



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

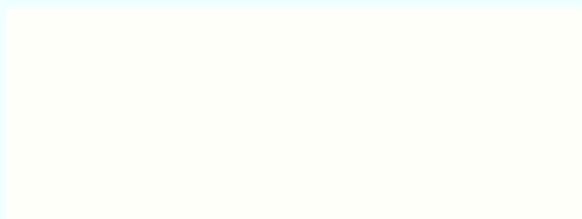
Monografia de Final de Curso

Aluna: Carina Maíra Moreira Pittoli

Orientador: Francisco Carlos Groppo

Co-Orientador: Rogério Heládio Lopes Motta

Ano de Conclusão do Curso: 2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Carina Maíra Moreira Pittoli

Avaliação da estabilidade de soluções de clorexidina 0,12% submetidas a diferentes condições de armazenagem.

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,
para a obtenção do Diploma de Cirurgião Dentista

Orientador: Prof. Dr. Francisco C. Groppo

Piracicaba

2006

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo apoio
e incentivo durante esses quatro anos de estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco C. Groppo pela oportunidade e dedicação na orientação deste trabalho.

Aos Drs., Rogério e Juliana, pela atenção e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, Fernanda e Gustavo, pelas colaborações, essenciais para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	p.
Lista de ilustrações	6
RESUMO	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS	14
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

LISTA DE GRÁFICOS

	p.
Gráfico 1 - Variação da temperatura média aferida semanalmente durante o período do estudo.	15
Gráfico 2 - Valores de pH das soluções de clorexidina em função dos meses de avaliação.	15
Gráfico 3 – Valores da leitura em espectrofotometria (mês 0) para <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i> .	20

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1: Esquematização do método colorimétrico.	16
Figura 2 – Curva de calibração obtida para a análise inicial das amostras (mês 0).	17
Figura 3 – Esquema representando as diluições das soluções de clorexidina.	19

LISTA DE QUADROS

	p.
Quadro 1 - Concentrações das soluções testadas de clorexidina (em porcentagem).	17
Quadro 2. Valores de densidade óptica dos tubos controle considerando as duas cepas durante os períodos estudados.	21
Quadro 3 - Valores obtidos na leitura em espectrofotometria durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de <i>S. aureus</i> .	22
Quadro 4 - Valores obtidos na leitura em espectrofotometria durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de <i>S. mutans</i> .	23

RESUMO

A microbiota oral está intimamente relacionada à formação do biofilme bacteriano e das doenças dele decorrentes. Uma redução do número destes microrganismos implica, portanto, em prevenção e controle destas doenças. Diversas substâncias têm sido utilizadas para o controle químico de placa bacteriana como substitutas ou adjuntas aos procedimentos mecânicos. A clorexidina tem mostrado grande efetividade antimicrobiana contra cepas gram-positivas e negativas, fungos e leveduras, aeróbicas facultativas e anaeróbicas, sendo recomendada para o controle químico do biofilme dental. Existem poucos estudos avaliando a estabilidade da clorexidina, particularmente nas condições de temperatura brasileira. O objetivo deste trabalho é verificar através de testes *in vitro* (colorimétrico, pH e microbiológico) a qualidade e estabilidade de soluções para bochecho de digluconato de clorexidina 0,12% armazenadas sob diferentes condições, por um período de 6 meses.

1. INTRODUÇÃO

Tendo a cárie dental sua origem na placa bacteriana, o controle desta placa é fundamental para sua redução. A ação mecânica é o melhor método de controle da placa. A escovação, que deve ser realizada diariamente, muitas vezes não é executada adequadamente, pois consome tempo, necessita de motivação, educação e habilidade manual por parte dos pacientes. Desse modo, o controle mecânico pode ser melhorado ou substituído, em algumas situações especiais, pelo controle químico. A clorexidina tem sido o agente químico mais estudado e considerado o mais seguro e eficaz na ação antiplaca (PUCHER & DANIEL, 1992; JENKINS et al., 1993; RENTON-HARPER et al., 1996; HILDEBRANDT, 1996). Seu uso como substituto da escovação ocorre exclusivamente quando a limpeza mecânica é muito difícil ou impossível (ADDY, 1986).

A clorexidina é utilizada em colutórios, géis e dentifrícios para o controle de placa e gengivite (NEIDLE & YAGIELA, 2000). Existem no comércio os mais variados preparos para bochechos, podendo alguns possuir propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (OSTROLENK & WEISS, 1959) e as suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas são responsáveis pela eficácia do produto (FREITAS et al., 2003).

A clorexidina age através da interação eletrostática de suas cargas positivas e negativas na parede celular da bactéria, ocorrendo ruptura da mesma, precipitando o citoplasma e causando a morte da bactéria. Na placa bacteriana, a clorexidina age desalojando pontes de cálcio, o que é um fator de adesividade de microorganismos para formação de placa bacteriana, provocando sua desarticulação e, conseqüentemente, não formação (DAVIES, 1973; HAMP, S. E. & EMILSON, C. G., 1973).

Devido ao caráter catiônico a clorexidina tem forte afinidade por ânions, tais como os íons fosfato da parede celular da microbiota oral que normalmente coloniza as superfícies dentais (HUGO & LONGWORTH, 1966) reduzindo, assim, a habilidade de

aderência e colonização das superfícies dentais. Provavelmente, este é o efeito antiplaca mais significativa da clorexidina (AXELSSON, 1993).

A clorexidina tem mostrado efeito bactericida contra cepas gram-positivas e negativas, fungos e leveduras, aeróbicas facultativas e anaeróbicas (EMILSON, 1977). Apesar de ser um agente antimicrobiano de largo espectro, a clorexidina afeta mais os estreptococos do grupo mutans do que os outros microrganismos da microbiota oral (EMILSON, 1977; MALTZ-TURKIENICZ et al., 1980; SCHAEKEN et al., 1984).

Uma propriedade positiva da clorexidina é a substantividade, que é a habilidade intrínseca de ser retida na superfície oral e de ser liberada gradualmente em fluidos orais, (FREITAS et al., 2003), produzindo conseqüentemente um efeito bacteriostático contínuo (NEIDLE & YAGIELA, 2000). Quando usada em altas concentrações, possui efeitos bactericidas e, em baixas concentrações, exerce efeito bacteriostático presente na placa (VASCONCELOS, 2001). A concentração mínima das soluções à base de clorexidina que produz inibição bacteriana é 0,12%, sendo que concentrações inferiores a esta falham em reduzir a contagem de mutans na saliva (CLARK & GUEST, 1994).

