Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Odontologia Restauradora

Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Endodontia

Estudo dos produtos químicos originados a partir da degradação do gel de clorexidina a 2 %, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Samuel Henrique Câmara de Bem

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora – Área de concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia).

Ribeirão Preto

2011

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Odontologia Restauradora

Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Endodontia

Estudo dos produtos químicos originados a partir da degradação do gel de clorexidina a 2 %, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Samuel Henrique Câmara de Bem

Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora
Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora – Área de concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia).

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Samuel Henrique Câmara de Bem

FICHA CATALOGRÁFICA

De-Bem, Samuel Henrique Câmara

Estudo dos produtos químicos originados a partir da degradação do gel de clorexidina a 2 %, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Ribeirão Preto, 2011.

135 p.: il.; 28 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Área de concentração: Odontologia Restauradora, subárea Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora

1. Clorexidina. 2. Cromatografia Gasosa. 3. Espectrometria de massas. 4. *para*-cloroanilina.

Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Endodontia, no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos (LAGRO) do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e no Laboratório de Espectrometria de Massas e Produtos Naturais do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) da Universidade de São Paulo.

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Odontologia Restauradora

Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Endodontia

Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Samuel Henrique Câmara de Bem, apresentada ao Departamento de Odontologia Restauradora - Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, ____ / ____ / ____.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora (Orientador)

Prof. Dr.

Prof. Dr.

“O que me preocupa não é o grito dos maus. É o silêncio dos bons”

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

Dedicatória Especial

Dedico especialmente este trabalho.....

Aos meus pais, **Celso Antoninho de Bem** e **Rita de Cássia Biagini Câmara de Bem**, que de maneira tão especial direcionou seus filhos para a vida. Nunca dispensaram recursos emocionais e materiais para nos transformar em pessoas dignas. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Gustavo Henrique Câmara de Bem**, **Tiago Henrique Câmara de Bem** e **Eduardo Henrique Câmara de Bem**, com nossa cumplicidade e união passamos por quaisquer dificuldades. Amo vocês!

À minha namorada, **Scheila Samara Garcia**, por toda compreensão e ajuda durante os anos do curso, pelo companheirismo e amor correspondido. Amo você!

Dedicatória

A todos os meus familiares aos quais representados pelos tios **Francisco Quast e Sonia Teresa Câmara Quast, Genésio Sérgio de Bem e Silvianita de Bem, Lauro Grigoletto e Kelma de Bem Grigoletto, Dirceu Baptistela e Selma de Bem Baptistela, Gilberto Maschieto (*in memorian*) e Leni Câmara Maschietto, Antônio Carlos Januário Câmara e Valéria Câmara** por toda a ajuda dispensada nas dificuldades da vida.

Em especial aos meus tios **Afonso Maurício Chaguri e Maria do Carmo Câmara Chaguri** por me receberem de braços abertos em sua casa durante todo este período. Muito obrigado!

A toda família **Garcia**, pelo acolhimento e apreço! Ao longo desses anos tenho me espelhado nas demonstrações de caráter, respeito, amizade e amor direcionados a mim. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e discernimento durante a realização desta etapa. Fonte infinita de consolo nas horas onde as esperanças terrenas se esvaem, sempre presente nos momentos de aflição.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora**, por todo apreço, incentivo e direcionamento durante o desenvolvimento deste projeto; pelas atividades clínicas e lições passadas para a vida que, com certeza, fizeram a diferença para a conclusão de mais esta etapa.

Ao **Prof. Dr. João Luís Callegari Lopes**, pela amizade e disposição na utilização de qualquer recurso necessário para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, pelas orientações durante todo o curso, o convívio clínico semanal e a oportunidade de poder colocar em prática os ensinamentos docentes.

Ao **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, pelas orientações clínicas, conversas e dedicação para com os alunos. Suas atitudes como docente espelham os pós-graduandos.

Aos demais professores (as) do programa de pós-graduação em Endodontia **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva, Ricardo Novak Savioli, Luis Pascoal Vansan e Isabel Cristina Fröner**, pelos ensinamentos transmitidos.

À **Dra. Débora Fernandes Costa Guedes**, pelo convívio semanal, discussões de trabalho, orientações, elogios, incentivos nas horas de angústia e direcionamento para a realização de cada passo de todo o trabalho, com certeza fizeram a diferença.

Ao **Prof. Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes**, pela oportunidade de utilizar seu laboratório e equipamentos necessários para a conclusão do trabalho.

À **Profª Drª Marilda das Dores Assis**, pela oportunidade de utilizar seu laboratório, equipamentos e reagentes necessários para a realização da pesquisa.

À **Prof.ª Sofia Takeda Uemura**, coordenadora do Curso de Odontologia da Fundação Hermínio Ometto - Uniararas, por toda compreensão durante o decorrer da pós-graduação. Seus incentivos e a confiança depositada foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Ao **Prof. Dr. Waldocyr Simões**, pela oportunidade de participar de sua equipe como docente, pela confiança depositada, elogios dispensados, orientações constantes e ensinamentos transmitidos aos quais incentivam e aperfeiçoam minhas atitudes clínicas e pessoais.

Aos companheiros professores da equipe de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araras, **Prof.(s) Dr.(s) Cid Alonso Manicardi, Homero Casonato Junior, Marcos Roberto dos Santos Frozoni e Profs. Alex André Corrarello e Fabrício Gibertoni**, agradeço o companheirismo, a unidade, dedicação e amizade de vocês para comigo e com nossa equipe.

Aos colegas professores da disciplina de Clínica Odontológica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araras, **Prof.(s) Fábio Venâncio, Florence Zumbaio Mistro e Marcelo Grigoletto** pelo convívio e cumplicidade.

À **Fundação Hermínio Ometto – Uniararas**, por todo auxílio e disposição em possibilitar a realização da minha Pós – graduação.

Ao **Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)** da Universidade de São Paulo, professores e funcionários por toda contribuição e recursos nas análises dos resultados.

Aos colegas de turma, **Josilaine Amaral Pimenta, Juliane Nhata, Kleber Campioni Dias, Luciana Cavali Santello, Marcus Vinícius de Melo Ribeiro e Rayana Longo Bighetti** pelo convívio e amizade durante a pós-graduação.

Aos colegas **Graziela Bianchi Leoni e Geraldo Celso da Silva Onety**, pela amizade e convivência durante a pós-graduação.

Ao funcionário **Carlos Feitosa dos Santos**, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela amizade, disposição, orientações, responsabilidade, humildade e apreço dedicado a mim e a todos os demais pós-graduandos.

Ao colega **Reginaldo Santana da Silva**, técnico do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo companheirismo e a pronta disposição em poder colaborar conosco, alunos, obrigado.

À colega **Luiza Godoi Pitol**, técnica do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela convivência, educação e pronta disposição em contribuir com o que foi necessário durante o curso.

À colega **Patrícia Marchi**, técnica do laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela convivência, respeito e pronta disposição em contribuir com o que foi necessário durante o curso.

Às funcionárias, **Maria Amália Viesti de Oliveira, Maria Isabel Cezário Francisco Miguel e Rosângela Angelini** do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo tratamento pessoal e doce com que sempre se relacionaram comigo.

Às funcionárias **Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto**, secretárias do Setor de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e orientações concedidas durante a pós-graduação.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela ajuda financeira disponibilizada durante o curso. Obrigado!

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, com profunda gratidão, pela oportunidade de ter realizado este trabalho.

À **Universidade de São Paulo**, em especial, ao **Campus de Ribeirão Preto**, por sua natureza, pelos colegas, ambiente e condições oferecidas que contribuíram com minha formação acadêmica, profissional e humana.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Introdução	31
Retrospectiva da Literatura	39
1. <i>Da clorexidina</i>	41
2. <i>Da para-cloroanilina</i>	58
Proposição	65
Materiais e Método	69
1 <i>Reagentes</i>	72
2. <i>Equipamentos e materiais utilizados</i>	72
3. <i>Seleção das Amostras</i>	74
4. <i>Preparo da solução padrão de pCA; da solução e do gel de digluconato de clorexidina a 2 % no laboratório</i>	75
5. <i>Método de extração para análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS)</i>	76
6. <i>Otimização do CG-MS para análise dos produtos de degradação do digluconato de clorexidina</i>	77
7. <i>Curva de calibração da pCA</i>	79
8. <i>Verificação da homogeneidade do gel de CHX</i>	81
Resultados	83
1. <i>Das amostras</i>	85
2. <i>Verificação da homogeneidade do gel de CHX</i>	113
Discussão	115
1. <i>Da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)</i>	117
2. <i>Da análise das amostras.....</i>	118

Conclusões	123
Referências Bibliográficas	127

RESUMO

DE-BEM, S. H. C. **Estudo dos produtos químicos originados a partir da degradação do gel de clorexidina a 2 %, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas**. 2011. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O presente trabalho teve como objetivo determinar, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS), produtos oriundos da degradação do digluconato de clorexidina (CHX) 2 % em gel. Foram selecionados três géis: comercial Gel_Chlorhexidina® (Maquira), CHX gel UNIARARAS (Manipulado pela Farmácia Ensino Uniararas) e gel CHX 2 % preparado a partir de uma solução comercial de CHX 20 % Sigma® no laboratório. Para que fosse possível comparar os resultados, foi preparada uma solução de CHX 2 % partindo da mesma solução comercial de CHX Sigma®. Para a avaliação dos produtos de degradação da CHX 2 %, os géis e a solução foram pesados (1 g / gel – 1 mL /solução) e acondicionados em tubos plásticos (Eppendorf®). Os tubos foram subdivididos em quatro diferentes situações de armazenamento (sobre a bancada de trabalho com e sem a presença de luz, em forno de Pasteur a 36,5 °C sem luz e em geladeira a 8 °C sem luz) e quatro diferentes períodos de análise (inicial, após 1 mês, 3 meses e 6 meses de armazenamento) resultando em 52 análises cromatográficas. Após o período determinado, as amostras foram extraídas, filtradas e analisadas por meio de CG-MS. Os resultados mostraram, na análise inicial, que todos os géis e a solução já continham produtos de degradação da CHX (espécies de oxigênios reativos - ROS). Um dos ROS era a *pCA*. Além da *pCA*, outros ROS foram observados, *oCA* e/ou *mCA* (isômeros da *pCA*) e os organoclorados *orto*-isocianato clorofenil e 2-amino-5-clorobenzonitrila. A porcentagem de *pCA* calculada nas amostras dos géis não foi gradual nem uniforme, levantando a hipótese de falta de homogeneidade da CHX na formulação do gel. A não homogeneidade foi comprovada através de análise em espectrofotometria UV/Vis. Uma sugestão de manipulação dos géis de CHX foi então sugerida e a homogeneidade da CHX nos géis manipulados desta maneira foi comprovada através de análise em espectrofotometria UV/Vis. Concluiu-se que os géis e a solução de CHX a 2 % analisados neste trabalho, apresentaram produtos oriundos da degradação da CHX em todas as situações de armazenamento e tempo de análises propostas, essa degradação é um problema intrínseco da CHX. Os produtos formados a partir da oxidação da CHX são tóxicos e possuem características genotóxicas, podendo trazer riscos ao seres humanos com danos celulares e no DNA. Mais estudos são necessários para verificar o potencial carcinogênico da CHX, de seus produtos de degradação e se o uso de produtos contendo CHX é seguro em seres humanos.

Palavras – Chave: Clorexidina; Cromatografia Gasosa; Espectrometria de massas; *para*-cloroanilina.

ABSTRACT

DE-BEM, S. H. C. **Study of chemicals derived from the degradation of 2 % chlorhexidine gel, by means gas chromatography coupled to mass spectrometry.** 2011. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The aim of this study was to determine, by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), products originated from the degradation of 2 % chlorhexidine digluconate (CHX) gel. Three gels were selected: commercial Gel_Chlorhexidina[®] (Maquira), 2 % CHX gel UNIAARARAS (handled at the Pharmacy Education UNIAARARAS) and 2% CHX gel prepared in laboratory from a commercial 20% CHX solution (Sigma[®]). For comparison of the results, a 2% CHX solution was also prepared from the same commercial 20 % CHX solution (Sigma[®]). For assessment of the products of 2 % CHX degradation, the gels and the solution were weighed (1 g / gel - 1 mL / solution) and placed in plastic tubes (Eppendorf[®]). The tubes were divided into four different storage conditions (on the workbench with and without the presence of light, Pasteur oven at 36.5 °C without light and in a refrigerator at 8 °C without light) and four different evaluation periods (initial and after 1 month, 3 months and 6 months of storage), resulting in 52 chromatographic analyses. After the specified evaluation periods, the samples were extracted, filtered and analyzed by GC-MS. The results showed that, in the initial analysis, all gels and the solution already contained CHX degradation products (reactive oxygen species - ROS). One of the ROS was para-chloroaniline (*pCA*). In addition to *pCA*, other ROS were observed, *oCA* and/or *mCA* (*pCA* isomers) as well as the organochlorines ortho-chlorophenyl isocyanate and 2-amino-5-chloro-benzonitrile. The percentage of *pCA* calculated in the CHX gel samples was neither gradual nor uniform, raising the possibility of lack of homogeneity in gel formulation. The lack of homogeneity was confirmed by UV/Vis spectrophotometry. Changes in the preparation of the CHX gels were suggested, and the homogeneity of the CHX gels prepared following the suggestions was confirmed by UV/Vis spectrophotometry. It was concluded that the 2% CHX gels and solution evaluated in this study presented products from CHX degradation in all storage conditions and evaluation periods, and this degradation is an intrinsic problem of CHX. The products formed from the oxidation of CHX are toxic and have genotoxic characteristics, and may pose risks for humans such as damage to cells and DNA. Further studies are required to determine the carcinogenic potential of CHX and its degradation products and whether the use of products containing CHX in humans is safe.

