



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



1290004920

TCC/UNICAMP  
W125a  
FOP

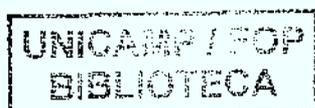
# **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Katharina Wagner

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Brenda Paula F. de Almeida Gomes

Ano de Conclusão do Curso: 2009



**Katharina Wagner**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA  
GEL 2% EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgião-Dentista

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Piracicaba  
2009

Univ. \_\_\_\_\_  
TCC / UNICAMP  
W 125 a  
Vol. \_\_\_\_\_  
Tombo 4920  
Proc. 16P-134/10  
Preço R\$ 11,00  
Data 12/08/10  
Registro 76 8084

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

W125a Wagner, Katharina.  
Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana da clorexidina gel 2% em diferentes condições de armazenamento. / Katharina Wagner. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.  
45f. : il.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.  
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Dedico este trabalho a meus pais,  
Wolfram e Cristina, que tornaram o  
sonho possível e ao meu namorado  
Luis Felipe, que tornou o  
caminho mais doce.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo esforço e amor que  
me dedicaram.

Ao Luis Felipe pelo amor e companheirismo  
nos momentos difíceis.

A Profª Brenda pela habilidade com a qual  
dirigiu meu trabalho e apoio ao projeto.

Ao co-orientador Francisco Montagner,  
pela ajuda e incentivo para o desenvolvimento  
do projeto.

A amiga Fernanda Chamosa D'Amore  
momentos de trabalho mais leves.

A todas as amigas da faculdade  
Que foram uma grande família.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas, Gráficos e Figuras .....	1
RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
PROPOSIÇÃO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

- Tabela 1:** Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a temperatura de armazenamento das substâncias, tempo de armazenamento e substância empregada, frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis* .....14
- Tabela 2:** Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a temperatura de armazenamento das substâncias, tempo de armazenamento e substância empregada, frente ao microrganismo *Candida albicans* .....15
- Tabela 3:** Halos de inibição da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis* .....24
- Tabela 4:** Halos de inibição da CLOREXIDINA GEL 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis*.....25
- Tabela 5:** Halos de inibição da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao fungo *Candida albicans*.....27
- Tabela 6:** Halos de inibição da CLOREXIDINA GEL 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao fungo *Candida albicans*.....28
- Tabela 7:** Média do pH da CLOREXIDINA LÍQUIDA e GEL 2% em diferentes períodos de tempo e condições de armazenamento.....30

<b>Tabela 8:</b> Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de CLOREXIDINA GEL 2% coletadas após 1 mês de sua fabricação.....	33
<b>Tabela 9:</b> Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de CLOREXIDINA GEL 2% coletadas após 2 mês de sua fabricação.....	34
<b>Tabela 10:</b> Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de CLOREXIDINA GEL 2% coletadas após 2 meses de sua fabricação.....	35
<b>Tabela 11:</b> Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de CLOREXIDINA GEL 2% coletadas após 4 meses de sua fabricação.....	36
<b>Tabela 12:</b> Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de CLOREXIDINA GEL 2% coletadas com mais de 4 meses após sua fabricação.....	37
<b>Gráfico 1:</b> Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento.....	24
<b>Gráfico 2:</b> Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA GEL 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento.....	26
<b>Gráfico 3:</b> Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento, frente a <i>Candida albicans</i> .....	28

**Gráfico 4:** Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA GEL 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento, frente a *Candida albicans*.....29

**Gráfico 5:** Variação da ação antimicrobiana e do pH de amostras de CLOREXIDINA GEL 2% armazenadas em temperatura ambiente.....32

**Figura 1:** Preparo do inóculo: A) Placa de Petri contendo *E. faecalis* ATCC 29212. B) Contaminação do meio de cultura líquido. C) Meio de cultura contendo o inóculo. D) Espectrofotômetro para leitura dos graus de turvação. Técnica da Camada Dupla de Agar: E) Primeira camada de Muller-Hinton Agar. F) Inoculação do meio de cultura com *E. faecalis*. G) Segunda camada contendo BHI Agar e o microrganismo. H) Placa de Petri demonstrando as duas camadas de meio de cultura. Distribuição das amostras: I) Posicionamento do cilindro de metal sobre as duas camadas de meio de cultura. J) Aplicação das amostras. L) Incubação do conjunto em estufa microbiológica a 37°C, por 48-72h. .... 18

**Figura 2:** Amostras de clorexidina gel 2% coletadas das clínicas de graduação e pós-graduação da FOP-UNICAMP, demonstrando a presença de alteração na coloração ..... 39

## RESUMO

O preparo químico-mecânico tem por objetivo promover a limpeza e a modelagem do canal radicular, por meio do emprego de instrumentos endodônticos, de substâncias ou soluções químicas auxiliares e da irrigação-aspiração. Para complementar a ação mecânica exercida pelos instrumentos endodônticos são empregadas soluções irrigadoras e substâncias químicas auxiliares. Os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar a atividade antimicrobiana da clorexidina gel e líquida a 2% nas temperaturas ambiente, refrigerada (8°C) e aquecida (37°C) em diferentes períodos de tempo (7 dias, 14 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias); b) verificar a influência das condições de armazenamento no surgimento de alterações cromáticas da substância; c) observar alterações no pH das substâncias após seu armazenamento; e, d) verificar a ação antimicrobiana, pH e forma de armazenamento de amostras de clorexidina gel 2% obtidas nas clínicas de graduação e especialização da FOP-UNICAMP. O pH inicial da CHX 2% gel e líquida é próximo ao neutro, tornando-se básica com o passar do tempo. Não foi observada alteração na cor das substâncias testadas, independentemente do período de tempo ou da condição de armazenamento. CHX 2% líquida e gel foram capazes de produzir halos de inibição de crescimento do *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em todos os períodos de tempo, nas diferentes condições de armazenamento. A manutenção a 8°C foi mais efetiva ao preservar o efeito antimicrobiano e o pH das substâncias. As amostras coletadas nas clínicas da FOP-UNICAMP demonstraram ser efetivas frente ao *E. faecalis*, mesmo após diferentes períodos de armazenamento em temperatura ambiente. Observou-se alterações mais significativas para os critérios ação antimicrobiana e pH após o período de 4 meses. Conclui-se que a clorexidina, tanto na forma gel quanto na forma líquida, apresenta uma estabilidade em sua ação antimicrobiana, tanto a nível laboratorial quanto clínico, mesmo quando armazenada em temperatura ambiente ou condições adversas.

## DESCRITORES

Endodontia – Clorexidina – Microrganismos.

# **INTRODUÇÃO**

## **PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO DOS CANAIS RADICULARES**

O preparo químico-mecânico tem por objetivo promover a limpeza e a modelagem do canal radicular, por meio do emprego de instrumentos endodônticos, de substâncias ou soluções químicas auxiliares e da irrigação-aspiração (Lopes & Siqueira, 2004). Em 1974, Schilder recomendou um novo conceito de preparo, o qual denominou como “limpeza e modelagem”. Para esse autor, a ação de limpeza tem por objetivo a remoção de todo o conteúdo do sistema de canais radiculares tais como tecido pulpar, restos necróticos, microrganismos e seus produtos de metabolismo, enquanto que a modelagem confere ao canal radicular uma conformação progressivamente cônica (desde o orifício de sua entrada até o ápice), mantendo, dessa forma, sua anatomia original.

Durante o preparo químico-mecânico, a limpeza é lograda pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos junto às paredes internas do canal radicular. Aliada a essa ação mecânica, uma ação química de limpeza é obtida pelo emprego de soluções químicas auxiliares de instrumentação (Lopes & Siqueira, 2004).

## **SUBSTÂNCIAS EMPREGADAS NO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO**

As substâncias empregadas no preparo químico-mecânico podem ser substâncias químicas auxiliares ou soluções irrigadoras, dependendo de suas propriedades físicas e químicas (Lopes & Siqueira, 2004).

As propriedades de uma Substância Ideal para ser empregada no preparo químico-mecânico são tensão superficial e viscosidade adequadas,

atividade solvente de tecido, ação antimicrobiana, atividade quelante e lubrificante além de suspensão de detritos (Lopes & Siqueira, 2004).

A alta complexidade do sistema de canais radiculares determinada pela presença de istmos, canais acessórios e irregularidades, torna necessário o uso de uma substância capaz de dissolver todo tecido pulpar. Essa capacidade depende de vários fatores, tais como o volume da solução e a massa de tecido orgânico; área de contato com os tecidos; tempo de ação; temperatura da solução; agitação mecânica; concentração da solução e frequência de renovação (Lopes & Siqueira, 2004).