Um fato raramente considerado é a possibilidade de interações entre os componentes dos enxagüatórios e do dentífrício utilizado na escovação (BARKVOLL et al., 1988; BARKVOLL et al., 1989).

O lauril sulfato de sódio (LSS) é um dos detergentes sintéticos mais utilizados em dentífrícios (WELLS & LUBOWE, 1964), com concentração variando de 0,5% a 2,0% (BARKVOLL et al., 1989). Este detergente e a clorexidina não são compatíveis em solução aquosa (BONESVOLL, 1977), pois, sendo a última um composto catiônico, formará sais de baixa solubilidade com ânions como sulfatos, fosfatos e carboxilas (KIRKEGAARD et al., 1974; RØLLA et al., 1970; RØLLA & MELSEN, 1975; BARKVOLL et al., 1988). O efeito antimicrobiano apresenta-se reduzido em suspensões contendo ambos (BARKVOLL et al., 1989).

O intervalo recomendado entre a escovação com dentífrico contendo LSS e um bochecho com clorexidina, deve ser superior a 30 minutos ou preferencialmente próximo de 2 horas após a escovação (BARKVOLL et al., 1989).

O monofluorofosfato de sódio (MFP) é uma forma de flúor comumente utilizada em dentífricos e que também interage com a clorexidina formando sais de baixa solubilidade e diminuindo assim a ação de ambos. A clorexidina e o monofluorofosfato de sódio, em concentrações clinicamente relevantes, não são compatíveis (BARKVOLL et al., 1988).

Entretanto, o fluoreto de sódio (NaF) é compatível com a clorexidina e podem ser utilizados em conjunto sem prejuízo da atividade de ambos (CURY et al., 1994). Quando combinados, a clorexidina e o fluoreto de sódio apresentam efeito tóxico sinérgico no citoplasma bacteriano e nas enzimas responsáveis pela fermentação de carboidratos, diminuindo a formação de ácido pelos microrganismos (LUOMA, 1972; McDERMID et al., 1985; MEURMAN, 1988).

Apesar da sua efetividade terapêutica, o uso clínico da clorexidina pode ocasionar efeitos colaterais (GREENSTEIN et al., 1986). A clorexidina apresenta efeitos indesejáveis como manchas nos dentes, na língua, perda do paladar e sensação de queimação na língua (CARVALHO et al., 1991). O manchamento dentário é bem documentado e, provavelmente, o mais problemático efeito adverso do uso destes produtos orais (NORDBO, 1971; PRAYITNO & ADDY, 1979). Esses efeitos, no entanto, podem ser solucionados através de uma profilaxia profissional ou quando da suspensão do tratamento (CARVALHO et al., 1991).

Muitos anti-sépticos bucais, quando testados clinicamente ou em laboratório, não confirmam as propriedades e/ou especificações informadas pelo fabricante, o que pode agravar as condições de higiene oral, em função da falsa idéia de limpeza (MONFRIN, 2000). Desta forma, diante da escassez de trabalhos avaliando o efeito da armazenagem sobre a eficácia de soluções de clorexidina, o presente estudo teve como objetivos

avaliar a atividade antimicrobiana e a integridade de soluções de digluconato de clorexidina armazenadas em diferentes condições.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Resumo do que foi realizado no período (Agosto/2004 Julho/2005)

Para o presente estudo foram adquiridos lotes de três soluções de digluconato de clorexidina a 0,12%: uma de marca reconhecida no mercado brasileiro (Periogard® - Solução 1), uma aviada em uma farmácia de manipulação de Piracicaba/SP (Proderma®- Solução 2) e uma aviada em uma farmácia de manipulação de Limeira/SP (Farmavip®- Solução 3), todas com prazo de validade superior ao período do estudo (6 meses).

Após a compra das soluções, todas as amostras foram transferidas para frascos iguais visando à padronização dos métodos de armazenagem (mesma área de superfície de contato). Foram realizados os testes iniciais para a verificação colorimétrica e de pH das amostras obtidas e determinação da atividade antimicrobiana das mesmas. Em seguida, as amostras foram distribuídas nas diferentes condições de armazenagem e foram avaliadas mensalmente durante um período de 6 meses com as metodologias propostas. Foram utilizadas as seguintes condições:

1. geladeira ($5 \pm 0,1$ °C);
2. temperatura ambiente com exposição de luz;
3. temperatura ambiente sem exposição de luz;
4. estufa de aerobiose a 37°C.

O Gráfico 1 mostra a variação da temperatura média aferida semanalmente durante o período de 6 meses.

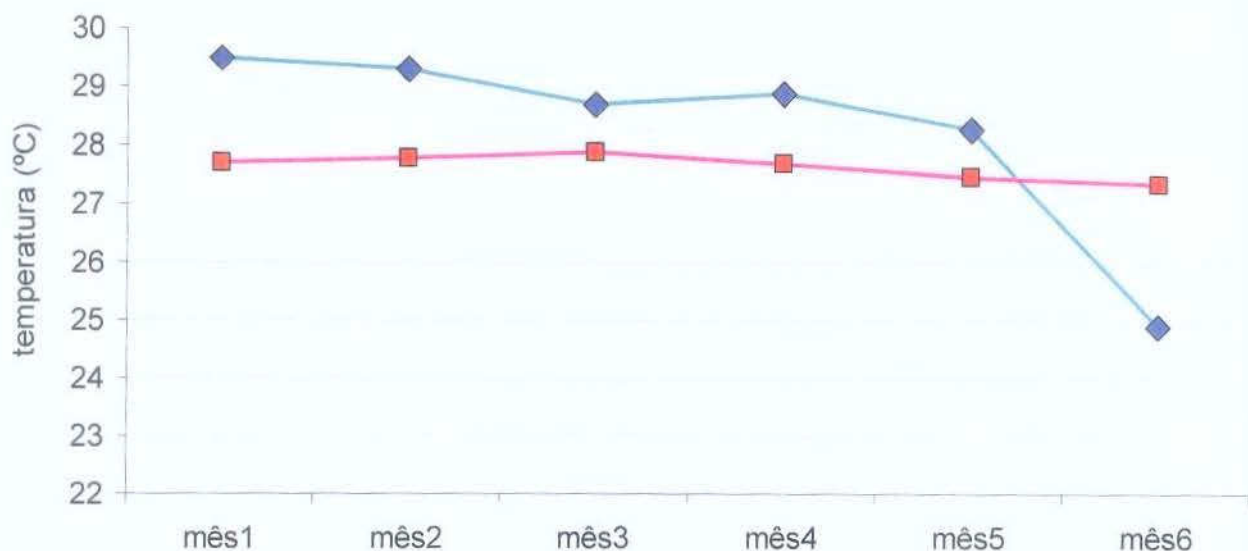


Gráfico 1 - Variação da temperatura média aferida semanalmente durante o período do estudo.

