogênio 5% de nitrato de potássio comparand com um gel de peróxido de carbamida a 10% (Opalescence- Ultradent). Para tal foi determinado dois grupos com 8 pacientes, onde o produto foi aplicado tanto na arcada superior como inferior. O tratamento clareador foi aplicado 3 horas ao dia durante quatro semanas. O grau de clareamento foi avaliado usando a escala Vita; a sensibilidade dental foi mensurada por uma escala de quatro pontos e a irritação gengival foi registrada pela presença ou ausência de lesões na gengiva marginal. Os autores observaram que o clareamento foi similar em ambos materiais; o grau de sensibilidade foi menor no produto que tinha nitrato de potássio e a irritação gengival apareceu em seis pacientes . Assim concluindo que neste estudo os materiais não apresentam diferença entre eles.



### **3. PROPOSIÇÃO**

#### **3.1.OBJETIVO GERAL**

Estudar o efeito citotóxico do clareador dental peróxido de carbamida na concentração de 10% e 16%, através da produção de superóxido ( $O_2^-$ ) e óxido nítrico (ON) em cultura de macrófagos, em ratos, nos intervalos de 3 horas e 24 horas, juntamente com a saliva artificial.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos após tratamento com o peróxido de carbamida a 10% e 16%, nos tempos de 3 e 24 horas;
- 3- Avaliar a produção de superóxido, pelos macrófagos após tratamento com peróxido de carbamida a 10% e 16% ,nos tempos de 3 e 24 horas;





## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE), sob o protocolo nº 016311/2007-97 (Anexo I).

### 4.2. LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Setor de Microbiologia, da Universidade Federal de Pernambuco.

### 4.3. MATERIAL CLAREADOR DENTAL

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de concentrações clareadores indicados para o clareamento supervisionado, que são: Peróxido de Carbamida a 10% (Whiteness 10% – FGM), Peróxido de Carbamida a 16% (Whiteness 16%- FGM). Estes materiais foram codificados neste estudo como: W10 e W16 (Figura 01).



Figura 01-Material clareador (Whiteness 10% e 16%)

#### 4.4. SALIVA ARTIFICIAL

Foi utilizado saliva artificial manipulada na Fórmula Ativa- Recife /Pe (Figura 02). A composição da saliva pode ser vista no Quadro 01.

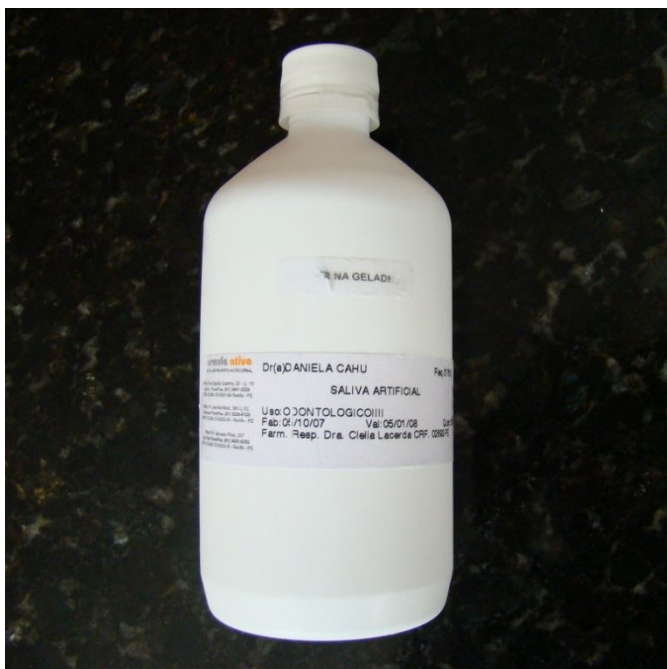


Figura 02-Saliva artificial (Fórmula Ativa - Recife)

**Quadro 01** - Composição da saliva

|                     |                     |                           |                   |                   |
|---------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| Cloreto do potássio | Cloreto de magnésio | Fosfato de potássio       | Sorbitol          | Benzoato de sódio |
| Cloreto de sódio    | Cloreto de cálcio   | Fosfato ácido de potássio | Fluoreto de sódio | Água destilada    |

#### 4.5. ANIMAIS E DIETA

Foram utilizados 24 ratos machos, albinos Wistar (90-120 dias), com peso aproximado entre 300g até 500g provenientes do biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Os animais eram mantidos no biotério com temperatura controlada ( $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), ciclo claro-escuro invertido de 12:12 h e livre acesso à água e ração, em gaiolas de propileno, com tampa de arame zincado, contendo 3 animais por gaiola e a ração será Labina (ração balanceada-Purina), a qual contém 23% de proteínas mistas (Figura 03).



Figura 03 - Ratos albinos tipo Wistar na gaiola de propileno

#### **4.6. OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica utilizada por DE CASTRO et al., 2000. Os animais eram anestesiados com uretana 12,5% na proporção de 8ml/Kg (intraperitoneal) assim variando entre 2,4 ml até 4,0 ml de acordo com o peso dos ratos. O LBA foi coletado com injeção de soro fisiológico através de uma cânula plástica inserida na traquéia (Figura 04). Várias alíquotas de 3ml eram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50ml (Falcon, Sigma) até se obter um volume aproximadamente de 30ml de LBA para cada animal (Figura 05).



**Figura 04** - Obtenção do lavado broncoalveolar.

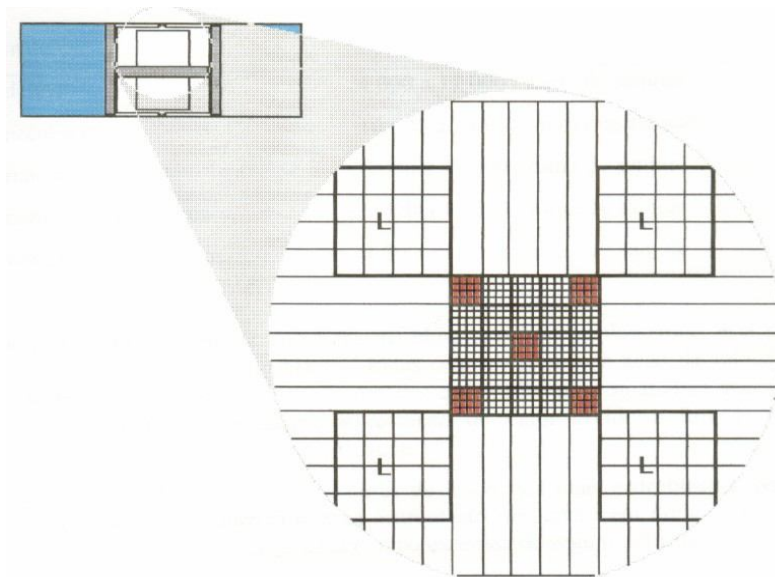


**Figura 05** - Lavado broncoalveolar

#### 4.7. CULTURAS DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES (MA)

Centrifugou-se o LBA recolhido a 1500 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado que corresponde às células ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) contendo soro fetal bovino a 3% (Invitrogen) e os antibióticos Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100µg/ml e Anfotericina B 0,25 µm/ml.

A contagem total das células foi feita a partir de uma amostra do LBA, diluição de 1:10, em corante azul trypan, que foram contados em uma câmara de volume (câmara de Neubauer) com o auxílio do microscópio óptico 40X (Figura 06).



**Figura 06** - Área de contagem dos macrófagos na câmara de Neubauer.

As células foram transferidas para placas de cultura de poliestireno com 35 mm de diâmetro (6 poços), onde foi dispensado 2ml da suspensão em uma

proporção de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera úmida contendo 5%  $\text{CO}_2$ , desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se 2 ml de meio RPMI, deixando as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

## **4.8. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E PREPARO DAS PLACAS DE CULTURA**

### **4.8.1 Óxido Nítrico**

Os grupos experimentais foram oito divididos em: controle negativo, sem tratamento, no intervalo de 3 horas (**R<sub>1</sub> C<sub>1</sub>**); um grupo controle positivo (LPS), tratado com LPS no intervalo de 3 horas (**R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>**); peróxido de carbamida a 10% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 3 horas (**R<sub>3</sub>W10**); peróxido de carbamida a 16% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 3 horas (**R<sub>4</sub>W16**); controle negativo, sem tratamento, no intervalo de 24 horas (**R<sub>5</sub> C<sub>1</sub>**); controle positivo (LPS) tratado com LPS no intervalo de 24 horas (**R<sub>6</sub> C<sub>2</sub>**); peróxido de carbamida a 10% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 24 horas (**R<sub>7</sub>W10**); peróxido de carbamida a 16% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 24 horas (**R<sub>8</sub> W16**) **Quadro 2 e 3**. Esses quadros são ilustrações que simulam como foram organizadas as placas de cultura. O número de réplicas foi 12 por cada grupo.