Estudos realizados através de microscopia eletrônica de varredura (Baker *et al.*, 1975) mostram que a remoção dos restos orgânicos e microrganismos do canal radicular parece estar diretamente relacionada ao volume de solução irrigadora empregada, em detrimento ao tipo de solução usada, independente de sua natureza química.

Uma solução química muito viscosa escoar com dificuldade tendo, portanto, menor alcance e refluxo. Logo, o aumento da viscosidade reduz a capacidade de penetração da solução química em irregularidades e reentrâncias do canal radicular (Lopes & Siqueira, 2004).

As substâncias químicas empregadas no preparo químico-mecânico devem apresentar uma atividade antimicrobiana, pois, aliadas à instrumentação terão a capacidade de exercer um efeito significativo na eliminação de bactérias (Byström & Sundqvist, 1983).

Durante o preparo do canal radicular, forma-se a *smear layer* e para sua remoção é recomendada a aplicação de um agente quelante, que vai exercer efeito químico na remoção de íons cálcio (Lopes & Siqueira, 2004).

Através da propriedade de umectação, as soluções empregadas no preparo químico-mecânico, conservam as paredes hidratadas e atuam também como lubrificantes, reduzindo a força de atrito e formando uma película que diminui o contato físico entre as superfícies do instrumento e da dentina (Lopes & Siqueira, 2004).

Além de todas as propriedades acima citadas, as substâncias auxiliares têm ainda, como função, manter os detritos orgânicos e inorgânicos, liberados durante a instrumentação do canal radicular, em suspensão, para impedir sedimentação na região apical. A maioria das substâncias utilizadas em Endodontia apresenta fluidez satisfatória. Porém, antes que a substância possa atingir uma viscosidade crítica, que diminua a sua fluidez, a mesma deve ser renovada, através de um sistema de irrigação-aspiração (Lopes & Siqueira, 2004).

Substâncias desinfetantes, via de regra, apresentam certa toxicidade para as células vivas. Isso ocorre porque essas substâncias não possuem uma ação restrita apenas sobre os microrganismos. Os efeitos nocivos que as substâncias auxiliares podem causar aos tecidos dependem de sua própria toxicidade, sua concentração, do tempo e da área de contato com os tecidos. Durante o tratamento endodôntico, o curto período em que essas substâncias entram em contato com os tecidos periapicais e a pequena área exposta, pode minimizar o efeito irritante do agente irrigante (Lopes & Siqueira, 2004).

## **HIPOCLORITO DE SÓDIO**

O hipoclorito de sódio pertence ao grupo dos compostos halogenados, sendo que seu emprego em Odontologia iniciou-se em 1792, quando foi produzido pela primeira vez e recebeu o nome de Água de Javele (Estrela, 2004).

Na Endodontia, essa substância é muito utilizada devido às suas excelentes propriedades, tais como: diminuição da tensão superficial; neutralização parcial de produtos tóxicos; ação bactericida; auxiliar na instrumentação; pH alcalino; ação dissolvente; desidratar e solubilizar substâncias protéicas; ação rápida; dupla ação detergente; não ser irritante nas condições de uso; arraste mecânico e ação lubrificante (Leonardo, 2004).

Entretanto como o hipoclorito de sódio não apresenta capacidade de dissolução tecidual seletiva, ele pode atingir os tecidos periapicais e provocar

danos. Essa possibilidade de extravasamento do agente irrigante é aumentada quando se faz a patência e o desbridamento foraminal. A injeção de hipoclorito de sódio a 5,25%, que geralmente não ultrapassa um volume de 0,5ml, nos tecidos moles pode provocar uma intensa resposta inflamatória que se inicia com dor intensa de durabilidade entre 2 e 5 minutos seguida de edema tecidual e hemorragia (Sabala & Powell, 1989).

Uma alternativa ao uso de hipoclorito de sódio tem sido o digluconato de clorexidina. Essa substância já é consagrada na Odontologia, no controle de doenças bucais em pacientes idosos e portadores de necessidades especiais, pois é capaz de reduzir de forma significativa a população de *Streptococcus mutans* e, se acidentalmente ingerida, é quase que totalmente eliminada pelas fezes (Leonardo, 2005).

## CLOREXIDINA

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro (Lopes & Siqueira, 2004). Sua ação antimicrobiana resulta da ligação de suas moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias que são carregadas negativamente. Em altas concentrações a clorexidina apresenta efeito bactericida porque rompe a parede celular, interferindo no mecanismo de transporte e secundariamente na coagulação do citoplasma pela alta afinidade a proteínas. Em baixas concentrações o efeito observado pela clorexidina é bacteriostático, pois é capaz de inibir as funções de membrana, sendo seu efeito mantido por várias horas após a aplicação, devido a sua excelente substantividade, ou seja, efeito residual (Hugo & Longworth, 1964; Hugo & Longworth, 1965; Rölla *et al.*, 1970; Rölla & Melsen, 1975; Greenstein *et al.*, 1986).

O uso da clorexidina em Endodontia tem se ampliado devido a sua atividade antimicrobiana contra bactérias presentes em infecções endodônticas (Cervone *et al.*, 1990; Ferraz *et al.*, 2001), pelo seu efeito residual (White *et al.*,

1997; Komorowsky *et al.*, 2000; Dametto *et al.*, 2005) e biocompatibilidade (Jeansonne & White, 1994; Tanomaru Filho *et al.*, 2002).

Leonardo *et al.*, em 1999, realizaram estudo *in vivo* para avaliar a capacidade antimicrobiana e o efeito residual da clorexidina a 2% em dentes humanos com necrose pulpar e lesão periapical crônica. Concluiu-se que como solução irrigadora, a clorexidina apresentou efeito antimicrobiano e sua substantividade foi comprovada até 48 horas após a aplicação. Seu efeito residual é devido à sua capacidade de se ligar a hidroxiapatita (Rölla *et al.*, 1970). Portanto, ocorre uma liberação gradual da clorexidina adsorvida nas paredes do canal radicular, propiciando um ambiente bacteriostático com nível constante de clorexidina, podendo esse efeito perdurar de 48 horas-72 horas (White *et al.*, 1997), até 7 dias (Dametto *et al.*, 2005), 21 dias (Komorowski *et al.*, 2000), 12 semanas (Rosenthal *et al.*, 2004). Essa propriedade a difere de outros agentes desinfetantes que rapidamente se dissipam por não possuírem substantividade (Messer & Chen, 1984).

Quando as diferentes formas de apresentação da clorexidina 2%, tanto em solução quanto em gel, foram comparadas, estudos de Ferraz *et al.*, 2001, apontam propriedades químicas semelhantes, com a forma gel apresentando vantagem em relação à base utilizada, o Natrosol, que possui pH entre 6,0-9,0 e é solúvel em água ou álcool.

Ferraz, em 1999, realizou estudo avaliando a solução de clorexidina a 2%, clorexidina gel a 2% e solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. Analisou *in vitro* a ação antimicrobiana dessas substâncias em difusão em Agar, capacidade de remoção da *smear layer* sob microscopia eletrônica de varredura e eliminação de *Enterococcus faecalis*. Nos resultados obtidos, a clorexidina gel apresentou maiores halos de inibição contra os microrganismos testados em difusão em Agar e, ainda, maior remoção de lama dentinária que as demais substâncias usadas.

Estudos de Ferraz *et al.* (2001) e Gomes *et al.* (2001) avaliaram a ação antimicrobiana do gluconato de clorexidina gel a 2% e da solução de hipoclorito de

sódio a 5,25% em canais radiculares contaminados *in vitro* com *Enterococcus faecalis*. Os dois estudos apontaram resultados semelhantes para os dois agentes irrigantes. Em trabalho *in vitro*, Ferraz *et al.* (2007) relatam que a clorexidina gel 2% e a clorexidina líquida 2% foram mais eficazes que o hipoclorito de sódio 5,25% na inibição do crescimento de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, ratificando seu emprego como uma importante substância química auxiliar.

Uma das limitações da clorexidina é a sua incapacidade de dissolução de tecidos orgânicos (Vianna *et al.*, 2004). Porém, a forma gel da clorexidina 2% facilita a instrumentação, promovendo melhor remoção mecânica de tecidos orgânicos o que, em última análise, compensa a incapacidade de dissolução dos mesmos (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002).