2.2 - Análise de pH

As medidas de pH foram realizadas mensalmente em pHmetro ORION® modelo 290A acoplado a um micro-eletrodo LAZAR BNC. As condições de análise do pH foram estabelecidas através de validação com soluções tampão Merck® (Merck S.A. Indústrias Químicas) de pH conhecido (4,0 e 7,0) e testes de concordância entre as medidas aferidas com o eletrodo convencional e o microeletrodo, atestando sua confiabilidade. O Gráfico 2 mostra os valores de pH das soluções de clorexidina obtidas em relação aos 6 meses de estudo.

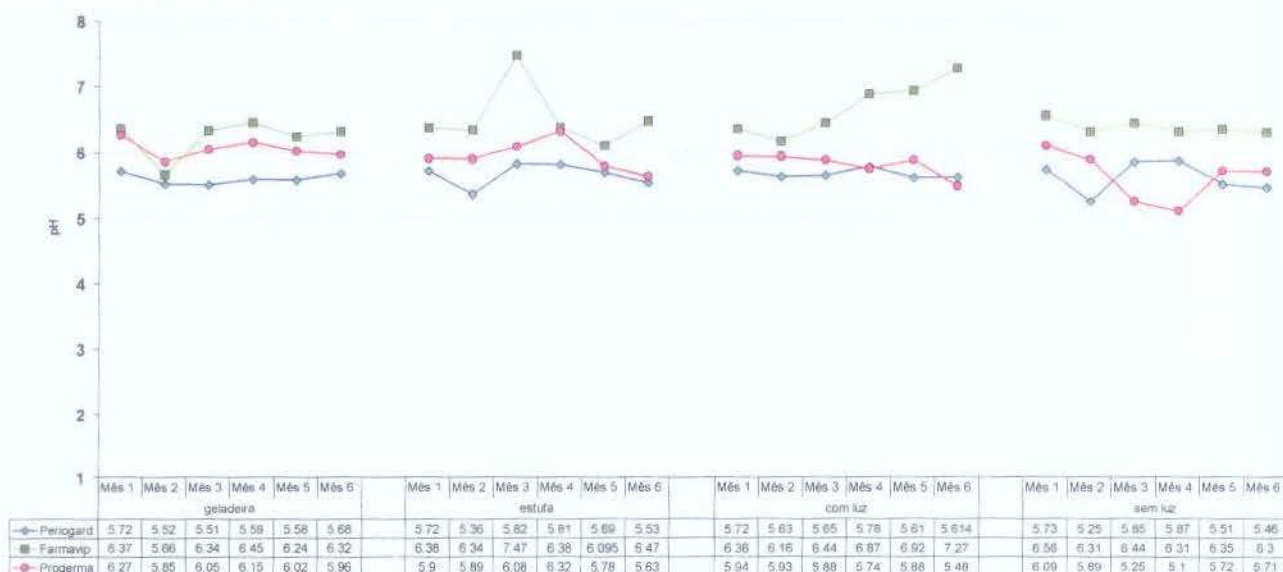


Gráfico 2 - Valores de pH das soluções de clorexidina em função dos meses de avaliação.

2.3- Método colorimétrico

Para os testes colorimétricos do presente estudo foi utilizado uma adaptação da metodologia proposta por Wilson & Wilson (1993) que preconiza a utilização de bromotimol em leitura em espectrofotometria e consiste nas seguintes soluções:

- Preparo da solução de bromotimol: 0,06g azul de bromotimol diluído em 100mL de metanol.
- Preparo da solução tampão (pH 7,0): 48,8g de sódio ortofosfato dibásico, 24,4g de sódio ortofosfato monobásico, 25g de cloreto de sódio, homogeneizados em 1L de água destilada e deionizada.
- Preparo das amostras para leitura em espectrofotometria:

Foram adicionados em funis de separação: 500 μ L das amostras de clorexidina, 10mL de água destilada e deionizada, 500 μ L de ácido clorídrico a 1%, 1mL da solução tampão e 100 μ L de azul de bromotimol (1). Após a homogeneização por agitação, adicionou-se 500 μ L de tetracloreto de carbono e nova agitação por mais 1 minuto (2). Depois de transcorridos 10 minutos, a fase contendo clorexidina foi separada através do funil de separação e submetida à leitura em espectrofotometria a 413nm (3).

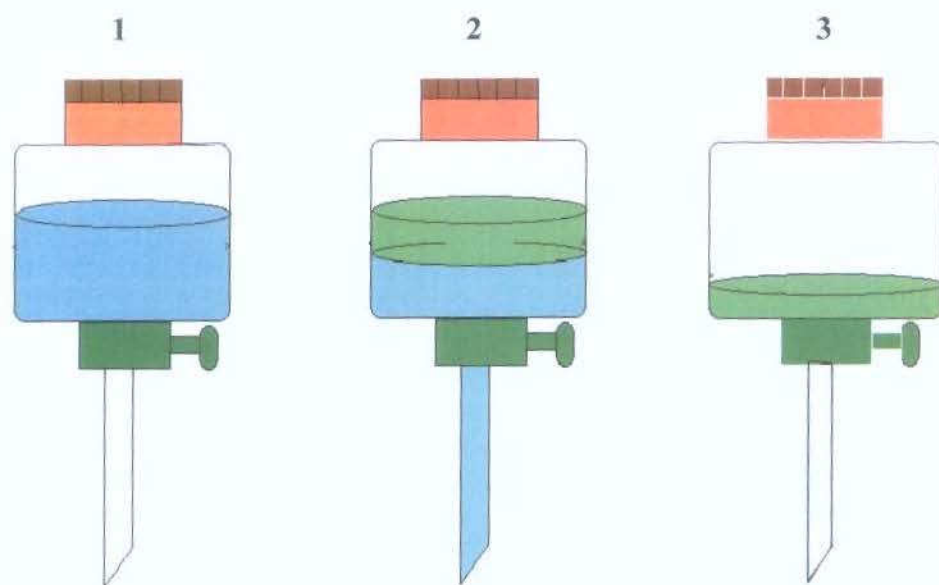


Figura 1: Esquematização do método colorimétrico.