Key – words: Chlorhexidine; Gas Chromatography; Mass Spectrometry; *para*-chloraniline.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CHX	Clorexidina
cm	Centímetro (s)
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de Massas
DO	Densidade óptica
g	Gramma (s)
GG	Broca Gates-Glidden
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
LD ₅₀	Dose letal mediana
m	Metro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/kg	Miligramas por quilo
min.	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
m / z	Valor de massa carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nm	Nanômetro (s)
pCA	<i>para</i> -Cloroanilina
pCNO	<i>para</i> -Nitroclorobenzeno

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécime de oxigênios reativos
TR	Tempo de retenção
μL	Microlitro
μm	Micrometro
° C	Grau Celsius
%	Por cento
λ	Comprimento de onda
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV/Vis	Ultra violeta ao visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do digluconato de clorexidina (CHX).....	34
Figura 2 - Grupos funcionais (A) amina primária, (B) amina secundária, (C) amina terciária, (D) “hexil”, (E) “guanidina” e (F) “clorofenil”. Amino refere-se às aminas ou outro composto químico contendo o grupo NH ₂ combinado com um radical orgânico não ácido. Pode ser primária, secundária ou terciária; Fenil faz parte do grupo funcional Aryl derivado de um anel aromático simples e Hexil é o radical hidrocarbono “-C ₆ H ₁₃ ”.....	35
Figura 3 - (A) <i>para</i> -cloroanilina, (B) 4-clorofeniluréia, (C) , 4-clorofenilguanidina, (D) 1-cloro-4-nitrobenzeno.....	37
Figura 4 - Vista geral do equipamento (Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas) utilizado nas análises.....	73
Figura 5 - Vista geral do equipamento (Espectrofotômetro UV-VIS, duplo feixe com varredura) utilizado nas análises.....	74
Figura 6 - (A) Eppendorfs® contendo Gel_Sigma, com e sem proteção de luz. (B) Acréscimo de 1,5 mL de ACN para a extração da amostra. (C) Filtragem da solução extraída. (D) Vial contendo solução pronta para análise em CG-MS.....	77
Figura 7 - Cromatograma da <i>pCA</i> , obtido após análise da solução padrão de <i>pCA</i>	78
Figura 8 - Espectro de massas da <i>pCA</i> , obtido após análise da solução padrão de <i>pCA</i>	78
Figura 9 - Resolução cromatográfica ideal obtida para a separação dos produtos de decomposição da CHX.....	78
Figura 10 - Cromatogramas utilizados para confecção da curva de calibração para a <i>pCA</i>	80

Figura 11 - Regressão linear, equação da reta utilizada para quantificação da porcentagem de conversão de CHX em <i>pCA</i>	81
Figura 12 - Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Uniararas.....	86
Figura 13 - Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 1 na Figura 12. Confirmando a presença do organoclorado <i>Orto</i> -isocianato clorofenil.....	87
Figura 14 - Estrutura química do produto <i>Orto</i> -isocianato cloro fenil.....	87
Figura 15 - Espectro de massas da <i>pCA</i> , indicado pela seta 2 na Figura 12.....	88
Figura 16 - Espectro de massas da <i>orto</i> ou <i>meta</i> -cloroanilina, indicado pela seta 3 na Figura 12.....	88
Figura 17 - Estrutura química dos isômeros da <i>pCA</i>	88
Figura 18 - Espectro de massas do metilparabeno, indicado pela seta 4 na Figura 12.....	88
Figura 19 - Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 5 na Figura 12. Confirmando a presença do organoclorado 2-amino-5-clorobenzonitrila.....	89
Figura 20 - Estrutura química do produto 2-amino-5-clorobenzonitrila.....	89
Figura 21 - Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Uniararas.....	90
Figura 22 - Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 5 na Figura 21.....	91
Figura 23 - Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Uniararas.....	92
Figura 24 - Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Uniararas.....	93
Figura 25 - Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Chlorhexidina®.....	95

Figura 26 - Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Chorhexidina®.....	96
Figura 27 - Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Chorhexidina®.....	98
Figura 28 - Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Chorhexidina®.....	99
Figura 29 - Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Sigma.....	101
Figura 30 - Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Sigma.....	102
Figura 31 - Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Sigma.....	104
Figura 32 - Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Sigma.....	105
Figura 33 - Análise cromatográfica inicial, da extração da Solução_Sigma.....	107
Figura 34 - Análise cromatográfica de 1 mês, da extração da Solução_Sigma.....	108
Figura 35 - Análise cromatográfica de 3 meses, da extração da Solução_Sigma.....	110
Figura 36 - Análise cromatográfica de 6 meses, da extração da Solução_Sigma.....	111
Figura 37 - Análises através de espectrofotometria UV/Vis das extrações do Gel de CHX à 2 % produzido da maneira convencional.....	113
Figura 38 - Análises através de espectrofotometria UV/Vis das extrações do Gel de CHX à 2 % produzido da maneira sugerida.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Situações de armazenagem.....	75
Tabela II - Períodos de análise.....	75
Tabela III - Concentrações utilizadas para confecção da curva de calibração para a <i>pCA</i>	79
Tabela IV - Conversão de CHX em <i>pCA</i> exposto em % para o Gel_Uniararas.....	94
Tabela V - Conversão de CHX em <i>pCA</i> exposto em % para o Gel_Chlorexidina®.....	100
Tabela VI - Conversão de CHX em <i>pCA</i> exposto em % para o Gel_Sigma.....	106
Tabela VII - Conversão de CHX em <i>pCA</i> exposto em % para o Solução_Sigma.....	112
Tabela VIII - Produtos de degradação da CHX encontrados nas amostras analisadas.....	112

INTRODUÇÃO

A clorexidina (CHX) foi desenvolvida em 1940, nos laboratórios de pesquisa da "Imperial Chemical Industries Ltd., Macclesfield, England", visando à obtenção de um agente antiviral. Como antiviral, a CHX mostrou-se ineficaz, mas apresentou-se com excelentes propriedades antimicrobianas. É uma base forte, mais estável na forma de sal. Caracteriza-se como um detergente catiônico, de molécula simétrica, com dois anéis 4-clorofenil e dois grupos bi-guanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1' hexametenobis [5-(p-clorofenil) biguanida]). Pertence aos integrantes da classe da *bis*-guanida, disponíveis na forma de acetato, hidrocloreto e digluconato (ZAMANY et al., 2003; BASRANI; LEMONIE, 2005; ZEHNDER, 2006).

Atualmente o digluconato de CHX é a formulação mais empregada no aviamento de produtos, dotado de propriedades bactericidas, bacteriostáticas e fungicidas; apresenta amplo espectro de atuação, age sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e leveduras (TORTORA et al., 2000; ZAMANY et al., 2003; ZEHNDER, 2006; PAQUETTE et al., 2007; ZANATTA; RÖSING, 2007).

A fórmula molecular do digluconato de CHX é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$. Possui peso molecular de 897,77; densidade = 1,06 g / cm³ e ponto de ebulição = 134 °C. (INDEX MERCK, 2001).

A CHX atua na membrana citoplasmática dos microrganismos, causando perda do controle osmótico e consequente quebra do material intracelular. Liga-se à hidroxiapatita do esmalte e aos tecidos moles da cavidade bucal, mudando a carga elétrica, para competir com os microrganismos (HELING; CHANDLER, 1998; LEONARDO et al., 1999). Seu grande espectro microbiano, substantividade e baixa toxicidade (ROSENTHAL et al., 2004; DAMETTO et al., 2005; GOMES et al., 2006; EL-KARIM et al., 2007) têm promovido a utilização dessa substância em diversas áreas da saúde.

Foi introduzida no mercado em 1954, como um antisséptico para ferimentos na pele, por possuir excelente ação tópica (DAVIES et al., 1954; HENNESEY, 1973; FOULKES, 1973; WINROW, 1973). Atualmente, existe no mercado grande variedade de produtos que contêm digluconato de CHX, utilizados em diferentes áreas como, por exemplo, médica, odontológica, veterinária e alimentar. Sua estrutura química, sob a forma de digluconato de CHX, está ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do digluconato de clorexidina (CHX).

A CHX possui na sua estrutura molecular grupos funcionais tais como radicais "amino", "fenil" ("clorofenil"), "hexil" e "guanidina", os quais se encontram ilustrados na Figura 2.

Figura 2. Grupos funcionais (A) amina primária, (B) amina secundária, (C) amina terciária, (D) "hexil", (E) "guanidina" e (F) "clorofenil". Amino refere-se às aminas ou outro composto químico contendo o grupo NH₂ combinado com um radical orgânico não ácido. Pode ser primária, secundária ou terciária; Fenil faz parte do grupo funcional Aryl derivado de um anel aromático simples e Hexil é o radical hidrocarbono "-C₆H₁₃".

A eficiência da CHX contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos garantiu sua ampla adoção em diversas áreas médicas. Pode ser utilizada em procedimentos cirúrgicos, em tratamentos neonatais, no tratamento de doenças periodontais, em enxagatórios bucais, em gomas de mascar odontológicas, na endodontia e no tratamento de queimaduras (LÖE; SCHIOTT, 1970; RÖLLA; MELSEN, 1975; HULL, 1980; DELANY et al., 1982; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995; LAFFORGUE et al., 1997; SIQUEIRIA; USEDÁ, 1997; BASRANI et al., 2002; GOMES et al., 2003; GOMES et al., 2006; SOARES et al., 2007; VIANNA et al., 2007; MCCLURE et al., 2007; SEMENOFF et al., 2009).

Na odontologia, a CHX foi testada como agente inibidor da placa bacteriana primeiramente, por Løe; Schiott, em 1970, demonstraram que bochechos de uma solução de gluconato de clorexidina 0,2 %, realizados duas vezes por dia, foram eficientes para diminuir o crescimento do biofilme bacteriano e o desenvolvimento de gengivite clinicamente detectável por um período de 21 dias (RÖLLA et al., 1970).

Na área endodôntica, a utilização da CHX como substância auxiliar à instrumentação e medicação intracanal tem sido exaustivamente estudada por diferentes autores (DELANY et al., 1982; SIQUEIRIA; USEDÁ, 1997; BARTHEL et al., 2000; FERRAZ et al., 2001; GOMES et al., 2001; BASRANI et al., 2002; ZAMANY et al., 2003; GOMES et al., 2003; ESTRELA et al. 2003; BASRANI et al., 2004; ZEHNDER, 2006; GOMES et al., 2006; SOARES et al., 2007; FERRAZ et al., 2007; PAQUETTE et al., 2007; MOHAMMADI; ABBOTT, 2009; VALERA et al., 2010).

A aplicação crescente da CHX na área da saúde, entretanto, gera preocupação devido aos relatos de formação de produtos químicos quando da sua degradação, dotados de alta toxicidade (CHHABRA et al., 1991; VALENTOVIC et al., 1996; BELOW et al., 2004; BASRANI et al., 2007; GRASSI et al., 2007; YEUNG et al., 2007; BARBIN et al., 2008; PIZON et al., 2009; BASRANI et al., 2010; THOMAS; SEM, 2010; KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010; NOWICKI; SEM, 2011), tais como para-cloroanilina (*pCA*), 4-clorofeniluréia, 4-clorofenilguanidina e o 1-cloro-4-nitrobenzeno (CHHABRA et al., 1991; VALENTOVIC et al., 1996; BELOW et al., 2004). Essas substâncias químicas oriundas da degradação da CHX podem ser vistas na Figura 3.

A degradação a que se refere pode ser aumentada em função de alguns fatores, tais como a presença de luz, aumento de temperatura e do pH (JAMINET et al., 1970; KOHLBECKER, 1989).

Figura 3. A) *para*-cloroanilina. B) 4-clorofeniluréia. C) 4-clorofenilguanidina. D) 1-cloro-4-nitrobenzeno.

A utilização da CHX na área da saúde está difundida e comprovada. No entanto, mais pesquisas necessitam ser realizadas com o intuito de se verificar o potencial risco de sua utilização, devido aos vários produtos tóxicos oriundos da sua decomposição, bem como a concentração ideal para a sua utilização “*in vivo*”.

RETROSPECTIVA DA LITERATURA

Para facilitar a compreensão, da retrospectiva da literatura realizada neste trabalho, este capítulo foi dividido em tópicos, a saber: da clorexidina e da *para*-cloroanilina

1.Da clorexidina

DAVIES et al. (1954), avaliaram inúmeras polydiguânidas em diferentes aspectos: propriedade antibacteriana, teste de compatibilidade com antibióticos, efeitos de crescimento bacteriano, influência do pH, ação sobre o tamanho do inóculo, atividade sobre esporos bacterianos e desenvolvimento de resistência bacteriana. Os resultados determinaram que a bis-guanida denominada de “Hibitane” foi a que obteve maior atividade antimicrobiana. Esta ação foi obtida tanto para bactérias gram-negativas como para gram-positivas, apresentando para esta última maior ação. Mostrou-se pouco ativa contra esporos bacterianos, porém manteve atividade antimicrobiana na presença de fluídos corporais. Não demonstrou promover resistência bacteriana, possuiu baixa toxicidade oral, não apresentando atividade antibacteriana sistêmica, mas foi altamente eficiente contra *Streptococcus*

Hemolyticus, em ferimentos cutâneos infectados, produzidos artificialmente durante o estudo.