Nos grupos que foram testados os materiais clareadores, foram acrescidos a saliva artificial na mesma quantidade do clareador. Essa quantidade segue as especificações do protocolo de pesquisa para verificar a produção de óxido nítrico e foi de 100µl para cada poço (DE CASTRO et al. 2000). Para a realização deste experimento foram utilizadas  $10^6$  células para cada poço. A determinação do tempo em que o material foi colocado em contato com as células foi determinada a partir das instruções do fabricante em relação ao tempo de liberação do oxigênio

nascente, que seria o tempo de ação do material, e também pelo que foi visto na literatura (SANTOS et al. 2000). Assim, 3 horas é o tempo ativo do material e 24 horas corresponderia ao tempo aproximado de 1 semana de clareamento, com 3 horas diárias.

**Quadro 02** – Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 3 horas, organizados em placa de cultura.

|                                    |                                 |  |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| <b>Controle (-)</b><br><b>R1C1</b> | <b>W10 (3h)</b><br><b>R3W10</b> |  |
| <b>LPS</b><br><b>R2C2</b>          | <b>W16 (3h)</b><br><b>R4W16</b> |  |

**Quadro 03** – Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 24 horas, organizados em placa de cultura.

|                                    |                                  |  |
|------------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>Controle (-)</b><br><b>R5C1</b> | <b>W10 (24h)</b><br><b>R7W10</b> |  |
| <b>LPS</b><br><b>R6C2</b>          | <b>W16 (24h)</b><br><b>R8W16</b> |  |

#### 4.8.2. Superóxido

Os grupos experimentais foram 6 divididos em: controle negativo, sem tratamento, no intervalo de 3 horas (**R<sub>1</sub> C<sub>1</sub>**), peróxido de carbamida a 10% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 3 horas (**R<sub>2</sub>W10**), peróxido de carbamida a 16% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 3 horas (**R<sub>3</sub>W16**), controle negativo, sem tratamento, no intervalo de 24 horas (**R<sub>4</sub> C<sub>1</sub>**), o peróxido de carbamida a 10% aplicado sobre a cultura de macrófagos por 24 horas (**R<sub>5</sub>W10**), peróxido de carbamida a 16% aplicados sobre a cultura de macrófagos por 24 horas (**R<sub>6</sub> W16**) **Quadro 4 e 5**. Para a realização deste experimento é necessário  $2 \times 10^6$  de células para cada poço. O número de réplicas para cada grupo foi nove. Os valores negativos foram descartados.

Nos grupos que foram testados os materiais clareadores foram acrescidos à saliva artificial na mesma quantidade do clareador. Essa quantidade segue as especificações do protocolo de pesquisa para verificar a produção de superóxido e foi de 200 µl para cada (DE CASTRO et al. 2000).

**Quadro 04** – Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 3 horas, organizados em placa de cultura.

|   |  |  |
|---|--|--|
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><b>Controle (-)</b><br/><b>R1C1</b></div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><b>W10 (3h)</b><br/><b>R2W10</b></div> |  |
|   | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><b>W16 (3h)</b><br/><b>R3W16</b></div> |  |



**Quadro 05** – Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 24 horas, organizados em placa de cultura.

|   |   |  |
|---|---|--|
| <p><b>Controle (-)</b></p> <p><b>R4C1</b></p> | <p><b>W10 (24h)</b></p> <p><b>R5W10</b></p> |  |
|   | <p><b>W16 (24h)</b></p> <p><b>R6W16</b></p> |  |

#### **4.9. Estudo das células (macrófagos) do lavado broncoalveolar**

##### **4.9.1 Produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares**

Uma vez ocorrida à adesão celular na placa de cultura, cada poço era aspirado e lavado com 1ml de solução salina a 0,9%. Os poços eram distribuídos nas placas de cultura conforme descrito anteriormente. Neste momento as células foram estimuladas com o LPS 10 µg/ml e com os materiais clareadores que eram Whiteness 10% e Whiteness 16% juntamente com a saliva artificial. As placas de cultura retornaram à estufa para posterior realização das leituras em espectrofotômetro, com 3 horas e 24 horas de contato com o clareador. Podem ser vistos a composição de cada grupo nas placas de cultura quadros 06 e 07.

**Quadro 06** – Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 3 horas e a composição de cada grupo.

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Controle (-)</b><br/><b>R1C1</b></p> <p>1ml de RPMI</p>              | <p><b>W10 (3h)</b><br/><b>R3W10</b></p> <p>800 µl de RPMI +<br/>100 µl W10 +<br/>100 µl de saliva</p> |  |
| <p><b>LPS</b><br/><b>R2C2</b></p> <p>990 µl de RPMI +<br/>10 µl de LPS</p> | <p><b>W16 (3h)</b><br/><b>R4W16</b></p> <p>800 µl de RPMI +<br/>100 µl W16 +<br/>100 µl de saliva</p> |  |

**Quadro 07** – Grupos experimentais para verificação da liberação do óxido nítrico no tempo de exposição de 24 horas e a composição de cada grupo.

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Controle (-)</b><br/><b>R5C1</b></p> <p>1ml de RPMI</p>              | <p><b>W10 (24h)</b><br/><b>R7W10</b></p> <p>800 µl de RPMI +<br/>100 µl W16 de +<br/>100 µl de saliva</p> |  |
| <p><b>LPS</b><br/><b>R6C2</b></p> <p>990 µl de RPMI<br/>+ 10 µl de LPS</p> | <p><b>W16 (24h)</b><br/><b>R8W16</b></p> <p>800 µl de RPMI +<br/>100 µl W16 de +<br/>100 µl de saliva</p> |  |

### **Construção da curva padrão**

Para efetuar a dosagem de óxido nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito e nitrato das amostras é necessário realizar uma curva padrão. Para a construção desta foi utilizado reagentes a base da solução de Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 1mM (Solução padrão), meio de cultura RPMI 1640 e reagente de Griess (Solução de revelação) em volumes pré-estabelecidos conforme a descrição a seguir. Quantidades crescentes da solução padrão foram adicionadas ao RPMI 1640 e reagente para se obter oito (08) soluções de diferentes concentrações (Figura 07) . O reagente foi adicionado após a mistura da solução padrão e o RPMI nas quantidades estabelecidas, porém, removeu-se 500 $\mu\text{l}$  da mistura e acrescentou-se 500 $\mu\text{l}$  da solução reveladora. As quantidades pré-estabelecidas estão descritas no quadro 08.

**Quadro 08** – Construção de curva padrão para dosagem do óxido nítrico

| <b>SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRITO DE SÓDIO A 1mM (ul)</b> | <b>MEIO DE CULTURA RPMI 1640(<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|--|--|
| 0  | 1000   |
| 2  | 998  |
| 5  | 995  |
| 10   | 990  |
| 25   | 975  |
| 50   | 950  |
| 75   | 925  |
| 100  | 900  |



Figura 07 - Curva padrão

### **Processo de revelação da curva padrão e das amostras**

A confecção da curva padrão ocorreu nos momentos das coletas das amostras, e as leituras tanto das amostras quanto da curva padrão foram efetuadas após o período de incubação.

Para o procedimento das leituras, em espectrofotômetro, utilizou-se um comprimento de onda de 540 nm. Em seguida, retiramos 500 $\mu$ L de cada solução da curva padrão e a mesma quantidade de amostras de sobrenadantes das culturas de células misturados a 500  $\mu$ l da solução revelação, e, após 10 minutos foi realizada a leitura. No grupo controle as células não receberam tratamento com LPS, apenas 2ml de RPMI 1640 e 500  $\mu$ l solução de revelação.

