

# Artigos Originais

---

## CITOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE *Allium cepa* L. - POTENCIAL CITOTÓXICO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

### Ana Paula Peron

Docente Mestre do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Apucarana - FAP. E-mail: anpapegenpes@hotmail.com

### Fabiano Gaspar Camilloto

Biólogo do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Apucarana - FAP. E-mail: zuzumara@bol.com.br

### Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Docente Doutora do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: arbvepv@wnet.com.br

**RESUMO:** No campo das investigações farmacológicas é importante avaliar o potencial genotóxico e/ou carcinogênico de substâncias químicas. Essas avaliações são necessárias para aumentar a segurança da população que faz uso desses compostos. Este trabalho teve por objetivo fazer uma avaliação citogenética do clareador dental peróxido de carbamida, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, analisando-o em três concentrações: [1]: 10%, [2]: 20% e [3]: 35% (grupo-tratamento- TR). Para esta avaliação foram estabelecidos três grupos: CO (0h), TR (24h) e RE (24h). Foram analisadas 5.000 células por grupo para o cálculo do índice mitótico médio de cada grupo, e a análise estatística foi feita pelo teste do Qui-quadrado. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que as concentrações testadas do peróxido de carbamida não causaram ação citotóxica estatisticamente significativa nem alterações cromossômicas no sistema teste utilizado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Peróxido de carbamida; Citotoxicidade; Células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

## CYTOTOXIC OF CARBAMIDE PEROXIDE IN THE ROOT OF MERISTEMATIC CELLS *Allium cepa* L. - CYTOTOXIC POTENTIAL OF CHEMICALS

**ABSTRACT:** In the drug research field it is important to assess the potential genotoxic and/or carcinogenic chemical substances. Such assessments are needed to increase the population security that use these compounds. This study aimed to make a cytogenetic assessment of dental bleach carbamide peroxide in the roots of *Allium cepa* meristematic cells, analyzing it in three concentrations: [1]: 10%, [2]: 20% and [3]: 35% (group-treatment-TR). For this assessment it was established three groups: CO (0h), TR (24h) and RE (24h). It was examined 5.000 cells per group to calculate the average mitotic index of each group, and statistical analysis was performed by Chi-square. From the results, it was found that the tested concentrations of carbamide peroxide caused no statistically significant cytotoxic activity or chromosomal changes in the test system used.

**KEYWORDS:** Carbamide peroxide; Cytotoxic; Roots of *Allium cepa* Meristematic Cells.

## INTRODUÇÃO

O clareamento dental foi introduzido na Odontologia há mais de 150 anos, mas apenas nas últimas décadas o clareamento de dentes vitais e não vitais passou a ser amplamente divulgado e extensamente aplicado na prática odontológica. Diferentes tipos de agentes clareadores, associados a técnicas específicas de aplicação, têm permitido a realização deste procedimento com relativo sucesso até mesmo quando o tratamento é realizado pelos próprios pacientes (clareamento caseiro). O clareamento dental caseiro, apesar de caracterizar uma modalidade de tratamento mais lenta do que aquela realizada em consultório, tem sido amplamente empregado pela população em geral, principalmente pela sua praticidade e baixo custo (COSTA; HUCK, 2006).

Haywood e Heymann (1989) implantaram uma técnica de clareamento dental caseiro à base de peróxido de carbamida. Desde então este composto pode ser encontrado em concentrações de 10%, 15%, 20% e 35% em anidro glicerol ou glicina, ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ ). O peróxido de carbamida também é conhecido como peróxido de uréia, peróxido de hidrogênio uréia, peróxido de hidrogênio carbamida ou peridrol-uréia.

Segundo Kawamoto e Tsujimoto (2004), a maioria dos clareadores dentais sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais livres, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas. A base da habilidade clareadora está no fato de que, quando esses agentes reagem com moléculas orgânicas altamente conjugadas, eles rompem a conjugação do elétron e alteram a absorção de energia da molécula, o que leva à alteração na sua estrutura óptica, podendo resultar no deslocamento do espectro de absorção do composto e causar alterações na estrutura do dente e em tecidos próximos.