Segundo a metodologia proposta, foram realizadas curvas de calibração com concentrações abrangendo o intervalo de 0 a 100 µg/mL de clorexidina utilizando como padrão uma solução de clorexidina a 20% (Sigma®) diluída em diferentes concentrações. Entretanto, foram observados problemas com a metodologia, uma vez que as retas obtidas não apresentavam linearidade. Com um ajuste no pH da solução tampão para 7,4 e a troca da solução de bromotimol foi possível obter curvas de calibração satisfatórias para a análise colorimétrica das amostras. A curva de calibração obtida para a análise das amostras, assim como as concentrações obtidas das soluções testadas (em porcentagem) são demonstradas a seguir:

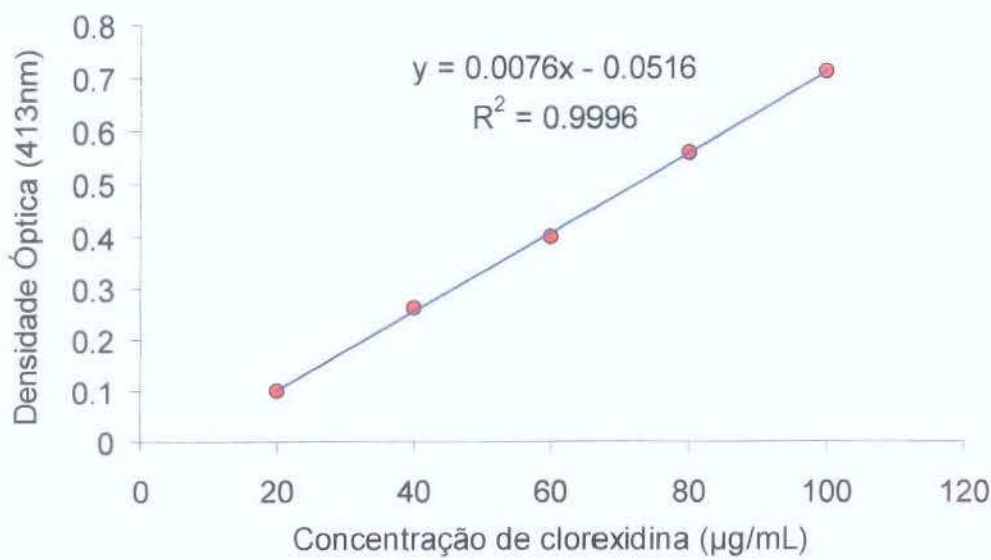


Figura 2 – Curva de calibração obtida para a análise inicial das amostras (mês 0).

Quadro 1 - Concentrações das soluções testadas de clorexidina (em porcentagem).

Solução	D.O. (413nm)	Concentração (µg/mL)	Média (%)
1	0.326	49.62	0.17
2	0.201	33.17	0.11
3	0.201	33.24	0.11

2.4 - Método microbiológico

Microrganismos

Para verificar a atividade antimicrobiana das soluções de clorexidina obtidas foram utilizados *S. mutans* UA 159, e *S. aureus* ATCC 25923. Os microrganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais (mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion - Merck®) contendo 20% de glicerol a -80°C ou liofilizadas) e depois cultivados em placas contendo BHI Agar (Merck®).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A avaliação da atividade antimicrobiana das soluções foi realizada, em triplicatas, através de testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os mesmos procedimentos foram realizados mensalmente para verificar se houve alteração na eficácia da atividade antimicrobiana das soluções armazenadas.

Após o crescimento em ágar, os microrganismos foram cultivados em caldo de BHI e incubados por 18 horas em estufa à 37°C com 10% de CO₂ (para *S. mutans*) e 6 horas em estufa à 37°C estufa de aerobiose (para *S. aureus*). Após este período foi feita a padronização das suspensões em espectrofotômetro em 800 nm, com transmitância em torno de 80%, ajustando a concentração dos inóculos para 10⁸ ufc/mL, e após diluição, para uma concentração final de 10⁵ ufc/mL.

Os tubos foram divididos em 3 séries de 5 tubos para o grupo experimental, mais os tubos controle (positivo e negativo). Para a diluição, foi adicionado ao primeiro tubo 10 mL de solução (não diluída em meio de cultura) de clorexidina a 0,12%. Após agitação em vortex, 5 mL foi transferido para ao segundo tubo com 5mL de MHB (Müller Hinton Broth - Merck®), e assim sucessivamente até atingir as concentrações de 0,12%, 0,06%, 0,03%, 0,015% e 0,0075% (Figura 2). Depois das diluições, os tubos foram agitados em um

agitador do tipo vórtex. Após a homogeneização das soluções, foram adicionadas em cada tubo alíquotas de 100 µL das suspensões bacterianas já mencionadas anteriormente e os tubos foram incubados por 18 horas em estufa à 37°C com 10% de CO₂ (para *S. mutans*) e 18 horas em estufa à 37°C estufa de aerobiose (para *S. aureus*).

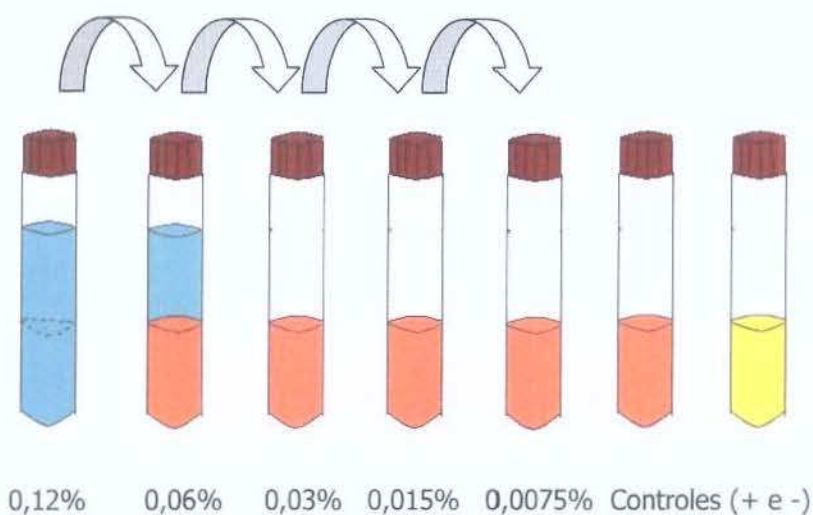


Figura 3 – Esquema representando as diluições das soluções de clorexidina.