A determinação espectrofotométrica dos níveis de nitrito e nitrato da curva padrão assim como, daqueles liberados nas amostras experimentais foram registradas em absorbância. A partir da determinação dos valores da curva padrão

foi possível converter os valores de todas as amostras pela aplicação de uma regra de três, tendo como referência a curva padrão e assim determinou-se a quantidade de nitrito e nitrato liberados pelos macrófagos nos diferentes grupos. Por exemplo, verifica-se na curva padrão os valores que mais se aproximam soma-se e divide por dois obtendo uma média e usa este valor como referência. Hipoteticamente temos uma curva padrão:

#### CURVA PADRÃO

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 1A = 0,090        | 1B = 0,157        |
| 2A = 0,294        | 2B = 0,519        |
| 3A = 0,415        | 3B = 0,486        |
| <b>4A = 1,402</b> | <b>4B = 1,423</b> |
| <b>5A = 2,114</b> | <b>5B = 2,345</b> |
| 6A = > 3          | 6B = > 3          |

Ex:  $1,402 + 1,423 = 2,825 / 2 = 1,412$

Após obter o valor médio aplica-se uma regra de três como pode-se ver abaixo:

$$\begin{array}{rcl} 4 & - & 1,412 \\ \text{Vo} & - & \text{G1} \end{array}$$

**Vo = Valor obtido no espectrofotômetro**

**G1 = o grupo experimental**

#### 4.9.2. Análise da produção de superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

O superóxido foi induzido pela adição de acetato miristato de forbol (PMA, Sigma) em solução de Hanks (HBSS, Invitrogen), na concentração de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Prepararmos dois sistemas de análise descontínua com avaliação a cada uma hora, por duas horas. A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos. Para o preparo destes

sistemas utilizamos macrófagos em cultura ( $2 \times 10^6$  células por 2 ml de RPMI 1640), com ou sem a presença de SOD. Os sistemas foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>, por 10 min (ativação da SOD). O ferrocitocromo tipo IV, (30mg/mL em HBSS,  $2,4 \times 10^{-3}$ ) foi adicionado as células para quantificar a formação de superóxido através da redução do ferrocitocromo c. Amostras de 700µl foram retiradas de cada sistema. A primeira alíquota recolhida correspondeu ao tempo 0h de cada sistema e as amostras subseqüentes eram coletadas em intervalos regulares de tempo (1 e 2 horas). Porém para o experimento apenas o tempo 2 foi avaliado em todos os grupos, por ser neste tempo maior a produção de superóxido. As medidas espectrofotométricas foram realizadas a 550nm para determinar o grau de redução do ferrocitocromo c e dos sobrenadantes. Os valores de superóxido eram obtidos pelo valor de absorbância usando a fórmula:

$$O_2^- = \frac{205,49 \times DO \times 0,7}{2}$$

Abaixo se pode observar a composição de cada grupo na placa de cultura nos quadros 09 e 10.

**Quadro 09** – Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 3 horas e a composição de cada grupo.

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>Controle (-)</b><br/><b>R1C1</b></p> <p>1ml de RPMI</p> | <p><b>W10 (3h)</b><br/><b>R2W10</b></p> <p>1600 µl de RPMI +<br/>200 µl W10 +<br/>200 µl de saliva</p> |  |
|   | <p><b>W16 (3h)</b><br/><b>R3W16</b></p> <p>1600 µl de RPMI +<br/>200 µl W16 +<br/>200 µl de saliva</p> |  |

**Quadro 10** – Grupos experimentais para verificação da liberação do superóxido no tempo de exposição de 24 horas e a composição de cada grupo.

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Controle (-)</b><br/><b>R4C1</b><br/>1ml de RPMI</p> | <p><b>W10 (24h)</b><br/><b>R5W10</b><br/>1600 µl de RPMI +<br/>200 µl W16 de +<br/>200 µl de saliva</p> |  |
|  | <p><b>W16 (24h)</b><br/><b>R6W16</b><br/>1600 µl de RPMI +<br/>200 µl W16 de +<br/>200 µl de saliva</p> |  |

#### 4.10. Análise Estatística

Para comparação dos diferentes grupos, foi empregada a análise de variância (ANOVA) para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi utilizado o teste de Tukey para identificar as diferenças entre os grupos. Para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos.





## 5. RESULTADOS

### 5.1. ÓXIDO NÍTRICO

Os grupos testados para avaliação da liberação de óxido nítrico foram: o grupo Controle, LPS, W10 e W16. A produção de ON nos grupos testados foram avaliados em dois períodos que foram: 3 horas e 24 horas. Assim, os grupos experimentais de ON foram: Controle (3h), LPS (3h), W10 (3h), W16 (3h), Controle (24h), LPS (24h), W10 (24h), e W16 (24h) com n= 12.

Para verificar o nível de citotoxicidade dos grupos estimulados, que eram o grupo do LPS, W10 e W16, estes foram comparados com o grupo controle nos dois intervalos de tempo.

#### Tempo de 3 horas - Óxido nítrico

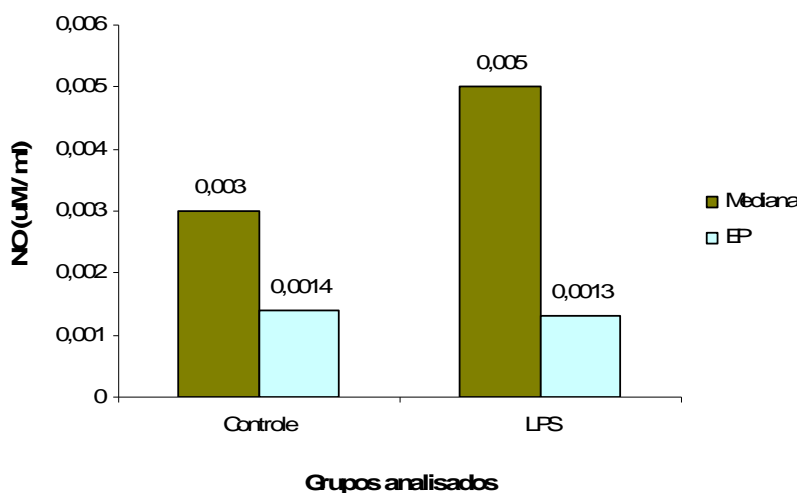
Nos grupos testados observou-se que o grupo que apresentou menor produção de óxido nítrico foi o grupo Controle e o que apresentou a maior foi o grupo W10. Os grupos que receberam o tratamento com os materiais clareadores W10 e W16 liberaram uma maior quantidade de ON quando comparados com o grupo controle como se pode verificar na tabela 01.

**Tabela 01** - Estatística descritiva do óxido nítrico no tempo de 3 horas

| <b>3 horas</b>  | <i>Tamanho</i> | <i>Média</i>  | <i>DP</i> | <i>EP</i> | <b>Mediana</b> |
|-----------------|----------------|---------------|-----------|-----------|----------------|
| <b>Controle</b> | 12             | <b>0,0050</b> | 0,0049    | 0,0014    | 0,0030         |
| <b>LPS</b>      | 11             | <b>0,0059</b> | 0,0043    | 0,0013    | 0,0050         |
| <b>W10</b>      | 12             | <b>0,0209</b> | 0,0101    | 0,0029    | 0,0225         |
| <b>W16</b>      | 12             | <b>0,0118</b> | 0,0087    | 0,0025    |                |

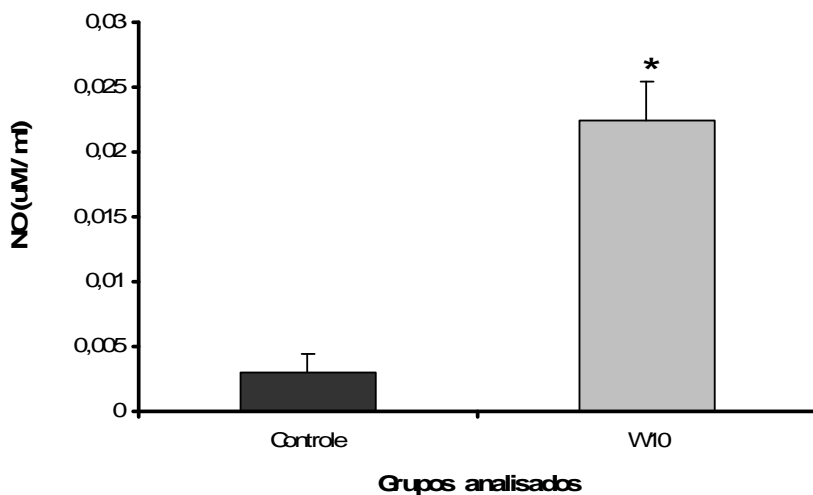
Na comparação do grupo Controle com o LPS, pela aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney, teve valor de  $p= 0,406$ , não tendo diferença estatisticamente significativa, como pode ser observado no gráfico 01.