É sabido que as mutações e as alterações no processo de divisão celular podem ocorrer pelo efeito de agentes mutagênicos físicos ou químicos como temperatura, radiações ionizantes, conservantes, agrotóxicos, medicamentos, drogas naturais ou sintéticas, aditivos alimentares, entre outros compostos químicos (ALBANESE, 1988; BOEI, 1998).

Até o momento, poucos são os estudos relatando os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores, sendo que a maioria das pesquisas feitas em nível celular foi realizada *in vitro*. Em função de o peróxido de carbamida ser muito utilizado no clareamento dental caseiro pela população, muitas vezes de forma indiscriminada, aliado à falta de estudo deste composto químico em nível celular *in vivo*, decidiu-se realizar este trabalho, que teve por objetivo verificar a ação do peróxido de carbamida em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

## 2 METODOLOGIA

De acordo com Fiskej (1994), o sistema teste de raiz de *Allium cepa* é fácil de manusear, tem baixo custo, requer um tempo curto para realização e obtenção dos resultados, apresenta boas condições cromossômicas para estudos de danos cromossômicos ou distúrbios na divisão celular, é de alta sensibilidade e revela alta confiabilidade.

O cariótipo de *Allium cepa* consiste em oito pares de cromossomos, entre metacêntricos e submetacêntricos (GRANT, 1982). Cada bulbo produz um grande número de raízes em um curto período de tempo, fornecendo um grande número de células em divisão por lâmina.

Para este trabalho foi utilizado o gel clareador dental Extra White, à base de peróxido de carbamida, obtido de uma fonte comercial localizada no município de Apucarana - PR. Testou-se este composto em três concentrações: [1]: 10%, [2]: 20% e [3]: 35%. Para cada concentração testada foram utilizados 10g de gel clareador, que equivalem à mesma dose do produto recomendada para o homem em cada aplicação. Os bulbos de cebola de cada concentração foram colocados em contato direto com o produto a ser testado.

Para a realização deste estudo foram obtidas cebolas (*Allium cepa*) de tamanho mais ou menos uniforme, adquiridas de uma fonte comercial e colocadas para enraizar em frascos com água, à temperatura ambiente, até obtenção de raízes com cerca de um centímetro a um centímetro e meio de comprimento. Antes de cada tratamento foram coletadas algumas raízes para servirem de controle do próprio bulbo (0h). Em seguida, colocaram-se os bulbos em suas respectivas amostras (soluções-tratamento) por 24 horas. Após o tratamento, foram retiradas e fixadas algumas raízes de cada cebola. Foram lavadas as raízes restantes e os bulbos novamente colocados em água durante 24 horas, para se recuperar, sendo as raízes restantes retiradas e fixadas.

As raízes das cebolas foram coradas pela reação de Feulgen (FREESE, 1971). As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio óptico em objetiva de 40X. Foram avaliadas 1.000 células por bulbo, totalizando 5.000 células para cada grupo de controle, tratamento e recuperação. Foram avaliadas alterações na estrutura dos cromossomos e alterações no índice de divisão celular (IM). Para a análise estatística foi feito o teste do Qui-quadrado.

## 3 RESULTADOS

Tabela 1. Índices Mitóticos (IM) médio obtidos, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, tratadas com peróxido de carbamida.

Grupos [mg/ml]	Índices Mitóticos		
	CO (0h)	TR (24h)	RE (24h)
CO [0]	5,0	5,2	5,0
PC [1]	4,9	5,2	5,0
PC [2]	5,4	5,1	5,0
PC [3]	5,0	4,9	5,5

CO - Controle. PC: peróxido de carbamida, [1]: 10%, [2]: 20% e [3]: 35%. CO (0h) controle; TR (24h) tratamento e REC (24 h) recuperação em água.