Ao contrário do hipoclorito de sódio, não há estudos que demonstram por quanto tempo a clorexidina é capaz de manter sua atividade antimicrobiana quando armazenada por diferentes períodos e temperaturas. Gambarini *et al.*, em 1998, estudaram o efeito da temperatura na degradação do hipoclorito de sódio. As soluções que foram aquecidas, quando comparadas com as que não foram aquecidas, mantiveram alto conteúdo de cloreto disponível, alto poder de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana.



## PROPOSIÇÃO

Os objetivos do estudo foram:

1. Avaliar a ação antimicrobiana e pH da clorexidina 2% gel e líquida quando refrigeradas (8°C) ou aquecidas (37°C), em diferentes períodos de tempo (7 dias, 14 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias), frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.
2. Avaliar as alterações cromáticas das substâncias clorexidina 2% gel e líquida quando refrigeradas (8°C) e aquecidas (37°C) em diferentes períodos de tempo (7 dias, 14 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias).
3. Verificar a ação antimicrobiana, pH e alterações cromáticas, correlacionando com a forma de armazenamento, para as amostras de clorexidina gel 2% obtidas nas clínicas de graduação e especialização da FOP-UNICAMP .

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. ANÁLISE DAS AÇÃO ANTIMICROBIANA, PH E ALTERAÇÕES CROMÁTICAS DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA 2% E DO GEL DE CLOREXIDINA 2% ARMAZENADAS A 8°C OU 37°C EM DIFERENTES PERÍDOS DE TEMPO.

#### 1.1. Microrganismos

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
- *Candida albicans* (NTCC 3736)

#### 1.2 Meios de cultura

- Brain Heart Infusion Broth (BHI) – Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK.
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA) – Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK.
- Mueller-Hinton Agar (MHA) – Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK.

#### 1.3 Medicamentos testados

- Clorexidina líquida 2%
- Clorexidina gel 2%

#### 1.4 Manipulação das Substâncias químicas auxiliares

As substâncias químicas auxiliares foram armazenadas em diferentes condições de temperatura. Frascos contendo as soluções foram acondicionados

em temperatura de 8°C, em geladeira, e de 37°C em estufa microbiológica. Seis alíquotas de 100µL das amostras foram retiradas dos frascos no momento de sua obtenção, e o teste microbiológico foi realizado, com o objetivo de estabelecer o valor controle dos halos de inibição para as substâncias. Após serem acondicionadas nas temperaturas especificadas, nove alíquotas de 100µL foram retiradas de cada frasco após 7, 15, 30, 60 e 90 dias. As amostras foram distribuídas nos poços que estavam sobre os meios de cultura inoculados com os respectivos microrganismos. As **Tabelas 1 e 2** resumem os grupos avaliados.

**Tabela 1.** Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a temperatura de armazenamento das substâncias, tempo de armazenamento e substância empregada, frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis*.

GRUPO	n	TEMPERATURA	TEMPO	SUBSTÂNCIA
G1AG	3	8°C	7 dias	CHX líquida 2%
G1BG	3	8°C	7 dias	CHX gel 2%
G2AG	3	8°C	14 dias	CHX líquida 2%
G2BG	3	8°C	14 dias	CHX gel 2%
G3AG	3	8°C	30 dias	CHX líquida 2%
G3BG	3	8°C	30 dias	CHX gel 2%
G4AG	3	8°C	60 dias	CHX líquida 2%
G4BG	3	8°C	60 dias	CHX gel 2%
G5AG	3	8°C	90 dias	CHX líquida 2%
G5BG	3	8°C	90 dias	CHX gel 2%
G1AE	3	37°C	7 dias	CHX líquida 2%
G1BE	3	37°C	7 dias	CHX gel 2%
G2AE	3	37°C	14 dias	CHX líquida 2%
G2BE	3	37°C	14 dias	CHX gel 2%
G3AE	3	37°C	30 dias	CHX líquida 2%
G3BE	3	37°C	30 dias	CHX gel 2%
G4AE	3	37°C	60 dias	CHX líquida 2%
G4BE	3	37°C	60 dias	CHX gel 2%
G5AE	3	37°C	90 dias	CHX líquida 2%
G5BE	3	37°C	90 dias	CHX gel 2%

\* G = 8°C, geladeira; E = 37°C, estufa microbiológica.

**Tabela 2.** Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a temperatura de armazenamento das substâncias, tempo de armazenamento e substância empregada, frente ao microrganismo *Candida albicans*.

GRUPO	n	TEMPERATURA	TEMPO	SUBSTÂNCIA
G6AG	3	8°C	7 dias	CHX líquida 2%
G6BG	3	8°C	7 dias	CHX gel 2%
G7AG	3	8°C	14 dias	CHX líquida 2%
G7BG	3	8°C	14 dias	CHX gel 2%
G8AG	3	8°C	30 dias	CHX líquida 2%
G8BG	3	8°C	30 dias	CHX gel 2%
G9AG	3	8°C	60 dias	CHX líquida 2%
G9BG	3	8°C	60 dias	CHX gel 2%
G10AG	3	8°C	90 dias	CHX líquida 2%
G10BG	3	8°C	90 dias	CHX gel 2%
G6AE	3	37°C	7 dias	CHX líquida 2%
G6BE	3	37°C	7 dias	CHX gel 2%
G7AE	3	37°C	14 dias	CHX líquida 2%
G7BE	3	37°C	14 dias	CHX gel 2%
G8AE	3	37°C	30 dias	CHX líquida 2%
G8BE	3	37°C	30 dias	CHX gel 2%
G9AE	3	37°C	60 dias	CHX líquida 2%
G9BE	3	37°C	60 dias	CHX gel 2%
G10AE	3	37°C	90 dias	CHX líquida 2%
G10BE	3	37°C	90 dias	CHX gel 2%

\* G = 8°C, geladeira; E = 37°C, estufa microbiológica.

## 1.5 Preparação do inóculo

A ação antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares foi avaliada pelo método de difusão em agar, e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano.

Os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foram subcultivados em placas de BHIA e incubados por 18-24 h a 37°C (em atmosfera de 10% CO<sub>2</sub>).

Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em tubos contendo 5 mL do meio de cultura líquido apropriado. Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland (1,5 x 10<sup>8</sup> bactérias/mL).

Tais inóculos foram utilizados, pois promovem crescimento semiconfluente de todos os microrganismos testados.

## 1.6 Preparo das camadas de agar e do inóculo

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foram utilizadas placas de 140 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata e em tempos diferentes.

Utilizou-se o método da camada dupla.

Inicialmente foram preparadas placas contendo 40 mL de Muller-Hinton Agar (MHA) que serviram de base para a camada de inóculo, que foi preparada a seguir.

Quarenta mL de Brain Heart Infusion Agar (BHIA) foram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingir 45°C, ainda em estado líquido, foram adicionados 400 µL do inóculo microbiano e foi promovida agitação uniforme do conjunto. O BHIA passou a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano, e foi então distribuído sobre a camada sólida de Muller-Hinton Agar.