**Gráfico 01 - CONTROLE X LPS (3h)**



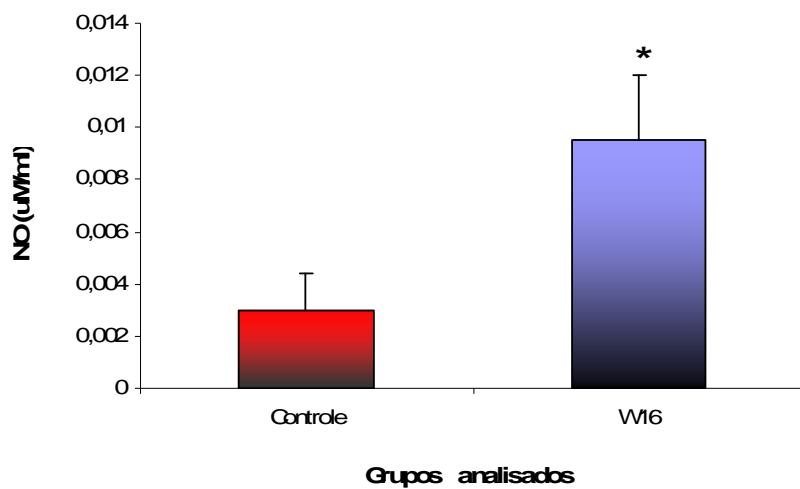
Na comparação do grupo Controle com o grupo do material clareador W10 (whiteness a 10%) foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney obtendo valor de  $p= 0,001$ , ou seja, demonstrando que existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (mediana = 0,0030) e o grupo W10 (mediana = 0,0225), observado no gráfico 02.

**Gráfico 02 - CONTROLE X W10 (3h)**



No grupo do material clareador W16 (Whiteness a 16%) também foi aplicado o teste de Mann-Whitney obtendo o valor de  $p = 0,011$ , demonstrando que existe diferença estatisticamente significativa, entre o grupo Controle (mediana = 0,0030) e o grupo W10 (mediana = 0,0095), observado no gráfico 03.

**Gráfico 03-CONTROLE X W16 (3h)**



## Tempo de 24 horas - Óxido nítrico

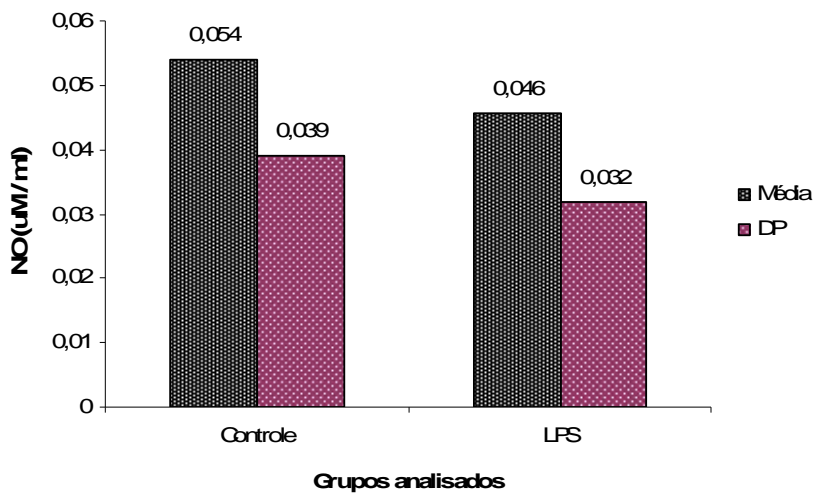
Neste período os grupos que receberam o tratamento tanto com o LPS como os materiais clareadores W10 e W16 liberaram uma menor quantidade de ON quando comparados com o grupo Controle como pode ser observado na tabela 02. Porém somente, os grupos experimentais dos materiais clareadores quando cruzados com o Controle apresentaram diferença estatisticamente significativa (Gráficos 05 e 06).

**Tabela 02** - Estatística descritiva do óxido nítrico no tempo de 24 horas

| <b>24horas</b>  | <b>Tamanho</b> | <b>Média</b>  | <b>DP</b> | <b>EP</b> | <b>Mediana</b> |
|-----------------|----------------|---------------|-----------|-----------|----------------|
| <b>Controle</b> | 12             | <b>0,0547</b> | 0,0326    | 0,0094    | 0,0450         |
| <b>LPS</b>      | 12             | <b>0,0457</b> | 0,0166    | 0,0047    | <b>0,0445</b>  |
| <b>W10</b>      | 12             | <b>0,0175</b> | 0,0394    | 0,0114    | 0,0110         |
| <b>W16</b>      | 12             | <b>0,0134</b> | 0,0087    | 0,0025    | 0,0095         |

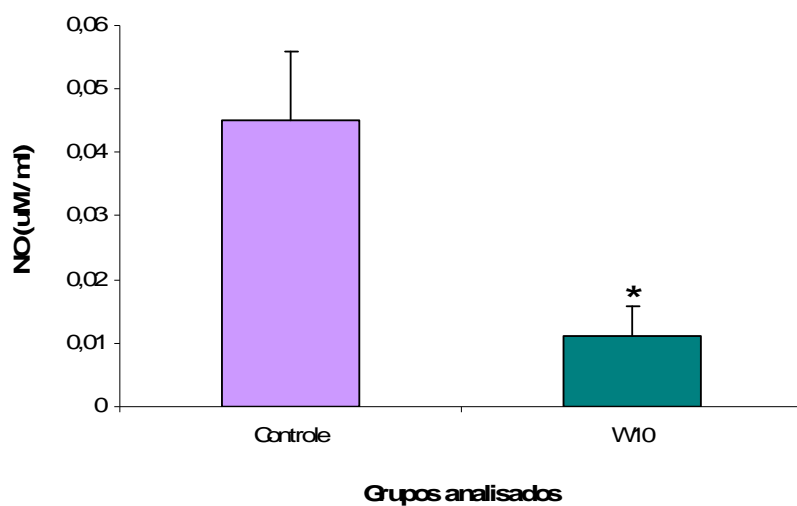
O cruzamento do grupo Controle x LPS pela aplicação do teste paramétrico teste t, cujas médias eram Controle (0,0547) e LPS (0,0457) apresentaram valor de  $p = 0,550$ , ou seja não teve diferença estatística, observado no gráfico 04.

**Gráfico 04** - CONTROLE X LPS (24h)

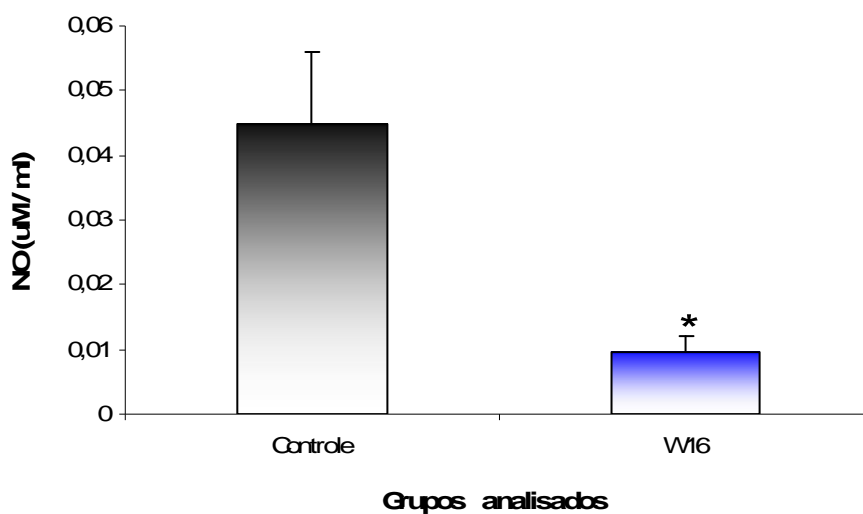


O cruzamento do grupo Controle x W10 pela aplicação do teste Mann-Whitney e cujas medianas foram Controle (0,045) e W10 (0,011) obtiveram valor de  $p=0,002$ , concluindo que houve diferença estatisticamente significativa(Gráfico 05). Isto também foi observado no grupo em que foi testado o W16, cuja mediana foi 0,009 e pelo teste estatístico Mann-Whitney obteve-se valor de  $p= < 0,001$  (Gráfico 06).

