ANNELYZE PODOLAN KLOSTER

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE “IN VITRO” DO EFEITO
ANTIMICROBIANO DE BANDAGEM BUCAL**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontopediatria
Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

BAURU
2011

K697d Kloster, Annelyze Podolan
Desenvolvimento e análise “in vitro” do efeito
antimicrobiano de bandagem bucal / Annelyze
Podolan Kloster. – Bauru, 2011.
101 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:
Data:

(Folha De Aprovação)

ANNELYZE PODOLAN KLOSTER

Dados Curriculares

Nascimento	17 de fevereiro de 1984
Naturalidade	Cuiabá – MT
Filiação	Ronaldo Kloster Emeri Fatima Podolan Kloster
2002 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Cuiabá/UNIC – Cuiabá – MT
2007 – 2008	Curso de Especialização em Saúde Coletiva pelo Instituto IBPEX/ Facinter – Cuiabá – MT
2007 – 2008	Curso de Especialização em Odontopediatria pela Universidade de Cuiabá/UNIC – Cuiabá – MT
2009 – 2011	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Mestrado, Área de Concentração Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – Bauru – SP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pelo dom que me deste, pelas oportunidades que me apresentaste e pela vitória alcançada, obrigada Senhor!

“Quando a solidão doeu em mim (...)

Quando eu não soube compreender a vida, Tu vieste compreender por mim.

Quando os meus olhos não podiam ver, Tua mão segura me ajudou a andar.

Quando eu não tinha mais amor no peito, Teu amor me ajudou a amar.

Quando os meus sonhos vi desmoronar, me trouxeste outros pra recomeçar.

Quando me esqueci que era alguém na vida, Teu amor veio me lembrar.”

Aos meus pais, Ronaldo e Eméri,

Mais uma vez este sonho realizado é nosso! Obrigada pela confiança... Acredito que vocês nunca imaginaram que eu chegaria tão longe... Sei que não foi tão simples como da última vez, a saudade foi nossa companheira e a nossa rotina foi diferente nestes últimos anos, mas o amor de vocês foi o combustível para que eu realizasse mais este projeto, e mesmo com mais esse título continuo sendo o reflexo de vocês e dos valores que me ensinaram. Amo muito vocês.

Ao meu irmão Filype,

Dines, você continua sendo o meu maior orgulho! Obrigada por ter cuidado do pessoal de casa enquanto eu não pude estar lá... Obrigada pela paciência e pela compreensão. Espero que esta minha vitória lhe sirva de inspiração: agora é a sua vez!!

Ao meu amor Paulo Artur,

“E mesmo que eu viva pra sempre e todos os meus sonhos sejam realizados, as minhas lembranças de amor sempre serão suas.” (Perhaps love)

Obrigada pelo seu amor, pelo incentivo, por ser mais “razão”, por ter me esperado e por ter vencido comigo mais esse desafio... Acredito que dessa vez descobrimos o valor que temos na vida um do outro e hoje vivemos de amor sincero e admiração mútua, pois muito do que sou hoje, devo a você. TE AMO!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora **Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, que se tornou uma referência ímpar para mim, todo o meu agradecimento e minha admiração; sua disposição contagiante e seu espírito inovador me fizeram aceitar a ideia de colocar em prática esta pesquisa que hoje apresentamos com um resultado muito feliz e que foi comemorado com muito entusiasmo; aprendi com você que nunca devemos desistir de uma ideia, por mais inusitada que ela seja. Agradeço a oportunidade de ter feito parte do seu time de alunos orientados e de ter aprendido muito com você. Foi uma honra ter convivido com você professora! Muito Obrigada!

À Professora **Dra. Silgia Aparecida da Costa**, que deu “vida” às nossas bandagens e prontamente nos ajudou a realizar este projeto. Sua disponibilidade, atenção e a maneira carinhosa com que sempre nos atendeu são raras de serem encontradas. Obrigada pela sua preciosa colaboração.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru, sou imensamente grata por ter sido aluna de vocês e vou levar cada ensinamento como lições para toda a vida! **Prof. Dr. Ruy Abdo**, prático e dinâmico; **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, pelas conversas sinceras e pelos conselhos que recebi durante as clínicas da graduação, receba todo o meu carinho e a minha admiração; **Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio Silva** agradeço pela atenção, dedicação e conhecimentos transmitidos e por ter despertado em mim um apreço pelos gatinhos! **Profa. Dra. Daniela Rios**, que nos recebeu tão bem, ouviu nossas dúvidas e sempre nos deu muito afeto, continue recebendo bem os próximos que passarem por aqui e nunca perca o olhar doce de quem um dia já foi aluna como nós! À você, que me permite chamá-la de **Dani**, todo o meu carinho e amizade! À **Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira** obrigada por ter me ensinado bem mais do que eu vim aprender aqui! Te levo no coração e nunca vou me esquecer dos seus conselhos e da sua maneira de levar a vida, conte sempre comigo!

Aos funcionários do Departamento, **D. Lia, Lilian, Estela, Fátima e Alexandre**, companhias diárias, que foram muito importantes para que nossas atividades dessem certo. Sempre preocupadas para que nos sentíssemos bem, fizeram o nosso dia a dia ser muito mais agradável na companhia de vocês. Obrigada por tudo!

Ao **André** técnico do laboratório de Microbiologia, que contribuiu imensamente para que a fase laboratorial dessa pesquisa desse certo e que vibrou junto comigo quando vimos os microrganismos crescendo no meio de cultura, muito muito obrigada! Sua gentileza e paciência comigo valeram ouro!

Aos meus **pacientes** que me permitem ser “Tia Anne” e me motivam a aprimorar meus conhecimentos para ganhar sorrisos como a maior recompensa do meu trabalho.

Aos colegas da Pós Graduação em Odontopediatria, **Ana Paula, Flávia, Janaína, Maisa, Vanessa, Adriana, Ana Lídia, Akio, Carla, Juliana, Natalino, Susi, Sileide, Tatiana e Priscila**: agradeço a vocês os momentos de convivência, a oportunidade de partilhar conhecimentos e de aprender com vocês. Espero que a distância não nos deixe perder o contato e que eu receba sempre boas notícias de vocês! Sucesso amigos!

Luciana, bahiana linda e chique! Muito sucesso pra você em todos os seus projetos. Obrigada pela companhia e pelas conversas animadas!

Aos amigos da Patologia e da Dentística, que navegaram comigo neste mesmo barco e que foram ótimas companhias do meu dia a dia de mestrado!

Tamara e Bianca lindas! Obrigada pela companhia divertida de vocês. Sucesso! Contem sempre comigo.

Aos meus amigos que resistiram à minha ausência, que torceram por mim e que eu pude contar em todos os momentos mesmo de longe, amo vocês! Em especial a **Juliana e a sua família**, que me hospedaram com muito carinho em cada maratona de idas e vindas, o meu carinho e a minha amizade sempre!

Ao Prof. **Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato**, meu professor e amigo de todos os momentos, obrigada por me apresentar à FOB e toda a sua dimensão, e pelo incentivo para que eu realizasse mais este sonho! Seus conselhos valem ouro pra mim e esse foi mais um precioso que eu recebi!

Ao Prof. **Dr. Heitor Marques Honório**, que colaborou na realização dos testes estatísticos desta pesquisa, o meu agradecimento.

Ao **Cnpq**, pela concessão da bolsa de estudos deste mestrado.

Às minhas amigas Flávia, Janaína e Maisa...

“Quem me dará um ombro amigo quando eu precisar?

E se eu cair, se eu vacilar quem vai me levantar?”

“Sou eu, quem vai ouvir você quando o mundo não puder te entender

Foi Deus, quem te escolheu pra ser o melhor amigo que eu pudesse ter”

Amigos, pra sempre Bons Amigos que nasceram pela fé (de que tudo daria certo)

Amigos, pra sempre Para sempre amigos sim, se Deus quiser!

“Quem é que vai me acolher na minha indecisão?

Se eu me perder pelo caminho quem me dará a mão?”

“Foi Deus, quem consagrou você e eu para sermos bons amigos, num só coração

Por isso eu estarei aqui quando tudo parecer sem solução...”

Peço a Deus que te guarde e te dê a sua Paz.

Eu jamais poderia imaginar que o meu mestrado em Bauru me daria de presente 3 amigas como vocês... Eu apenas tinha pedido a Deus que me desse força pra dar conta desse projeto e Ele me mandou vocês. Não foi por acaso, não foi forçado, não foi arranjado; foi sincero, foi amizade verdadeira, dessas que a gente leva pela vida toda! Acreditem, vocês fizeram a diferença na minha vida nesses dois anos e eu sei que também marquei a vida de vocês. Aqui fomos um grupo, tudo nosso foi dividido: os pacientes, os seminários, os problemas, as angústias, as decepções, as coisas boas, as conquistas, as risadas, as caronas, tudo, absolutamente tudo... Fomos o apoio, a “família”, o socorro, a conselheira uma da outra, a companhia do fim de semana chuvoso, o desabafo quando a professora “enlouquecia” ou quando o namorado pisava na bola. Cada uma sabe o quanto esses momentos foram importantes e levaremos para sempre essa amizade que nos fez ser pessoas melhores, que nos fez felizes durante esse momento único para cada uma de nós! Obrigada pelos momentos felizes e pela amizade sincera que vivemos! Amo muito vocês!

Anne

*“Nunca houve noite que pudesse impedir o nascer do sol e a
esperança”*

Autor desconhecido

*“É apenas com o coração que se pode ver direito, o essencial é
invisível aos olhos”*

Antoine Saint-Exupéry

RESUMO

A busca por um dispositivo terapêutico que possa ser aplicado em feridas e lesões da mucosa oral é um desafio para a Odontologia. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bandagem bucal com capacidade de liberação de fármacos e avaliar *in vitro* sua eficiência antimicrobiana sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. A bandagem foi feita a partir de quitosana, que é um biopolímero com características específicas. Este biopolímero é biocompatível, biodisponível, biodegradável, tem ação antimicrobiana, pode ser indicado para uso em vários segmentos da área da saúde e possui baixo custo. A bandagem possibilitou a incorporação de um fármaco antimicrobiano e neste caso foi incorporada a clorexidina, eficaz no tratamento de lesões ulceradas, traumatismos e feridas cirúrgicas, amplamente utilizado em odontologia. Sendo assim, foram desenvolvidas cinco tipos de bandagens: bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 0,2%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 0,6%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 1,0%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 2,0% e quitosana a 5%, sem adição de clorexidina. Obtidas as amostras, foi testada a ação antimicrobiana das bandagens frente aos microrganismos *C.albicans* e *S.mutans* através de antibiograma. Para efeito comparativo, foram testados géis nas seguintes formulações: gel de quitosana; gel de quitosana e clorexidina 0,2% e 2,0% e gel de clorexidina 0,2% e 2,0% sobre os mesmos tipos de microrganismos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, onde se observou que as bandagens que continham quitosana pura não inibiram o crescimento de microrganismos e, as bandagens com clorexidina a 2,0% formaram os maiores halos de inibição para *C.albicans* e *S.mutans* (16,6mm e 25,0mm respectivamente). Dentre os géis testados, o gel de clorexidina 2,0% teve melhor resultado para ambos os microrganismos e o gel de quitosana pura, assim como a bandagem de igual composição também não foram eficientes. Conclui-se que a bandagem possui eficácia na inibição do crescimento dos microrganismos *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Sugerimos que mais estudos ainda são necessários para o aprimoramento deste dispositivo inovador.