JAMINET et al. (1970), por meio de exames da densidade óptica de soluções, avaliaram a estabilidade da CHX a 0,02 % frente a dois processos de esterilização variando o pH por meio do ácido bórico e do bórax. A esterilização em autoclave possibilitou a hidrólise da CHX gerando *pCA* diretamente proporcional ao aumento de pH. A esterilização da CHX, em autoclave, produz discreta decomposição térmica com pequena produção de *pCA*. Os autores observaram que a hidrólise da CHX provoca redução mínima na sua atividade antimicrobiana e que os subprodutos gerados não afetam a sua conservação. Os autores citaram, ainda, que a CHX é incompatível com inúmeras substâncias, ressaltando aquelas com caráter aniônico.

LÖE; SCHIOTT (1970) avaliaram o efeito de bochechos e aplicação tópica de CHX sobre o desenvolvimento da placa dental e gengivite em humanos. Utilizaram como amostra, vinte e quatro estudantes de odontologia com gengivas saudáveis e dentes totalmente limpos e higiene bucal satisfatória. Os estudantes foram divididos em quatro grupos: (A) quatro indivíduos bochechavam, duas vezes por dia, uma solução de 0,2 % de CHX; (B) oito alunos bochechavam, uma vez por dia, a mesma solução; (C) seis alunos não usaram a solução, formando o grupo controle; (D) seis alunos receberam uma aplicação diária de uma solução à 2 % de CHX. O estudo confirmou observações anteriores dos mesmos autores (Löe e Rindom Schiött, 1969 e 1970) que a utilização da CHX 0,2 % duas vezes ao dia, é capaz de prevenir de forma eficaz a formação da placa bacteriana. Um único bochecho diário não é capaz de inibir a formação das placas em todas as áreas dos dentes. Uma única aplicação de uma solução de 2 % CHX impediu totalmente a formação da placa bacteriana. Após a interrupção do tratamento com CHX, a placa bacteriana era formada em taxas normais, sugerindo que não há efeito significativo além de um período de 24 horas. Concluíram que a inibição completa da placa bacteriana e a prevenção da gengivite podem ser conseguidas através da aplicação diária de CHX, desde que o agente seja administrado de forma adequada.

HENNESSEY (1973) avaliou algumas propriedades antimicrobianas da CHX, relatou que a CHX quase não possui propriedades antimicrobianas sistêmicas, mas possui uma potente ação antimicrobiana em uso tópico local.

WINROW (1973) estudou as vias metabólicas do digluconato de CHX em ratos, camundongos, cães, sagüis, macacos (rhesus) e humanos por meio de uma

CHX marcada com carbono 14 inserido no anel aromático ou na cadeia alifática. A leitura do digluconato de CHX marcado foi realizada por meio de cintilação. Quando o digluconato de CHX foi administrado oralmente, a maior parte foi excretada intacta nas fezes (90%), mas, uma pequena parte foi excretada pela urina (10%). Após a administração de uma dose oral de CHX em cães, os níveis sanguíneos detectados foram muito baixos o que levou à conclusão de que a CHX é uma droga pobremente absorvida pelo organismo quando ingerida. A pouca quantidade absorvida no trato digestivo é processada no fígado e nos rins. A CHX tem afinidade pela mucosa do trato digestivo incluindo a da boca, mas essa ligação à superfície da mucosa possui natureza reversível. A frequência de segmentação metabólica pela ingestão oral também é muito baixa e não há evidências de formação de *pCA*. No entanto, após administração intravenosa em ratos, encontraram-se metabólicos polares da CHX e pequenas quantidades de CHX intacta na bile o que sugere segmentação bioquímica do digluconato de CHX. Os autores conseguiram reaver 90% do digluconato de CHX presente no fígado de ratos evidenciando que não há ligações covalentes estáveis do digluconato de CHX com proteínas. Os autores também comprovaram a capacidade de adsorção do digluconato de CHX na superfície das mucosas com liberação em função do tempo (substantividade).

FOULKES (1973) relatou algumas observações toxicológicas da CHX, a primeira avaliação rapidamente estabeleceu uma marcante diferença entre valores no uso intravenoso e oral, em camundongos, o valor LD_{50} intravenoso para a CHX é de 22 mg/kg, já o valor correspondente para o uso tópico oral é 1800 mg/kg. Este padrão se repete em estudos realizados com coelhos e bezerros. A CHX não é eficaz contra infecções sistêmicas por administração parenteral, portanto, seu uso é restrito à anti-sepsia tópica profilática via oral ou cutânea. Esta relativamente simples avaliação da toxicidade foi seguida por testes crônicos em ratos durante períodos de três meses, um ano e dois anos. A única variação verificada nesses testes foi o aparecimento de células gigantes na região abdominal, nenhum tumor ou quaisquer outras manifestações tóxicas foram observadas em nenhum dos tecidos examinados. Esses testes iniciais foram complementados com avaliações de efeitos teratogênicos, reprodutivos e de sensibilização da pele em ratos e de irritação dos olhos em coelhos. O resultado desses estudos foi totalmente satisfatório na medida em que nenhuma alteração teratogênica ou reprodutiva foi encontrada. O uso humano demonstrou que concentrações de CHX 2 % podem causar desconforto

cutâneo e que concentrações de até 0,2 % são toleradas pelos olhos. Estabeleceu ainda que pelos testes de toxicidade animal realizados anteriormente e por muito tempo de experiência clínica, a CHX tem um nível anormalmente baixo de toxicidade em animais e nos seres humanos. Por esta razão, concluiu que a utilização clínica da CHX na higiene bucal pode prosseguir com segurança.

RÖLLA; MELSEN (1975) realizaram importante trabalho sobre o mecanismo de inibição da placa bacteriana pela CHX. Demonstraram que essa intensa ação inibidora da placa é uma propriedade única das bis-guanidas e que se dá pelo fato de como elas são retidas na cavidade bucal. Cerca de 30 % da CHX é retida na boca durante o bochecho, sendo que os dentes não são os principais locais de ligação, mas sim a placa bacteriana retida nos dentes. Essa ligação se dá de forma eletrostática entre os grupos de proteínas ácidos e as moléculas básicas das bis-guanidas. No presente estudo, extratos protéicos extraídos de glândulas salivares maiores mostraram estar vinculados à droga entre pH 3,0 e 6,4; apenas extratos retirados da glândula sublingual estavam vinculados em pH inferior a 3,0. Sugeriu-se ainda que cátions divalentes poderiam provocar um deslocamento lento da CHX de sítios carboxila presentes na mucosa oral, placa bacteriana e cálculos gengivais explicando seu mecanismo de ação a longo prazo. Concluíram que o mecanismo de inibição da placa bacteriana pela CHX se dá pelo fato de que o número de bactérias disponíveis na saliva para promover a adsorção aos dentes é significativamente reduzido.

HULL (1980) estudou três diferentes métodos de inibição química da placa bacteriana por meio de enzimas, antibióticos e anti-sépticos. O método mais eficiente e mais empregado de inibição do crescimento da placa bacteriana é a remoção mecânica; porém, a motivação e a habilidade para se alcançar o sucesso está acima da capacidade de um enorme número de pacientes. Deste modo, alternativas de controle da placa vêm sendo exaustivamente estudadas como é o caso da inibição química. Os diferentes métodos de controle químico da placa aqui investigados produziram resultados variáveis. As investigações com enzimas específicas ou com sistemas enzimáticos múltiplos produziram resultados conflitantes, obtendo sucesso em pesquisas *“in vitro”*, mas não *“in vivo”*, com resultados decepcionantes com pouca inibição da placa e efeitos desagradáveis após o uso. O uso de antibióticos, principalmente os de amplo espectro de ação, se mostraram eficazes na inibição da placa bacteriana; porém, há problemas potenciais

no seu uso prolongado tais como o desenvolvimento de cepas resistentes, promovendo futura ineficiência da droga, aumento de outras partes da flora oral como é o caso da *Candida Albicans*, onde a droga não tem ação alguma e, por fim, reações de hipersensibilidade. Concluíram que o bochecho com CHX é o método mais utilizado para a inibição química da placa bacteriana, porém a CHX provou não ter efeito sobre a placa bacteriana sub-gengival e seu uso causa efeitos adversos, como o manchamento dos dentes. Este agente não substitui o método mecânico de remoção da placa bacteriana (escovação), mas provou ser um complemento útil para sua inibição.

DELANY et al. (1982) avaliaram a redução microbiana frente ao uso da CHX a 0,2 % em tratamento de canais radiculares. Quarenta dentes recém – extraídos com polpas necróticas foram tratados endodônticamente sob condições clínicas simuladas. Amostras bacteriológicas foram obtidas antes, durante, imediatamente após e 24 horas após a instrumentação, utilizando como substâncias de irrigação a CHX 0,2 % e a solução salina estéril. Houve uma redução altamente significativa de microorganismos nos canais radiculares nas amostras tratadas com CHX. Novas reduções significativas foram observadas após curativo de demora com CHX após 24 horas. Os dentes tratados com solução salina também demonstraram uma diminuição generalizada na flora após os procedimentos biomecânicos, no entanto, houve um aumento absoluto no número de microorganismos de 80 % nas amostras unirradiculares e de 50 % nas amostras multirradiculares, quando a medicação intracanal não foi aplicada. Concluíram que a CHX em solução a 0,2 % pode ser um agente antimicrobiano muito eficaz quando usado como solução de irrigação endodôntica e que como curativo intracanal ajuda a reduzir ainda mais as bactérias restantes dentro do sistema de canais radiculares.

LAFFORGUE et al. (1997) estudaram a absorção percutânea da solução de digluconato de CHX por meio de difusão estática celular. Utilizaram pele intacta e ferida de tecido abdominal de ratas. Verificaram que a absorção em pele sadia foi de 0,01 % e em pele ferida é de 0,87 %. Concluíram que a absorção percutânea da CHX depende do estado em que a pele se encontra.

SIQUEIRA; UZEDA (1997) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes medicamentos, (G1) pasta de Ca(OH)_2 com água destilada; (G2) gel de CHX 0,12 %; (G3) gel de metronidazol 10 %; (G4) pasta de Ca(OH)_2 com glicerina e (G5) pasta

de Ca(OH)_2 com paramonoclorofenol canforado. A metodologia utilizada foi o teste de difusão em ágar. As zonas de inibição promovida pelos medicamentos foram medidas e comparadas. Os resultados mostraram que o G5 promoveu as maiores zonas de inibição contra todos os microrganismos testados, o G2 também foi inibitório contra todas as cepas, mas, no geral, não foi mais eficaz do que o G5. O G3 também foi eficaz contra todas as cepas testadas, no entanto, foi mais eficaz do que o G5 apenas contra dois microrganismos. Os G1 e G4 foram ineficazes contra todas as cepas testadas neste experimento. Concluíram que a zona de inibição promovida pelo G5 foi tão boa quanto aos outros medicamentos testados, porém este estudo foi realizado “*in vitro*” sendo que a extrapolação dos resultados para a prática clínica deve ser feita com cautela.

HELING; CHANDLER (1998) avaliaram por meio de espectrofotometria, a capacidade antimicrobiana de diferentes irrigantes endodônticos contra monoculturas de “*Enterococcus Faecalis*”. Compararam os irrigantes: solução salina, EDTA, peróxido de hidrogênio em concentrações de 1,5 a 3 %, CHX variando a concentração de 0,1 a 1,8 % e NaOCl 1 %. Utilizaram para o estudo, incisivos bovinos artificialmente contaminados. Os irrigantes foram utilizados individualmente ou em associação. Amostras de dentina foram colhidas imediatamente após instrumentação de cada uma das limas ISO 0.23; 0.25; 0.27; 0.29; 0.31; 0.33 e 0.35 e submetidas a crescimento bacteriano. Os resultados mostraram que a solução salina e o EDTA não diferiram estatisticamente, matando significativamente menos bactéria do que as demais soluções. Não houve diferença entre a CHX e o NaOCl. O NaOCl mostrou-se mais efetivo do que o peróxido de hidrogênio nas amostras de dentina próximas à luz do canal; em camadas mais profundas, essa diferença não existiu. A CHX mostrou-se mais eficaz em camadas de dentina próximas a luz do canal. Obtiveram conclusões iguais a de estudos anteriores onde a CHX e o NaOCl mostraram-se igualmente eficazes como agentes antimicrobianos. Contudo, as propriedades de dissolução tecidual do NaOCl o tornam o irrigante de escolha. No entanto, combinações específicas de CHX e peróxido de hidrogênio tiveram efeito sinérgico, o que sugere potenciais benefícios da sua utilização como irrigante. Eles também podem representar um caminho promissor para erradicação da infecção por “*Enterococcus Faecalis*” persistente em casos de retratamento, isso deve ser mais explorado em futuros estudo “*in vivo*”.