**Gráfico 05-CONTROLE X W10 (24h)**



**Gráfico 06-CONTROLE X W16 (24h)**



## 5.1.SUPERÓXIDO

Nos grupos testados, no tempo de 3 horas, observou-se que o grupo que apresentou menor produção de superóxido foi o grupo Controle e o que apresentou a maior foi o grupo W16. Os grupos que receberam o tratamento com os materiais clareadores W10 e W16 liberaram uma maior quantidade de superóxido quando comparados com o grupo controle, como se pode verificar na tabela 03.

No tempo de 24 horas, o grupo que apresentou maior produção de superóxido foi o grupo W16 seguido pelo grupo controle e o W10 (Tabela 04).

**Tabela 03** - Estatística descritiva do superóxido no tempo de 3 horas

| <b>3 horas</b> | <i>Tamanho</i> | <i>Média</i> | <i>DP</i> | <b>Mediana</b> |
|----------------|----------------|--------------|-----------|----------------|
| Controle       | 5              | 12,830       | 3,317     | 13,090         |
| W10            | 4              | 25,570       | 39,943    | 6,835          |
| W16            | 6              | 26,692       | 22,594    | 29,595         |

**Tabela 04** - Estatística descritiva do superóxido no tempo de 24 horas

| <b>24horas</b> | <i>Tamanho</i> | <i>Média</i> | <i>DP</i> | <b>Mediana</b> |
|----------------|----------------|--------------|-----------|----------------|
| Controle       | 4              | 13,990       | 11,070    | 14,530         |
| W10            | 5              | 5,736        | 5,272     | 4,090          |
| W16            | 6              | 25,097       | 17,954    | 7,075          |

Para verificar a citotoxicidade dos grupos foi feito o cruzamento do grupo Controle com os grupos de materiais clareadores W10 e W16 nos intervalos de 3 horas e 24 horas. Após a aplicação do teste paramétrico test-t entre os grupos: C x W10 e C x W16 nos tempos de 3 horas e 24 horas não revelaram diferenças estatisticamente significantes.





## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo o potencial citotóxico do peróxido de carbamida a 10% e 16%, foi verificado através do tratamento dos macrófagos alveolares com estes clareadores, a fim de verificar se estas substâncias ativavam os macrófagos, levando-os a produzir maiores quantidades de superóxido e óxido nítrico, os quais são liberados quando os macrófagos são ativados frente um agente agressor.

Para se compreender o que acontece a nível celular sendo importante ter o conhecimento do mecanismo de ação do material clareador em contato com a saliva ou tecidos orais. O peróxido de carbamida a 10-16% decompõe-se em 3-5% de peróxido de hidrogênio e 7 a 10% de uréia (PIMENTA; PIMENTA, 1998). O peróxido de hidrogênio, é considerado o agente ativo, é metabolizado por enzimas, como peroxidases e degrada-se em água e oxigênio (BARATIERI, 1993). A uréia decompõe-se em dióxido de carbono e amônia elevando o pH da placa dental (LEONARD, 1994).

O baixo peso molecular das soluções de peróxido permite que transitem livremente pelos espaços interprismáticos, através do esmalte e também dentina, provocando a oxidação dos pigmentos presentes nessas estruturas (PIMENTA; PIMENTA, 1998).

A preocupação com o efeito desmineralizador dos clareadores dentais determinou estudos sobre o pH. O pH dos materiais clareadores varia de 4.6 a 7.4. Estudos clínicos demonstram que somente durante os primeiros minutos de clareamento, o pH permanece crítico. Após este período, devido à degradação da uréia, o pH da solução é bruscamente elevada, aumentando também o pH da

placa. Ainda é importante lembrar que a saliva tem potencial remineralizador. (LEONARD, 1994).

Outro aspecto importante que deve ser considerado é a degradação do gel clareador na cavidade bucal, pois, existe uma relação entre o material clareador e a saliva. Segundo Matis et al. (1999), o agente ativo do gel fica disponível por 10 horas, porém, sua degradação é maior na primeira hora. Após 2 horas mais de 50% mantém disponível e passada 10 horas apenas 10% fica disponível. Concordantes com estes resultados, Wattanapayungkul et al. (1999) demonstraram que a proporção da degradação do peróxido de carbamida foi maior durante os 5 minutos iniciais e na primeira hora onde a concentração variou de 54-70%. Muitos são os fatores que podem influenciar a rápida degradação do peróxido de carbamida durante a primeira hora, incluindo: presença de película no dente, saliva, flora oral, mudança do pH do agente ativo e a saturação do oxigênio (WATTANAPAYUNGKUL ET AL. 1999).

Existe um grande interesse pelo estudo dos efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio presente nos materiais clareadores. Estudos em animais têm relatado o efeito citotóxico da aplicação dos materiais clareadores em culturas de células, sejam fibroblastos ou macrófagos, pela ingestão do material clareador; e ainda os efeitos na mucosa gengival (MARTIN, et al.,1968; HANKS et al., 1992; DAHL; BECKER, 1995; TIPTON et al., 1995<sup>a</sup>, TIPTON et al., 1995<sup>b</sup>; KOULAOUZIDOU et al., 1998; ASFORA, 2000; PIEROLI et al., 2000, SANTOS et al., 2000, ASFORA, 2005 et al., ).

Em relação à ingestão do material clareador, foram vistos, em ratos, sinais de toxicidade aguda e ulceração gástrica (DAHL; BECKER, 1995). Já o efeito na

mucosa gengival, em cães, pela aplicação do peróxido de hidrogênio (1%) determinou reação inflamatória aguda. E após 48 horas resultou na destruição das células epiteliais (MARTIN et al., 1968).

É crescente o interesse pela avaliação das alterações celulares decorrentes da aplicação dos materiais clareadores. O efeito do peróxido de carbamida contido nos clareadores, em fibroblastos gengivais provoca alterações morfológicas e até a morte celular, e ainda diminui a proliferação e produção de colágeno e fibronectina. Porém esses efeitos podem ser influenciados pela concentração do material, quanto pelo tempo em contato com as células (HANKS et al., 1992; KOULAOUZIDOU et al., 1998).

Em macrófagos, podem-se constatar alterações morfológicas proporcionadas pelos produtos clareadores. O potencial citotóxico do peróxido de hidrogênio e do peróxido de carbamida 10% e 16% são intensificados com o aumento da dose (ASFORA, 2000; ASFORA, 2005).

Nosso resultado demonstrou que à produção de óxido nítrico no tempo de 3 horas, pode ser visto na tabela 01, que os materiais clareadores W10 e W16 apresentaram maiores valores que o grupo controle. Os gráficos 02 e 03 ilustram o resultado estatístico onde foi verificada diferença significativa quando comparados com o grupo controle, demonstrando aumento na produção de óxido nítrico, evidenciando assim citotoxicidade. Entretanto, no tempo de 24 horas, os grupos W10 e W16 apresentam produção de ON menor que o grupo controle. Apesar de apresentarem diferença significativa (Gráfico 05 e 06) quando comparados ao controle, não representam citotoxicidade, pois foi muito pequena a produção de óxido nítrico. Esse tempo de 3 horas da aplicação do material

clareador foi determinado por Santos et al.(2000) que relataram que acima de 3 horas, clinicamente, é desnecessário o uso do produto por mais de 3 horas.Em nosso estudo, como queríamos ver a nível celular o efeito do material clareador aplicamos por 24 horas também para simular a aplicação de 1 semana.