Palavras chave: curativos hidrocolóides, quitosana, clorexidina, teste de sensibilidade microbiana, cicatrização.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF ORAL BANDAGE

The search for a therapeutic device that can be applied to wounds and oral lesions is a challenge for dentistry. The purpose of this study was to develop a bandage capable of release drugs and evaluate *in vitro* yours antimicrobial efficiency on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. The bandage was made of chitosan, which's a biopolymer with specific characteristics. This biopolymer are biocompatible, biodegradable, bio-obtainable, antimicrobiotic, can be indicated for use in several segments of healthcare and have low cost. The bandage allowed the incorporation of antimicrobial drugs and in this case was incorporated chlorhexidine, effective on treatment of ulcerated lesions, trauma and surgical wounds, widely used in dentistry. Thus, were developed five types of bandages with the following concentrations of chlorhexidine: chitosan bandage 5% + chlorhexidine 0,2%; chitosan bandage 5% + chlorhexidine 0,6%; chitosan bandage 5% + chlorhexidine 1,0%; chitosan bandage 5% + chlorhexidine 2,0% and chitosan 5%, without addition of chlorhexidine. With obtained samples, the antimicrobial action of the bandages were tested against *C.albicans* and *S.mutans* microorganisms through sensitivity. For comparison, we tested gels with these formulations: chitosan gel, chitosan gel and chlorhexidine 0.2% and 2.0% and chlorhexidine 0.2% and 2.0% over the same kind of microorganisms. The obtained results were analyzed statistically, where were observed that the pure chitosan bandages didn't inhibit the growth of microorganisms, and the bandage with 2.0% chlorhexidine formed the largest halo of inhibition for *C.albicans* and *S.mutans* (16.6 mm and 25.0 mm respectively). Among the tested gels, 2.0% chlorhexidine gel showed better results for both microorganisms and the pure chitosan gel, as well as the bandage with the same composition was also not effective. We conclude that the oral bandage has efficacy in inhibiting the growth of microorganisms *C.albicans* and *S.mutans*. More studies are still needed for improving this innovative device.

Key words: Bandage, chitosan, chlorhexidine, products with antmicrobial action, wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 2.3.1 - Estrutura química da quitina	47
Figura 2.3.2 - Reação da conversão da quitina em quitosana	48
Figura 2.3.3 - Estrutura química da quitosana.....	49
Figura 4.1.1 - Quitosana pura em flocos.....	60
Figura 4.1.2 - Bandagem de quitosana contendo fármaco embalada e esterilizada .	60
Figura 4.1.3 - Gel de Quitosana 5%, Gel de clorexidina a 0,2%, Gel de clorexidina a 2,0%, Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 0,2% e Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 2,0%.....	61
Figura 4.4.1 – Placa de petri contendo meio de cultura Ágar Sabourad.....	63
Figura 4.4.2 – Microrganismo inoculado em meio de cultura pronto para ser plaqueado.....	63
Figura 4.4.3 – Plaqueamento de <i>C.albicans</i> sobre meio de cultura.....	64
Figura 4.4.4 – Bandagens dispostas sobre meio de cultura Agar Sabourad.....	64
Figura 4.4.5 – Discos contendo gel em diferentes composições dispostos sobre meio de cultura Agar Sabourad.....	65
Figura 4.4.6 – Cultivo de <i>C.albicans</i> após 48 horas de incubação, evidenciando a formação de halos de inibição de crescimento	65
Figura 4.5.1 – Placas de cultura contendo meio de cultura SB20.....	66

Figura 4.5.2 – <i>Streptococcus mutans</i> visto por microscopia.....	67
Figura 4.5.3 – Plaqueamento de <i>S.mutans</i> sobre meio de cultura.....	68
Figura 4.5.4 – Bandagem sobre meio de cultura.....	68
Figura 4.5.5 – Bandagem sobre meio de cultura.....	69
Figura 4.5.6 – Discos contendo gel sobre meio de cultura SB20.....	69
Figura 4.5.7 – Placas de petri em microaerofilia em estufa bacteriológica a 37°C	70
Figura 4.5.8 – Halo de inibição formado ao redor das amostras de bandagem sobre cultura de <i>S.mutans</i>	71
Figura 4.5.9 – Medição dos halos de inibição.....	71
 - GRÁFICOS	
Gráfico 5.1 - Valores de média (em milímetros) do halo de inibição formado por bandagens e géis sobre cultura de <i>C.albicans</i> , em ordem decrescente de tamanho.....	77
Gráfico 5.2 - Valores de média (em milímetros) do halo de inibição formado por bandagens e géis sobre cultura de <i>S.mutans</i> , em ordem decrescente de tamanho.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de bandagem sobre <i>C.albicans</i> ($p<0,05$) $n=03$	75
Tabela 5.2 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de gel sobre <i>C.albicans</i> .($p<0,05$) $n=03$	76
Tabela 5.3 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de bandagem sobre <i>S.mutans</i> ($p<0,05$) $n=03$	77
Tabela 5.4 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de gel sobre <i>S.mutans</i> .($p<0,05$) $n=03$	78

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>S.mutans</i>	Streptococcus mutans
<i>C.albicans</i>	Candida albicans
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
FDA	Food and Drug Administration
ADA	American Dental Association
DNA	Acido desoxirribonucléico
RNA	Acido ribonucléico
min	minutos
h	hora
Ltda	limitada
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
USP	Universidade de São Paulo
BHI	Brain Heart Infusion
ufc	unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentual
°C	grau Celcius
C	Carbono
H	Hidrogênio
Cl	Cloro
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
g	grama
cm ³	centímetro cúbico
Ca	Cálcio
β	beta
p	valor da probabilidade
<	menor
ml	mililitro
™	trademark
mm	milímetro
nm	nanômetro
m	metro
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1	MICROBIOTA ORAL	41
2.1.1	STREPTOCOCCUS MUTANS (<i>S.mutans</i>)	41
2.1.2	CANDIDA ALBICANS (<i>C.albicans</i>)	43
2.2	CLOREXIDINA	45
2.3	QUITINA E QUITOSANA	47
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	MATERIAIS	59
4.2	DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS	61
4.2.1	PREPARO DO GEL DE QUITOSANA	61
4.2.2	PREPARO DO GEL DE QUITOSANA COM CLOREXIDINA	61
4.3	DESENVOLVIMENTO DAS BANDAGENS	62
4.4	MÉTODO AGAR DIFUSÃO E TESTE ANTIMICROBIANO <i>C.albicans</i>	62
4.5	MÉTODO AGAR DIFUSÃO E TESTE ANTIMICROBIANO <i>S.mutans</i>	66
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
5	RESULTADOS	73
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	93

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A busca por alternativas terapêuticas que possam ser aplicadas em feridas cirúrgicas, feridas oriundas de traumatismos físicos e/ou químicos e outras lesões ulceradas nos tecidos moles da boca é realizada há algumas décadas por pesquisadores (ANDERS, 1989; NEEDLMAN, 1997; SENEL, 2000). Esta questão se faz particularmente significativa quando relacionada ao tratamento destas feridas e/ou lesões em crianças nas diversas faixas etárias. A obtenção de um veículo alternativo que não seja líquido, pó, gel ou creme para aplicar nestas feridas, que permita o contato do fármaco por um tempo mais prolongado com o tecido afetado, será de grande contribuição para favorecer o processo de reparo, pois a película de saliva que por vezes atua como um elemento protetor da mucosa, lubrificando-a constantemente, em outras impede a penetração de medicamentos nos tecidos, solubilizando-os mais rapidamente, antes da sua completa ação. Nesta ótica, o controle da infecção bucal é sempre um desafio, pois a boca é um meio onde existem muitos microrganismos. Além disso, quatro fatores podem comprometer a cicatrização: a presença de corpos estranhos no tecido mole, necrose, isquemia e tensão na ferida cirúrgica mesmo em indivíduos saudáveis. Com relação aos corpos estranhos, algumas consequências podem acontecer durante o processo cicatricial caso eles estejam presentes. O mais comum, é a proliferação de bactérias e fungos contaminando o tecido e favorecendo sua proliferação (PETERSON, 2005).

Sendo assim, são justificados esforços em pesquisas para desenvolver algum tipo de produto e/ou material com ação antimicrobiana que possa ser utilizado em tecidos úmidos, como é o caso da mucosa oral. Este produto e/ou material idealmente deverá ter a capacidade de adesão nestas áreas e ser reabsorvido no meio bucal após o tempo necessário para que a ação do fármaco possa ser efetiva. Outro elemento que deverá ser cuidadosamente avaliado é o tipo de fármaco a ser utilizado e a sua compatibilidade com o produto que será utilizado como veículo para a incorporação dos mesmos.

Dentre a grande variedade dos polímeros naturais que podem ser utilizados para aplicações na área da saúde, especial interesse tem sido dado à quitina e à quitosana (SENEL, 2000; HOVEN *et al.*, 2007; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2007; PILLAI, 2009). A quitina é um polímero natural, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose

(BERGER, *et al.*, 2004; PANCHENCE, *et al.*, 2000, KUBOTA *et al.*, 2000). Pode ser encontrada em abundância no exoesqueleto da maioria dos crustáceos como: caranguejos, camarões, lagostas e cutículas de alguns insetos (HOVEN *et al.*, 2007; HIRANO, 1999). Modificando quimicamente a quitina se obtém a quitosana, que é um derivado solúvel em soluções de ácido acético diluída. A quitosana é um biopolímero, relevante no que tange a biodisponibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, de baixo custo e de grande importância econômica e ambiental, já que as carapaças dos crustáceos são resíduos abundantes que são rejeitados pela indústria pesqueira, o que reduz assim o impacto ambiental. É utilizada na área farmacêutica, nutricional, agricultura e terapia genética, entre outras áreas (AZEVEDO *et al.*, 2007; PILLAI, 2009). A quitosana possui propriedades únicas, o que a torna interessante para inúmeras aplicações na área de saúde (KURITA *et al.*, 2000; TOLAIMATE *et al.*, 2000). Este polímero apresenta grande versatilidade para formar filmes, géis, fibras, matrizes poliméricas para liberação controlada de fármacos, estruturas porosas para engenharia de tecidos o que a torna bastante atrativa para área da saúde (WESKA *et al.*, 2007, JAYAKUMAR *et al.*, 2007; REGE *et al.*, 2003; MADIHALLY *et al.*, 1999).