### 1.7 Colocação dos poços sobre a superfície do agar

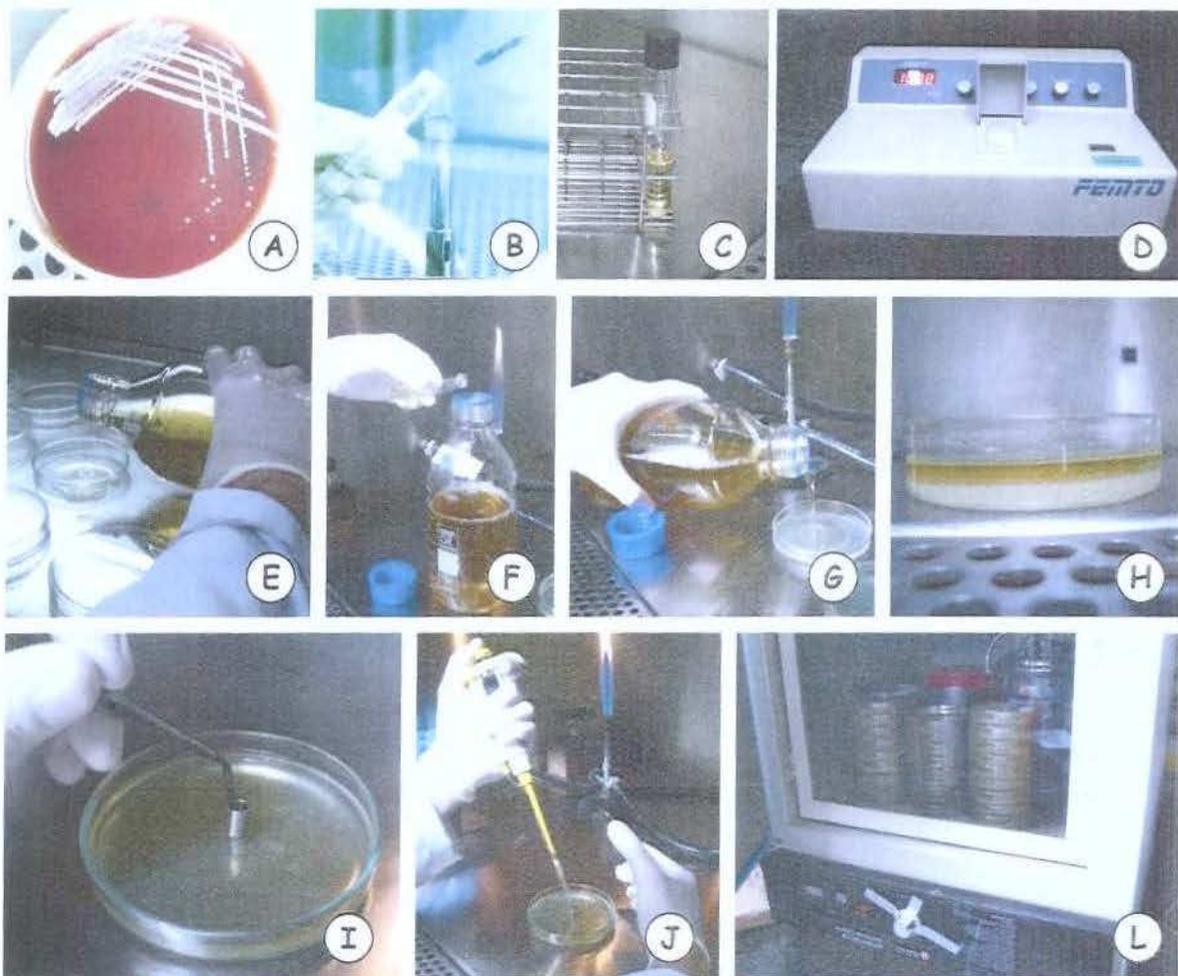
No interior da câmara de fluxo laminar, após a solidificação dos meios de cultura, as amostras foram colocadas sobre a superfície do agar utilizando-se pinças estéreis.

### 1.8 Incubação

As placas foram incubadas a 37°C em condições gasosas apropriadas.

### 1.9 Leitura dos Halos de Inibição

A leitura parado halos de inibição de crescimento para os microrganismos foi feita após 48 horas de incubação a 10% de CO<sub>2</sub>. As medidas das zonas de inibição de crescimento microbiano correspondem à distância entre a superfície externa do poço contendo a substância química auxiliar e o início da região de crescimento microbiano, os quais foram medidos com auxílio de paquímetro digital (DIGIMESS Instrumentos de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A **Figura 1** ilustra as etapas que compreendem a Técnica da Camada Dupla de Agar, considerando que o microrganismo empregado foi o *E. faecalis*. O mesmo procedimento foi empregado para o fungo *C. albicans*.



**Figura 1. Preparo do inóculo:** A) Placa de Petri contendo *E. faecalis* ATCC 29212. B) Contaminação do meio de cultura líquido. C) Meio de cultura contendo o inóculo. D) Espectrofotômetro para leitura dos graus de turvação. **Técnica da Camada Dupla de Agar:** E) Primeira camada de Muller-Hinton Agar. F) Inoculação do meio de cultura com *E. faecalis*. G) Segunda camada contendo BHI Agar e o microrganismo. H) Placa de Petri demonstrando as duas camadas de meio de cultura. **Distribuição das amostras:** I) Posicionamento do cilindro de metal sobre as duas camadas de meio de cultura. J) Aplicação das amostras. L) Incubação do conjunto em estufa microbiológica a 37°C, por 48-72h.

## 1.10 pH DAS SOLUÇÕES

O pH das amostras de clorexidina líquida 2% e gel 2% armazenadas a 8°C, a 37°C após diferentes períodos de tempo e também daquelas coletadas das Clínicas de Graduação e Pós-graduação em Endodontia da FOP-UNICAMP foi avaliado em pHmetro digital (Digimed DM 21, São Paulo, SP, Brasil)..

## 1.11 Verificação das alterações cromáticas

A alteração cromática foi avaliada através da observação e visualização de mudança na transparência das soluções ou dos géis de clorexidina 2%. Caso houvesse alterações, as mesmas eram anotadas, considerando-se a cor apresentada pelas mesmas.

## **2. ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA, PH E ALTERAÇÕES DE COR EM AMOSTRAS DE CLOREXIDINA GEL 2% COLETADAS NAS CLÍNICAS DE GRADUAÇÃO E ESPECIALIZAÇÃO EM ENDODONTIA DA FOP-UNICAMP.**

Através dos mesmos métodos de avaliação descritos anteriormente, realizamos a análise da ação antimicrobiana frente ao *E. faecalis*, pH e alterações de cor em 30 amostras de clorexidina gel 2% coletadas no Curso de Odontologia e nos Cursos de Aperfeiçoamento e Especialização em Endodontia da FOP-UNICAMP. Foram anotadas ainda características das amostras, tais como: data de fabricação, data de validade e forma de armazenamento da mesma.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS 10.0 *for Windows* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) utilizando os testes estatísticos ANOVA e Teste de Tukey, Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou Teste T, quando apropriado. A significância foi estabelecida em nível de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana da clorexidina 2% nas formas de solução e gel ao longo de 90 dias, quando armazenadas em condições de temperatura diferentes.

*E. faecalis* e a *C. albicans* foram os microrganismos de escolha para o presente estudo por possuir uma considerável resistência a substâncias químicas auxiliares comumente utilizadas em endodontia além de estar freqüentemente associado à presença de lesões periapicais persistentes e insucesso no tratamento endodôntico (Hancock *et al.*, 2001; Love, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003). São microrganismos de cultivo relativamente fácil e de alta relevância clínica. O *Enterococcus faecalis* é uma espécie bacteriana capaz de se estabelecer e sobreviver na ausência de outras bactérias, em casos de dentes com necessidade de retratamento, na presença de lesões periapicais (Pinheiro *et al.*, 2003). *C. albicans* demonstra ser bastante resistente aos agentes antimicrobianos empregados em endodontia, pois tem sido isolada em canais radiculares após a execução do preparo químico-mecânico e o emprego de medicações intracanal (Lana *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2005). Encontram-se disponíveis na literatura vários estudos avaliando a efetividade de substâncias auxiliares frente ao *E. faecalis* e *C. albicans* tornando, assim, possível a comparação dos nossos resultados a outros já relatados.

O teste de difusão em Agar permite uma padronização da densidade do inóculo microbiano, garantindo o crescimento homogêneo dos microrganismos em toda a superfície e interior do Agar (Tobias, 1988). O resultado é obtido através do tamanho das zonas de inibição. Um dos fatores limitantes da técnica é a capacidade de dissociação das substâncias e sua difusão através do Agar. No presente estudo, como foram utilizadas soluções de diferentes concentrações da mesma substância, este fator não relevante.

A clorexidina na forma de gel pode ser empregado como substância química auxiliar durante o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Ferraz *et al.*, 2001), pois apresenta amplo espectro antimicrobiano (Vianna *et al.*, 2004), capacidade de lubrificação (Ferraz *et al.*, 2001) e principalmente capacidade antimicrobiana residual (Tonamaru-Filho *et al.*, 2002).

Diversos relatos na literatura descrevem a influência de condições de armazenamento de soluções de hipoclorito de sódio na liberação de íons cloro e em suas propriedades antimicrobianas (Clarkson *et al.*, 2001; Fraiss *et al.*, 2001). Para as soluções cloradas, o aquecimento imediatamente antes do uso favorece a ação antimicrobiana (Dychdala, 1991).

Em relação à clorexidina, poucos estudos avaliam o efeito antimicrobiano após aquecimento. Evanov *et al.* (2004) demonstraram que a ação da clorexidina líquida 0,12% teve sua ação melhorada em 37°C e 46°C. No entanto, não se observam relatos a respeito da influência do calor ou armazenamento em temperaturas baixas frente à ação antimicrobiana da clorexidina, nas formas líquida e gel, em períodos prolongados de tempo.

As condições de armazenamento em laboratório diferem das condições de armazenamento clínico porque em laboratório as substâncias são armazenadas em condições ideais, sem variação de temperatura, o que não ocorre em situação clínica. Isso nos remeteu ao desenvolvimento de um estudo clínico, no qual amostras coletadas de acadêmicos foram analisadas. Via de regra, essas amostras foram armazenadas em temperatura ambiente que é extremamente variável.