Interpretando esses resultados, pode-se observar a influência do tempo como uma variável importante. Esses resultados são discordantes de Koulaouzidou et al. (1998) que ressaltaram que a citotoxicidade é influenciada pelo tempo de ação do clareador, ou seja, quanto maior o tempo maior será a citotoxicidade. Porém acreditamos que com o passar do tempo ocorre a degradação natural do produto diminuindo seu potencial citotóxico.

Estes resultados discordam de ASFORA, 2000 que através da avaliação do índice de aderência de macrófagos, constatou que o peróxido de carbamida a 10% e 16%, eram produtos não compatíveis independente da concentração e tempo de tratamento, pois ambos aumentaram o índice de aderência, evidenciando dano morfológico do macrófago. Entretanto no nosso estudo foi introduzida, a saliva artificial, que além de reproduzir mais fielmente as condições clínicas de uso dos clareadores pelos pacientes, parece ter um importante papel modulador do meio.

Quando observado a produção de superóxido pelos macrófagos, após estimulação com os clareadores W10 e W16, em contato também com a saliva artificial, os resultados demonstraram que tanto no tempo de 3 horas como 24 horas não houve significância, ou seja, não apresentaram citotoxicidade. Apesar dos valores serem maiores que o grupo controle no tempo de 3 horas (Tabela 03).

E no tempo de 24 horas os valores menores foram para W10 demonstrando que não existe citotoxicidade (Tabela 04).

Os nossos resultados encontrados sugerem novamente que o diferencial seja a incorporação da saliva, pois a mesma pode minimizar os efeitos não somente pela diluição do clareador como pela sua capacidade tampão. A maioria dos trabalhos até então encontrados na literatura de citotoxicidade dos clareadores não utilizavam a saliva artificial. Somente Tipton et al. (1995<sup>b</sup>) relataram que a toxicidade do material clareador é devido à liberação de peróxido de hidrogênio, portanto esta pode ser reduzida pelas enzimas presentes na saliva e /ou tecidos orais que o degradam. Ainda Tipton et al. (1995<sup>a</sup>) relataram a necessidade de estudos *in vivo*, pois os resultados podem ser diferentes devido aos mecanismos de defesa específicos e não específicos da mucosa oral e ação das enzimas.

Deve-se ter cautela na administração dos materiais clareadores, pois existem evidências de carcinogenicidade em várias concentrações de peróxido de hidrogênio nos tecidos bucais (LARSON,1999). Alguns estudos demonstram a ação co-carcinogênica do peróxido de carbamida a 10% (PIEROLI, 2000). Mas é importante salientar que esses resultados foram obtidos devido a utilização do DBMA, que é um indutor carcinogênico, e não foi levado em consideração o efeito da saliva que normalmente neutraliza o efeito dos peróxidos. Porém pela técnica da citologia esfoliativa para avaliar as alterações citológicas do epitélio gengival, de pacientes submetidos à técnica de clareamento caseiro com peróxido de carbamida a 10%, não foram encontradas alterações que indicam critérios citológicos de malignidade (CHAVES, 2005).

É importante ressaltar a necessidade de mais estudos clínicos para verificar os efeitos dos peróxidos sobre células e tecidos para que possa ter segurança na administração dos materiais clareadores. Os benefícios estéticos do clareamento são evidentes, porém os seus efeitos sobre a mucosa bucal devem ser mais estudados. É importante à indicação precisa do tratamento evitando assim danos. Os nossos resultados foram bastante significativos, pois se pode verificar que apesar dos materiais clareadores liberarem peróxidos, os quais podem determinar várias reações fisiológicas e patológicas, estes dependendo do tempo de aplicação podem apresentar mínima ou nenhuma citotoxicidade provavelmente devido a sua interação com a saliva.



## 7. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e análise dos resultados podemos concluir que:

1. No tempo de 3 horas à produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados com os materiais clareadores W10 e W16 apresentaram citotoxicidade;
2. No que se refere à produção de óxido nítrico no tempo de 24 horas foi visto que, os materiais clareadores W10 e W16 não apresentaram citotoxicidade;
3. O fator tempo na produção de óxido nítrico, pelos macrófagos, influenciou os efeitos dos materiais clareadores tanto no tempo de 3 horas como 24 horas;
4. No tempo de 3 horas e 24 horas à produção de superóxido pelos macrófagos tratados com os materiais clareadores W10 e W16 não apresentaram citotoxicidade.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol**, v. 2, p. 283-318, 1984.

ALDANA, L. et al. Inactivation of tooth whitener peroxide by oral fluids (abstract 1266). **J. Dent. Res.** 1991; 70(special issue):424.

ALONSO, de la P V.; BALBOA, C. O. Comparison of the efficacy and safety of carbamide and peroxide in at-home bleaching gels. **Quintessence Int.**, v. 37, n. 7, p. 551-6, jul-aug, 2006.

ANDERSON, D.G. et al. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. **J. Endod.**, v.25, n.4, p.247-250, april, 1999.

ASFORA ,K.K. **Ação dos clareadores dentais na função e morfologia de macrófagos.** Camaragibe, 2000. 91p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Pernambuco da Universidade de Pernambuco, Camaragibe, 2000.

ASFORA, K.K.; SANTOS, M.C.M. S.; MONTES<sup>a</sup> , M.A.J.R.; DE CASTRO, C.M.M.B. Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of adherence capacity and morphology of macrophages. **J. Dent.**, v. 33, p. 155-162, feb., 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 10520** : Informação e documentação: Citações em documentos: Apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 14724: Informação e documentação: Trabalhos acadêmicos: Apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BABIOR, B.M. Superoxide: two-edged sword. **Brazilian journal of medical**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BARATIERI, L.N. et al. **Clareamento Dental**, 1 ed. São Paulo: Ed. Santos, 1993.

BARATIERI, L.N. et al. **Caderno de dentística: Clareamento dental.** São

Paulo: Ed. Santos, 2004.

CARDOSO, P.C.; GODOY, F. S.; OLIVEIRA, M.T., BARATIERI, L. N. Influência do tempo de aplicação de um gel clareador a base de peróxido de carbamida a 10% na cor dos dentes – um estudo *in vitro*. **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 10, jan/mar, p. 78-83, 2007.

CARLSSON, J. Salivary peroxidases: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J. Oral Pathol.*, Copenhagen, v. 16, p. 412-16, July. 1987

CELADA, A; NATHAN, C. Macrophage activation revisited. **Immunology Today**. v.15, p. 100-102, 1994.

CHANDRA, R .K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, n. 2, p. 460S- 3S, 1997.

CHAVES, D. S. **Avaliação clínica e citológica de pacientes submetidos a clareamento com peróxido de carbamida à 10 %**. Camaragibe, 2005. 71p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Pernambuco da Universidade de Pernambuco, Camaragibe, 2005.

CHRISTENSEN, G.J. Home-use bleaching survey. **Clin. Res. Assoc. Newsletter**, v.15, p. 2, 1996.

CURTIS J.R. J. W.; et al. Assessing the effects of 10 percent carbamide peroxide on oral soft tissues. **J. Amer. Dent. Assoc**, v 127, p. 1218-23, aug., 1996.

CURTIS J.R. J. W.; et al. Evaluation the effects of a dentist-supervised patient applied carbamida peroxide bleaching agent on oral soft tissues. **J. Esthet.. Dent.**, v 8, n. 1, p.18-25, 1996.

DAHL, J. E.; BECHER, R. Acute toxicity of carbamide peroxide and commercially available tooth-bleaching agents in rats. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 2, p. 710-14, feb., 1995.

DE CASTRO, C.M.B. et al. Estresse: Interações neuroendócrinas e imunológicas. **Anais Faculd de Méd –UFPE**, v. 44, n. 2, p. 132-37, 1999.

DE CASTRO, C.M.B. et al. Effect of the stress on the production of O<sub>2</sub> in alveolar macrophages. **J.Neuroimmunol.**, v. 108, n.1, p. 68-72, 2000.

DE LA FUENTE, M. et al. MOdulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. **Immunology**, v.73, p. 205-11, 1991.