LEONARDO et al. (1999) avaliaram “*in vivo*”, através de técnicas de cultura e zonas de inibição, o efeito antimicrobiano da CHX 2 % usada como solução irrigante. Doze pacientes foram selecionados para o estudo e após criterioso acesso ao canal radicular uma amostra bacteriana inicial foi retirada do interior do canal com o auxílio de um cone de papel estéril. Realizou-se o preparo químico mecânico com irrigação de 1,8 ml de CHX a 2 % a cada troca de lima. Em seguida uma mecha de algodão estéril foi mantida na embocadura de cada canal e o dente foi devidamente restaurado com óxido de zinco e eugenol. Decorridas 48 horas, os selamentos foram removidos e uma segunda amostra foi retirada do interior dos canais. Os resultados mostraram eliminação total de “*Streptococcus Mutans*” e eficácia antimicrobiana de 77,78 % para anaeróbios na análise após 48 horas da realização da instrumentação. Sugeriram, frente aos resultados obtidos neste trabalho e em outros estudos “*in vivo*”, que a CHX 2 % pode ser utilizada, como solução irrigante em canais radiculares, devido à sua atividade antimicrobiana intracanal.

BARTHEL et al. (2000) avaliaram a infiltração bacteriana em dentes obturados endodônticamente, verificando se a medicação intracanal utilizada antes da obturação final tem efeito inibitório na infiltração de microrganismo no interior do canal radicular. Noventa e três dentes unirradiculares foram selecionados, padronizados, esterilizados e divididos aleatoriamente em 4 grupos, n = 20, de acordo com as medicações usadas. G1 gel CHX 5 %; G2 Ledermix (associação de antibiótico com corticosteróide); G3 associação de Ca(OH)_2 e água e G4 nenhuma medicação. Todos os dentes foram obturados através da técnica da condensação lateral e AH 26 como cimento obturador. Das raízes restantes, cinco não foram obturadas, cinco foram obturadas apenas com guta-percha e ambos os grupos serviram como controle positivo, para o controle negativo; 3 dentes foram tratados como o grupo que não recebeu medicação intracanal e foram totalmente impermeabilizados com cera. Utilizou-se o teste de infiltração bacteriana como metodologia. Os espécimes foram, impermeabilizados utilizando-se cera, com exceção da superfície coronária e 2 mm apicais e fixados em tubos plásticos com duas câmara de vidro (uma superior e uma inferior) de maneira com que a porção coronária estivesse sempre em contato com o meio de cultura contaminado com *Staphylococcus Epidermidis* e a porção apical com meio de cultura estéril. Por um período de um ano, diariamente as culturas foram lidas verificando-se a presença de turbidez, o que indicaria a contaminação. Os grupos controles positivos foram os que

infiltraram em menor tempo, o grupo controle negativo permaneceu livre de turbidez durante todo o experimento. O G3 foi o que apresentou menor contaminação, seguido pelos G4, G1 e G2 respectivamente. Concluíram que o Ca(OH)_2 foi o medicamento que melhor impediu a penetração de bactérias no interior do canal radicular seguido pela CHX e Ledermix.

GOMES et al. (2001) avaliaram “*in vitro*” através do teste de diluição em caldo (infusão cérebro-coração) a eficácia de diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5 %, 1 %, 2,5 %, 4 % e 5,25 % e duas formas de CHX (solução e gel) em três diferentes concentrações 0,2 %, 1 % e 2 %. Os irrigantes foram colocados em contato direto com culturas puras de *Enterococcus Faecalis* por 10, 30 e 45 segundos, 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos, 1 e 2 horas. Após cada período de tempo 1 mL de cada amostra foi transferida a tubos de ensaio contendo meios de cultura estéreis com associação de neutralizadores para se evitar ação residual das substâncias. Os resultados mostraram que todas as substâncias testadas foram capazes de matar o *Enterococcus Faecalis*, porém, em diferentes períodos de tempo. Os irrigantes mais eficazes foram os apresentados na forma de solução tanto para o NaOCl como para a CHX. Porém o gel de CHX 2 % se mostrou eficaz em matar os microrganismos testados, visto que o período necessário foi de 1 minuto.

FERRAZ et al. (2001) avaliaram a capacidade de limpeza das paredes, internas do canal radicular, após preparo químico-mecânico e a desinfecção promovidas pelo gel de CHX 2 %. Setenta dentes recém extraídos foram utilizados. Os espécimes foram esterilizados e posteriormente contaminados com *Enterococcus Faecalis* e divididos em três grupos; G1 irrigação com gel de CHX 2 %; G2 irrigação com solução de CHX 2 % e G3 irrigação com NaOCl 5,25 %. Os resultados não foram estatisticamente significantes e mostraram que 20 % dos dentes permaneceram contaminados no G1, 45 % nos G2 e G3. Frente à limpeza das paredes após o preparo químico mecânico, o G1 foi o que apresentou melhor resultado depois do grupo controle positivo superando a solução de CHX e NaOCl. Concluíram que o gel de CHX, à base de hidroxietilcelulose, tem ótimo potencial como irrigante endodôntico de rotina, pois provou possuir baixa toxicidade e amplo espectro antimicrobiano.

BASRANI et al. (2002) avaliaram a substantividade antimicrobiana de diferentes medicamentos na dentina radicular humana. Noventa e oito dentes unirradiculares foram padronizados com 6 mm de comprimento, diâmetro da luz do

canal correspondente a broca Gates-Glidden (GG) nº 3, esterilizados, imersos em meio BHI, secos com papel absorvente estéril e fixados no fundo de placas de Petri. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, G1 gel CHX 2 %; G2 gel CHX 0,2 %; G3 solução CHX 2 %; G4 Ca(OH)_2 associado ao gel puro; G5 Ca(OH)_2 associado ao gel CHX 0,2 %; G6 solução CHX 2 % e um núcleo polimérico de liberação lenta de CHX; G7 solução salina estéril; G8 gel puro; 0,1 mL de cada medicamento foi colocado no interior dos canais e os dentes selados e incubados por 7 dias a 37 °C. Inóculos bacterianos de *Enterococcus Faecalis* foram injetados no interior dos canais e repostos a cada dois dias durante 21 dias. Ao final do período de inoculação, duas amostras de raspas de dentina foram removidas com brocas GG nº 4(a) e nº 5(b), e incubadas em meio BHI a 37 °C por 72 horas, a turbidez do meio determinou o crescimento bacteriano. A densidade óptica (DO) do caldo foi lida através de espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. No grupo 3, os valores de DO da amostra de dentina (a) apresentaram valores significativamente menores do que a amostra de dentina (b). No grupo 4 a amostra (a) teve significativamente valores de DO mais elevados do que a amostra (b). Em todos os outros grupos, os valores da amostra (a) e (b) não diferiram significativamente. Amostras dos grupos 1, 3 e 6 tiveram respectivamente e significativamente valores menores de DO do que aqueles dos grupos 7 e 8 (controles positivos) para (a) e (b). Neste experimento, os medicamentos foram testados em monoculturas sendo que as doenças endodônticas são causadas principalmente por infecções mistas. O medicamento que é eficaz contra um único microrganismo pode não ser necessariamente eficaz contra uma complexa flora microbiana “*in vivo*”. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a eficácia da CHX contra outros reconhecidos patógenos endodônticos.

GOMES et al. (2003) avaliaram a efetividade do gel de CHX 2 % e do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) como medicação intracanal contra o *Enterococcus Faecalis*. Cem incisivos centrais superiores bovinos foram utilizados e sofreram contaminação com este patógeno durante sete dias. As amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada. G1 gel de CHX; G2 Ca(OH)_2 combinado com polietilenoglicol 400; G3 gel de CHX combinado com Ca(OH)_2 ; G4 infusão cérebro coração (grupo controle). As medicações foram colocadas no interior do canal e as avaliações de contaminação foram realizadas em

diferentes períodos de tempo 1, 2, 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que o gel de CHX sozinho inibiu completamente o microrganismo depois de 1, 2, 7 e 15 dias. O Ca(OH)_2 combinado com o polietilenoglicol 400 não foi eficaz contra o microrganismo em nenhum período de avaliação. O gel de CHX combinado com o Ca(OH)_2 foi eficaz somente no primeiro e segundo dias de análise. Houve diferença estatística entre as medicações e os períodos de tempo avaliados, o gel de CHX sozinho se mostrou efetivo contra o *Enterococcus Faecalis* até um período de 15 dias de medicação.

ZAMANY et al. (2003) realizaram um estudo "in vivo" empregando dois protocolos terapêuticos nos quais, após o preparo químico mecânico com hipoclorito de sódio, utilizava-se uma irrigação final por 30 segundos com 4 mL de solução salina ou de CHX 2 %. O método de avaliação utilizava meios de cultura, nos quais os indicadores biológicos foram colhidos do próprio canal de dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. O protocolo utilizando CHX gerou cultura positiva em apenas 1 de 12 casos, contra 7 de 12 casos com solução salina. A introdução do digluconato de CHX 2 % na irrigação final realizada imediatamente após o preparo biomecânico melhorou a eficiência da terapêutica endodôntica no que diz respeito à ação antimicrobiana. A irrigação extra após o preparo biomecânico mostra ter uma relevância clínica importante.

ESTRELA et al. (2003) avaliaram o efeito antimicrobiano do NaOCl a 2 % e da CHX a 2 % usando como metodologia os testes de difusão em ágar e exposição direta. Cinco microrganismos: *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus Subtilis*, *Candida Albicans*, e uma mistura foram utilizados. As cepas foram inoculadas em infusão cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para o teste de difusão em ágar, 18 placas de Petri com 20 mL de ágar BHI foram inoculadas com 0,1 mL das suspensões microbianas. 54 discos de papel com 9 mm de diâmetro foram imersos nas soluções experimentais durante 1 min. A seguir, em cada placa, 3 discos de papel contendo uma das soluções irrigantes foram colocadas sobre a superfície do ágar BHI. As placas foram mantidas por 1 hora em temperatura ambiente, e incubadas a 37 °C por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição microbiana foram medidos de forma perpendicular entre si, valendo-se da média dessas medidas. Para o teste de exposição direta, 162 pontas de papel absorvente estéreis de diâmetro 50 foram imersas na suspensão

experimental por 5 min., e foram colocadas sobre uma placa de Petri cobertas com 10 mL de uma das soluções irrigantes, ou com a água destilada. Em intervalos de 5, 10 e 30 min., as pontas de papel foram removidas do contato com as soluções teste e individualmente transportadas e imersas em 7 mL de Letheen Broth e incubadas a 37 °C por 48 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Um inóculo de 0.1 mL obtido do meio Letheen Broth foi transferido para 7 mL do BHI, e incubado nas mesmas condições descritas. O crescimento microbiano foi novamente avaliado pela turbidez do meio de cultura. Os resultados mostraram efetividade antimicrobiana para ambas soluções irrigadoras testadas. A magnitude do efeito antimicrobiano foi influenciada pelo método experimental, pelos microrganismos e pelo tempo de exposição.

ROSENTHAL et al. (2004) avaliaram a substantividade da CHX na modelagem do canal radicular e quantificaram a duração do efeito antimicrobiano residual após a obturação endodôntica. Sessenta dentes bovinos foram expostos à solução aquosa de digluconato de CHX 2 % por 10 minutos. Em seguida, os dentes foram obturados. Utilizando espectrofotometria, verificou-se a presença de digluconato de CHX no estrato de dentina raspado dos segmentos radiculares tratados após a remoção da obturação e armazenagem por períodos de 1 dia, 3, 6 e 12 semanas. Com a utilização de cultivo em meio de cultura, avaliou-se a ação antimicrobiana frente ao "*Enterococcus Faecalis*". Detectou-se, no estrato de dentina, digluconato de clorexidina a 0,0048% (1 dia); 0,0023% (3 semanas); 0,0016% (6 semanas) e 0,0010% (12 semanas) e a ação antimicrobiana foi inversamente proporcional ao período de armazenamento. Os autores relataram que o digluconato de CHX permanece na dentina do canal radicular com eficiência antimicrobiana por mais de 12 semanas e, apesar do hipoclorito de sódio ser ainda considerado a solução de escolha, a utilização do digluconato de CHX pode ser vantajosa em casos com infecção primária e, ainda mais importante, nos retratamentos. O digluconato de CHX pode ser aplicado alternadamente durante o preparo químico mecânico ou como medicação intra canal. Ainda foi relatado que o digluconato de clorexidina a 0,0002% ainda apresenta ação antimicrobiana elevada.

BASRANI et al. (2004) investigaram o pH, a capacidade de umectação, o tempo de trabalho, a radiopacidade, e a viscosidade das seguintes medicações intra canais: (G1) gel de digluconato de CHX 2 %, (G2) gel de digluconato de CHX 0,2 %, (G3) gel de hidróxido de cálcio a 40 % misturado com digluconato de CHX 0,2%,

(G4) gel de hidróxido de cálcio a 40 % e (G5) gel controle. A consistência de gel foi conseguida por meio da utilização de "methylcellulose 400 USP 1 g / 100 mL". Os autores observaram que a medicação intracanal contendo a associação do hidróxido de cálcio com o digluconato de CHX 0,2 % manteve os mesmos níveis de pH, tempo de trabalho e radiopacidade do gel de hidróxido de cálcio isolado. Entretanto, a umectação e a viscosidade da mistura foram elevadas. Os autores concluíram que todas as medicações intra canais testadas apresentam propriedades físico químicas satisfatórias para serem utilizadas na terapêutica endodôntica. Os autores discutiram o significado clínico da elevação da viscosidade como da capacidade de umectação ou molhamento mostrado pela mistura. Medicações intracanaís mais viscosas podem oferecer problemas para a introdução no canal radicular via cânulas ou agulhas. Em contraste, a capacidade de umectação elevada permite que o medicamento entre em contato com a superfície dentinária de maneira mais eficaz podendo penetrar em reentrâncias, no sistema de canais radiculares e, até mesmo, nos túbulos dentinários com mais eficiência elevando seu potencial terapêutico.