Dentre os fármacos de ação antimicrobiana utilizados em Odontologia a clorexidina é um dos mais potentes sendo que vários estudos confirmaram que é altamente eficaz no controle dos microrganismos bucais (FARDAK e TURNBULL, 1985; FERJERSKOV e THYLSTRUP, 1996; ADDY, 2005; VON BLUCHER, 2007; ZANATTA, 2007; SEMENOFF *et al.*, 2010). Pode ser apresentada na forma de diversos sais, como: o gluconato, o digluconato, o acetato e o hidrócloridrato, sendo que o digluconato é a forma mais indicada por ter maior solubilidade em água e em pH fisiológico dissociar-se liberando o componente catiônico (ADDY, 2005). Em baixas concentrações (menor que 0,12%) a clorexidina é bacteriostática e em altas concentrações (acima de 0,5%) bactericida (SASSONE *et al.*, 2008).

Contudo, como a maioria dos antimicrobianos e antifúngicos a clorexidina não possui capacidade intrínseca de se ligar à mucosa oral. O uso dessas substâncias pode ser feito com formulações melhoradas por meio de agentes carreadores. A quitosana é um polímero biocompatível que tem sido proposto como um polímero bioadesivo capaz de fixar o medicamento na mucosa bucal (KNAPCZYK, 1994; MIYAZAKI *et al.*, 1994). Estudos mostraram que hidrogéis de

quitosana prolongam tanto o tempo de retenção quanto o de liberação da droga na mucosa bucal (NEEDLEMAN et al., 1997).

Considerando o exposto, se faz pertinente o desenvolvimento e a avaliação de um material e/ou produto incorporado de um antimicrobiano que possa ser aplicado na mucosa bucal.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Microbiota Oral

A cavidade oral é uma extensão da parte externa do corpo humano e possui uma microbiota própria compreendendo um grupo diversificado de microrganismos que incluem bactérias, fungos, micoplasmas, protozoários e possivelmente uma microbiota viral que pode existir de tempos em tempos, em situações de desequilíbrio no organismo. A mucosa jugal, o dorso da língua e as superfícies dentárias são altamente colonizadas por estes microrganismos. A aquisição da microbiota oral residente ocorre no nascimento e é um processo natural de colonização, sendo que espécies distintas de bactérias podem ser isoladas na boca de bebês após poucas horas do seu nascimento (FEJERSKOV, 1996).

A microbiota oral está diretamente relacionada com a formação de biofilme dentário e com as doenças decorrentes dele. Prevenir e controlar as afecções que ocorrem na boca do ser humano consiste em reduzir estes microrganismos de maneira eficiente (SILVA, 2010; OLIVEIRA, 2004).

São vários os microrganismos bucais, mas neste capítulo serão feitas referências a apenas dois de maior interesse na Odontologia e que foram alvos do presente trabalho que são eles: *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

2.1.1 - *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

Os estreptococos constituem um dos mais populosos grupos de bactérias da boca. Formados por um conjunto heterogêneo de cocos que se dividem num só plano, os estreptococos agrupam-se em cadeias de tamanhos variáveis e, embora estes microrganismos façam parte da microbiota oral normal, muitos deles são considerados importantes agentes infecciosos para o homem quando há um desequilíbrio e sua contagem aumenta. São agentes etiológicos associados à bacteremias, endocardites, abscessos, infecções do trato geniturinário e infecções de feridas em geral.

O biofilme dentário aderido à superfície do dente é o habitat principal de mais de 500 diferentes espécies bacterianas e entre elas estão os estreptococos. Os do grupo *mutans* (*S. mutans*), estudados em específico neste trabalho, são cocos gram-positivos, alfa hemolíticos e anaeróbios facultativos (NISERGARD E NEWMAN, 1997; OLIVEIRA, 2004; RODRIGUES, 2008; BANU, 2010; PARTHO

2010). São considerados como os principais microrganismos causadores da cárie dentária devido à sua capacidade de metabolizar os carboidratos presentes na dieta e transformá-los em ácidos, sendo o principal o ácido láctico. Sua presença aumentada no meio bucal resulta na diminuição do pH e provoca a desmineralização do esmalte e dentina quando esta está exposta. Além da produção de ácido a partir de açúcares, a capacidade de aderir à superfície dentária onde crescem em forma de biofilmes, a tolerância de pH baixo, e produção de bacteriocinas são importantes fatores de virulência de *S. mutans* (NISERGARD E NEWMAN, 1997; OLIVEIRA, 2004; RODRIGUES, 2008; BANU, 2010; PARTHO 2010). É um dos microrganismos responsáveis pela formação do biofilme maduro que de fato é imprescindível para a ocorrência da cárie; também é o principal agente causador da endocardite bacteriana (PARTHO, 2010). O acúmulo do biofilme pode ser considerado um promotor da alteração da composição microbiológica local, e consequentemente, conduz ao estabelecimento de outras doenças bucais. (BAEHNI E TAKEUCHI, 2003).

A produção de polissacarídeos extracelulares caracterizados por sua viscosidade favorece a aderência do *S. mutans* à superfície dentária, contribuindo para a formação do biofilme dentário cariogênico.

Linhagens de *S. mutans* são classificadas dentro de três sorotipos (*c*, *e* e *f*) e a especificidade sorológica é definida pelo polissacarídeo ramnose-glicose (RGP) presente em sua parede celular. A maioria dos indivíduos é colonizada com somente um sorotipo de *S. mutans* e suspeita-se que o sorotipo *c* deva ser o progenitor dos outros sorotipos. As linhagens com sorotipo *e* e *f* devem ter sido originadas a partir de uma mutação pontual no loco determinante do sorotipo *c* ou uma deleção de uma porção deste loco. O papel das mutacinas (produtos gerados pelo *S. mutans*) *in vivo* ainda não está claro, entretanto a atividade antimicrobiana destas substâncias deve conferir uma vantagem ecológica para a produção de linhagens na comunidade bacteriana assim como no biofilme dentário, e pode também ser importante para o estabelecimento do microrganismo *in vivo* (RODRIGUES et al, 2008). As mutacinas podem apresentar um importante papel biológico na regulação e composição do biofilme dental, tanto na atividade de sinergismo como de antagonismo, sugerindo que o largo espectro de mutacinas pode ser mais importante na colonização e estabilização das espécies cariogênicas, mantendo e estabelecendo nichos e atividade microbiana altamente complexa. Talvez esse componente explique por que

uma vez que *S.mutans* estejam estabelecidos, são dificilmente eliminados da microbiota oral (RODRIGUES et al, 2008; PARTHO, 2010).

Assim, estudar agentes que possam atuar no controle da população do *S.mutans* é de grande importância para o controle das doenças bucais e manter o equilíbrio da microbiota oral, favorecendo processos de reparo de lesões e feridas.

2.1.2 - *Candida albicans* (*C. albicans*)

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos integrantes da microbiota oral do homem desde o nascimento (VIEIRA et al, 2005). Esta condição microbiológica propicia comumente uma relação de equilíbrio entre parasita-hospedeiro, diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo leveduriforme, permanência equilibrada da capacidade de aderência e da produção de enzimas e toxinas (NISERGARD E NEWMAN, 1997; VIEIRA, 2005; BOTERO, 2008; RORIG, 2009). Alterações físicas, químicas, iatrogênicas e mecânicas, que ocorrem na cavidade oral, bem como a mastigação, podem entre diversos fatores descritos, favorecer a ruptura do equilíbrio estabelecido entre o fungo e o hospedeiro fazendo com que as infecções por *Candida* sejam de origem geralmente endógena (GIANNINI E SHETTY, 2011; BOTERO, 2008; MENEZES, 2008; VIEIRA et al, 2005).

A *C. albicans* é considerada o principal agente etiológico da candidíase, uma infecção oportunista, relacionada com locais e fatores predisponentes sistêmicos (GIANNINI E SHETTY, 2011; PINTO et al, 2006; NISERGARD E NEWMAN, 1997). Em consequência, há interesse nos fatores de virulência destas leveduras para estabelecer estratégias de prevenção e de controle com antifúngicos. A habilidade de produzir enzimas hidrolíticas é considerada um importante fator de virulência. As principais enzimas produzidas por leveduras do gênero *Candida* são as proteinases e as fosfolipases. Outra característica associada com a patogenicidade em humanos é a propriedade de multiplicação a altas temperaturas, como 39°C e 42°C (RORIG, 2009). Devido à neutropenia decorrente do tratamento de pacientes submetidos à quimioterapia, infecções por *C. albicans* são mais

frequentes e tendem a potencializar os sinais e sintomas, causando desconforto e dificultando a recuperação do paciente (PINTO et al., 2006; HESPANHOL, 2010).

O tratamento da candidíase oral em geral é instituído empiricamente, apesar desta infecção apresentar-se com sintomas e aparência macroscópica bastante variáveis (GIANNINI E SHETTY, 2011; WINGETER et al., 2007). Esse polimorfismo exigiria do clínico a necessidade de adequação da terapêutica e isto contribui para o aparecimento de espécies de leveduras resistentes. Este fato, aliado a pouca disponibilidade de novos produtos desenvolvidos pela indústria farmacêutica tem motivado vários estudos sobre a susceptibilidade *in vitro* dos fungos agentes de infecções humanas bem como alternativas para seu tratamento (WINGETER et al., 2007).

Infecções fúngicas de origem hospitalar passaram a ter grande importância nos últimos anos, pelo aumento progressivo e pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. O ambiente hospitalar contribui para a disseminação dessas infecções que são de origem endógena e outras podem também ser adquiridas por via exógena, pelas mãos dos funcionários do hospital, infusos contaminados, biomateriais e fontes inanimadas ambientais (MARTINS-DINIZ et al., 2005). Segundo estudo de Martins-Diniz e colaboradores (2005) que isolou e quantificou fungos em ambiente hospitalar e de funcionários para medir níveis de contaminação verificaram que *C. albicans* foi a espécie que prevaleceu nas amostras da equipe de profissionais e concluiu que a presença de leveduras nas mãos desses profissionais tem preocupado as equipes de controle de infecção hospitalar, pois podem ser fonte potencial de contaminação e disseminação de microrganismos. *Candida albicans* é a principal espécie capaz de provocar infecção hospitalar também em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Acredita-se que a maioria dos episódios de candidemia sejam adquiridos de origem endógena, pela translocação do patógeno através da mucosa do trato gastrointestinal, local onde a colonização por este fungo ocorre em até 70% da população normal. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* do lúmen intestinal para os capilares mesentéricos (BORGES et al, 2009). Segundo Oliveira et al.(2007), infecções respiratórias adquiridas em ambiente hospitalar podem estar

associadas ao biofilme bucal, já que estes pacientes possuem higiene deficiente da boca durante o período de internação. Este biofilme também pode ajudar a abrigar colônias de patógenos pulmonares, facilitando assim o desenvolvimento de pneumonias. Os autores propõem uma revisão dos procedimentos específicos para o controle destes patógenos na cavidade oral e que devem ser considerados na prevenção de pneumonia nasocomial, especialmente em pacientes de UTI.