Após o período de incubação, foram realizadas leituras em espectrofotometria a 660 nm dos tubos para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) das soluções de clorexidina frente aos microrganismos testados.

Após a leitura em espectrofotometria, uma alíquota de 10 µL de cada tubo foi inoculada em placas de BHI ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro através do “Spiral-plater” (Whittley Automatic Spiral Plater da DW Scientific) e incubadas por 24 horas, a 37°C em estufa com 10% CO₂.

O CBM₁₀₀ foi considerado a menor concentração de clorexidina onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana) e o CBM₅₀ a concentração que reduziu o inóculo em 50%.

3. RESULTADOS

O Gráfico 3 mostra a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. mutans* das formulações de clorexidina antes dos períodos e das condições de armazenagem.

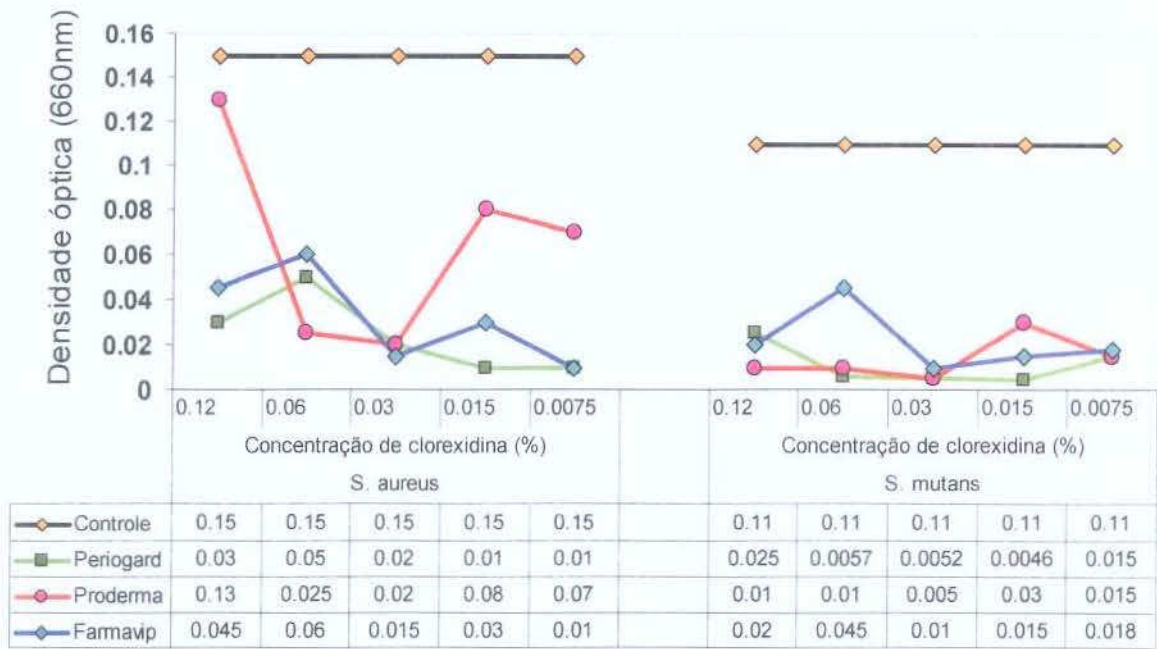


Gráfico 3 – Valores da leitura em espectrofotometria (mês 0) para *S. aureus* e *S. mutans*.

Os valores mostram que todas as soluções, em todas as concentração foram eficazes em reduzir ambas as cepas, uma vez que os valores de densidade óptica situaram-se abaixo do valor obtido com as cepas na ausência das formulações de clorexidina (controle).

O Quadro 2 mostra os valores de controle para as duas cepas durante os períodos estudados.

Quadro 2. Valores de densidade óptica dos tubos controle considerando as duas cepas durante os períodos estudados.

	DENSIDADE ÓPTICA (660 nm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
Mês 1	0.79	0.345
Mês 2	1.095	0.943
Mês 3	1.104	0.854
Mês 4	0.784	0.854
Mês 5	0.973	0.874
Mês 6	0.794	0.809

O Quadro 3 mostra os valores obtidos na leitura em espectrofotometria na análise realizada durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de *S. aureus*.

Quadro 3 - Valores obtidos na leitura em espectrofotometria durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de *S. aureus*.