**1. ANÁLISE DAS AÇÃO ANTIMICROBIANA E PH DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA 2% E DO GEL DE CLOREXIDINA 2% ARMAZENADAS A 8°C OU 37°C EM DIFERENTES PERÍDOS DE TEMPO.**

**1.1 Halos de Inibição da CHX 2% frente ao *Enterococcus faecalis* nos períodos de tempo em diferentes condições de armazenamento**

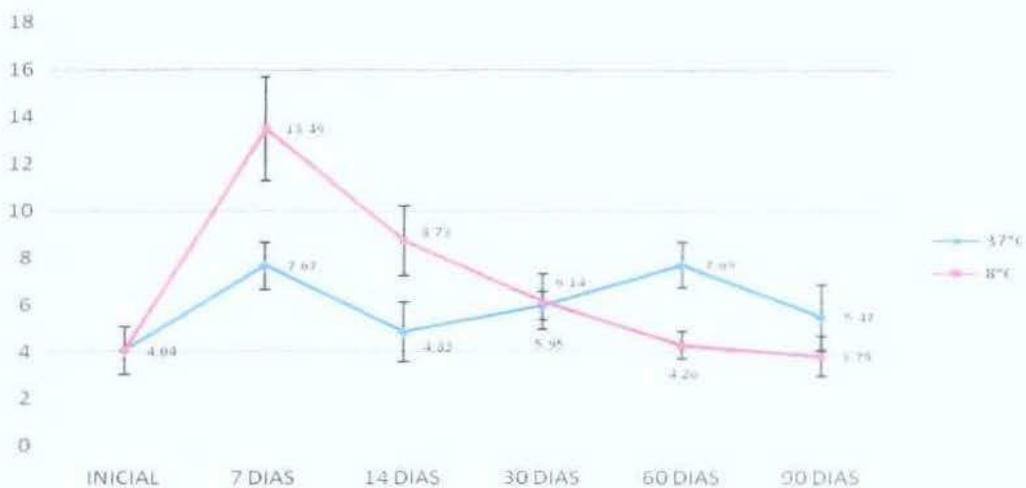
A clorexidina líquida 2% foi capaz de produzir halos de inibição de crescimento em todos os períodos de tempo, nas diferentes condições de armazenamento (**Tabela 3 e Gráfico 1**). Os valores de inibição iniciais produzidos pela substância são similares aos reportados por Vianna *et al.* (2009), sendo inferiores aos demonstrados pela clorexidina gel 2%. Nesta forma de apresentação, a sua ação frente ao *Enterococcus faecalis* é imediata, necessitando de apenas 15 segundos para a inibição do crescimento bacteriano (Vianna *et al.*, 2004). Concentrações mais baixas de clorexidina líquida, tais como 0,2%, necessitam de cerca de 2 horas para eliminar *E. faecalis*, sendo contraindicada para o preparo dos canais radiculares (Vianna *et al.*, 2004).

Os maiores halos de inibição foram observados no período de 7 dias, quando o medicamento foi armazenado tanto em temperatura de 8°C ou 37°C. Observou-se uma redução na ação antimicrobiana da substância com o decorrer do tempo, indicando que o calor é um fator que pode favorecer a degradação principalmente após 60 dias de armazenamento. Estes resultados são demonstrados na **Tabela 3 e no Gráfico 1**.

**Tabela 3.** Halos de inibição da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento\*.

	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO					
	8°C			37°C		
INICIAL	4,04	± 1,01	D -	4,04	± 1,01	C -
7 DIAS	13,49	± 2,21	A b	7,67	± 1,01	A a
14 DIAS	8,73	± 1,49	B b	4,83	± 1,28	BC a
30 DIAS	6,14	± 1,19	C a	5,95	± 0,61	B a
60 DIAS	4,26	± 0,58	D a	7,69	± 0,96	A b
90 DIAS	3,79	± 0,84	D a	5,47	± 1,41	BC b

\* Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha.



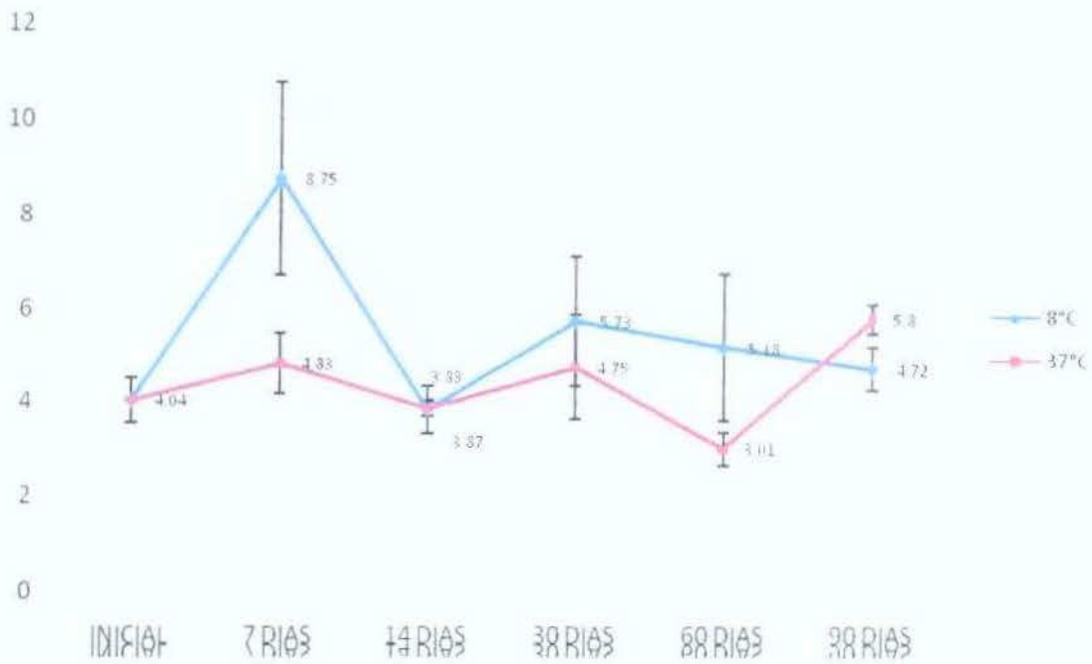
**Gráfico 1.** Variação da atividade antimicrobiana da clorexidina líquida 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento.

No presente estudo, independente das condições de temperatura e do tempo de armazenamento, a clorexidina gel 2% foi efetiva para todas as amostras testadas (**Tabela 4 e Gráfico 2**). O acondicionamento em temperatura de 8°C propiciou maior preservação do efeito antimicrobiano da substância em todos os períodos testados quando comparada a 37°C.

**Tabela 4.** Halos de inibição da CLOREXIDINA GEL 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento frente ao *E. faecalis*\*

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO							
	8°C				37°C		
INICIAL	4,04	± 0,47	BC	-	4,04	± 0,47	BC -
7 DIAS	8,75	± 2,04	A	A	4,83	± 0,65	B b
14 DIAS	3,83	± 0,51	C	A	3,87	± 0,16	C a
30 DIAS	5,73	± 1,38	B	A	4,75	± 1,12	B a
60 DIAS	5,18	± 1,57	BC	A	3,01	± 0,35	D b
90 DIAS	4,72	± 0,46	BC	A	5,80	± 0,46	A b

\* Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha.