DAMETTO et al. (2005) avaliaram a ação antimicrobiana da CHX e do NaOCl contra o *Enterococcus Faecalis*, através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Oitenta dentes unirradiculares foram preparados até diâmetro #25, esterilizados e contaminados por sete dias com monocultura de *Enterococcus Faecalis*. Os espécimes foram divididos em cinco grupos, G1 gel CHX 2 %; G2 solução CHX 2 %; G3 NaOCl 5,25 %; G4 água destilada e G5 gel natrosol puro. A fim de se avaliar a ação antimicrobiana, três diferentes amostras bacterianas foram registradas, antes do preparo biomecânico, imediatamente após o preparo e sete dias após o preparo. O gel e a solução de CHX reduziram significativamente o número de (UFC) para o *Enterococcus Faecalis* imediatamente e sete dias após o preparo biomecânico. O hipoclorito de sódio a 5,25 % também reduziu as (UFC) imediatamente após a instrumentação do canal, mas não foi capaz de manter o canal livre de *Enterococcus Faecalis*, que foram detectáveis nas amostras finais. Concluíram que a CHX em gel e solução, tem potencial antimicrobiano para uso como substância auxiliar durante o preparo biomecânico de canais radiculares.

BASRANI; LEMONIE (2005) revisaram uma série de artigos científicos sobre a CHX em diferentes aspectos, como, a sua estrutura molecular, mecanismo de ação, o uso na Odontologia, na Endodontia como substância irrigadora e medicação intracanal, substantividade e citotoxicidade. A CHX é uma molécula catiônica com

dois anéis simétricos 4-clorofenil ligados a duas bis-guanidas sendo mais encontrada na forma de digluconato por ser mais estável e solúvel em água. Possui amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, esporos, vírus e fungos. Em baixas concentrações tem ação bacteriostática eliminando principalmente potássio e fósforo do interior da célula, em concentrações elevadas atua como bactericida destruindo a membrana celular bacteriana precipitando o citoplasma. Ela vem sendo utilizada na Odontologia principalmente na Periodontia como inibidora do crescimento da placa bacteriana, em Endodontia seu uso como substância irrigadora e medicação intra canal vem aumentando, sendo que as concentrações mais comumente utilizadas variam de 0,12 % à 2 % na forma de solução e/ou gel. Concluíram que a CHX parece ser um medicamento potencial para o uso em Endodontia como substância irrigadora e/ou como medicação intracanal sozinha ou em conjunto com outros medicamentos.

ZEHNDER (2006) apresentou uma revisão da literatura sobre soluções irrigantes com ênfase na ação e interação das substâncias utilizadas na terapêutica endodôntica. Com relação à CHX, os autores explicaram que ela é uma base forte sendo mais estável na forma de sal sendo que, o digluconato de CHX, apresenta-se conveniente por ser solúvel em solução aquosa. A CHX é o anti-séptico mais potente da sua família química (bisguanidas). Ela tem sido utilizada na concentração de 0,1 a 0,2 % no controle da placa bacteriana e até 2 % na endodontia. É incapaz de dissolver tecido sendo, também, pouco efetiva contra bactérias Gram negativas. No entanto, é eficiente contra Gram positivos o que explica sua ação contra o *Enterococcus faecalis* (bactéria facultativa Gram positiva) e a credencia para ser utilizada nos retratamentos onde essa bactéria é predominante, mas desabona sua aplicação em infecções endodônticas primárias que geralmente são polimicrobiais, com alta prevalência de bactérias anaeróbias Gram negativas. Nesses casos, o gênero *Enterococcus* é raro. Os autores chamam a atenção para o alardeado efeito da CHX contra os microrganismos Gram positivos em laboratório. Isso pode gerar uma expectativa que talvez não seja possível de ser contemplada clinicamente. Contra bactérias anaeróbias, a CHX apresenta-se menos efetiva que o NaOCl, no entanto, essa diferença praticamente desaparece em testes com bactérias facultativas.

GOMES et al. (2006) investigaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) combinado com gel de CHX 2 % contra patógenos endodônticos e

compararam os resultados com os alcançados pelo Ca(OH)_2 combinado com água estéril e por gel de CHX 2 % sozinho. Utilizaram como métodos os testes de difusão em ágar e contato direto. Para o teste de difusão em ágar os resultados mostraram que o gel de CHX sozinho, foi o que produziu os maiores valores de inibição bacteriana, variando de 4,33 a 21,67 mm, seguido pela combinação de Ca (OH)_2 e gel de CHX que variou de 2,84 a 6,5 mm e de Ca (OH)_2 combinado com água estéril que não produziu nenhum alo de inibição. Para o teste de contato direto os resultados mostraram que o gel de CHX sozinho precisou de apenas 1 minuto ou menos para produzir a eliminação total dos microrganismos, o gel de CHX associado ao Ca (OH)_2 necessitou 30 segundos até 6 horas e o Ca (OH)_2 combinado com água estéril necessitou de 30 segundos até 24 horas. Concluíram que a combinação do, Ca (OH)_2 com o gel de CHX, produziram melhor atividade antimicrobiana do que a combinação do Ca (OH)_2 com água estéril e enfatizaram a importância do contato direto do medicamento intracanal com os microrganismos presentes no interior do canal radicular.

ZANATTA; RÖSING (2007) revisaram a literatura em relação ao mecanismo de ação e efeitos adversos da CHX, contextualizando o seu efeito sobre o biofilme formado e as repercussões clínicas de sua utilização. Concluíram que a CHX ocupa papel de destaque dentre os anti-sépticos utilizados para controle químico da placa na Odontologia. Entretanto, evidências recentes demonstram claramente a diminuição de sua eficácia no biofilme supragengival formado. Isso reforça a necessidade de uma remoção mecânica do biofilme previamente à sua utilização, com o intuito de potencializar seu efeito antiplaca e anti-gengivite, bem como diminuir seus efeitos adversos de manchamento e formação de cálculo dental.

FERRAZ et al. (2007) compararam a eficácia antimicrobiana do gel de CHX, soluções de CHX e NaOCl como irrigantes endodônticos. A atividade antimicrobiana das substâncias testadas foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. As zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas pela CHX gel a 0,2 %; 1 % e 2 % foram observados frente a 5 espécies de bactérias anaeróbias facultativas e 4 espécies de anaeróbios estritos, Gram-negativos e produtores de pigmento negro; e comparados com os resultados obtidos pelo NaOCl e pela CHX solução. As maiores zonas de inibição foram produzidas quando as bactérias testadas ficaram em contato com a CHX a 2 % em gel, apresentando diferença estatisticamente

significante quando comparados às zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas por todas as concentrações avaliadas de NaOCl, inclusive 5,25 %. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa comparando as zonas produzidas por concentrações equivalentes de CHX solução ou gel. Os resultados indicaram que a CHX em gel tem grande potencial para ser usada como substância química auxiliar devido às suas propriedades antimicrobianas.

EL-KARIN et al. (2007) revisaram a literatura a respeito dos efeitos antimicrobianos de irrigantes e medicações intracanal. Afirmaram que o NaOCl é o irrigante mais comumente utilizado no preparo do canal radicular, principalmente por deter a capacidade de dissolução tecidual. Contudo, problemas de biocompatibilidade oriundo da utilização do NaOCl em concentrações elevadas levaram ao uso de substâncias com propriedades antimicrobianas conhecidas e com menor toxicidade, como a CHX. A CHX é um antimicrobiano eficaz com baixa toxicidade, mas a sua principal desvantagem é a falta de capacidade de dissolução tecidual. As evidências mostram que a instrumentação mecânica, irrigação e uso de medicação intracanal são importantes para o sucesso da terapia endodôntica. No entanto, todos os irrigantes e medicações intracanaís disponíveis atualmente possuem limitações, portanto a busca para se alcançar a substância irrigadora e a medicação intracanal ideal continua.

SOARES et al (2007) mensuraram, através de teste em difusão ágar, a atividade anti-bacteriana residual de várias pastas à base de Ca(OH)_2 . Os canais radiculares foram instrumentados com o sistema Profile® e preenchidos com quatro diferentes pastas: G1- Ca(OH)_2 P.A. / solução anestésica; G2-Calen® / PMCC; G3-Calen® e G4- Ca(OH)_2 P.A. / solução de digluconato de CHX 2 %. Após 21 dias, amostras foram recuperadas dos canais radiculares com limas tipo K #60 e colocadas em placas de Petri com ágar semeado com "*Micrococcus luteus*". Após pré-difusão, incubação e otimização, as zonas de inibição do crescimento bacteriano foram mensuradas e analisadas. Verificou-se que todas as pastas apresentaram ação antibacteriana residual. Os halos de inibição do G4 foram significativamente superiores as de G1 e G2. Portanto, independentemente do veículo, todas as pastas à base de Ca(OH)_2 determinaram, em diferentes magnitudes, atividade anti-bacteriana residual mensurável. No mais, diferentemente do PMCC, a solução de digluconato de CHX 2 % ampliou de modo significativo a atividade anti-bacteriana residual do hidróxido de cálcio.

PAQUETTE et al. (2007) avaliaram "*in vivo*" (pacientes com periodontites apicais através de imagens radiográficas conclusivas), a ação antimicrobiana do digluconato de CHX a 2 % em solução aplicado após o preparo do canal radicular por um período de 7 a 15 dias. Três métodos foram utilizados na avaliação: (1) contagem de UFC em meios de cultura encubados em condição aeróbia e (2) anaeróbia, ambas em 37 °C por 14 dias e (3) análise microscópica. Os autores observaram que a medicação intracanal não elevou a proporção de dentes com culturas negativas nem diminuiu, significativamente, a contagem de bactérias nos canais radiculares após o preparo biomecânico. Foi detectado, na segunda sessão, que os canais que haviam sido completamente preenchidos por solução estavam vazios. Argumentou-se que a medicação de digluconato de CHX 2 % em estado líquido poderia ter escapado pelo forame apical ou ter difundido pela dentina comprometendo a terapêutica medicamentosa entre sessões. Os autores levantam a atenção para a necessidade de se desenvolver um carreador para o digluconato de CHX com o objetivo de controlar de maneira mais efetiva a infecção endodôntica ou, até mesmo, buscar alternativas para a medicação intracanal.

YEUNG et al. (2007) estudaram as propriedades pró-oxidativas e antioxidativas da CHX e sua interação com o DNA, para avaliar a segurança de seu emprego e formação de ROS através de quimiluminescência e por meio da utilização de gel de agarose a 0,8 % e eletroforese, avaliou-se o potencial degradativo do DNA. Os autores verificaram que a CHX, tanto com o hipoclorito de sódio como com o hidróxido de cálcio, exibe reações antioxidantes e pró-oxidantes. Reações de oxigenação podem matar a bactéria, mas também são capazes de destruir os tecidos adjacentes infectados. Desta maneira o potencial de genotoxicidade e de dano tecidual, quando extruído nos tecidos periapicais e em altas concentrações, deve ser considerado.

SEMENOFF et al. (2009) avaliaram, através do teste de difusão em ágar, o efeito antimicrobiano de 5 diferentes soluções de CHX 0,12 % manipuladas em farmácias, frente a monoculturas de "*Enterococcus Faecalis*". Foram selecionadas 20 placas de Petri, contendo meio de cultura ágar sangue, sendo que 4 destas foram destinadas ao controle negativo. Os microrganismos foram inoculados em 16 placas, destas, 4 serviram como controle positivo. Nas 12 placas restantes foram inseridos 5 discos de papel absorvente embebidos nas substâncias testes de forma equidistantes e codificadas com os números de 1 a 5. Um disco foi embebido com a

substância controle, codificada com o número 6. Após o término desta etapa as placas foram mantidas em estufa com temperatura constante de 36 °C. A análise dos halos de inibição foi realizada após 72 horas. Concluíram que todas as soluções de CHX 0,12 % testadas foram efetivas contra o microrganismo "*Enterococcus Faecalis*".

MOHAMMADI; ABBOTT (2009) revisaram a literatura em relação a vários aspectos da CHX dentre os quais, sua estrutura e o mecanismo de ação; atividade antibacteriana; atividade antifúngica; ação nos biofilmes; substantividade; efeito sobre a dentina; dissolução tecidual; interação com o Ca(OH)_2 ; infiltração microbiana coronária e apical após seu uso; interação com o NaOCl; citotoxicidade e reações alérgicas. Concluíram que a CHX é uma guanidina sintética bicatiônica. É uma molécula carregada positivamente que interage com a membrana celular das bactérias, tem uma vasta atividade contra microrganismos Gram positivos e Gram negativos; é um agente antifúngico eficaz especialmente contra "*Candida albicans*"; seu efeito sobre biofilmes microbianos é significativamente menor do que o NaOCl; possui substantividade antibacteriana em dentina por até 12 semanas; alguns componentes da dentina como o colágeno, microorganismos mortos e exsudato inflamatório no sistema de canais radiculares podem reduzir ou inibir sua atividade antibacteriana; possui pouca ou nenhuma capacidade de dissolver tecidos orgânicos; sua mistura com Ca(OH)_2 pode aumentar sua atividade antimicrobiana; quando utilizada como medicação intracanal ou substância de irrigação atrasa a contaminação do canal; em combinação com o NaOCl causa mudança de cor e formação de um precipitado que pode alterar no selamento apical da obturação; pode melhorar significativamente a adesão da camada híbrida; sua biocompatibilidade é aceitável e em casos raros pode causar reações alérgicas.