Mês	Concentração	GELADEIRA			ESTUFA			COM LUZ			SEM LUZ		
		Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma
1	0,12	0,048	0,02	0,071	0,057	0,079	0,0117	0,045	0,098	0,076	0,05	0,06	0,143
	0,06	0,05	0,098	0,0109	0,049	0,09	0,0124	0,035	0,065	0,0132	0,072	0,115	0,0175
	0,03	0,037	0,045	0,054	0,045	0,094	0,073	0,024	0,034	0,085	0,023	0,079	0,0117
	0,015	0,033	0,027	0,023	0,036	0,069	0,04	0,036	0,007	0,056	0,034	0,067	0,071
	0,0075	0,025	0,022	0,02	0,03	0,063	0,034	0,09	0,002	0,066	0,027	0,064	0,068
2	0,12	0,043	0,048	0	0,086	0,059	0,058	0,016	0,024	0,042	0,063	0,033	0,072
	0,06	0,084	0,055	0,047	0,131	0,024	0,173	0,041	0,034	0,085	0,024	0,028	0,095
	0,03	0,064	0,024	0,022	0,047	0,021	0,074	0,011	0,024	0,067	0,089	0,013	0,064
	0,015	0,02	0,019	0,011	0,023	0,022	0,061	0,013	0,013	0,049	0,105	0,007	0,06
	0,0075	0,012	0,014	0,008	0,021	0,013	0,068	0,006	0,015	0,069	0,106	0,028	0,051
3	0,12	0,03	0,13	0,139	0,03	0,231	0,06	0,037	0,079	0,07	0,016	0,072	0,15
	0,06	0,019	80,51	0,08	0,02	0,09	0,083	0,013	0,049	0,042	0,022	0,047	0,082
	0,03	0,009	133,05	0,029	0,0016	0,07	0,06	0,007	0,021	0,016	0,042	0,013	0,009
	0,015	0,006	144	0,008	0,001	0,004	0,014	0,007	0,004	0,007	0,043	0,007	0,01
	0,0075	0,007	0,009	0,004	0,009	0,008	0,05	0,003	0,001	0,005	0,005	0,004	0,01
4	0,12	0,04	0,095	0,15	0,035	0,289	0,005	0,028	0,073	0,07	0,029	0,08	0,169
	0,06	0,018	161	0,106	0,016	0,088	0,093	0,02	0,048	0,043	0,027	0,042	0,098
	0,03	0,01	267	0,04	0,016	0,02	0,084	0,008	0,025	0,016	0,024	0,014	0,05
	0,015	0,011	288	0,012	0,004	0,005	0,013	0,011	0,004	0,009	0,007	0,011	0,014
	0,0075	0,006	0,009	0,003	0,009	0,009	0,003	0	0	0,007	0,005	0,003	0,007
5	0,12	0,175	0,03	0,128	0,173	0,03	0,08	0,085	0,046	0,132	0,064	0,03	0,13
	0,06	0,038	0,02	0,059	0,092	0,025	0,041	0,05	0,016	0,066	0,053	0,018	0,073
	0,03	0,011	0,017	0,018	0,011	0,016	0,016	0,017	0,007	0,013	0,012	0,018	0,036
	0,015	0,01	0,01	0,005	0,004	0,016	0,008	0,005	0,003	0,006	0,002	0,08	0,015
	0,0075	0,009	0,008	0,005	0,008	0,009	0,002	0,003	0,006	0,015	0,005	0,006	0,06
6	0,12	0,014	0,014	0,043	0,02	0,001	0,017	0,041	0,014	0,012	0,025	0,009	0,02
	0,06	0,024	0,119	0,078	0,021	0,035	0,045	0,035	0,07	0,01	0,034	0,04	0,109
	0,03	0,042	0,213	0,115	0,032	0,019	0,159	0,03	0,17	0,118	0,044	0,05	0,06
	0,015	0,012	0,017	0,02	0,043	0,01	0,052	0,019	0,017	0,045	0,007	0,007	0,01
	0,0075	0	0,033	0,042	0,012	0,02	0,012	0,001	0,029	0,064	0	0,0875	0,011

O Quadro 4 mostra os valores obtidos na leitura em espectrofotometria na análise realizada durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de *S. aureus*.

Quadro 4 - Valores obtidos na leitura em espectrofotometria durante os 6 meses, nas diferentes condições de armazenagem, considerando a cepa de *S. mutans*.

Mês	GELADEIRA				ESTUFA			COM LUZ			SEM LUZ		
	Concentração	Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma	Periogard	Farmavip	Proderma
1	0,12	0,03	0,026	0,066	0,049	0,024	0,108	0,024	0,017	0,07	0,002	0,021	0,078
	0,06	0	0,036	0,019	0,045	0,069	0,115	0,035	0,093	0,081	0,023	0,061	0,108
	0,03	0,012	0,012	0,035	0,036	0,037	0,078	0,041	0,04	0,055	0,003	0,034	0,059
	0,015	0,018	0,003	0,14	0,039	0,026	0,043	0,003	0,031	0,067	0,008	0,024	0,037
	0,0075	0,002	0,025	0,005	0,03	0,025	0,037	0,001	0,027	0,022	0	0,025	0,029
2	0,12	0,044	0,035	0	0,059	0,032	0,001	0,03	0,026	0	0,046	0,039	0
	0,06	0,097	0,031	0,031	0,108	0,039	0,002	0,054	0,021	0,034	0,073	0,022	0,048
	0,03	0,021	0,023	0,012	0,018	0,02	0,016	0,023	0,022	0,016	0,031	0,025	0,017
	0,015	0,012	0,03	0,035	0,009	0,027	0,009	0,011	0,015	0,013	0,016	0,017	0,006
	0,0075	0,009	0,006	0,007	0,013	0,025	0,012	0,007	0,016	0,008	0,017	0,008	0,001
3	0,12	0,043	0,055	0	0,077	0,045	0,165	0,037	0,032	0	0,06	0,078	0,181
	0,06	0,031	0,07	0,06	0,017	0,037	0,047	0,045	0,029	0,039	0,08	0,021	0,05
	0,03	0,029	0,025	0,034	0,04	0,029	0,03	0,026	0,032	0,018	0,209	0,025	0,026
	0,015	0,011	0,018	0,014	0,02	0,02	0,013	0,025	0,015	0,023	0,035	0,012	0,011
	0,0075	0,005	0,01	0,07	0,005	0,001	0,014	0,013	0,03	0,001	0,013	0,049	0,005
4	0,12	0,045	0,045	-0,002	0,015	0,034	0,15	0,041	0,029	-0,007	0,057	0,097	0,12
	0,06	0,0197	0,039	0,065	0,019	0,038	0,067	0,065	0,024	0,045	0,089	0,008	0,034
	0,03	0,035	0,034	0,031	0,064	0,024	0,034	0,025	0,031	0,024	0,054	0,034	0,017
	0,015	0,008	0,021	0,013	0,037	0,013	0,09	0,032	0,017	0,007	0,027	0,017	0,05
	0,0075	0,01	0,013	0,09	0,003	0,001	0,12	0,011	0,004	0,001	0,015	0,09	0,003
5	0,12	0,065	0,042	-0,001	0,036	0,035	-0,004	0,065	0,063	0,243	0,057	0,14	0,315
	0,06	0,031	0,043	0,054	0,034	0,027	0,031	0,034	0,0784	0,067	0,035	0,015	0,027
	0,03	0,017	0,024	0,037	0,034	0,027	0,012	0,016	0,364	0,035	0,034	0,017	0,026
	0,015	0,016	0,014	0,017	0,012	0,017	0,04	0,008	0,046	0,017	0,027	0,012	0,017
	0,0075	0,009	0,001	0,05	0,001	0,014	0,001	0,008	0,012	0,006	0,001	0,008	0,17
6	0,12	0,015	0,015	0,024	0,021	0,001	0,033	0,019	0,018	0,004	0,026	0,009	0,021
	0,06	0,042	0,064	0,068	0,02	0,005	0,075	0,024	0,079	0,078	0,035	0,039	0,073
	0,03	0,084	0,145	0,048	0,038	0,005	0,171	0,026	0,189	0,113	0,008	0,004	0,043
	0,015	0,007	0,045	0,048	0,021	0	0,098	0,035	0,063	0,043	0,092	0,006	0,015
	0,0075	0,001	0,023	0,031	0	0,016	0,004	0,005	0,015	0,01	0	0,498	0