**Gráfico 2.** Variação da atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento frente ao *E. faecalis*

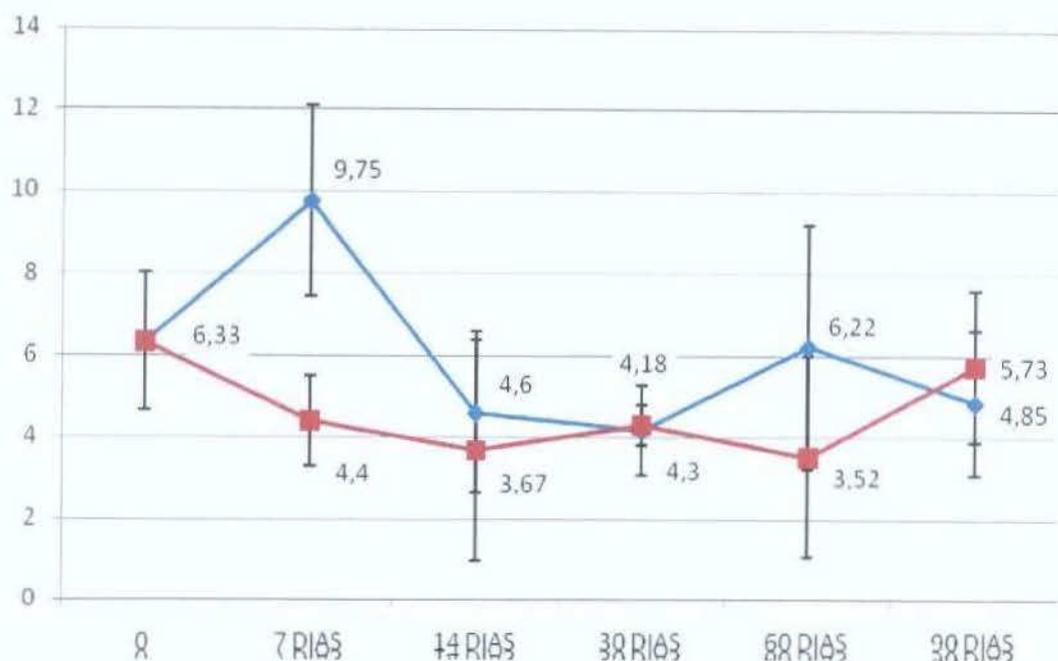
## 1.2 Halos de Inibição da CHX 2% frente a *Candida albicans* nos períodos de tempo em diferentes condições de armazenamento

Tanto a clorexidina líquida quanto a clorexidina gel 2% foram capazes de produzir halos de inibição de crescimento em todos os períodos de tempo, frente ao fungo *Candida albicans*, nas diferentes condições de armazenamento (Tabelas 5 e 6; Gráficos 3 e 4). Nossos resultados iniciais demonstraram halos de inibição superiores aos reportados por Vianna *et al.* (2004) para a clorexidina gel 2% frente ao *Candida albicans*.

**Tabela 5.** Halos de inibição da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao fungo *Candida albicans*\*.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO									
8°C					37°C				
INICIAL	3,51	± 0,96	AB	-	3,51	± 0,96	A	-	
7 DIAS	8,31	± 1,89	A	A	6,13	± 1,63	A	b	
14 DIAS	5,64	± 1,28	AB	A	5,94	± 1,11	A	a	
30 DIAS	4,23	± 0,45	B	A	3,52	± 1,08	A	a	
60 DIAS	1,97	± 1,78	AB	A	6,63	± 2,13	A	a	
90 DIAS	3,71	± 1,51	AB	A	6,28	± 0,70	A	a	

- Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha.

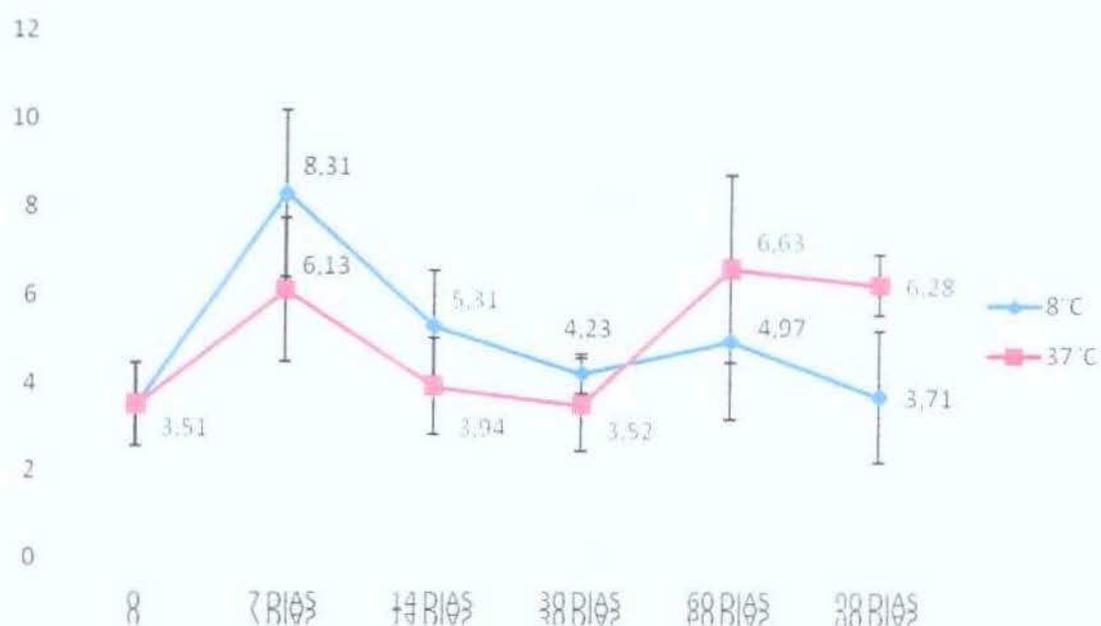


**Gráfico 3.** Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA LÍQUIDA 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento, frente a *Candida albicans*.

**Tabela 6.** Halos de inibição da CLOREXIDINA GEL 2% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, frente ao fungo *Candida albicans*\*.

	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO							
	8°C				37°C			
INICIAL	6,33	± 1,68	AB	-	6,33	± 1,68	C	-
7 DIAS	9,75	± 2,32	A	a	4,40	± 1,10	ABC	a
14 DIAS	4,60	± 1,97	B	a	3,67	± 2,72	ABC	a
30 DIAS	4,18	± 1,11	AB	a	4,30	± 0,48	BC	a
60 DIAS	6,22	± 2,98	AB	a	3,52	± 2,47	A	a
90 DIAS	4,85	± 1,77	AB	a	5,73	± 1,86	ABC	a

\* Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha.



**Gráfico 4.** Variação da atividade antimicrobiana da CLOREXIDINA GEL 2% nas diferentes temperaturas de armazenamento, frente a *Candida albicans*.

De uma forma geral, observou-se uma redução na ação antimicrobiana da substância no decorrer do período de tempo. Para a CHX 2% gel e para a CHX 2% líquida, não houve influência da temperatura nos halos de inibição quando comparados os mesmo período de tempo, exceto para o período de 7 dias, CHX 2% líquida.

### 1.3 Alterações de pH das substâncias dependendo do período de tempo e condição de armazenamento.

A clorexidina gel 2% e líquida 2% apresentaram-se com pH inicial próximo ao neutro, concordando com Souza-Filho *et al.* (2008). No entanto uma tendência à basicidade foi constatada com a progressão do período de armazenamento (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Média do pH de clorexidina líquida 2% e clorexidina gel 2% em diferentes períodos de tempo e condições de armazenamento.

	Clorexidina Líquida 2%			Clorexidina Gel 2%		
	Controle	8°C	37°C	Controle	8°C	37°C
IMEDIATO	7,01			7,36		
7 DIAS		6,66	9,00		6,60	7,97
14 DIAS		9,45	9,48		8,71	9,25
30 DIAS		9,40	9,49		9,00	9,75
60 DIAS		8,20	9,23		8,55	9,54
90 DIAS		8,70	9,00		8,60	10,00

A 8°C, menores alterações no pH foram observadas, tanto para a clorexidina líquida quanto para a gel. Valores de pH 9 e 10 foram obtidos para CHX Líquida e CHX Gel no período final do experimento, quando armazenadas a 37°C. Lopes & Siqueira (2004) relatam que as soluções aquosas são mais estáveis em pH de 5 a 8, e acima disso ocorre precipitação do sal de digluconato de clorexidina.

Parsons *et al.* (1980) e Ringel *et al.* (1982) relatam que a atividade antimicrobiana da clorexidina é excelente na faixa de pH entre 5,5 e 7, o que abrange o pH das superfícies corporais. Em nosso estudo, foi observado que a alteração no pH, com tendência à basicidade, promoveu a diminuição da atividade antimicrobiana das substâncias. Mesmo apresentando atividade antimicrobiana em todos os períodos de tempo, alterações de temperatura e períodos prolongados de armazenamento permitem a degradação/oxidação das

substâncias, tanto gel quanto líquida. O armazenamento em temperaturas baixas parece retardar o processo de oxidação.

#### **1.4. Alterações de coloração da CHX 2% líquida e gel dependendo do período de tempo e condição de armazenamento**

Não foi observada alteração na cor das substâncias testadas, independentemente do período de tempo (90 dias) ou da condição de armazenamento.