2.2 - Clorexidina

A clorexidina é um composto químico sintetizado em laboratório desde 1954. É definida como uma biguanidina catiônica que apresenta uma molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1' hexametilenobis [5-(p-clorofenil)biguanida]). Entre os antissépticos de uso bucal, é um dos agentes antimicrobianos mais potentes e estudados sendo considerada altamente eficaz e em geral referenciada como padrão para estudos de comparação da eficácia de outros agentes antimicrobianos aplicados em Odontologia. Pode ser apresentada na forma de diversos sais, como o gluconato, digluconato, acetato e hidrocloreto, sendo que a digluconato é a forma mais indicada por ter maior solubilidade em água e dissociar-se em pH fisiológico liberando o componente catiônico. Sua fórmula molecular é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$, com peso molecular de 897,77, densidade = 1,06 g / cm³ e ponto de ebulição = 134°C (LASCALA, 2002).

Em baixas concentrações (menor que 0,1%) moléculas de baixo peso molecular escoam, especialmente potássio e fósforo dando a clorexidina a característica de ser bacteriostática e em altas concentrações (acima de 0,1%) a clorexidina atua de forma bactericida devido a precipitação ou coagulação do citoplasma das bactérias causada pela ligação cruzada com as proteínas (SASSONE et al., 2008; MENEZES, 2008). Devido a sua carga positiva, é adsorvida sobre a hidroxiapatita do esmalte dentário, proteínas salivares, biofilme dentário e macromoléculas ácidas das superfícies bucais. Através destes locais de retenção o fármaco é gradualmente liberado por difusão e a concentração na boca é mantida em um nível suficiente para criar um meio bacteriostático até 24 horas após a sua utilização.(ZANATTA, 2007; VON BLUCHER, 2007; BONESVOLL et al, 1974). A molécula catiônica (positiva) da clorexidina interage com a bactéria, provavelmente

em decorrência da adsorção à parede celular aniônica (negativa), alterando as estruturas da superfície e aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana facilitando a entrada da clorexidina no citoplasma. O equilíbrio osmótico é perdido e, em consequência, ocorre uma precipitação dos constituintes citoplasmáticos o que impede a reparação da membrana celular, causando a morte da bactéria (MENEZES, 2008; VON BLUCHER, 2007).

Pesquisas têm revelado que a clorexidina, além de possuir uma ação imediata sobre os microrganismos bucais devido às suas propriedades catiônicas, une-se também à hidroxiapatita do esmalte dos dentes e à mucina salivar, formando uma película orgânica na superfície dos dentes e nas proteínas salivares, que funciona como um reservatório (ZANATTA, 2007).

Os mecanismos de adsorção e liberação gradual foram testados *in vitro* e *in vivo* com clorexidina marcada radioativamente, sendo que moléculas de clorexidina aderidas às proteínas salivares são liberadas sob a forma ativa quando a sua concentração no meio diminui, o que pode ocorrer de 8 a 12 horas após a absorção inicial, e após 24 horas concentrações reduzidas podem ainda ser detectadas, prevenindo assim a colonização bacteriana e o efeito inibidor residual da formação do biofilme dentário (ZANATTA, 2007; VON BLUCHER, 2007; LASCALA, 2002; BONESVOLL et al, 1974).

A quantidade de clorexidina retida na cavidade bucal aumenta quase que proporcionalmente com a concentração da fórmula farmacêutica. A penetração da clorexidina através da mucosa oral intacta é inexistente ou muito limitada. Cerca de 30 % da clorexidina utilizada para bochechos fica retida ou adsorvida na película adquirida, nas proteínas salivares e na mucosa oral. Após o bochecho, a quantidade retida na boca é constantemente deslocada dos seus sítios de ligação pelos íons Ca^{++} presentes na saliva (ZANATTA, 2007).

A clorexidina tem se mostrado um efetivo agente antimicrobiano no tratamento de gengivite, dispersor da placa já formada e na inibição da recolonização do biofilme dentário (ZANATTA, 2007; CURY et al., 1999). Esta ação pode ser atribuída a uma redução do número de bactérias na saliva, evitando o desencadear do quadro inflamatório da gengivite. O digluconato de clorexidina sob a forma de bochechos (0,2%), aplicação tópica (2%) ou em pastas dentífricas (0,6 ou 0,8%) em humanos ou animais, reduz a formação do biofilme dentário e consequentemente, a gengivite (LASCALA, 2002).

O uso repetido da solução de clorexidina faz com que o número de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos na saliva seja reduzido em 80-90 %. A FDA (Food and Drug Administration) e a ADA (American Dental Association) autorizaram o uso da clorexidina como agente efetivo para controle de placa, baseado em suas propriedades anti-placa e para o combate à gengivite (ZANATTA, 2007; ROSING et al. 2005; CARRANZA, 1997).

2.3 - Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero natural, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose (LENARDON et al, 2010; BURKATOVSKAYA et al., 2008; BERGER, et al., 2004; PANCHENCE, et al., 2000, KUBOTA et al., 2000). É um mucopolissacarídeo que compõe a estrutura do exoesqueleto de crustáceos, insetos e algumas espécies de fungos, sendo degradada pela enzima quitinase (KUMAR, 2000; VIEIRA, 2005; SPIN NETO, 2008; MARTINEZ-CAMACHO, 2010). A quitina *in natura* é encontrada como um material esbranquiçado, duro e anelástico, com baixíssima solubilidade e reatividade química, sendo também não imunogênico. Por ser altamente nitrogenada, é utilizada rotineiramente como material quelante em reações químicas (MUZZARELLI, 1973). É um polímero não ramificado formado por unidades de N-acetil-Dglucosaminas, unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), formando cadeias de várias centenas de unidades (Figura 2.3.1) (HOVEN et al., 2007; CANELLA et al., 2001). A sua estrutura química é semelhante à da celulose, na qual os grupos hidroxila (celulose) da posição C-2, são substituídos pelo grupo acetamida (KUMAR, 2000).

Figura 2.3.1 - Estrutura química da quitina

Partindo-se da matéria-prima bruta, após lavagem abundante, banhos ácidos retiram todo o conteúdo mineral das cascas, e banhos básicos promovem sua desproteinização, aliada a uma leve desacetilação (SPIN NETO, 2008). Este processo, chamado de N-desacetilação consiste na remoção controlada dos grupos acetil (C_2H_3O) em meio alcalino de modo a tornar o produto final solúvel em soluções de ácidos diluídos. Não é um processo fácil, devido à natureza cristalina da quitina (CANELLA *et al.*, 2001; ARGUELLES *et al.*, 2001). Da desacetilação da quitina, obtém-se a quitosana (Figura 2.3.2).

Figura 1.3.2 – Reação da conversão da quitina em quitosana

A quitosana é um biopolímero, com relevantes propriedades estruturais como a biodisponibilidade, biocompatibilidade aos tecidos e biodegradabilidade. Estas propriedades incluem a formação de filmes, quelação de íons metálicos e características estruturais ópticas (MARTINEZ-CAMACHO, 2010; BURKATOVSKAYA *et al.*, 2008; VIEIRA, 2005; SENEL, 2000; NEEDLMAN, 1997). Possui baixo custo e de grande importância econômica e ambiental, já que as carapaças dos crustáceos são resíduos abundantes e que são rejeitados pela indústria pesqueira, reduzindo assim o impacto ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2007; PILLAI, 2009).

Quimicamente, a quitosana tem alto peso molecular, sendo uma poliamina que apresenta propriedades que se relacionam com a presença de grupos aminos livres em sua estrutura (Figura 2.3.3), o que a torna apta à aplicação em diversas áreas (PILLAI, 2009; BURKATOVSKAYA *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2007; VIEIRA, 2005; SENEL, 2000; NEEDLMAN, 1997).

Figura 2.3.2 - Estrutura química da quitosana

A dissolução da quitosana dá origem a fibras, filmes, lâminas e géis, que podem ser utilizados diretamente ou transformados em outros materiais na tentativa de utilização como biomateriais (MARTINEZ-CAMACHO et al, 2010).

Algumas das principais áreas de aplicação da quitosana são: agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Porém sua aplicação mais nobre é na área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais) (PILLAI, 2009; BURKATOVSKAYA, 2006; KHOR, 2003).

Camacho-Martinez et al., 2010 afirmam que a quitosana possui propriedades antimicrobianas e fungistáticas. Três mecanismos têm sido propostos para explicar as propriedades antimicrobianas da quitosana. No primeiro, as cargas positivas presentes na cadeia polimérica de quitosana devido ao seu grupo amino, interagem com as cargas negativas obtidas a partir dos resíduos de macromoléculas (lipopolissacarídeos e proteínas) nas membranas das células microbianas, interferindo com a troca de nutrientes entre o exterior e o interior da célula. Essas cargas podem também competir com o cálcio para os locais eletronegativos na membrana, comprometendo a sua integridade e causando a liberação de material intracelular, resultando em morte celular. O segundo mecanismo propõe que a quitosana atua como um agente quelante, criando compostos a partir de metais

essenciais para célula; o terceiro mecanismo estabelece que a quitosana de baixo peso molecular é capaz de entrar núcleo da célula, interagindo com o DNA, interferindo na síntese de RNA mensageiro, afetando a síntese de proteínas e inibindo a ação de várias enzimas. Esses mecanismos são baseados em resultados de investigações anteriores onde a quitosana foi adicionada ao meio de cultura, em estado líquido ou sólido. No caso dos filmes de quitosana o mecanismo de inibição não foi explicado mas existem fatores externos, como condições anaeróbicas ou asfixia, que devem ser considerados. Filmes de quitosana são biodegradáveis, biocompatíveis, flexíveis, duráveis, fortes, duros e difíceis de quebrar, tem valores moderados de água e permeabilidade ao oxigênio. Apesar de não ter realizado testes em estreptococos ou candida, este estudo de Martinez-Camacho et al. 2010 mostrou que a atividade antifúngica de filmes de quitosana foi positiva para diversos tipos de fungos (MARTINEZ-CAMACHO et al, 2010).

Burkatovskaya et al, 2006 desenvolveu uma bandagem feita de acetato de quitosana associada a um agente hemostático. A hemostasia que antes era feita a partir da compressão do ferimento com ataduras de gaze, hoje pode ser realizada a partir da aplicação desta bandagem que contém elementos que favorecem esse processo de reparo. Os pesquisadores mostraram que em muitos casos, ao fechar um ferimento já infectado, com um curativo comum, pode-se aumentar a proliferação bacteriana no local e tornar a ferida potencialmente contaminada para o indivíduo. Desta maneira, a bandagem feita com quitosana, que possui propriedades naturalmente antimicrobianas agregou duas vantagens relevantes: potencial antimicrobiano e capacidade hemostática.

Spin Neto, et al (2008), ressaltaram que a própria estrutura química da quitosana, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas. Berger, (2004) avaliou os benefícios da quitosana em forma de hidrogéis e suas aplicações biomédicas e concluiu que há viabilidade da utilização deste veículo para aproveitar as propriedades antimicrobianas e de cicatrização da quitosana.