ERNST, C. P. et al. Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. **Quintessence Int.**, v. 27, n. 1, p. 53-6, 1996.

FERREIRA, S.L.Z., FERREIRA, T. R.F.Z.; COELHO, A. J. M.; DANTAS, C. J.S. A potencialidade genotóxica dos clareadores dentais caseiros: é seguro utilizá-los? **GBPD Anais fc**, 2007.

FLOYD, R. A. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. **J. Amer. Dent. Assoc**, v. 128, p. 37s-40s, apr., 1997.

HANKS, C T.; FAT, J.C.; WATAHA, J.C.; CORCORAN, J.F. Cytotoxicity and dentinpermeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. **J. Dent. Res.** v.72, p. 931-8, 1993.

HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H.O. Nightguard vital bleaching. **Quintessence Int.**, v. 20, p. 173-6, 1989.

KIM, H et al. Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague-Dawley rats. **J Sports Med Phys Fitness.**, v.43, p. 99-104, 2003.

KOULAOUZIDOU, E. et al. In vitro evaluation of the citotoxicity of a bleaching agent. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 14, p. 21-5, 1998.

LARSON, T.D. The effect of peroxides on teeth and tissue review of the literature. **Northwest Dent**, St Paul, v.4, p. 29-32, nov/dec., 1990.

LARSON, T.D. Tooth whitening review of the literature. **Northwest Dent**, St Paul, v.73, p. 21-6, 1994.

LEONARD, R.H. et al. Change in pH of plaque and 10% carbamide peroxide solution during nightguard vital bleaching treatment. **Quintessence Int.**, v.29, p. 819-23, 1994.

LEONARD, JR. R. H.; HAYWOOD, V.B.; PHILLIPS, C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. **Quintessence Int.**, v. 28, n. 8, p. 527-34, 1997.

LEONARD, JR. R.H.; SHARMA, A.; HAYWOOD, V.B. Use of different concentrations of carbamide peroxide for bleaching teeth. **Quintessence Int.**, v.29, p. 503-07, 1998.

LEONARDO, R. T. **Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos, quanto à alteração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio,**

**em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.** Bauru,1996. 146p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo,Bauru, 1996.

LEONARDO, R.T; CONSOLARO, A.; CARLOS. I.Z.; LEONARDO, M.R. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. **J. Endod.**, v. 26, n. 6, p. 328-30, june, 2000.

LI, Y. Toxicological considerations of tooth bleaching using peroxide-containing agents. **J. Amer. Dent. Assoc**, v.128, p. 31s-6s, apr., 1997.

MARTIN, J H.; et al. Cellular response of gingival, to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. **J. Periodontol.**, v. 39, p. 208-10,1968.

MATIS, B.A.,et al.. The efficacy and safety of a 10% carbamide peroxide bleaching gel. **Quintessence Int.**, v. 29, p. 555-63, 1998.

MATIS, B.A.,et al..In vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. **JADA**, v. 130, p. 555-63, february,1999.

MELO, J. F. **Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos desnutrição neonatal.** Recife, 2007. 75p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2007

MENDES, S. T. O., et al. In vitro evaluation of cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **J. Endod.**, v. 29, n. 2, p. 95-9, February, 2003.

MONDELLI, R.F.L.Clareamento dental. **Rev. Dent. Rest.**, v.1, p.163-215, out-dez, 1998.

MORATO, L.H.; DUARTE,R.V.; ALBUQUERQUE,R.C. Peróxido de carbamida: alternativa para o clareamento. **Rev. do CROMG**, v.4, n. 1, p.64-71, out-dez, 1998.

PEAKMAN, M; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1999.

PIEROLI, D. A **Avaliação do potencial carcinogênico de agentes clareadores dentais.** Bauru, 1997.Tese ( Mestrado). Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 1997.

PIEROLI, D.A.; NAVARRO, M.F.L.; CONSOLARO,A. Evaluation of carcinogenic potencial of bleaching agents in a DMBA indution-model. **Oral.Med. Pathol.**, v.5,

n. 1, jun, 2000.

PIMENTA, I.C.; PIMENTA, L.A.F. Clareamento dental caseiro - riscos e benefícios: o que o clínico precisa saber. **RBO**, v.55, n.4, p. 195-200, jul/ago., 1998.

PORTO, S. M. M. S. **Impacto da desnutrição neonatal e do treinamento físico moderado em mecanismos de defesa de ratos adultos**. Recife, 2006. 99p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde, Nutrição, Recife, 2006.

POWELL, L.V.; BALES, D.J. Tooth bleaching: its effect on oral tissues. **J. Amer. Dent. Assoc** Chicago, v. 122, n.11, p. 50-54, nov, 1991.

PRICE, R.B.T.; SEDAROUS, M.; HILTZ, G.S. The pH of tooth - whitening products. **J.Can. Dent. Assoc.**, v.66, p.421-6, 2000.

RASQUIN, O.M. **Estudo da liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, em culturas de macrófagos, com as concentrações 18 e 9 mg/ml, dos cimentos endodônticos, Sealapex, Top Seal, Pro canal, Sealer 26 e Endomethasone**. Rio de Janeiro, 1998. 159p. Tese (Livre docência) - Universidade Gama Filho, Rio de Janeiro, 1998.

SANTOS, M.C.M.S. et al. Clareador peróxido de carbamida altera produção de O<sub>2</sub> em macrófago. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo v. 14 sup., p. 97, 2000.

SEGURA, J.J. et al. Comparative effects of two endodontic irrigants, clorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. **J. Endod.**, v. 25, n. 4, p. 243-46, April 1999.

SIBILLE, Y; REYNOLDS, HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **Amer. Review Respiratory Disease**, v.141, p.1052-61, 1990.

SIMONSEN, R..J. Home-bleaching- is there scientific support? **Quintessence Int.**, v.21, n.12, p. 931, 1990.

STERRETT, J.; PRICE, R.B.; BANKEY, T. Effects of home bleaching on tissues of oral cavity. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 61, p. 201-5, 1995

STRASSLER, H. E. et al. Carbamide peroxide at home bleaching agents. **Update NYSDJ**, v.58, p.453-55, 1999.

TAM,L. The safety of home bleaching techniques. **J. Can. Dent. Assoc.**,v. 65, p. 453-5, 1999.

TIPTON, D.A.; BRAXTON, S. D.; DABBOUS, M.K. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. **J. Periodontol**, v. 66, p. 7-13, 1995.

TIPTON, D.A.; BRAXTON, S.D.; DABBOUS, M.K. Role of saliva and salivary components as modulators of bleaching agent toxicity to human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodontol**, v. 66, p. 766-74, 1995.

WATTANAPAYUNGFUL, P. et al. A clinical study of effect of pellicle on the degradation of 10% carbamida peroxide within the first hour. **Quintessence Int.**, v.30, n. 11, p. 737-741, 1999.





## ANEXO I

**ANEXO II -Valores de leitura óxido nítrico**

| <b>CONTROLE(3h)</b> | <b>LPS(3h)</b> | <b>W10(3h)</b> | <b>W16(3h)</b> |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| 0,001               | 0,004          | 0,001          | 0,022          |
| 0,001               | 0,002          | 0,037          | 0,013          |
| 0,002               | 0,003          | 0,025          | 0,035          |
| 0,003               | 0,005          | 0,024          | 0,010          |
| 0,009               | 0,008          | 0,021          | 0,008          |
| 0,06                | 0,007          | 0,029          | 0,005          |
| 0,018               | 0,017          | 0,018          | 0,011          |
| 0,008               | 0,008          | 0,025          | 0,006          |
| 0,007               | 0,006          | 0,030          | 0,009          |
| 0,003               | 0,003          | 0,020          | 0,005          |
| 0,002               | 0,002          | 0,006          | 0,013          |
| 0,001               | 0,0            | 0,015          | 0,005          |

| <b>CONTROLE(24h)</b> | <b>LPS(24h)</b> | <b>W10(24h)</b> | <b>W16 (24h)</b> |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 0,163                | 0,126           | 0,065           | 0,036            |
| 0,082                | 0,060           | 0,033           | 0,019            |
| 0,042                | 0,047           | 0,019           | 0,015            |
| 0,036                | 0,042           | 0,011           | 0,023            |
| 0,010                | 0,028           | 0,010           | 0,010            |
| 0,019                | 0,015           | 0,012           | 0,009            |
| 0,054                | 0,058           | 0,007           | 0,006            |
| 0,047                | 0,054           | 0,008           | 0,007            |
| 0,073                | 0,074           | 0,011           | 0,009            |
| 0,043                | 0,005           | 0,009           | 0,009            |
| 0,049                | 0,066           | 0,016           | 0,010            |
| 0,038                | 0,040           | 0,009           | 0,008            |