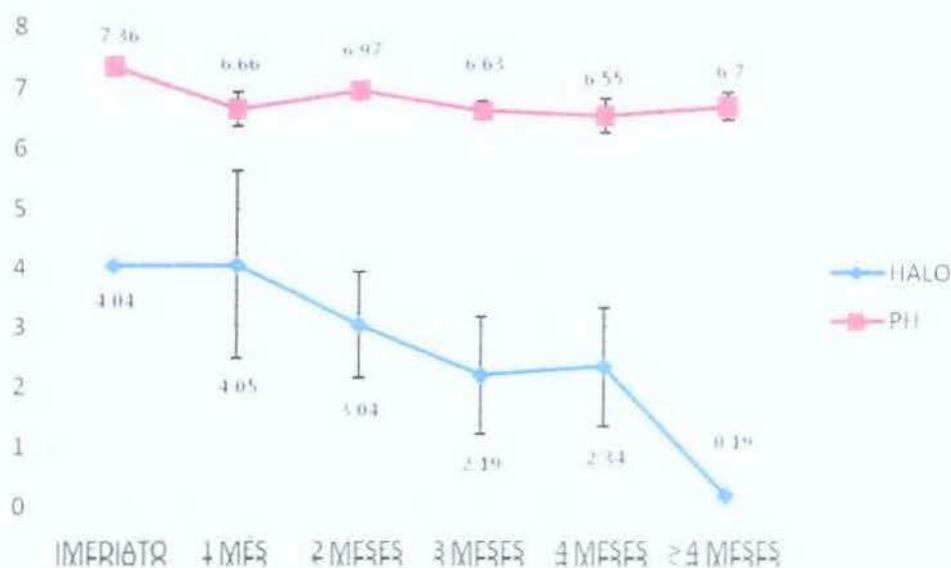
### **2. ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA, PH E ALTERAÇÕES DE COR EM AMOSTRAS DE CLOREXIDINA GEL 2% COLETADAS NAS CLÍNICAS DE GRADUAÇÃO E ESPECIALIZAÇÃO EM ENDODONTIA DA FOP-UNICAMP.**

Foram avaliadas 30 amostras de clorexidina gel 2% coletadas de frascos, fornecidas por Cirurgiões-Dentistas Clínicos Gerais (n=19) e Especialistas em Endodontia (n=11). Todos os profissionais entrevistados relataram que armazenam a substância química auxiliar em temperatura ambiente, embora o fabricante indique seu acondicionamento em temperatura refrigerada.

O prazo médio de validade indicado pelos fabricantes é de 6 meses após a manipulação. Para facilitar a análise dos resultados, as amostras foram divididas em grupos, considerando os meses decorridos de sua fabricação. Após o período de 6 meses, as amostras foram agrupadas em na categoria “fora do período de validade”, independente do período. Das amostras obtidas, 25 encontravam-se dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante, sendo que 7 haviam sido produzidas até 1 mês, 7 amostras até 2 meses, 8 amostras até

3 meses e 3 amostras haviam sido produzidas até 4 meses. Apenas 5 amostras haviam sido produzidas há mais de 6 meses.

Considerando-se os halos de inibição proporcionados pelas substâncias frente ao *E. faecalis*, observa-se um decréscimo numérico nos valores de potencial antimicrobiano, com o passar do tempo. No entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os valores inicial, após 1 mês, 2 meses, 3 meses e 4 meses. Não foram obtidas amostras para os períodos de 5 e 6 meses. Porém, amostras armazenadas por períodos superiores a 7 meses indicam uma redução estatisticamente significativa na ação antimicrobiana da clorexidina gel 2%, quando comparado aos demais períodos (ANOVA e Teste de Tukey,  $p < 0.01$ ). O pH das substâncias não demonstrou alteração estatisticamente significativa quando comparados os períodos de avaliação (ANOVA e Teste de Tukey,  $p = 0.311$ ). Estes resultados estão representados no **Gráfico 5**.



**Gráfico 5.** Variação da ação antimicrobiana e do pH de amostras de clorexidina gel 2% armazenadas em temperatura ambiente.

## 2.1 Grupo das Amostras que foram testadas após 1 mês de sua manipulação.

Todas as 7 amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e estavam dentro do período de validade. Da totalidade das amostras, 5 eram provenientes de CD Clínicos-Gerais e 2 de Especialistas em Endodontia.

**Tabela 8.** Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de Clorexidina gel 2% coletadas após 1 mês de sua fabricação.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO	pH
1	2,26	6,63
2	2,05	6,71
3	4,15	6,65
4	3,63	7,08
5	6,49	6,75
6	5,14	6,12
7	4,66	6,68
Média	4,05	6,66
dp	1,58	0,28
Mediana	4,15	6,68
Máxima	6,49	7,08
Mínima	2,05	6,12

## 2.2 Grupo das Amostras que foram testadas após 2 meses de sua manipulação.

Todas as 7 amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e estavam dentro do período de validade. Da totalidade das amostras, 6 eram provenientes de CD Clínicos-Gerais e 1 de Especialista em Endodontia.

**Tabela 9.** Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de Clorexidina gel 2% coletadas após 2 meses de sua fabricação.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO	pH
1	2,16	6,50
2	2,82	6,43
3	1,90	6,81
4	4,12	8,82
5	2,58	6,92
6	3,61	6,70
7	4,08	6,63
Média	3,04	6,97
dp	0,90	0,83
Mediana	2,82	6,70
Máxima	4,12	8,82
Mínima	1,90	6,43

### 2.3 Grupo das Amostras que foram testadas após 3 meses de sua manipulação.

Todas as 8 amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e estavam dentro do período de validade. Da totalidade das amostras, 6 eram provenientes de CD Clínicos-Gerais e 2 de Especialistas em Endodontia.

**Tabela 10.** Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de Clorexidina gel 2% coletadas após 3 meses de sua fabricação.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO	pH
1	3,85	7,77
2	1,98	6,63
3	1,72	6,73
4	1,14	6,74
5	1,60	6,32
6	4,19	6,62
7	2,39	6,58
8	2,33	6,78
Média	2,19	6,63
dp	0,98	0,15
Mediana	1,98	6,63
Máxima	4,19	6,78
Mínima	1,14	6,32

## 2.4 Grupo das Amostras que foram testadas até 4 meses de sua manipulação.

Todas as 3 amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e estavam dentro do período de validade. Da totalidade das amostras, 1 era proveniente de CD Clínicos-Gerais e 2 de Especialistas em Endodontia.

**Tabela 11.** Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de Clorexidina gel 2% coletadas após 4 meses de sua fabricação.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO	pH
1	3,47	6,57
2	2,03	6,65
3	2,70	6,65
Média	2,34	6,55
dp	0,99	0,16
Mediana	2,36	6,61
Máxima	3,47	6,65
Mínima	1,14	6,32

## 2.5 Grupo das Amostras que foram testadas após mais de 6 meses de sua manipulação.

Este grupo representa as amostras que não estavam dentro do prazo de validade. Foram coletadas 5 amostras, sendo que as 5 foram armazenadas em temperatura ambiente. Uma amostra era proveniente de CD Clínico-Geral e 4 de Especialistas em Endodontia.

Observa-se ausência de halo de inibição microbiana para as 4 amostras com tempo de fabricação de 8 a 9 meses. Um halo discreto foi observado para a amostra coletada 7 meses após sua fabricação. Os valores de pH são próximos da neutralidade, variando entre 6,37 e 7,01.

**Tabela 12.** Valores de média e mediana para os halos de inibição e pH das amostras de Clorexidina gel 2% coletadas após 4 meses de sua fabricação.

AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO	pH	TEMPO DE FABRICAÇÃO (meses)
1	0,97	7,01	7
2	0	6,74	8
3	0	6,37	9
4	0	6,61	9
5	0	6,76	10
Média	0,19	6,70	-
dp	0,43	0,23	-
Mediana	0	6,74	-
Máxima	0,97	7,01	-
Mínima	0	6,37	-

Os resultados obtidos no estudo com amostras coletadas dos acadêmicos de Odontologia e Cirurgiões-Dentistas sugerem que a substância apresentou ação antimicrobiana satisfatória durante os primeiros 4 meses de armazenamento em temperatura ambiente. O pH das substâncias coletadas não apresentou alteração estatisticamente significativa. No entanto, quando as amostras apresentavam-se fora do prazo de utilização indicado pelo fabricante, ou seja, a partir do 6º mês, houve uma diminuição importante na capacidade antimicrobiana da substância quando armazenadas em temperatura ambiente. Dessa forma, torna-se importante verificar e obedecer aos prazos de utilização descritos pelo fabricante na embalagem do produto para que as propriedades da substância sejam atingidas.