VALERA et al. (2010) avaliaram, por meio de MEV, a limpeza das paredes do canal radicular após o preparo químico mecânico com diferentes soluções: (G1) NaOCl + CHX solução; (G2) NaOCl + CHX solução + EDTA; (G3) NaOCl + CHX gel; (G4) NaOCl + CHX gel + EDTA; (G5) solução salina e (G6) solução salina + EDTA. Sessenta dentes unirradiculares humanos foram divididos em seis grupos de acordo com as substâncias utilizadas: O maior número de túbulos dentinários abertos, foi encontrado no G4, em todos os terços das raízes, exibindo 70% dos túbulos dentinários abertos, a irrigação com CHX líquida (G1 e G2) apresentaram maior

número de túbulos fechados, com apenas 45% dos túbulos abertos. Foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos. O G4 apresentou a melhor limpeza e foi similar ao G3 e G6. A menor porcentagem de túbulos abertos foi observado no G1, sendo semelhante ao G2. Concluíram que a irrigação com NaOCl, seguido pela irrigação com solução salina e irrigação final com CHX gel, produziram a melhor limpeza das paredes dos canais, enquanto que a associação de NaOCl com CHX solução apresentou os piores resultados. O uso do EDTA ao final do preparo químico mecânico promoveu melhora da remoção e limpeza do “*smear layer*”.

2. Da *para*-cloroanilina

CHHABRA et al. (1991) analisaram, histologicamente e através de dissecação, ratos submetidos a dietas contendo *pCA* com o intuito de verificar sua toxicidade. Grupos de 50 ratos de cada sexo foram submetidos aleatoriamente a uma solução de *pCA* em água deionizada, em doses de 0; 2; 6 ou 18 mg / kg de peso corporal, 5 dias por semana durante 103 semanas. Grupos de 50 machos e fêmeas de camundongos também receberam doses de 0; 3; 10 ou 30 mg / kg durante o mesmo período. Em geral os pesos corporais e sobrevida não foram afetados pela administração de *pCA*. Em ratos, o grupo que recebeu 18 mg / kg teve anemia hemolítica leve e ligeiros aumentos de metahemoglobina em vários momentos durante o estudo. Fibrose do baço foi significativamente maior em todos os grupos tratados com *pCA* de ratos machos e no grupo de ratas que recebeu 18 mg / kg. Sarcomas do baço ocorreu em ratos machos, sendo sua incidência 0 / 49; 1 / 50; 3 / 50 e 38 / 50 no controle de baixa, média e alta dose de grupos, respectivamente. Houve pouco aumento da incidência de feocromocitomas da glândula adrenal em ambos os sexos de ratos. Alguns grupos de ratos do sexo masculino apresentaram aumento da incidência de adenomas ou carcinomas hepatocelular (11 / 50; 21 / 49; 20 / 50 e 21 / 50) nos controles, grupos de baixa, média e alta dose, respectivamente. Hemangiossarcoma de fígado ou baço foram também aumentados no grupo de alta dose (incidência de 4 / 50, 4 / 49, 1 / 50 e 10 / 50 em controles, de baixa, média e alta dose de grupos, respectivamente). Em conclusão, *pCA* foi carcinogênica no sexo masculino em ratos e camundongos.

VALENTOVIC et al. (1996) avaliaram “*in vitro*” a toxicidade da *orto*-cloroanilina e *para*-cloroanilina em comparação com 4-amino-3-clorofenol, 2-amino-

5-clorofenol e aminofenóis sobre células renais e hepáticas. A toxicidade foi monitorada através da mensuração dirigida do glicogênio piruvato e extravasamento de lactato desidrogenase (LDH). O tecido hepático foi menos suscetível à toxicidade do que o tecido renal para todos os compostos. Os estudos indicaram que fatias corticais renais ou hepáticas pode ser modelo “*in vitro*” para examinar a toxicidade das cloroanilinas. O rim foi mais sensível do que o fígado para todos os compostos testados. *Orto*-cloroanilina e *para*-cloroanilina foram os compostos menos nefrotóxicos, enquanto que a adição de um grupo hidroxila para formar um aminoclorofenol resultou em maior toxicidade renal. Estes resultados sugerem que os aminoclorofenóis são mais tóxicos para os rins, desde que o agente tóxico possa alcançá-lo. O potencial nefrotóxico em fatias corticais renais foi de 4-aminofenol > 2-amino-5-clorofenol > 4-amino-3-clorofenol > 2-amino-clorofenol > *orto*-cloroanilina = *para*-cloroanilina.

BELOW et al. (2004) determinaram no soro e na urina (material biológico), por meio de HPLC, a presença da CHX e produtos de sua degradação: *p*CA e *para*-nitroclorobenzeno. Reportaram que a metodologia foi eficaz na determinação dos compostos, mas tiveram dificuldade em quantificar a *p*CA devido a sua instabilidade e transformação em *para*-nitroclorobenzeno.

BASRANI et al. (2007) avaliaram qualitativamente e quantitativamente, através de espectrofotometria de raio X e espectrometria de massas respectivamente, o precipitado formado entre o NaOCl e CHX, avaliaram também a concentração mínima de NaOCl necessária para dar origem ao precipitado quando misturado a solução de CHX a 2 %. Para verificação da alteração de cor e do precipitado nove tubos de plástico tipo Eppendorf® foram utilizados com concentrações de NaOCl conhecidas 6 %, 3 %, 1,5 %, 0,75 %, 0,38 %, 0,19 %, 0,094 %, 0,047 % e 0,023 %. Para o controle utilizaram mais dois tubos sendo um apenas com NaOCl e outro apenas com CHX. Para determinar a concentração mínima de NaOCl em que uma mudança de cor ocorreu e um precipitado foi formado 0,5 mL de CHX a 2 % foi adicionada em cada um dos nove tubos, os tubos foram analisados a cada 15 min. nas primeiras duas horas e uma vez após 1 semana. Este teste foi repetido dez vezes e a concentração mínima necessária para a mudança de cor e a formação do precipitado foram registrados. Para caracterizar o precipitado formado seis Eppendorf® foram preparados com concentrações diluídas

de NaOCl 6 %, 3 %, 1,5 %, 0,75 %, 0,38 % e 0,19 % e 0,5 mL de 2 % de CHX foi adicionado, como descrito acima. As amostras secas foram então analisadas em espectrofotometria de raio X e espectrometria de massas. Os resultados mostraram que a mudança de cor ocorreu em todos os nove tubos onde a CHX foi adicionada, incluindo o com a menor concentração de NaOCl 0,023 %. Com o aumento da concentração de NaOCl, a gama de cores variou de pêssego ao marrom. Os resultados mostraram a presença de *pCA* em todos os tubos analisados conferindo o valor de massa carga de 127 correspondente ao padrão analisado, a concentração de *pCA* encontrada variou conforme a concentração de NaOCl inicialmente presente.

GRASSI et al. (2007) avaliaram, através de ensaio cometa (migração de DNA em gel de agarose sobre eletroforese), se o sangue, fígado, rins e células urinárias da bexiga são particularmente sensíveis para sofrer dano no DNA após a exposição gastrointestinal a CHX. Os resultados mostraram que para as células urinárias da bexiga e hepáticas não demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Por outro lado, células do sangue e dos rins apresentaram diferença estatisticamente significativa quando tratadas com CHX. Nenhum animal testado morreu durante os experimentos. Concluíram no estudo que sangue e rins são órgãos particularmente sensíveis a sofrer alterações no DNA quando expostos a CHX. Os resultados do estudo servem de alerta para uma correta avaliação do potencial de riscos à saúde, à exposição da CHX, visto que danos ao DNA é um evento carcinogênico importante para o desenvolvimento de um câncer.

BARBIN et al. (2008) analisaram, através de espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a degradação da CHX e da CHX associada ao Ca(OH)_2 . Uma solução estoque de *pCA* e CHX foram preparadas e analisadas como padrão de resposta para a comparação com o resultado das amostras. Como metodologia analisaram a solução de CHX 0,2 % e a solução de CHX 0,2 % associada ao Ca(OH)_2 , imediatamente, 7 e 14 dias após a sua confecção. A análise da CHX sozinha, não demonstrou *pCA* na análise inicial; após 7 dias a CHX se degradou em vários subprodutos ainda sem a presença de *pCA*; após 14 dias a degradação da CHX foi total e a *pCA* se mostrou presente. Para a mistura de CHX e Ca(OH)_2 a presença de ROS foi notada na análise inicial e de 7

dias, em ambas a presença de *pCA* não foi observada, houve ausência dos picos de referência da CHX a partir da análise de 7 dias o que sugere que a degradação da CHX foi total a partir deste período. Na análise de 14 dias não foi detectada a presença de *pCA*. Frente a esses resultados, os autores sugerem que mais pesquisas são necessárias para avaliar qual concentração de CHX é segura para uso humano e contemple a maioria das propriedades ideais.

PIZON et al. (2009) relataram um caso em que um homem de 20 anos de idade, estava trabalhando em uma fábrica de resíduos químicos quando desenvolveu tonturas, dor abdominal e náuseas. Aos exames notou-se coma, taquicardia, cianose e oximetria de pulso de 75%. A gasometria arterial revelou pH 7,38; pCO_2 41 mm/Hg e 69 % de metahemoglobina. A administração de azul de metileno 2 mg / kg levou à completa recuperação sem sequelas, *pCA* foi mais tarde identificada como o produto químico envolvido. Ele negou o contato direto com o produto químico, mas não estava usando uma máscara de pó ou respirador. GC-MS confirmou a presença de *pCA* e metabólitos na urina do paciente. Concluíram que a exposição dérmica e a inalação de poeira e aerossóis de *pCA* pode levar a risco de morte por metahemoglobinemia. O estresse oxidativo rapidamente é neutralizado com a administração de azul de metileno e o diagnóstico pode ser confirmado com a análise da urina do paciente em GC-MS, na busca de *pCA* e seu metabólito primário *p*-chloroacetanilide.

BASRANI et al. (2010) determinaram através de CG-MS a presença de *pCA* no precipitado formado após a interação de NaOCl e CHX. Analisaram em CG-MS, como padrões de resposta de comparação dos resultados, anilina, 2-cloroanilina, 3-cloroanilina, 4-cloroanilina e cloro benzeno. Para a formação do precipitado, 0,5 mL de NaOCl a 6 % e 0,5 mL de CHX a 2 %. O precipitado formado foi analisado em CG-MS com os seguintes parâmetros 1 mL de injeção, temperatura de injeção de 250 °C, razão de separação de 25 : 1, gás de arraste foi hélio em mL / min. sendo a temperatura inicial do forno de 60 °C, rampa 1, 12 °C / min. até 100 °C, mantida por 5 minutos, rampa 2, 35 °C / min até 300 °C, com coluna ZB-5MS (30 m x 0.25 μ m x 0.25 μ m). A análise cromatográfica dos padrões de 2-cloroanilina, 3-cloroanilina, e 4-cloroanilina foram TR = 6,71; 8,74 e 8,83 mim. respectivamente. O pico para a *pCA* está no padrão TR = 8,83 mim. e um pico aparece em 8,89 na amostra do precipitado, que é *pCA*. Não foram encontrados quaisquer derivados de anilina ou

outros cloro benzenos no precipitado analisado. Apenas *pCA* foi encontrada. Em conclusão, verificou-se apenas a presença de *pCA* no precipitado formado quando NaOCl 6,0 % e 2,0 % de CHX são misturados. Devido ao seu possível efeito tóxico, os autores aconselham não combinar NaOCl com CHX, até que mais informações sobre seus efeitos em seres humanos seja comprovado.

THOMAS; SEM (2010) avaliaram, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a composição do precipitado formado a partir da união de CHX e NaOCl. Analisaram inicialmente padrões de CHX e *pCA* puras para servirem de referência; o precipitado analisado foi obtido a partir da mistura de 50 mL de solução de CHX 2 % e 50 mL de solução de NaOCl 5,25 % sendo coletado após 1 hora da união, a amostra então foi desidratada e repartida ao meio, em uma delas foi inserido 0,1 mg / mL de *pCA* pura, para então serem submetidas a RMN. A RMN da CHX pura mostrou picos para os prótons do anel aromático em 6,71 e 6,85 ppm e para a *pCA* os picos 6,56 e 7,01 ppm foram identificados. Na análise do precipitado uma série de picos foram encontrados variando de 6,5 a 8,0 ppm, porém os picos característicos da *pCA* não foram encontrados. Concluíram que a mistura de NaOCl e CHX não produz *pCA* em qualquer quantidade mensurável e que mais pesquisas devem ser realizadas para se determinar a composição química do precipitado formado a partir da mistura entre estes produtos e seus efeitos nos dentes e tecidos periapicais.

KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN (2010) avaliaram a espessura e a composição do precipitado formado entre a interação de NaOCl e CHX, por meio de análise visual em lupa estereoscópica e ressonância magnética nuclear respectivamente. Quarenta dentes uni radiculares foram utilizados, os grupos foram divididos conforme as soluções de irrigação final, G(Ts) EDTA + NaOCl + CHX; G(Aba) álcool absoluto entre as soluções; G(Sal) solução salina entre as soluções e G(Dw) água destilada entre as soluções com o intuito de se remover o precipitado formado entre a mistura. As imagens estereoscópicas mostraram um precipitado alaranjado-marrom depositado ao longo da parede do canal no grupo (Ts), enquanto houve uma distribuição mais esparsa nos grupos (Sal) e (Dw). No grupo Aba, as imagens revelaram canais claros, sem evidência de deposição do precipitado. Os resultados mostraram maior espessura do precipitado nos terços cervical e médio dos canais radiculares apresentando diferença estatística significativa em relação ao terço apical que apresentou mínima formação. O teste de Beilstein e solubilidade em

HCl confirmou a presença de cloro e anilina. A análise de ressonância magnética nuclear revelou dois pares duplicados correspondente ao próton “*orto*” confirmando a posição “*para*” ocupada pelo cloro, revelando a presença de *p*CA. Os autores concluíram que a interação entre o NaOCl e a CHX forma um precipitado alaranjado-marrom insolúvel, sendo este de relevância clínica no que diz respeito a coloração, dificuldade no vedamento apical e no potencial de *p*CA liberado no periápice. A utilização intermediária do álcool absoluto com a solução final impediu a formação deste precipitado.

NOWICKI; SEM (2011) avaliaram, por meio de RMN, a composição química do precipitado formado entre a mistura de CHX e NaOCl. Amostras puras de CHX e *p*CA foram analisadas para servirem de padrão de comparação. O precipitado foi obtido a partir da mistura de 25 mL de CHX 2 % e 25 mL de NaOCl 5,25 % aquecidos a 37 °C. Duas amostras de 1,5 mL foram colhidas e submetidas à RMN. A análise espectral de RMN indicou claramente que existem dois produtos de degradação que são *para*-clorobenzenos substituídos, mas não são *p*CA. Com base na análise química concluíram que a toxina *p*CA não foi produzida, uma diferente molécula para-clorobenzeno substituída, *para*-clorofeniluréia (PCU), e uma molécula relacionada para-clorofenilguanida (PCGH) foram produzidas. Existem dados toxicológicos sobre estes compostos e a literatura sugere que possa haver problemas de toxicidade, sabe-se que a PCU pode ser metabolizada em *p*CA. Assim, a formação do precipitado ainda deve ser evitada pelo uso de uma lavagem intermediária a fim de evitar a oclusão dos túbulos dentinários e o comprometimento do vedamento do canal radicular obturado. Mais pesquisas devem ser conduzidas para determinar os possíveis efeitos da PCU e quaisquer metabólitos em tecidos dentais e periapicais e avaliar qualquer toxicidade aguda ou crônica.

A revista da literatura mostra que há vários estudos sobre a eficácia antimicrobiana da CHX e que a partir de sua decomposição há a geração de vários produtos tóxicos, desta maneira faz-se necessário mais pesquisas sobre a vida útil do produto, sua decomposição em diferentes formas de armazenamento e os efeitos toxicológicos “*in vivo*”.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho consiste em determinar, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, os produtos oriundos da degradação do gel de clorexidina a 2 %, nas seguintes condições:

- a. em diferentes períodos de tempo;
- b. em diferentes tipos de armazenamento do gel;
- c. e na verificação da homogeneidade da clorexidina no gel.

MATERIAIS E MÉTODO

A metodologia empregada no presente estudo não utilizou, em nenhuma etapa, órgãos, tecidos ou células de seres humanos ou animais. Foram empregadas apenas substâncias químicas manipuladas em laboratórios mediante suporte técnico e organizacional, que garantiram a segurança biológica dos operadores. Portanto, não houve a necessidade de submeter o projeto dessa investigação à apreciação de comitê de ética em pesquisa.

O volume dos reagentes analisados foi reduzido ao mínimo necessário com o objetivo de gerar o menor impacto ambiental possível. O descarte dos restos não utilizados foi executado no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (LAGRO-FORP-USP).

Para facilitar a compreensão da metodologia empregada neste trabalho, este capítulo foi dividido em tópicos, a saber: Reagentes; Equipamentos e materiais utilizados; Seleção da amostra; Preparo da solução padrão de *p*CA, da solução e do gel de digluconato de clorexidina a 2 % no laboratório; Método de extração para análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS); Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS); Otimização

do CG-MS para análise dos produtos de degradação do digluconato de clorexidina; Curva de calibração da *pCA* e Verificação da homogeneidade do gel de CHX.

1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho apresentavam grau de pureza analítica e estão listados a seguir:

- *para*-cloroanilina, Sigma-Aldrich®, WGK, Germany;
- digluconato de clorexidina a 20 %, Sigma-Aldrich®, WGK, Germany;
- digluconato de clorexidina a 20 % All Chemistry®, Índia;
- hidroxietilcelulose (Natrosol), PharmaSpecial®;
- acetonitrila – J. T. Baker SOLUSORB® - USA;
- H₂O deionizada, Quimis®;
- propilenoglicol, Synth®;
- metilparabeno, Synth®.

2. Equipamentos e materiais utilizados

- Cromatógrafo Gasoso QP 2010 Plus com alto injetor AOC-20i Shimadzu®, equipado com detector de Massas. Utilizou-se o hélio como gás de arraste. Os cromatogramas foram registrados em computador através do programa GCSolution responsável pela integração dos picos (Figura 4);
- Espectrofotômetro UV/Vis duplo feixe com varredura – Modelo Q789UVDB – QUIMIS. Faixa de operação de comprimento de onda entre 190 nm à 1100 nm. Utilizou-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Figura 5);
- Deionizador de água, QUIMIS®;
- Balança Analítica Mettler Toledo® AG245;
- Micropipetas – Eppendorf® Research 200 µl, 500 µl e 1000 µl;
- Micro seringa – Hamilton CO. Reno.Nevada Gastight® #100² - 2 mL;

Figura 5. Vista geral do equipamento (Espectrofotômetro UV-VIS, duplo feixe com varredura) utilizado nas análises.

3. Seleção das amostras

Selecionaram-se três géis e uma solução de CHX, todos na concentração de 2 %:

- (a) gel comercial (Chlorhexidina_Gel®, Maquira, Paraná, Brasil);
- (b) gel manipulado na Farmácia Ensino Uniararas (Gel_Uniararas);
- (c) gel preparado no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológico (LAGRO – FORP – USP) a partir de uma solução de CHX comercial Sigma® 20 % (Gel_Sigma).

A solução de CHX 2 % foi preparada a partir de uma solução de CHX comercial Sigma® 20 % (Solução_Sigma). Isso possibilitou estabelecer uma comparação da degradação entre os géis e a solução de CHX 2 %.

Estabeleceram-se quatro diferentes situações de armazenamento e quatro diferentes períodos de análise, como podem ser vistas nas Tabelas I e II:

Tabela I. Situações de armazenagem.

Condições propostas
Sobre a bancada de trabalho com luz
Sobre a bancada de trabalho sem luz
Em forno de Pasteur a 36,5 °C sem luz
Em geladeira a 8 °C sem luz

Tabela II. Períodos de análise.

Períodos propostos
Análise Inicial
1 mês
3 meses
6 meses

Todas as amostras foram acondicionadas em um tubo plástico transparente com tampa de 1,7 mL (Eppendorf®), contendo 1 g para os géis e 1 mL para solução de CHX. Para as situações propostas sem a presença de luz, os tubos foram completamente vedados com fita isolante preta (3M, Campinas, Brasil) e armazenados nas diferentes condições propostas.

Com a distribuição de todas as amostras nas diferentes situações de armazenamento e nos períodos propostos, gerou-se o total de 52 análises cromatográficas.

4. Preparo da solução padrão de *pCA*; da solução e do gel de digluconato de clorexidina a 2 % no laboratório

-Preparo da solução padrão de *pCA*

Para o preparo da solução padrão de *pCA*, adicionaram-se 2 mg de *pCA* (Sigma, Aldrich, Germany) em um Becker de 20 mL, e se acrescentaram 5 mL de ACN. A solução, assim preparada, foi agitada com bastão de vidro durante 3 min. e acondicionada em vial para análise em CG-MS.

-Preparo da solução de digluconato de CHX 2 % (Solução_Sigma)

Para o preparo da solução de digluconato de CHX a 2 % adicionaram-se, 2 mL de CHX a 20 % (Sigma, Aldrich, Germany) em um Becker de 50 mL, e se completou com 18 mL de água destilada deionizada. A solução preparada foi agitada com bastão de vidro durante 3 min., fracionada nos Eppendorfs® com e sem a proteção da fita isolante e armazenada nas diferentes condições experimentais.

-Preparo do gel de digluconato de CHX 2 % (Gel_Sigma)

Para o preparo do gel de digluconato de CHX a 2 % adicionaram-se, 2 mL de CHX a 20 % (Sigma, Aldrich, Germany) em um Becker de 50 mL, e se completou com 18 g de gel natrosol. O produto preparado foi agitado com bastão de vidro durante 3 min., fracionado nos Eppendorfs® sem e com a proteção da fita isolante e armazenado nas diferentes condições experimentais.

5. Método de extração para análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS)

Decorrido o tempo experimental, adicionou-se inicialmente às amostras, 0,5 mL de ACN. Após a introdução da ACN, o Eppendorf® foi inserido no agitador magnético por 2 min. Transferiu-se então o volume obtido para um Becker de 20 mL e se acrescentaram mais 1,5 mL de ACN, homogeneizando a solução com bastão de vidro por 1 min. O volume obtido foi então aspirado com o auxílio de uma micro seringa e, após a troca da agulha por um filtro de solventes orgânicos, com porosidade 0.45 µm, a solução resultante foi filtrada e depositada em vial para análise em CG-MS (Figura 6).

Figura 6. A) Eppendorfs® contendo Gel_Sigma, com e sem proteção de luz. B) Acréscimo de 1,5 mL de ACN para a extração da amostra. C) Filtragem da solução extraída. D) Vial contendo solução pronta para análise em CG-MS.

6. Otimização do CG-MS para análise dos produtos de degradação do digluconato de clorexidina

Para a otimização da resolução cromatográfica (CG-MS), realizou-se a injeção de uma solução padrão de *pCA* (como relatado no sub-capítulo IV.4) na coluna DB-5 (25m, 0,25 m, 0,25 mm) do cromatógrafo gasoso. O padrão obtido (pico) da *pCA* está expresso na Figura 7 e seu espectro de massas, na Figura 8.

Figura 7. Cromatograma da *pCA*, obtido após análise da solução padrão de *pCA*.

Figura 8. Espectro de massas da *pCA*, obtido após análise da solução padrão de *pCA*.

A temperatura foi variada a fim de se obter a melhor separação possível dos produtos de decomposição da CHX. Dentre as condições avaliadas, a resolução cromatográfica ideal está apresentada na Figura 9.

Figura 9. Resolução cromatográfica ideal obtida para a separação dos produtos de decomposição da CHX.

7. Curva de calibração da *pCA*

Realizou-se a padronização do método com a obtenção da curva de calibração para a *pCA*. Preparou-se seis soluções de *pCA*, em ACN, com concentrações conhecidas, variando de 0,5 a 10 %.

-Determinação dos valores para a curva de calibração da *pCA*

Para o desenvolvimento da curva de calibração da *pCA* calculou-se o valor em mol de CHX presente em uma alíquota de 1 g de gel a 2 % ($2,23 \cdot 10^{-5}$ mol). Este valor foi considerado 100 % de possível conversão de CHX em *pCA*.

1 g de gel ----- 0,02 g ($2,23 \cdot 10^{-5}$ mol) de CHX $\longrightarrow$ conversão de 100 %.

Partindo desse, valor foi confeccionada uma curva de calibração da *pCA*, com a utilização dos valores da Tabela III, que apresentaram intensidades próximas aos cromatogramas, dos géis e da solução, analisados.

Tabela III. Concentrações utilizadas na realização da curva de calibração para a *pCA*.

Porcentagem de conversão	Número de mol
0,5 %	$1,11 \cdot 10^{-7}$
1,5 %	$3,34 \cdot 10^{-7}$
2,5 %	$5,57 \cdot 10^{-7}$
3,5 %	$7,80 \cdot 10^{-7}$
6,5 %	$1,45 \cdot 10^{-6}$
10 %	$2,23 \cdot 10^{-6}$

Realizou-se esta etapa para posterior quantificação dos resultados. Os picos de resposta obtidos com as seis soluções de *pCA* podem ser vistos na Figura 10.

Figura 10. Cromatogramas utilizados na realização da curva de calibração para a *pCA*.

Confeccionou-se a curva de calibração, lançando-se na abscissa a concentração de *pCA* e na ordenada, a área do pico obtida nos respectivos cromatogramas. A curva de calibração da *pCA* pode ser vista na Figura 11.

Figura 11. Regressão linear, equação da reta utilizada para quantificação da porcentagem de conversão de CHX em pCA.