### ANEXO III -Valores de leitura superóxido

| <b>C<sub>1</sub>(24h)</b> | <b>C<sub>2</sub>(24h)</b> | <b>W10<sub>1</sub>(24h)</b> | <b>W10<sub>2</sub>(24h)</b> | <b>W16<sub>1</sub>(24h)</b> | <b>W16<sub>2</sub>(24h)</b> |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0                         | 0,29                      | 14,09                       | 4,89                        | 19,70                       | 44,88                       |
| 5,90                      | 0                         | 11,14                       | 2,37                        | 9,42                        | 9,70                        |
| 0                         | 17,70                     | 0                           | 0                           | 0                           | 1,43                        |
| 0,57                      | 11,36                     | 0                           | 0                           | 0                           | 0                           |
| 20,86                     | 26,61                     | 1,22                        | 4,09                        | 0                           | 4,45                        |
|                           |                           | 8,63                        | 0                           | 5,25                        | 1,00                        |
|                           |                           | 0                           | 2,37                        | 0                           | 0                           |
|                           |                           | 0                           | 0                           | 13,38                       | 29,12                       |
|                           |                           | 0                           | 14,96                       | 0                           | 0                           |

| <b>C<sub>1</sub>(3h)</b> | <b>C<sub>2</sub>(3h)</b> | <b>W10<sub>1</sub>(3h)</b> | <b>W10<sub>2</sub>(3h)</b> | <b>W16<sub>1</sub>(3h)</b> | <b>W16<sub>2</sub>(3h)</b> |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0                        | 10,93                    | 4,82                       | 10,07                      | 25,10                      | 20,64                      |
| 2,88                     | 8,27                     | 8,63                       | 3,60                       | 1,80                       | 45,31                      |
| 20,86                    | 15,53                    | 0,29                       | 85,30                      | 1,87                       | 61,64                      |
| 0                        | 13,09                    | 1,44                       | 0                          | 23,37                      | 38,55                      |
| 24,09                    | 16,33                    | 5,03                       | 3,30                       | 0,43                       | 0                          |
|                          |                          | 2,01                       | 0                          | 23,09                      | 0                          |
|                          |                          | 0                          | 0                          | 0                          | 7,62                       |
|                          |                          | 0                          | 0                          | 3,60                       | 4,39                       |
|                          |                          |                            |                            |                            |                            |

## ANEXO IV -Valores de leitura óxido nítrico

### Descritiva - Superóxido

| Column                 | Size | Mean   | Std Dev | Std. Error | Max    | Min   | Median | 25%    |
|------------------------|------|--------|---------|------------|--------|-------|--------|--------|
| <b>Controle 1h - 3</b> | 3    | 15.947 | 11.431  | 6.600      | 24.100 | 2.880 | 20.860 | 7.375  |
| <b>Controle 2h - 3</b> | 5    | 12.830 | 3.317   | 1.483      | 16.330 | 8.270 | 13.090 | 10.265 |
| <b>W10 1h - 3</b>      | 6    | 3.703  | 3.063   | 1.251      | 8.630  | 0.290 | 3.415  | 1.440  |
| <b>W10 2h - 3</b>      | 4    | 25.570 | 39.942  | 19.971     | 85.300 | 3.310 | 6.835  | 3.455  |
| <b>W16 1h - 3</b>      | 7    | 11.324 | 11.776  | 4.451      | 25.100 | 0.430 | 3.600  | 1.818  |
| <b>W16 2h - 3</b>      | 6    | 29.692 | 22.594  | 9.224      | 61.640 | 4.390 | 29.595 | 7.620  |

| Column                 | 75%    | Sum of Squares |
|------------------------|--------|----------------|
| <b>Controle 1h - 3</b> | 23.290 | 1024.244       |
| <b>Controle 2h - 3</b> | 15.730 | 867.056        |
| <b>W10 1h - 3</b>      | 5.030  | 129.208        |
| <b>W10 2h - 3</b>      | 47.685 | 7401.411       |
| <b>W16 1h - 3</b>      | 23.307 | 1729.664       |
| <b>W16 2h - 3</b>      | 45.310 | 7841.934       |

## ANEXO V

### Descriptiva- Superóxido

| Column          | Size | Mean   | Std Dev | Std. Error | Max    | Min   | Median | 25%   |
|-----------------|------|--------|---------|------------|--------|-------|--------|-------|
| Controle 1h -24 | 3    | 9.110  | 10.519  | 6.073      | 20.860 | 0.570 | 5.900  | 1.902 |
| Controle 2h -24 | 4    | 13.990 | 11.070  | 5.535      | 26.610 | 0.290 | 14.530 | 5.825 |
| W10 1h -24      | 4    | 8.770  | 5.506   | 2.753      | 14.090 | 1.220 | 9.885  | 4.925 |
| W10 2h -24      | 5    | 5.736  | 5.272   | 2.358      | 14.960 | 2.370 | 4.090  | 2.370 |
| W16 1h -24      | 4    | 11.938 | 6.148   | 3.074      | 19.700 | 5.250 | 11.400 | 7.335 |
| W16 2h -24      | 6    | 15.097 | 17.954  | 7.330      | 44.880 | 1.000 | 7.075  | 1.430 |

| Column          | 75%    | Sum of Squares |
|-----------------|--------|----------------|
| Controle 1h -24 | 17.120 | 470.274        |
| Controle 2h -24 | 22.155 | 1150.516       |
| W10 1h -24      | 12.615 | 398.593        |
| W10 2h -24      | 7.407  | 275.676        |
| W16 1h -24      | 16.540 | 683.413        |
| W16 2h -24      | 29.120 | 2979.126       |

## ANEXO VI

### Descritiva - NO

| Column       | Size | Mean    | Std Dev | Std. Error | Max    | Min      |
|--------------|------|---------|---------|------------|--------|----------|
| Controle 3h  | 12   | 0.00508 | 0.00498 | 0.00144    | 0.0180 | 0.001000 |
| LPS 3h       | 11   | 0.0059  | 0.00430 | 0.00130    | 0.0170 | 0.00200  |
| W10 - 3h     | 12   | 0.0209  | 0.0101  | 0.00290    | 0.0370 | 0.001000 |
| W16 - 3h     | 12   | 0.0118  | 0.00876 | 0.00253    | 0.0350 | 0.00500  |
| LPS 24h      | 12   | 0.0457  | 0.0326  | 0.00942    | 0.126  | 0.00500  |
| W10 - 24h    | 12   | 0.0175  | 0.0166  | 0.00478    | 0.0650 | 0.00700  |
| Controle 24h | 12   | 0.0547  | 0.0394  | 0.0114     | 0.163  | 0.01000  |
| W16 - 24h    | 12   | 0.0134  | 0.00875 | 0.00253    | 0.0360 | 0.00600  |

| Column       | Median  | 25%     | 75%     | Sum of Squares |
|--------------|---------|---------|---------|----------------|
| Controle 3h  | 0.00300 | 0.00150 | 0.00750 | 0.000583       |
| LPS 3h       | 0.00500 | 0.00300 | 0.00775 | 0.000569       |
| W10 - 3h     | 0.0225  | 0.0165  | 0.0270  | 0.00636        |
| W16 - 3h     | 0.00950 | 0.00550 | 0.0130  | 0.00252        |
| LPS 24h      | 0.0445  | 0.0215  | 0.0590  | 0.0368         |
| W10 - 24h    | 0.0110  | 0.00900 | 0.0175  | 0.00669        |
| Controle 24h | 0.0450  | 0.0370  | 0.0635  | 0.0530         |
| W16 - 24h    | 0.00950 | 0.00850 | 0.0170  | 0.00300        |



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)