No entanto, estudos adicionais serão necessários para determinar e quantificar quais as substâncias que se originam da degradação da clorexidina após seu período de validade, considerando ainda possíveis potenciais citotóxicos.

## 2.6 Alteração de Cor

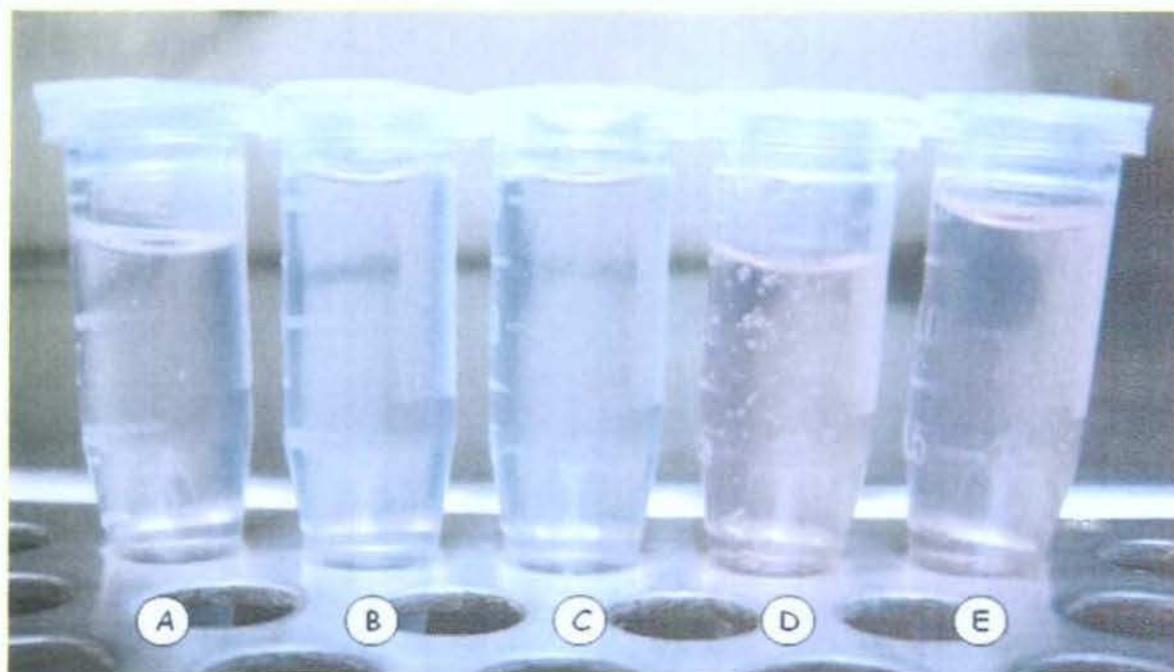
Foram observadas alterações de coloração em todas as amostras coletadas que foram armazenadas por períodos iguais ou superiores a 7 meses. Nos grupos iniciais, de 1 a 4 meses não foram percebidas alterações de cor.

A formação de compostos com coloração acastanhada resultantes da reação do digluconato de clorexidina com hipoclorito de sódio decorre da reação entre cloretos e o grupamento guanina da clorexidina produzindo uma *smear layer* química, capaz de influenciar os níveis de microinfiltração coronária (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002).

Quando se avaliou a ação antimicrobiana das amostras com coloração acastanhada, não foram observados halos de inibição para o *E. faecalis*. Torna-se

necessário obter um número maior de amostras para estabelecer uma correlação estatisticamente significativa entre alteração de cor e perda de ação antimicrobiana. Análises químicas adicionais deverão ser realizadas para determinar quais os possíveis compostos resultantes da degradação da clorexidina. Não foram observados relatos na literatura relacionados a estes fatores.

A **Figura 2** ilustra as alterações de cor observadas em amostras de clorexidina gel 2% coletadas das clínicas de graduação e pós-graduação em Endodontia da FOP-UNICAMP. Observa-se ausência de alteração de cor e transparência para amostras coletadas após 1 mês (A, B) e 3 meses (C), e uma leve coloração rósea em amostras de 7 (D) e 9 meses (E)

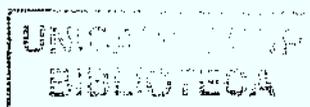


**Figura 2.** Amostras de clorexidina gel 2% coletadas das clínicas de graduação e pós-graduação em Endodontia da FOP-UNICAMP, demonstrando a presença de alteração na coloração. Ausência de alteração de cor para amostras coletadas após 1 mês (A, B) e 3 meses (C) e coloração rósea em amostras de 7 (D) e 9 meses (E).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, e considerando as limitações experimentais do presente estudo, podemos concluir que:

- a) Quando em condições laboratoriais, as substâncias químicas auxiliares clorexidina gel 2% e clorexidina líquida 2% apresentaram efeito antimicrobiano nos períodos experimentais avaliados, independente da forma de armazenamento.
- b) O aumento da temperatura parece interferir de forma variável no potencial antimicrobiano das substâncias, dependendo também do microrganismo empregado durante o teste.
- c) Em relação ao pH, observa-se uma tendência à basicidade e as alterações não foram capazes de eliminar o efeito antimicrobiano das substâncias, tanto em condições de armazenamento laboratoriais simuladas ou mesmo na clínica.
- d) Não foram observadas alterações de cor tanto da CHX 2% gel quanto da CHX 2% líquida quando armazenadas por 90 dias, tanto a 8°C quanto a 37°C.
- e) Em situação clínica, de armazenamento em temperatura ambiente, a clorexidina gel 2% manteve ação antimicrobiana satisfatória frente ao *E. faecalis* até 4 meses de armazenamento. Amostras com mais de 7 meses de fabricação não foram efetivas para a eliminação do *E. faecalis*.
- f) Alterações de coloração foram observadas em todas as amostras do grupo com mais de 7 meses de armazenamento em condições clínicas, sugerindo este como um possível fator que indica a perda de ação antimicrobiana da substância.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baker NA, Eleazer PD, Auerbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J Endod.* 1975; 1(4): 127-135.
2. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery.* 1983; 55(3): 307-12.
3. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6(1):33-6.
4. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich HM. The shelf-life of sodium hypochlorite irrigating solutions. *Aust Dent J.* 2001; 46(4): 269-76.
5. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(6):768-72.
6. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS. *Disinfection, sterilization and preservation.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p.133-5.
7. Estrela, Carlos. *Ciência Endodôntica.* São Paulo: Artes Médicas; 2004.
8. Evanov C, Lewehr F, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37°C and 46°C. *J Endod.* 2004; 30(9): 653-7.
9. Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005; 38(6): 372-380.

10. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007; 18(4): 294-8.
11. Ferraz CCR, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 27(7): 452-55.
12. Ferraz CC. Avaliação *in vitro* do gel de clorexidina usado como irrigante endodôntico. (Tese doutorado) Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1999.
13. Frai S, Ng Y-L, Gulabivala K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 206-15.
14. Gambarini G, De Luca M, Gerosa R. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. *J Endod.* 1998; 24(6):432-4.
15. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34(n): 424-428.
16. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986; 57(n): 370-6.
17. Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacterial isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579-586.
18. Hugo WB, Longworth AR. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1965; 17(n): 28-32.
19. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964; 16(n): 655-62.

20. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000; 26(6): 315-17.
21. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MAR, Farias LM. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microb and Immunol* 2001; 16(2):100-105.
22. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999; 25(3): 167-71.
23. Leonardo, MR. Endodontia – Tratamento de canais radiculares – Princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes médicas ; 2005.
24. Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia – Biologia e técnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
25. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5): 399-405.
26. Messer HH, Chen RS. The duration of the effectiveness of canal root medicaments. *J Endod.* 1984; 6(n): 240-5.
27. Parsons GJ, Patterson SS, Newton CW, Katz S, Kafrawy AH, Miller CH. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg.* 1980; 49(5): 455-9.
28. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
29. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. *In vitro* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod.* 1982; 8(5): 200-4.

30. Rølla G, Løe H, Schiøtt CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodontol.* 1970; 5(2): 90-5.
31. Rølla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res.* 1975; Special Edition: B57-62.
32. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(4): 488-92.
33. Sabala CL, Powell SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. *J Endod.* 1989; 15(10): 490-2.
34. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dental Clin North Am.* 1974; 18(2): 269-96.
35. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 28-33.
36. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35(9): 735-39.
37. Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J.* 1988; 21(2): 155-60.
38. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2004; 97(1): 79-84.
39. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2009; 107(4): 585-9.

40. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002; 35 (9):1-5.
41. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997; 23(4): 229-31.