Senel et al (2000) desenvolveram formulações contendo quitosana como agente carreador de clorexidina para a cavidade oral. Géis (na concentração de 1 ou 2%) e filmes de quitosana foram preparados contendo 0,1 ou 0,2% de clorexidina e

suas propriedades de liberação *in vitro* foram avaliados. A ação antifúngica da quitosana em si, bem como as várias formulações contendo clorexidina foram examinadas. A liberação de clorexidina gel foi mantida por 3 horas e a liberação prolongada foi observada para os filmes. Nenhum atraso foi observado em liberação de Clorexidina de ambos os géis ou filmes e a maior atividade antifúngica foi observada no gel de quitosana 2% adicionado Clorexidina 0,1%. Senel et al (2000) concluíram que a quitosana além de ter potencial antifúngico é capaz de prolongar o tempo e a quantidade de clorexidina na cavidade oral.

Needlman, (1997) investigou o possível papel da quitosana, goma xantana e poli óxido de etileno como auxiliares de administração de medicamentos tópicos aplicados sobre a mucosa oral, já que os três possuem boas propriedades de bioadesividade. Foram realizados estudos *in vitro*, que mostraram que a liberação do medicamento que continha quitosana foi significativamente maior do que para outros géis ou o grupo controle. Em contraste, a goma xantana deu tempo mais prolongado de adesão na mucosa oral (153,5 min) seguido de (óxido de etileno) (89,3 min) e quitosana (42,6 min), e esses tempos foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Os resultados deste estudo sugerem que as propriedades bioadesivas de um gel aquoso podem ser diretamente relacionadas à sua manutenção na cavidade oral.

Desta maneira, há justificativas na literatura para o desenvolvimento de um novo produto capaz de agregar os benefícios da quitosana e clorexidina na redução de microrganismos do meio bucal.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo:

3.1- Desenvolver uma bandagem bucal biodegradável incorporada a um fármaco e avaliar sua ação antimicrobiana nos seguintes microrganismos bucais: *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*;

3.2 - Comparar a efetividade da ação antimicrobiana da bandagem com um gel de clorexidina em diferentes concentrações.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A quitosana empregada neste estudo é um produto comercial (Sigma Aldrich, St. Louis USA), sendo, segundo informação do fabricante, procedente da purificação de quitinas extraídas de cascas de caranguejos. O material apresenta-se em aspecto de flocos, com tom levemente amarelado e é classificado como de média massa molar (Figura 4.1.1).

O fármaco empregado neste estudo foi a clorexidina (solução a 20%) - CEP- grade, CAS nº: 1847251-0 da Empresa: Evoluk Degussa Brasil Ltda. Todos os demais solventes empregados neste estudo foram de grau analítico.

As amostras das bandagens em diferentes concentrações e os géis testados foram preparadas no Laboratório de Química da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. As Bandagens foram embaladas individualmente e esterilizadas em óxido de Etileno (ESTERICAP, Brazil) (Figura 4.1.2).

Cinco bandagens de diferentes composições foram testadas sobre cada microrganismo: Bandagem com Quitosana 5%, Bandagem com Quitosana 5% + clorexidina a 0,2%, Bandagem com Quitosana 5% + clorexidina a 0,6%, Bandagem com Quitosana 5% + clorexidina a 1,0% e Bandagem com Quitosana 5% + clorexidina a 2,0%.

Para efeito comparativo, também foram testados 5 tipos de gel nas seguintes composições: Gel de Quitosana 5%, Gel de clorexidina a 0,2%, Gel de clorexidina a 2,0%, Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 0,2% e Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 2,0% (Figura 4.1.3).

Para os testes *in vitro* da ação antimicrobiana das bandagens e dos géis foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* de estoque do laboratório de Microbiologia da FOB USP, congelados a - 85°C em BHI (Brain Heart Infusion) com 20% de glicerol.

Figura 4.1.1 – Quitosana pura em flocos (Foto gentilmente cedida por Eduardo Cesar, Revista Fapesc, 2010)

Figura 4.1.2 – Bandagem de Quitosana contendo fármaco (embalada e esterilizada).

Figura 4.1.3 – Gel de Quitosana 5%, Gel de clorexidina a 0,2%, Gel de clorexidina a 2,0%, Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 0,2% e Gel de Quitosana 5% + clorexidina a 2,0%

4.2 Desenvolvimento dos Géis:

4.2.1. Preparo do gel de quitosana

Os géis foram preparados dissolvendo-se 5 g de quitosana em 100 ml de uma solução de ácido acético 2% (m/v), obtendo-se assim a concentração de 5%. A solução foi mantida sob agitação durante 24 h. Posteriormente a solução foi filtrada em tela de nylon, utilizando-se uma bomba de vácuo. O gel filtrado foi colocado em um banho de ultra-som, sendo mantida a temperatura de 30°C por 1 h. Após esta etapa o gel foi armazenado a 4°C para posterior utilização.

4.2.2. Preparo do gel de quitosana com clorexidina

O gel de quitosana preparado no item 4.2.1 foi utilizado para incorporação do fármaco clorexidina nas concentrações de 0,2% e 2% (m/m). Para o preparo do

gel de clorexidina a 0,2% (m/m), foi pesada em uma balança analítica uma massa do fármaco de 0,04g e a seguir foi feito a adição do gel de quitosana ate que o peso atingisse 20 g. O gel a 2% (m/m) foi preparado pesando-se uma massa do fármaco de 0,4 g e a seguir foi feito a adição do gel de quitosana ate que o peso atingisse 20 g. Após a adição do fármaco e do gel, a mistura foi homogeneizada, lacrada e mantida a temperatura de 4°C.

4.3 Desenvolvimento das Bandagens:

O gel de quitosana preparado no item 4.2.1 foi utilizado para incorporação do fármaco clorexidina nas concentrações de 0,2% e 2% (m/m). Para o preparo do gel de clorexidina a 0,2% (m/m), foi pesada em uma balança analítica uma massa do fármaco de 0,04g e a seguir foi feito a adição do gel de quitosana ate que o peso atingisse 20 g. O gel a 2% (m/m) foi preparado pesando-se uma massa do fármaco de 0,4 g e a seguir foi feito a adição do gel de quitosana ate que o peso atingisse 20 g. Após a adição do fármaco e do gel, a mistura foi homogeneizada e foi colocada em um banho ultra-som durante 15 min. Posteriormente, 5 g do gel a 0,2% (m/m) foi adicionado sob uma placa de Petri que foi colocada em uma balança analítica devidamente tarada. Após a pesagem, efetuou-se a homogeneização do gel sob a placa para garantir a uniformidade das bandagens. O mesmo procedimento foi repetido para o gel na concentração a 2% (m/m), sendo preparado um total de 4 placas para cada concentração. As placas preparadas foram colocadas em uma estufa a 45°C durante 24 horas para a secagem das bandagens. Após 24 horas as bandagens foram removidas das placas, foram embaladas e esterilizadas com em óxido de Etileno.

4.4 Método Ágar Difusão e Teste Antimicrobiano para *C. albicans*:

O meio de cultura Sabouraud Ágar (Difco™) utilizado para os testes com *C. albicans* foi preparado seguindo as recomendações do fabricante em frascos tipo “alemão” contendo 6,5g do meio para 100ml de água destilada, que em seguida foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Foi distribuído 20ml do meio de cultura ainda em estágio líquido em placas de petri (90x15mm) esterilizadas (Figura 4.4.1). Estas placas foram incluídas em estufa a 37°C por 24 horas para verificação do teste de esterilidade.

Figura 4.4.1 – Placa de petri contendo meio de cultura Ágar Sabourad

Os microrganismos utilizados (*C. albicans*) foram repicados em meio Agar BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco™) caldo 20% de glicerol, e foram armazenados em estufa a 37°C por 24 horas. Foram então suspensos por espectrofotometria a 660nm (OD 800) a uma concentração de turbidez $1,5 \times 10^8$ ufc ml⁻¹, equivalente ao padrão 0,5 de McFarland (figura 4.4.2).

Figura 4.4.2 – Microrganismo inoculado em meio de cultura pronto para ser plaqueado

Swabs estéreis foram mergulhados na suspensão de *C.albicans* e foi realizado o plaqueamento das amostras sobre o meio de cultura Sabouraud Agar (Figura 4.4.3). Sobre o meio plaqueado, foram colocadas três amostras de cada bandagem recortadas em discos de 0,6mm (Figura 4.4.4) e três amostras de cada gel (discos de papel estéril de 0,6mm embebidos em gel) a serem testadas (Figura 4.4.5). As placas de petri contendo *C. albicans* foram incluídas em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C pelo período de 48 horas, a fim de se observar o crescimento dos microrganismos (Figura 4.4.6).

Figura 4.4.3 – Plaqueamento de *C.albicans* sobre meio de cultura

Figura 4.4.4 – Bandagens dispostas sobre meio de cultura Ágar Sabourad

Figura 4.4.5 – Discos contendo gel em diferentes composições dispostos sobre meio de cultura Ágar Sabourad

Figura 4.4.6 – Cultivo de *C.albicans* após 48 horas de incubação, evidenciando a formação de halos de inibição de crescimento

4.5 Método Ágar Difusão e Teste Antimicrobiano para *S.mutans*

O meio de cultura Sacarose-Bacitracina 20% - SB20 (Difco™) utilizado para os testes com *S.mutans* foi preparado de acordo com a recomendação do fabricante onde foram utilizados 20,0g de sacarose e 2,0g do meio para 100ml de água destilada e 1,0ml de bacitracina. Este preparo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e em seguida foi distribuído 20 ml do meio de cultura ainda em estágio líquido em placas de petri (90x15mm) esterilizadas (Figura 4.5.1). Estas placas foram incluídas em estufa a 37°C por 24 horas para verificação do teste de esterilidade.

Os microrganismos utilizados (*S. mutans*) (Figura 4.5.2) foram repicados em meio Agar BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco™) caldo 20% de glicerol, e foram armazenados em estufa a 37°C por 24 horas. Foram então suspensos por espectrofotometria a 660nm (OD 800) a morada de turbidez $1,5 \times 10^8$ ufc ml⁻¹, equivalente ao padrão 0,5 de McFarland.

Figura 4.5.1 – Placas de petri contendo meio de cultura SB20

Figura 4.5.2 – Streptococcus mutans visto por microscopia

Swabs estéreis foram mergulhados na suspensão de *S.mutans* e foi realizado o plaqueamento das amostras sobre o meio de cultura SB20, (Figura 4.5.3). Sobre o meio plaqueado, foram colocadas três amostras de cada bandagem (Figuras 4.5.4 e 4.5.5) e três amostras de cada gel a serem testadas (Figura 4.5.6). As placas contendo *S.mutans* foram incluídas em microaerofilia (Figura 4.5.7) e levadas a estufa bacteriológica a 37°C, também pelo período de 48 horas, a fim de promover o crescimento dos microrganismos e posteriormente observarmos os halos de inibição de crescimento bacteriano formados (Figura 4.5.8).