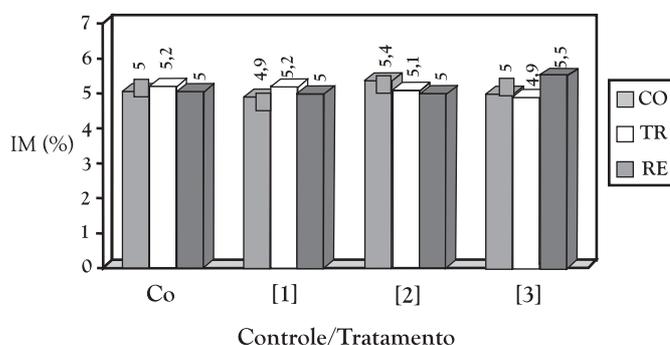


Figura 1. Índices mitóticos médio-totais obtidos para cada controle (CO - 0h), tratamento (TR - 24h) com três concentrações do peróxido de carbamida: [1] = 10%, [2] = 20% e [3] = 35%, e recuperação (REC - 24h).

A tabela 1 e a figura 1 mostram os índices médio-totais de divisão celular obtidos para o controle, tratamento com as três concentrações do peróxido de carbamid, e respectivas recuperações de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Os resultados mostram que não houve alteração estatisticamente significativa, entre estes em nenhum dos tempos e tipos de amostras avaliados. Não foi verificada a presença de alterações cromossômicas em nenhuma das concentrações testadas com o peróxido de carbamida neste sistema-teste.

#### 4 DISCUSSÃO

Estima-se que grande parte das neoplasias resulte da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (ROSSIT; CONFORTI-FROES, 2000). Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica pela detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana. Os impactos causados à saúde por agentes tóxicos muitas vezes não podem ser observados e medidos diretamente. A informação obtida na análise de risco (testes utilizados na detecção de agentes tóxicos) permite estimar e comparar estes impactos (SILVA; FONSECA, 2003).

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas no DNA. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar alguns processos, tais como a duplicação do DNA, a transcrição gênica e, conseqüentemente, a divisão celular. Elas também podem causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos e à morte celular (COSTA; MENK, 2000).

Para as três concentrações avaliadas do peróxido de carbamida, os índices mitóticos obtidos permaneceram praticamente iguais nas fases de controle, tratamento e recuperação, mostrando que essas concentrações não tiveram ação tóxica estatisticamente significativa nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Para as três concentrações testadas, não foram encontradas alterações cromossômicas.

Cantoni e Murray (1990) avaliaram a citotoxicidade do peróxido de carbamida sobre o DNA, utilizando para isso o meio de cultura de células de ovário de hamster chinês. Os autores verificaram a ocorrência de uma simples quebra nas cadeias do DNA, induzida pelo radical OH<sup>•</sup>, o que não representou, necessariamente, nenhuma lesão fatal à célula, devido aos seus eficientes e rápidos processos de reparo. Entretanto, quando ocorreu uma interferência nestes mecanismos reparadores, neste caso representado por um inibidor enzimático (3 - aminobenzidamida), foi observada a fixação da lesão.

Pieroli e Navarro (1997) estudou os efeitos de dois agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10%, utilizando como sistema-teste hamsters sírios dourados. A partir dos resultados obtidos concluiu que os dois clareadores testados possuíam efeito carcinógeno associado com o DMBA (ácido dimetilbenzotraceno), atuando na fase de promoção tumoral. Segundo essa mesma autora, as reações de radicais livres não são específicas apenas para moléculas pigmentadas dos dentes, podendo também reagir potencialmente com outras estruturas orgânicas. As espécies reativas

derivadas do oxigênio são conhecidas como promotoras de injúrias às células, devido ao estresse oxidativo que promovem. Este tipo de estresse pode causar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade celular.

Albuquerque e colaboradores (2002) avaliaram a influência da aplicação tópica do peróxido de carbamida na expressão imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na mucosa oral da língua de ratos. Doze ratos Wistar machos foram selecionados e submetidos à aplicação tópica de peróxido de carbamida a 10% sobre um lado do dorso da língua. O resultado demonstrou que a aplicação tópica deste composto, nesta concentração, induz proliferação celular epitelial transitória na mucosa oral desses animais.