Embora tenha sido observado crescimento bacteriano em diversas concentrações considerando cada uma das formulações, em nenhuma situação houve crescimento similar ao observado nos tubos controle, o que indicaria perda de função da formulação.

4. DISCUSSÃO

A clorexidina é um dos mais seguros e efetivos agentes antimicrobianos incorporados a bochechos e dentifrícios para higienização tradicional (HILDEBRANDT, 1996; OWENS, 1997). Embora, seja considerada como um agente antimicrobiano de largo espectro, sua característica seletiva para microrganismos do grupo mutans já foi relatada por outros autores (EMILSON, 1977; MALTZ-TURKIENICZ *et al.*, 1980; SCHAEKEN *et al.*, 1984). SREENIVASAN & GITTINS (2004) observaram uma redução significativa da microbiota bucal, de maneira geral, quando bochechos de solução de clorexidina a 0,12% foram realizados. No presente estudo, a eficácia *in vitro* contra os estreptococos do grupo mutans pode ser mais uma vez comprovada, sendo que a armazenagem das soluções não interferiu significativamente na atividade antimicrobiana.

KULKARNI & DAMLE (2003) demonstraram que enxaguatórios com clorexidina são mais eficazes em reduzir *S. mutans* quando comparados a outros enxaguatórios. O efeito antimicrobiano da clorexidina contra esses microrganismos também pode ser observado mesmo em concentrações relativamente baixas (KANAZAWA & UEDA, 2004). Esses trabalhos condizem com o presente estudo, uma vez que a clorexidina apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* mesmo nas menores diluições avaliadas, fato não observado com a cepa de *Staphylococcus aureus*.

Cepas de *S. aureus* podem causar, entre outras doenças, a endocardite bacteriana e infecções pós-operatórias. Desta forma, a redução destes microrganismos na cavidade bucal antes dos procedimentos cirúrgicos é muito importante. Estudos têm demonstrado que uma redução significativa destes microrganismos pode ser obtida com um bochecho de clorexidina a 0,12%. (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

A atividade antimicrobiana da clorexidina contra as cepas de *Staphylococcus aureus* foi observada nas 3 soluções avaliadas, inclusive nas amostras das soluções armazenadas em estufa a 37°C. Esses resultados corroboram com vários estudos

(AMORIM *et al.*, 2004; KANAZAWA & UEDA, 2004), mostrando a excelente atividade antimicrobiana frente a estes microrganismos.

Além disso, esses dados aliados aos dados dos ensaios microbiológicos com as cepas de *Streptococcus mutans* demonstram a preservação da atividade antimicrobiana das soluções de clorexidina avaliadas mesmo quando armazenadas em condições críticas como a estufa a 37°C, uma vez que todas as amostras avaliadas apresentaram redução significativa do crescimento das bactérias avaliadas.

Dentre os métodos empregados para a determinação da concentração de clorexidina podem ser citados a cromatografia líquida de alta eficiência (TSUCHIYA *et al.*, 1999) e o espectrofotométrico (WILSON & WILSON, 1993). No presente estudo foi utilizado o método cromatográfico, sendo que o mesmo foi eficaz para a quantificação de todas as amostras analisadas, independentemente do período e da condição de armazenagem avaliados.

Foi feita uma alteração da metodologia em relação ao projeto inicialmente proposto para a quantificação da clorexidina. O método espectrofotométrico, embora eficaz para a dosagem da clorexidina como demonstrado no relatório parcial, foi substituído para o método cromatográfico devido à dificuldade em se obter um reagente para a sua realização (tetracloreto de carbono, de uso controlado). Desta forma, o método cromatográfico passou a ser utilizado, sendo que o mesmo apresentou eficácia e facilidade de manuseio para a dosagem das amostras.

A análise cromatográfica e do pH das diferentes soluções de clorexidina permitiu verificar que o método de armazenagem não interferiu nas propriedades químicas das soluções, uma vez que não foram observadas diferenças significativas tanto nas concentrações como no pH das soluções avaliadas, inclusive nas soluções armazenadas em estufa a 37°C.

5. CONCLUSÃO

Desta forma, o presente trabalho permite concluir que o método de armazenamento não interfere nas propriedades químicas e na atividade antimicrobiana das soluções de clorexidina por um período de 6 meses.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobial. A short review. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.13, p.957-964, 1986.
2. AMORIM CV, AUN CE, MAYER MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol Pesqui Odontol Bras. 2004 Jul-Sep;18(3):242-6.
3. AXELSSON, P. Current role of pharmaceuticals in prevention of caries and periodontal disease. Int Dent J, Guiedford, v.43, p.473-482, 1993.
4. BARKVOLL, P., RØLLA, G., BELLAGAMBA, S. Interaction between chlorexidine digluconate na sodium monofluorophosphate in vitro. Scan J Dent Res, Copenhagen, v.96, n.1, p.30-3, 1988.
5. BARKVOLL, P., RØLLA, G., SVENDSEN, A.K. Interaction between chlohexidine gluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.16, p.593-595, 1989.
6. BONESVOLL, P. Influence of ionic strenght, calcium, sodium dodecyl sulfate and urea on the retention of chlohexidine in the human mouth after mouth rinses. Arch Oral Biol, Oxford, v.22, p.273-279, 1977.
7. CARVALHO, L.E.P.; GRANJEIRO,J.M.;BASTOS, J.R.M.; HENRIQUES, J.F.C.; TARZIA, O. Clorexidina em Odontologia R.G.O., 39 (6): 423-427, nov/dez., 1991.
8. CLARK, D.C., GUEST, J.L. The effectiveness of three different strengths of chlorhexidine mouthrinse. J Can Dent Assoc, Ottawa, v.60, n.8, p.711-714, Aug. 1994.
9. CURY, J.A., CURY, A.A.D.B., REBELO, M.A.B. Efeito de bochecho com clorexidina (CH) e Flúor (F) na redução de formação da placa dental e incorporação de flúor no esmalte dental. Revta Bras Odont, Rio de Janeiro, v.LI, n.3, Maio/Junho, 1994.
- 10.DAVIES, A. The mode of action of chlorhexidine. J.Periodont Res., 8(suplement 12):68-75, 1973.
- 11.DE FREITAS CS, DINIZ HF, GOMES JB, SINISTERRA RD, CORTES ME. Evaluation of the substantivity of chlorhexidine in association with sodium fluoride in vitro. Pesqui Odontol Bras. 2003 Jan-Mar;17(1):78-81. Epub 2003 Aug 05.
- 12.DE ALBUQUERQUE RF JR, HEAD TW, MIAN H, RODRIGO A, MULLER K,