Figura 4.5.3 – Plaqueamento de *S.mutans* sobre meio de cultura

Figura 4.5.4 – Bandagem sobre meio de cultura

Figura 4.5.5 – Bandagens sobre meio de cultura

Figura 4.5.6 – Discos contendo gel sobre meio de cultura SB 20

Figura 4.5.7 – Placas de petri em microaerofilia em estufa bacteriológica a 37°C

As amostras de bandagem possuíam o formato circular com 6mm de diâmetro. Os discos de papel estéreis, os quais foram mergulhados no gel, também mediam 6mm de diâmetro.

Zonas de inibição de crescimento dos microrganismos ao redor das amostras de bandagens e discos contendo os géis foram medidas após o período de incubação. Para medir a zona de inibição foi considerada a distância em linha reta entre uma margem a outra do halo (circunferência) de inibição, passando pelo centro do disco/bandagem. A medição repetida 3 vezes, foi realizada com réguas estéreis divididas em milímetros (0,01m) (Figura 4.5.9).

Figura 4.5.8 – Halo de inibição formado ao redor das amostras de bandagem sobre cultura de *S. mutans*

Figura 4.5.9 – Medição dos halos de inibição

4.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram compilados no programa Excel (Windows 7®), e os procedimentos estatísticos foram realizados no programa SigmaPlot 11.0 for Windows.

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério (grupo). Como os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, aplicou-se o Teste de Tukey para as comparações múltiplas, adotando-se sempre um nível de significância de 5%. Contudo; na comparação entre os grupos de géis para *S.mutans*, os dados não apresentaram distribuição normal (Teste de Kolmogorov-Smirnov), sendo para estes utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

Cinco amostras de bandagens – bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 0,2%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 0,6%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 1,0%; bandagem de quitosana a 5% + clorexidina a 2,0% e quitosana a 5%, sem adição de clorexidina – foram testadas a fim de avaliar o seu potencial antimicrobiano frente ao microrganismo *C.albicans*. O halo de inibição formado por cada bandagem foi medido em milímetros e a média e o desvio padrão de cada resultado apresentado na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de bandagem sobre *C. albicans* ($p<0,05$), $n=3$.

BANDAGEM <i>C.albicans</i>	Média	Desvio Padrão
0,2%	10,667 ^a	0,577
0,6%	13,000 ^b	0,000
1,0%	14,333 ^b	0,577
2,0%	16,667 ^c	1,155
QUITOSANA PURA	0,000 ^d	0,000

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

O teste comparativo das diferentes formulações de bandagem (ANOVA a um critério seguido do teste de Tukey) mostrou que a bandagem de concentração 2,0% de clorexidina teve maior diferença de média quando comparada a bandagem de quitosana pura. O halo de inibição formado pela bandagem de clorexidina a 0,2% foi o menor, seguido das bandagens de clorexidina a 0,6 e 1,0% que não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si. O melhor resultado foi o da bandagem de clorexidina a 2,0% que formou o maior halo de inibição sobre *C. albicans* (TABELA 5.1).

Para efeito comparativo, foram analisados também o efeito antimicrobiano de cinco tipos de géis, sobre *C. albicans*, nas seguintes concentrações: gel de clorexidina a 0,2%, gel de clorexidina a 2,0%, gel de clorexidina + quitosana a 0,2%, gel de clorexidina + quitosana 2,0% e gel de quitosana pura. O halo de inibição

formado por cada disco impregnado pelo gel foi medido em milímetros e a média e o desvio padrão apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de gel sobre *C. albicans* ($p < 0,05$), $n=3$.

GEL <i>C.albicans</i>	Média	Desvio Padrão
CHX 0,2%	14,667 ^a	0,577
CHX 2,0%	22,667 ^b	0,577
CHX+QUIT 0,2%	10,000 ^c	0,000
CHX+QUIT 2,0%	20,333 ^d	0,577
QUITOSANA PURA	0,000 ^e	0,000

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

O potencial antimicrobiano do gel de clorexidina a 2,0% foi maior, apresentando média do halo de inibição de 22,6 mm seguido do gel de clorexidina + quitosana a 2,0% que apresentou halo de 20,3 mm. O teste comparativo das diferentes formulações de gel (ANOVA a um critério seguido do teste de Tukey) mostrou que o gel de clorexidina a 2,0% teve maior diferença de média quando comparada ao gel de quitosana pura, como ilustrado na tabela 5.2.

As médias obtidas por cada formulação de gel e bandagem testados sobre *C.albicans* foram dispostas na figura 5.1 que mostra em ordem decrescente qual formulação foi mais eficiente, ou seja, formou o maior halo de inibição sobre o microrganismo.

Para avaliar o potencial antimicrobiano frente ao microrganismo *S.mutans* cinco amostras de bandagens com diferentes concentrações de fármaco (clorexidina a 0,2%, clorexidina a 0,6%, clorexidina a 1,0%, clorexidina a 2,0% e apenas com quitosana pura) foram testadas. O halo de inibição formado por cada bandagem foi medido em milímetros e a média e o desvio padrão de cada resultado apresentado na tabela 5.3.

Figura 5.1 – Valores de média (em milímetros) do halo de inibição formado por bandagens e géis sobre *C.albicans*, em ordem decrescente de tamanho.

Tabela 5.3 - Média e desvio padrão do halo de inibição das amostras de bandagem sobre *S.mutans* ($p < 0,05$), $n=3$.

BANDAGEM <i>S.mutans</i>	Média	Desvio Padrão
0,2%	20,667 ^a	0,577
0,6%	22,667 ^b	1,155
1,0%	24,000 ^{b,c}	0,000
2,0%	25,000 ^c	1,000
QUITOSANA PURA	0,000 ^d	0,000

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

O teste comparativo das diferentes formulações de bandagem (ANOVA a um critério seguido do teste de Tukey) sobre *S. mutans* mostrou que a bandagem de concentração 2,0% de clorexidina teve maior diferença de média quando comparada a bandagem de quitosana pura. O halo de inibição formado pela bandagem de clorexidina a 0,2% foi o menor (20,6mm). Entre os valores médios dos halos formados pelas bandagens de clorexidina a 0,6% e 1,0% não houveram diferenças

estatisticamente significantes entre si, bem como entre as bandagens de clorexidina a 1,0% e a 2,0%. A bandagem de clorexidina a 2,0% formou o maior halo de inibição sobre *S. mutans* (TABELA 5.3).

Foram analisados também o efeito antimicrobiano de cinco tipos de géis, sobre *S. mutans*, nas seguintes concentrações: gel de clorexidina a 0,2%, gel de clorexidina a 2,0%, gel de clorexidina + quitosana a 0,2%, gel de clorexidina + quitosana 2,0% e gel de quitosana pura. O halo de inibição formado por cada disco impregnado pelo gel foi medido em milímetros e a média e o desvio padrão apresentados na tabela 5.4.

5.4 – Média, desvio padrão e mediana do halo de inibição das amostras de gel sobre *S. mutans* ($p < 0,05$), $n=3$.

GEL <i>S. mutans</i>	Média	Desvio Padrão	Mediana
CHX 0,2%	24,00 ^a	0,000	24,000
CHX 2,0%	29,000 ^{a,b}	1,000	29,000
CHX+Q 0,2%	22,000 ^a	0,000	22,000
CHX+Q 2,0%	27,000 ^a	0,000	27,000
QUITOSANA PURA	0,000 ^{a,c}	0,000	0,000

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

O potencial antimicrobiano do gel de clorexidina a 2,0% foi maior, apresentando média do halo de inibição de 29,0 mm seguido do gel de clorexidina + quitosana a 2,0% que apresentou halo de 27,0 mm. O teste comparativo das diferentes formulações de gel (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Tukey) mostrou que o gel de clorexidina a 2,0% teve maior diferença de média quando comparada ao gel de quitosana pura, única comparação que teve diferença estatisticamente significativa. Os demais valores não obtiveram diferenças estatisticamente significante, como ilustrado na tabela 5.4.

As médias obtidas por cada formulação de gel e bandagem testados sobre *S. mutans* foram dispostos na figura 5.2 que mostra em ordem decrescente qual formulação foi mais eficiente, ou seja, formou o maior halo de inibição sobre *S. mutans* (em milímetros).

Figura 5.2 – Valores de média (em milímetros) do halo de inibição formado por bandagens e géis sobre *S.mutans*, em ordem decrescente de tamanho.

6 Discussão

6. Discussão

Este estudo teve como finalidade o desenvolvimento de um dispositivo inovador chamado de “bandagem bucal” que pudesse ser utilizada em tecidos úmidos no interior da cavidade oral ulcerados e/ou cortados em função de um procedimento cirúrgico ou traumatismo. A intenção é que permaneça em íntimo contato com o tecido e libere um agente antimicrobiano eliminando a contaminação bacteriana do tecido e assim, favoreça a cicatrização dessas feridas. O processo de elaboração deste novo produto foi intenso e vários testes foram feitos até que se chegasse a um resultado que pudesse dar início aos testes propostos.

Uma consideração a ser feita, é que pelo fato da bandagem bucal ser uma proposta nova, houve dificuldade em detectar na literatura trabalhos correlatos que permitam uma discussão mais aprofundada do tema.

Quando o paciente adulto ou infantil apresenta lesões na mucosa oral (aftas, ulcerações, rompimento da continuidade da mucosa) as opções de tratamento, mesmo que paliativo, são limitadas. A Odontologia tem hoje a disposição géis e soluções antissépticas, colutórios e formulações em orabase, que apresentam eficiência para o fim a que se destinam, porém dificultam a adesão do paciente ao tratamento (SENEL, 2000; PETELIN et al, 2004; TOLENTINO, 2010) . Volpato et al (2007) em revisão de literatura a respeito de opções de tratamento para mucosite bucal radio e quimio induzida em pacientes com câncer elucidaram que muitas são as intervenções potencialmente possíveis de serem empregadas nesses pacientes, porém os benefícios das técnicas ainda são desconhecidos e ainda não há um consenso com relação a protocolos de controle e prevenção, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes envolvidos (VOLPATO et al, 2007). Para o tratamento de estomatite aftosa recorrente também não há consenso quanto ao tipo de tratamento mais indicado. Estudos apontam que corticóides tópicos e enxaguatórios são alternativas para minimizar a dor e aumentar o tempo de cicatrização da ferida, porém a eficácia do tratamento consiste no máximo tempo de contato entre a ferida e o medicamento (QUIJANO et al, 2008) .

A bandagem bucal desenvolvida neste estudo tem como componente estrutural principal a quitosana (originário do esqueleto de crustáceos), um agente biodisponível, encontrado em abundância na natureza. A quitosana é também biodegradável e não poluente do meio ambiente (BERGER, et al., 2004;

PANCHENCE, *et al.*, 2000, KUBOTA *et al.*, 2000). Outra característica que favorece a escolha desta matéria prima no desenvolvimento das bandagens é o baixo custo, já que são aproveitadas as carapaças de crustáceos rejeitados pela indústria alimentícia e pesqueira. Sendo assim, a bandagem bucal torna-se uma alternativa viável do ponto de vista da sustentabilidade.