Ferreira (2001) verificou a possibilidade do efeito decorrente da ação de quatro agentes clareadores na geração de radicais livres e de danos oxidativos às células. Para isso foram realizados estudos em culturas bacterianas com mutações em genes associados com a codificação de enzimas envolvidas no reparo de lesões oxidativas e com aceptores de espécies reativas de oxigênio e quelantes de íons metálicos. Com relação à inativação da sobrevivência das culturas, utilizando-se aceptores, a inativação para as cepas mutantes foi inferior à da selvagem. Isso reforça uma possível ação genotóxica desses agentes clareadores. Ribeiro e colaboradores (2006) avaliaram, pelo teste de células individualizadas em gel (teste do cometa) *in vitro*, o potencial genotóxico associado à exposição aos agentes clareadores dentais. Células de ovário de hamster chinês (CHO) *in vitro* foram expostas a seis agentes clareadores dentais comercialmente disponíveis. Os resultados mostraram que todos os agentes clareadores testados contribuíram para os danos no DNA, na concentração de 35%.

Pelos dados aqui obtidos, verificamos que os resultados não foram citotóxicos nas concentrações avaliadas do peróxido de carbamida, em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, mas é importante ressaltar que dados obtidos a partir de sistemas-testes vegetais não podem ser considerados definitivos, já que a substância testada pode apresentar interações diferentes em cada organismo. Logo, o resultado de um único sistema-teste não deve ser tomado como definitivo, devendo-se então realizar o mesmo estudo com sistemas-testes diferentes.

#### 5 CONCLUSÃO

A segurança do peróxido de carbamida deve ser mais investigada, principalmente, em relação aos possíveis efeitos dos radicais livres de oxigênio liberados nos procedimentos clareadores.

#### REFERÊNCIAS

- ALBANESE, R. *A in vivo* Citogenetic Test in Bone - Marron Cells of the Alderly Park Wistar derived rat. **Evaluation of Short - Term**, v. 20, p. 127-131, 1988.
- ALBUQUERQUE, R. de C. et al. Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on rat oral epithelium proliferation. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 3, p. 1-10, 2002.
- BOEI, J. J. W. A. **Radiation Induced Chromosomal Aberrations in Mammalian Cells: Analysis by in situ Hybridization**. New York: Perkin - Elmer Corporation, 1998.

- CANTONI, O.; MURRAY, D. R. E. Effect of 3-aminobenzamide on DNA strand-break rejoining and cytotoxicity in CHO cells treated with hydrogen peroxide. **Bioch Bioph. Acta**, v. 867, p. 135-143, 1990.
- COSTA, R. M. A; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 24-26, 2000.
- COSTA, C. A. S.; HUCK, C. Efeitos citotóxicos e biocompatibilidade de agentes clareadores usados na odontologia. Uma revisão de literatura. **Robrac**, v. 15, p. 1-12, 2006.
- FERREIRA, S. L. Z. Avaliação do potencial genotóxico e/ou citotóxico dos agentes clareadores odontológicos nos níveis celular e molecular. Rio de Janeiro, 2001. 156p. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.
- FISKEJO, G. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Root Tips of Allium cepa L. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, v. 9, p. 235-241, 1994.
- FREESE, E. **Molecular Mechanisms of Mutations in Chemical Mutagens: Principals and Methods for their Detection**. New York: Hollaender; Plenum Press., 1971.
- GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research.**, v. 99, p. 273-291, 1982.
- HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H. O. Nighthguard vital bleaching. **Quintessence Int.**, v. 20, n. 3, p. 173-176, 1989.
- KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **J. Endod.**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2004.
- PIEROLI, D. A.; NAVARRO, M. F. de L. Clareação de dentes vitalizados: considerações gerais. **Rev. bras. Odont. Nac.**, v. 4, n. 4, p. 244-248, 1997.
- RIBEIRO, D. A. et al. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents *in vitro*. **Braz. Oral Res.**, v. 20, n. 1, p. 20-26, 2006.
- ROSSIT, A. R. B.; CONFORTI-FROES, N. D. T. Suscetibilidade genetic, biometabolismo e cancer. **Rev. Soc. Bras. Cancerol.**, v. 23, p. 22-30, 2000.
- SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, Juliana da; ERDTMANN, Bernardo; HENRIQUES, João Antonio Pêgas. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.