- SANCHES K, ITO IY. Reduction of salivary *S. aureus* and mutans group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int.* Sep;35(8):635-40, 2004.
13. EMILSON, C.G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*, Copenhagen, v.85, p.255-265, 1977.
 14. GREENSTEIN, G., BERMAN, C., JAFFIN, R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol*, Chicago, v.57, p.370-377, 1986.
 15. HAMP, S. E. & EMILSON, C. G. Some effects of chlorhexidine on the plaque flora of the beagle dog. *J. Periodont. Res.*8(suppl.12):28-35, 1973.
 16. HILDEBRANDT, G.H. Effects of Repeated Treatment with Sustained-Release Chlorhexidine Mouth Guards on Salivary Levels of Mutans Streptococci. *Caries Res*, Basel, v.30, p.445-453, 1996.
 17. HUGO, W.B., LONGWORTH, A.R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol*, London, v.18, p.569-578, 1966.
 18. JENKINS, S., ADDY, M., NEWCOMBE, R. The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.20, n.1, p.59-62, Jan. 1993.
 19. KANAZAWA K, UEDA Y. Bactericidal activity of chlorhexidine gluconate against recent clinical isolates of various bacterial species in Japan. *Jpn J Antibiot.* Oct 57(5):449-64, 2004.
 20. KIRKERGAARD, E. et al. Influence of chlorhexidine on in vitro uptake of fluoride in dental enamel. *Scand J Dent Res*, Copenhagen, v.82, p.556-569, 1974.
 21. KULKARNI VV, DAMLE SG . Comparative evaluation of efficacy of sodium fluoride, chlorhexidine and triclosan mouth rinses in reducing the mutans streptococci count in saliva : an in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.*, Sep 21(3):98-104, 2003.
 22. LUOMA, H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci. *Arch Oral Biol*, Oxford, v.17, p.1431-1437, 1972.
 23. MALTZ- TURKIEWICZ, M., KRASSE, B., EMILSON, C.G. Effects of chlorhexidine and iodine on in vitro plaques of *Streptococcus mutans* and

- Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.88, p.28-33, 1980.
24. McDERMID, A.S. et al. Additive inhibitory effects of combinations of fluoride and chlorhexidine on acid production by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. Caries Res, Basel, v.19, p.64-71, 1985.
 25. MEURMAN, J.H. Ultrastructure, growth and adherency of Streptococcus mutans after treatment with chlorhexidine and fluoride. Caries Res, Basel, v.22, p.283-287, 1988.
 26. NORDBO, H. Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine and aldehydes or ketones in vitro. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.79, n.5, p.356-361, 1971.
 27. OSTROLENK M., WEISS W. The effect of mouthwashes on the oral flora. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim). 1959 Apr;48(4):219-21.
 28. OWENS, J.; ADDY, M.; FAULKNER, J.; LOCKWOOD, C.; ADAIR, R. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. J Clin Periodontol, 24(10):732-737, 1997.
 29. PRAYITNO, S., ADDY, M. An in vitro study of factors affecting the development of staining associated with the use of chlorhexidine. J Periodontal Res, Copenhagen, v.14, n.5, p.397-402, Sep. 1979.
 30. PUCHER, J.J., DANIEL, J.C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. J Periodontol, Chicago, v.63, n.6, p.526-532, Jun. 1992.
 31. RENTON-HARPER, P. et al. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. J Periodontol, Chicago, v.67, n.5, p.486-489, May 1996.
 32. RØLLA, G., LÖE, H., SCHIØTT, C.R. The affinity of chlorhexidine for hydroxiapatite and salivary mucins. J Periodontal Res, Copenhagen, v.5, p.79-83, 1970.
 33. _____, MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibitions by chlorhexidine. J Dent Res, Washington, v.54, p.1357-1362, 1975.
 34. SCHAEKEN, M.J.M. et al. Effect of chlorhexidine and iodine on the composition of the human dental plaque flora. Caries Res, Basel, v.18, p.401-407, 1984.

35. SEKINO, S., RAMBERG, P., UZEL, N.G., SOCRANSKY, S., LINDHE, J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2003 Oct;30(10):919-25.
36. SREENIVASAN, P.K., GITTINS, E. The effects of a chlorhexidine mouthrinse on culturable microorganisms of the tongue and saliva. Microbiol Res. 2004;159(4):365-70.
37. TWETMAN, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. Caries Res. 2004 May-Jun;38(3):223-9.
38. VASCONCELOS, J. O uso da clorexidina na prática odontológica. Jornal de Assessoria ao Odontologista, Ano IV – 27 – Set./Out. 2001.
39. WILSON, S.J., WILSON, H.J. A method for the estimation of traces of chlorhexidine in water. Journal of Oral Rehabilitation, 1993, v. 20, p.225-231.
40. WELLS, F.V., LUBOWE, I. I. Cosmetics and the skin. New York, Reinhold Publishing Corp, 1974.
41. YAGIELA, J.A., NEIDLE, N.A., DOWD, F.J. Farmacologia e Terapêutica para Dentistas. 4ª edição, p.568-569, 2000.