A biocompatibilidade da quitosana é evidenciada em vários estudos (BURKATROVSKAYA, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007; PILLAI, 2009). Pelas características de conjugar a biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade é ampla a aplicabilidade da quitosana na formulação de biomateriais. Na área odontológica a quitosana foi utilizada pela primeira vez em forma de géis antimicrobianos em mucosa e canais radiculares, mas estudos vêm demonstrando que a quitosana pode ser utilizada como membrana periodontal, agente cicatrizador de defeitos ósseos e bolsas periodontais. Outra aplicação importante da quitosana é como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas ou locais, os chamados “*drug-delivery systems*”. Estes sistemas são capazes de proporcionar a liberação lenta e controlada dos medicamentos, mantendo uma ótima resposta da droga e diminuindo seus efeitos colaterais. Desta maneira a quitosana está sendo testada e utilizada como liberador de medicamentos na mucosa oral, canais radiculares, dentina cariada e bolsas periodontais (SPIN-NETO *et al.*, 2008).

Diante das boas propriedades apresentadas pela quitosana e da necessidade de se desenvolver um novo dispositivo inédito capaz de promover o reparo da mucosa oral e a descontaminação da mesma, este estudo se ateve ao desenvolvimento de uma bandagem bucal com ação antimicrobiana e a análise deste dispositivo frente a *C.albicans* e *S.mutans*.

A quitosana, além de ser o componente estrutural da bandagem bucal desenvolvida, possui também ação antimicrobiana comprovada por vários autores. Ballal *et al.* (2009) e Oliveira (2004) evidenciaram em seus estudos que a quitosana quando associada a clorexidina tem alto potencial antimicrobiano frente a *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Além da ação antimicrobiana possui também ação hemostática e estimula a cicatrização. Burkatovskaya (2006) apresenta em seu estudo uma bandagem hemostática feita a base de acetato de quitosana que tem por finalidade o controle do sangramento e a ação antimicrobiana quando colocada em contato com feridas cirúrgicas. Esta bandagem mostrou ser bactericida com

relação ao alginato curativo e a prata sulfadiazina, quando em contato com feridas feitas em ratos contaminadas por estafilococos e pseudomonas.

Optou-se pela clorexidina como agente antimicrobiano a ser associado à quitosana na bandagem bucal, por ser o antimicrobiano largamente utilizado pela odontologia quando se deseja controlar *S.mutans* e *C.albicans* (ZUCCO, 2010; TOLENTINO, 2010; MEIRA et al, 2007; KARL, 2007; ZANATTA, 2007; CURY et al., 1999). Clorexidina é eficaz como um enxaguatório bucal, mas, em comparação às soluções, as formulações em géis podem prolongar significativamente o tempo de permanência na cavidade bucal e, conseqüentemente, melhorar o efeito terapêutico do antimicrobiano. No estudo de Senel (2000), que avaliou géis e filmes com ação antimicrobiana para tratamento de doenças periodontais, tanto o gel quanto o filme de clorexidina foram preparados com quitosana como agente liberador do antimicrobiano para a cavidade oral permanecendo na mucosa e liberando a droga por um longo período de tempo, aumentando assim o efeito clínico devido à propriedade bioadesiva e alta viscosidade da quitosana.

O presente estudo utilizou Ágar Sabourad e Sacarose- Bacitracina 20 como meio de cultura, uma vez que estes meios são facilmente disponíveis e comumente usados para cultura de *C. albicans* e *S. mutans*. O teste de difusão em ágar foi empregado neste estudo para determinar a eficiência antimicrobiana das bandagens e géis testados. O teste de difusão em ágar geralmente é um método aceito para testar a atividade antimicrobiana de medicamentos e soluções odontológicas. É um teste padronizado tornando-o reprodutível e simples para executar e relativamente barato. No entanto, alguns fatores como o pH do substrato, período de incubação, sensibilidade, toxicidade e capacidade de difusão da droga pode ter um impacto sobre a atividade antimicrobiana dos meios de cultura nas placas.

Neste estudo foram testadas bandagens feitas a partir de quitosana (5g) e que continham ou não clorexidina em diferentes concentrações (0,2%, 0,6%, 1,0% e 2,0%). Para efeito comparativo, também foram desenvolvidos géis de quitosana (20g), clorexidina (0,2% e 2,0%) e quitosana associada a clorexidina (0,2% e 2,0%). Para que houvesse uma padronização, os testes foram realizados tendo por base o método de antibiograma (Kirby-Bauer), onde se tem a difusão do medicamento através de discos de papel estéreis sobre meio de cultura rico em nutrientes onde os microrganismos podem se multiplicar. O agente antimicrobiano se difunde na área

ao redor de cada disco, e um halo de lise bacteriana se torna visível. Como a concentração do medicamento é maior no centro, e menor nos limites do halo, o diâmetro é sugestivo para a Concentração Inibitória Mínima. Dessa maneira, as bandagens também foram esterilizadas e dimensionadas em círculos com o diâmetro semelhante aos discos de papel utilizados, para que os halos formados pudessem ser comparados.

A bandagem feita apenas de quitosana não permitiu a formação de halo de inibição de crescimento em cultura de *C.albicans*, não tendo portanto a ação antimicrobiana da quitosana comprovada. Como já foi elucidado, estudos afirmam que a quitosana tem propriedade antimicrobiana e outros atestam esta propriedade como é o caso do estudo de Burkatovskaya et al (2006) que mostrou a eficácia de acetato de quitosana frente aos microrganismos *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. O estudo de Ballal et al (2009) verificou a formação de halo de inibição do gel de quitosana frente a *C.albicans* e *Enterococcus faecalis*, mas considerou a formulação feita apenas de quitosana a menos eficiente quando comparada a quitosana combinada a outros agentes antimicrobianos. No presente estudo, os resultados obtidos mostraram a ineficiência da bandagem de quitosana frente a *C.albicans*, já que não houve a formação de halo de inibição. Alguns ajustes na composição da bandagem bem como na concentração de quitosana empregada na fórmula podem ser feitos e novos testes poderão ser realizados para que dados conclusivos sejam obtidos.

Quando analisadas as amostras de bandagem compostas por quitosana e clorexidina em diferentes concentrações frente a *C. albicans*, observamos que todas as bandagens que continham Clorexidina nas concentrações 0,2%, 0,6%, 1,0% e 2,0% foram eficientes, ou seja todas elas inibiram de certa forma o crescimento de *C.albicans*. Apenas entre as bandagens com concentrações de 0,6% e 1,0% não houveram diferenças estatisticamente significantes entre o tamanho do halo de inibição formado (13,0mm e 14,3 mm respectivamente). A bandagem na concentração de clorexidina a 2,0% formou o maior halo de inibição (16,6mm), podendo ser considerada a mais eficaz. Porém sabe-se que em concentrações acima de 0,1% a clorexidina já possui potencial bactericida, fato que não inviabiliza o uso da bandagem de menor concentração, já que a redução da dose do antimicrobiano não diminui a eficácia da bandagem e favorece a diminuição dos efeitos colaterais que possam ocorrer (manchamento nos dentes, alteração do

paladar, entre outros). O estudo de Senel et al.(2000) que testou filmes e géis de quitosana contendo clorexidina mostrou que os filmes contendo baixas concentrações de clorexidina (0,1% e 0,2%) foram eficazes frente a *C.albicans*, concordando com dados obtidos em nosso estudo.

Como método comparativo aos testes realizados com as bandagens, foram testados géis de quitosana pura, géis de quitosana e clorexidina a 0,2% e a 2,0% e géis de clorexidina a 0,2% e a 2,0% já que estas últimas formulações já são utilizadas pela Odontologia como medicamento tópico sobre a mucosa bucal com o intuito de redução de microrganismos. No caso dos géis que foram testados frente a *C.albicans*, o melhor resultado foi obtido com o gel de clorexidina a 2,0% (22,6mm) seguido do gel de quitosana e clorexidina a 2,0% (20,3mm). Apesar de haver diferença estatisticamente significativa entre a ação destes géis (com ou sem quitosana), ambos foram eficazes e alguns pontos devem ser considerados. Para Senel et al. (2000), a quitosana combinada a clorexidina na forma de géis funciona como um potencializador do agente antimicrobiano que aumenta o tempo de liberação da clorexidina para o meio bucal. Needlman (1997) estudou as propriedades de bioadesividade da quitosana e verificou que esta tem a capacidade liberar maior quantidade de fármaco para o meio.

No estudo de Ballal et al. (2009), concluíram que o gel de clorexidina 2,0% combinado a quitosana foi mais eficaz que o gel que continha apenas clorexidina a 2,0% quando este foi testado sobre cultura de *C.albicans* e *E.faecalis*; estes dados são inversos aos obtidos em nosso estudo, porém podem atestar que a quitosana quando combinada a clorexidina não anula a eficiência antimicrobiana da mesma, e pode potencializar a fórmula a partir de suas outras características (tempo e quantidade de medicamento liberado para o meio), de acordo com a ação esperada.

A ação do gel de quitosana pura testado neste estudo também foi nula para *C.albicans*. Ballal et al. (2009) comprovaram a eficiência do gel de quitosana sobre *C.albicans*, porém seu resultado (halo de 16,6 mm) ficou muito aquém do resultado obtido pelo gel de quitosana combinado a clorexidina (halo de 25,2mm).

Quando testada sobre culturas de *S.mutans* as amostras de bandagem apresentaram comportamento semelhante quando testadas sobre a cultura de *C.albicans*. A bandagem que continha apenas quitosana não inibiu o crescimento de *S.mutans*. O estudo de Vieira (2005) testou a eficácia de bochechos com solução de

quitosana a 0,4%, sobre a redução de estreptococos totais, *S.mutans* e lactobacilos da microbiota oral e concluiu que a solução de quitosana também não foi eficaz para a redução de nenhum dos microrganismos pesquisados bem como do índice de placa visível nem do índice de sangramento gengival.

As bandagens de quitosana contendo clorexidina em diferentes concentrações se mostraram eficientes na redução de *S.mutans*. O melhor resultado foi obtido com a bandagem que continha clorexidina a 2,0% formando o maior halo de inibição (25,0mm). Este resultado não demonstrou diferença estatisticamente significativa com relação à bandagem com clorexidina 1,0% (24,0mm); a bandagem de 1,0% também não apresentou diferença quando comparada a bandagem de clorexidina 0,6% (halo de 22,6mm); porém, houve diferença entre a bandagem de 2,0% e 0,6%. Sendo assim, o uso da concentração de 1,0% seria indicado, evitando possíveis efeitos colaterais que podem ser causados pela clorexidina.

Os tipos de géis testados sobre cultura de *S.mutans* foram os mesmos cinco testados sobre *C.albicans*. O gel de quitosana pura não formou halo de inibição, demonstrando assim a sua ineficiência frente a *S.mutans*. Quando comparadas as cinco formulações de géis entre si, apenas o gel de quitosana teve diferença estatisticamente significativa com o gel de clorexidina a 2,0%. As demais formulações não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. Os halos formados pelos géis de clorexidina 2,0%, gel quitosana com clorexidina a 2,0%, gel de clorexidina a 0,2% e gel de quitosana com clorexidina 0,2% formaram halos inibitórios de 29,0mm, 27,0mm, 24,0mm e 22,0mm respectivamente, o que demonstra a eficácia das formulações testadas.

Sugerimos que novos estudos sejam realizados a fim de verificar a ação antimicrobiana da quitosana em diferentes concentrações sobre microrganismos da cavidade oral, bem como avaliar a sua dinâmica de ação quando estiver combinada a clorexidina (tempo de liberação do fármaco, quantidade de fármaco absorvido pela mucosa, tempo de dissolução da bandagem, entre outros).

Desenvolvida a bandagem bucal que foi proposta, se faz necessária a continuação desta pesquisa e novos testes devem ser realizados: ensaio da citotoxicidade da bandagem, absorção de água e perda de massa, seu tempo de degradação e teste de liberação controlada do fármaco.

7 Conclusões

7. Conclusões

Diante dos objetivos propostos para este estudo e da metodologia aplicada, pode-se concluir que:

A bandagem bucal proposta foi desenvolvida, e é estruturalmente composta por quitosana e incorporada de Clorexidina como agente antimicrobiano;

A análise *in vitro* desta bandagem foi realizada e constatou-se que a bandagem bucal foi eficaz na inibição do crescimento dos microrganismos *C.albicans* e *S.mutans*.

O gel de clorexidina na concentração de 2,0% apresenta-se como a forma mais eficaz para a redução de *C.albicans* e *S.mutans* quando comparado aos demais géis e/ou bandagens compostos por quitosana e clorexidina ou apenas quitosana, porém é importante elucidar que as formulações contendo os dois componentes não estão totalmente contra-indicadas.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Addy M. O uso de antissépticos na terapia periodontal. In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 461-77
2. Anders R, Merkle, HR . Evaluation of laminated muco-adhesive patches for buccal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 1989; 49, 231-240.
3. Arguelles CPW, Gallardo A, Elvira C, San Román J. Quitosan: Un polisacárido natural biodegradable biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicine. Revista de Plásticos Modernos 2001, 585, 81-91.
4. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista eletrônica de materiais e processos 2007; 2(3): 27-34.
5. Baehni P; Takehuchi Y. Antiplatelet agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. Oral Dis 2003; 9(1): 23-29.
6. Ballal NV, Kundabala M, Bhat KS, Acharya S, Ballal M, Kumar R, Prakash RY. Susceptibility of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* to Chitosan, Chlorhexidine gluconate and their combination in vitro. Aust Endod J 2009; 35: 29–33.
7. Banu LD; Conrads G; Rehrauer H; Hussain H, Allan E; Pleog JR. The *Streptococcus mutans* Serine/Threonine Kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism. Infection and Immunity 2010; 78(5): 2209–2220.
8. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57, 19.
9. Bonesvoll P, Lökken P, Rølla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. Arch Oral Biol. 1974;19(11):1025-9.

-
10. Borges RM et al . Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2009; 42(4).
 11. Botero A; Alvear FS, Velez ME, Botero L, Velasquez H. Evaluation of the therapeutic approach of various types of periodontal disease. part iii: enterobacteriaceae enteric rods and yeast species. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* 2008; 20(1):72-86.
 12. Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. *Wound Repair Regen.* 2008 ; 16(3): 425–431.
 13. Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, Castano AP, Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds of mice. *Biomaterials* 2006; 27: 4157-4164.
 14. Canella KMC, Garcia RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova* 2001; 24: 13-17.
 15. Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kriger L, editor. *ABOPREV- Promoção de saúde bucal*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999. 129-39.
 16. Fardak O, Turnbull R. A review of literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1985; 112: 863–69.
 17. Fejerskov O, Thylstrup A. *Textbook of clinical cariology*. 3.ed. Denmark: Munksgard; 1996. p. 59-62.
 18. Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngol Clin N Am* 2011; 44: 231–240.
 19. Hespanhol FL, Tinoco EMB, Teixeira HGC, Falabella MEV, Assis NMSP. Manifestações bucais em pacientes submetidos à quimioterapia. *Ciência & Saúde Coletiva* 2010, 15(Supl. 1):1085-1094.
 20. Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International* 1999; 48: 732-34.
 21. Hoven VP, Tangpasuthadol V, Angkitpaiboon Y, Vallapa N, Kiatkamjornwong S. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers* 2007; 68 (1): 44-53.

-
22. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 40 (3): 175-81.
 23. Karl E; Toledo OA; Amorim RFSG; Bezerra ACB. Avaliação do tratamento intensivo com clorexidina na redução das contagens salivares de estreptococos grupo mutans na fase de dentadura mista. *Rev ABO nac* 2007; 14(6):348-351.
 24. Knapczyk J. Preclinical study of antimycotic chitosan hydrogel efficacy. In: Karnicki ZS, Brzeski MM, Bykowski PJ, Wojtasz-Pajak A. (Eds.), *Chitin World*. Wirtschaftsverlag NW-Verlag für neue Wissenschaft GmbH 1994, Germany. 512–519.
 25. Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. A simple preparation of the half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research* 2000; 234: 268-274.
 26. Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 2000; 46, 1-27.
 27. Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymer* 2000; 42: 19-21.
 28. Lascala NT; Moussalli NH. *Compêndio terapêutico periodontal*. 3. ed. São Paulo : Artes Medicas , 2002.
 29. Lenardon MD et al. Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *Journal of Cell Science* 2010; 123 (13): 2199-2206.
 30. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(18): 3919-28.
 31. Madihally SV, Mathew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999; 20: 1113-42.
 32. Martínez-Camacho AP et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 2010; 82: 305–315.
 33. Martins-Diniz JN et al . Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Rev. Saúde Pública* 2005; 39(3).

-
34. Meira ALT; Todescan SMC; Azoubel E; Bittencourt S; Azoubel MCF. Uso de antimicrobianos locais em periodontia: uma abordagem crítica. *Periodontia* 2007; 17(1): 92-98.
 35. Menezes MM, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC, Valera MC. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras* 2008 abr./jun.; 11 (2): 23-28.
 36. Miyazaki, S., Nakayama, A., Oda, M., Takada, M., Attwood, D. Chitosan and sodium alginate based bioadhesive tablets for intraoral delivery. *Biol. Pharm* 1994. Bull. 17, 745–747.
 37. Muzzarelli RA, Rocchetti R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Anal Chim Acta*. 1973; 64:371-9.
 38. Needleman IG, Smales FC, Martin GP. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J. Clin. Periodontol* 1997. 24, 394–400.
 39. Niesergard RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.
 40. Oliveira LCBS et al . A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nasocomial. *Rev. bras. ter. intensiva* 2007; 19 (4).
 41. Oliveira RA. Avaliação do efeito in vitro da quitosana e da associação de quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans* [Dissertação] São Carlos (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2004.
 42. Panchence JM, Kohn J. Biodegradable polymer. In: Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. (Ed.). *Principle of tissue engineering*, 2000. San Diego: Academic Press, p. 263-277.
 43. Partho C, Anirban B, Saswati B, Indranil B. ClpP of *Streptococcus mutans* Differentially Regulates Expression of Genomic Islands, Mutacin Production, and Antibiotic Tolerance. *Journal of Bacteriology* 2010; 192(5): 1312–1323
 44. Petelin M; Pavlica Z; Bizimoska S; Sentjurc M. In vivo study of different ointments for drug delivery into oral mucosa by EPR oximetry. *Int J Pharm* 2004; 270(1-2): 83-91.

-
45. Peterson LJ. Cirurgia Oral e maxilofacial contemporânea 2005. Elsevier. 4, 123-145..
 46. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 2009; 34: 641-678.
 47. Pinto LP et al. Prevention of oral lesions in children with acute lymphoblastic leukemia. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2006; 70, 1847-1851.
 48. Quijano D, Rodriguez M. Corticoides tópicos en la estomatitis aftosa recurrente. Revisión sistemática. Acta Otorrinolaringol Esp. 2008; 59(6):298-307.
 49. Rege PR, Garmise RJ, Block LH. Spray-dried chitinosans: Part I: preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics 2003; 252(1): 41-51.
 50. Rodrigues MR; Maciel SM; Ferreira FBA; Piovezan F; Pieralisi FJS; PoliFrederico RC. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. *Cienc Odontol Bras* 2008; 11 (4): 40-46
 51. Rörig KCO; Colacite J; Abegg MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009; 42(2):225-227.
 52. Rösing CK, Maltz M, Oppermann RV. Controle químico do biofilme supragengival. Cadernos da ABOPREV 2005; 5:1-8.
 53. Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Hirata Jr R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. Aust Endod J 2008; 34(1): 19-24.
 54. Semenoff TADV, Borges AH, Pedro FLM, Silva Junior A, Caporossi LS, Semenoff-Segundo A. Comparative analyses of antimicrobial activity of 2% chlorhexidine. Revista odonto ciência 2010, 1: 1-5.
 55. Senel S, et al. Chitosan films and hydrogels of clorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. International Journal of Pharmaceutics 2000,193: 197-203.
 56. Silva TC. Estudo dos efeitos da terapia fotodinamica sobre *Streptococcus mutans*. [Tese] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo;2010.

-
57. Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio-Jr E. Chitosan based biomaterials with medical and dental application: literature review. Rev Odontol UNESP. 37(2): 155-161. 2008.
58. Tolaimate DJ, Rhazi M, Alagui A, Vicendon M, Vottero P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer 2000; 41: 2463-69.
59. Tolentino ES; Chinellato LEM; Tarzia O. Avaliação da aceitação de pacientes em relação ao uso de antissépticos orais e estudo do pH das diferentes soluções. Rev Bras Odontol 2010; 67(1):13-18.
60. Vieira JDG et al. *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2005; 38(5):383-386.
61. Vieira LB. Eficácia do bochecho de quitosana a 0,4% sobre o biofilme e bactérias orais. [Dissertação] São Carlos (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2005.
62. Volpato LER, Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. Rev Bras Otorrinolaringol 2007; 73 (4): 562-8.
63. Von Blücher AG. Dispositivos para liberação lenta de clorexidina para prevenção de periimplantite. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em ciência dos materiais] - Instituto Militar de Engenharia; 2007.
64. Weska RF, Moura JM, Batista LM, Rizzi J, Pinto LAA. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology, Journal of Food Engineering 2007; 80 (3):749-53.
65. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(3):272-276.
66. Zanatta FB; Rosing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. ScientificA 2007; 1(2): 35-43.

-
67. Zucco DL; Rossi B; Lopes CMCF; França PHC; Schubert EW. Efeito de clorexidina em gel ou dentifrício nos níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em crianças do distrito de Saí (São Francisco do Sul, SC, Brasil). RSBO 2010; 7(1):27-34.