8. Verificação da homogeneidade do gel de CHX

Um estudo piloto indicou que os géis, comercial e aviados em farmácias de manipulação, não possuíam homogeneidade. Realizou-se então uma análise, por meio de espectrofotometria UV/Vis, entre o modo empregado de confecção do gel pelas farmácias de manipulação e um modo sugerido de se confeccioná-lo.

Seguindo as orientações das farmácias de manipulação indicadas para a confecção de 100 g de gel de CHX a 2 %, utilizaram-se os produtos na seguinte formulação: 3 g de propilenoglicol, 0,2 g de metilparabeno, 92,8 g de água e 4 g de natrosol.

-Modo de preparo do gel de CHX pelas farmácias de manipulação (maneira convencional)

Os produtos líquidos são pesados e misturados em um Becker com a água a temperatura de 70 °C. A seguir, 4 gramas de Natrosol são adicionadas pouco a pouco ,com intervalos regulares de agitação e descanso, obtendo-se a consistência de gel. A adição da CHX é realizada após a confecção do gel, mediante mistura manual, obtendo-se um gel de CHX aparentemente homogêneo.

Em virtude da comprovação da não homogeneidade dos géis comerciais e aviados em farmácia de manipulação, sugeriu-se uma nova alternativa de produção do gel de CHX 2%: misturar a CHX aos líquidos da fórmula acima citada, com a posterior adição do natrosol.

-Método de análise da homogeneidade do gel de CHX

Analizou-se a homogeneidade dos dois géis (maneira convencional de produção e maneira sugerida) pesando-se alíquotas de 0,1 gramas de cada gel e as reservando em tubos plásticos de 1,7 mL (Eppendorf®). Extraiu-se a CHX contida em cada alíquota, utilizando-se 0,5 mL de ACN e, com auxílio de uma microseringa acoplada a um filtro de fase orgânica, a amostra foi filtrada.

A essa solução, adicionaram-se mais 1,5 mL de ACN e, após homogeneização com bastão de vidro, uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e inserida em um balão volumétrico de 5 mL completando-se o volume final com ACN.

Analizou-se esta solução por meio de espectrofotometria UV/Vis detectando-se a CHX no comprimento de onda ideal para o experimento em 253 nanômetros.

RESULTADOS

Os resultados cromatográficos dos produtos de degradação da CHX, obtidos com a submissão das amostras no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectômetro de Massas (CG-MS), estão expressos nas figuras a seguir.

1. Das Amostras

1-Gel Uniararas

O resultado obtido por meio do Cromatógrafo Gasoso a qual foi submetido a extração do Gel_Uniararas para a análise inicial está ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Uniararas.

Observa-se na Figura 12, um pico com tempo de retenção TR de 6,5 min., o qual se refere à geração de um Espécie de Oxigênio Reativo (ROS), de massa carga (m/z) = 153, 125, 63 e 50, sugerindo a presença do produto *Orto*-isocianato clorofenil, que é um organoclorado. O espectro de massas deste pico, indicado pela seta 1, na Figura 12, pode ser visto com detalhe na Figura 13. A estrutura química do produto *Orto*-isocianato clorofenil pode ser visto na Figura 14.

O pico indicado pela seta 2, correspondente ao TR de 7,8 min., é referente a detecção da *pCA* de m/z = 127, 65 e 45, e seu espectro de massas pode ser observado na Figura 15.

A seguir, observa-se a presença de um novo pico, indicado pela seta 3, com TR de 8,2 min., que evidencia a presença de um isômero desta substância, *meta* ou *orto*-cloroanilina de m/z = 127, 65 e 45, seu espectro de massas pode ser observado na Figura 16. A estrutura química dos isômeros da *pCA* podem ser vistos na Figura 17.

Para o pico indicado pela seta 4 na Figura 12, com TR de 12,5 min., observa-se a presença do metilparabeno de $m/z = 152, 121, 65$ e 45 , correspondente ao conservante utilizado na manipulação deste gel, seu espectro de massas pode ser visualizado na Figura 18.

Continuando com a análise da Figura 12, com TR de 14,4 min., observa-se outro pico referente a um outro ROS, de $m/z = 152, 125$ e 63 , correspondente a presença do produto, 2-amino-5-clorobenzonitrila, que é um organoclorado. O espectro de massas, do pico indicado pela seta 5, está expresso na Figura 19. A estrutura química do produto 2-amino-5-clorobenzonitrila pode ser visto na Figura 20.

A análise cromatográfica inicial do Gel_Uniararas evidenciou a presença de dois tipos de ROS (*Orto*-isocianato clorofenil e 2-amino-5clorobenzonitrila), bem como *p*CA e seus isômeros *o*CA e/ou *m*CA. Esses produtos resultantes da decomposição da CHX são altamente tóxicos ao seres humanos, conforme (CHHABRA et al., 1991; INDEX MERCK, 2001; GRASSI et al., 2007).

Figura 13. Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 1 na Figura 12. Confirmando a presença do organoclorado *Orto*-isocianato clorofenil.

Figura 14. Estrutura química do produto *Orto*-isocianato cloro fenil.

Figura 15. Espectro de massas da *p*CA, indicado pela seta 2 na Figura 12.

Figura 16. Espectro de massas da *orto* ou *meta*-cloroanilina, indicado pela seta 3 na Figura 12.

Figura 17. Estrutura química dos isômeros da *p*CA.

Figura 18. Espectro de massas do metilparabeno, indicado pela seta 4 na Figura 12.

Figura 19. Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 5 na Figura 12. Confirmando a presença do organoclorado 2-amino-5-clorobenzonitrila.

Figura 20. Estrutura química do produto 2-amino-5-clorobenzonitrila.

A seguir, o Gel_Uniararas foi submetido à análise após 1 mês de armazenamento nas diferentes situações (com luz, sem luz, forno 36,5 °C e geladeira 8 °C) e os resultados cromatográficos podem ser observados na Figura 21.

Figura 21. Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Uniararas.

Os picos expressos na Figura 21, indicados pelas setas 1, 2, 3, 4 e 6 correspondem aos mesmos produtos evidenciados na análise inicial do Gel_Uniararas, apresentando o ROS com TR de 6,5 min., *p*CA com TR de 7,8 min., *orto* ou *meta*-cloroanilina com TR de 8,2 min., metilparabeno com TR de 12,5 min. e outro ROS com TR de 14,4 min., respectivamente.

Nota-se uma nova formação de pico, indicada pela seta 5, com tempo de retenção de 13,9 min., correspondente à uma nova geração de ROS apresentando valor de $m/z = 149, 121, 65$ e 45, seu espectro de massas pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22. Espectro de massas do ROS, indicado pela seta 5 na Figura 21.

A identificação química do produto acima não foi possível. Este padrão de resposta se repete em todas as diferentes situações de armazenamento para o período de análise de 1 mês.

Para o Gel_Uniararas, no período de armazenamento de 1 mês, nota-se que os picos da linha vermelha - indicados pelas setas 2 e 6 - aumentaram, evidenciando maior oxidação da CHX com o aumento da temperatura.

No tempo experimental de 1 mês, para todas as situação propostas, observou-se a presença de todos os produtos gerados a partir da análise inicial e ainda a formação de um novo ROS.

Os resultados cromatográficos das análises após 3 e 6 mês de armazenamento para o Gel_Uniararas podem ser observados nas Figuras 23 e 24 respectivamente.

Figura 23. Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Uniararas.

Figura 24. Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Uniararas.

Observando as Figuras 23 e 24, correspondentes aos períodos de 3 e 6 meses de armazenamento respectivamente, nota-se a presença dos mesmos picos e produtos gerados a partir do 1º mês de armazenamento, sendo maior a intensidade do pico da *pCA*, para ambas as figuras, na situação com luz.

Como a *pCA* foi detectada em todas as análises cromatográficas para o presente gel e sendo este o produto mais tóxico, realizou-se a quantificação da conversão da clorexidina (CHX) em *para*-cloroanilina (*pCA*). Este cálculo se deu por meio da equação da reta da curva de calibração da *pCA* (Figura 11). Estes resultados estão ilustrados na Tabela IV:

Tabela IV. Conversão de CHX em *pCA* exposto em % para o Gel_Uniararas.

Gel_Uniararas – Análise inicial de <i>pCA</i> 1.11%			
	1 Mês	3 Meses	6 Meses
Gel Uniararas_com_Luz	0.84%	1.22%	1.27%
Gel Uniararas_sem_Luz	0.93%	1.16%	0.98%
Gel Uniararas_forno	1.18%	0.84%	0.92%
Gel Uniararas_geladeira	0.95%	0.99%	0.76%
Média	0.98%	1.05%	0.98%
Desvio Padrão	0.14%	0.17%	0.21%

A degradação da CHX em *pCA* mantém-se presente em todas as situações e períodos de tempo analisados. Isso sugere que essa degradação é um fator intrínseco da CHX, independente das situações analisadas.

2- Gel Chlorhexidina® 2 % (Maquira, Paraná, Brasil)

O resultado obtido por meio do cromatógrafo gasoso ao qual foi submetido o Gel_Chlorhexidina® na análise inicial está ilustrado na Figura 25.

Figura 25. Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Chlorhexidina®.

Observa-se na Figura 25, indicado pela seta 1, um pico com tempo de retenção TR de 7,8 min., referente a detecção da *pCA* de $m/z = 127, 65$ e 45 .

Continuando a análise da Figura 25, o pico indicado pela seta 2, com TR de 8,2 min. evidencia a presença do isômero da *pCA*, *orto* ou *meta*-cloroanilina de $m/z = 127, 65$ e 45 .

A análise cromatográfica inicial do Gel_Chlorhexidina®, evidenciou a presença de dois produtos de oxidação da CHX, indicando *pCA* e um isômero *orto* ou *meta*-cloroanilina.

Os picos com TR de 6,5; 12,5; 13,9 e 14,4 min. estão presentes no cromatograma inicial do Gel_Chlorhexidina® (Figura 25) porém, não foram citados por apresentarem concentrações abaixo do limite de detecção do aparelho não podendo ser distinguidos do ruído de fundo. As concentrações destes compostos aumentaram com o tempo e são observados nos cromatogramas dos períodos 1, 3 e 6 meses de análise.

A seguir, o Gel_Chlorhexidina® foi submetido à análise após 1 mês de armazenamento nas diferentes situações (com luz, sem luz, forno 36,5 °C e geladeira 8 °C), e os resultados cromatográfico podem ser observados na Figura 26.

Figura 26. Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Chlorhexidina®.

Os picos expressos na Figura 26, indicados pela seta 2 e 3 correspondem aos mesmos produtos evidenciados na análise inicial do Gel_Chlorhexidina®, apresentando *pCA* com TR de 7,8 min. e *orto* ou *meta*-cloroanilina com TR de 8,2 min., respectivamente.

Na análise de 1 mês, os 4 picos que se apresentavam abaixo dos limites de detecção do aparelho foram detectados com maior intensidade, eles estão indicados pela setas 1, 4, 5 e 6 respectivamente. Isso caracteriza um aumento da degradação da CHX no Gel_Chlorhexidina®.

A seta 1 da Figura 26, evidencia a geração de um ROS com TR de 6,5 min., este produto é correspondente ao organoclorado *Orto*-isocianato clorofenil. O pico indicado pela seta 4 evidencia o metilparabeno, com TR de 12,5 min., que é o conservante utilizado na fabricação deste gel.

A seguir, indicado pela seta 5, observa-se o ROS com TR de 13,9 min., quimicamente não detectado em nosso experimento. Indicado pela seta 6, surge um novo pico, referente a geração de um ROS com TR de 14,4 min., identificado neste estudo como sendo o organoclorado 2-amino-5-clorobenzonitrila. Este padrão de resposta, indicando o surgimento destes quatro novos produtos, se repete em todas as diferentes situações de armazenamento para o período de análise de 1 mês.

Para o Gel_Chlorhexidina®, no período de armazenamento de 1 mês, nota-se que os picos da linha azul, indicados pelas setas 2 e 6, aumentaram, evidenciando maior oxidação da CHX com a presença de luz.

Os resultados cromatográficos das análises após 3 e 6 mês de armazenamento para o Gel_Chlorhexidina® podem ser observados nas Figuras 27 e 28 respectivamente.

Figura 27. Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Chlorhexidina®.

Figura 28. Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Chlorhexidina®.

Observando as Figuras 27 e 28, correspondentes aos períodos de 3 e 6 meses de armazenamento respectivamente, nota-se a presença dos mesmos picos e produtos gerados a partir do 1º mês de armazenamento, sendo maior a intensidade do pico da *pCA*, para ambas as figuras, para a situação sem luz.

Com a identificação da *pCA*, realizou-se a quantificação da conversão da clorexidina (CHX) em *para*-cloroanilina (*pCA*). Esse cálculo se deu por meio da equação da reta da curva de calibração da *pCA* (Figura 11). Esses resultados estão ilustrados na Tabela V:

Tabela V. Conversão de CHX em *pCA* exposto em % para o Gel_Chlorhexidina®.

Gel_Chlorhexidina® – Análise inicial de <i>pCA</i> 1.07%				
	1 Mês	3 Meses	6 Meses	
Gel Chlorhexidina_com_Luz	1.15%	1.03%	1.14%	
Gel Chlorhexidina _sem_Luz	1.00%	1.00%	1.43%	
Gel Chlorhexidina _forno	0.93%	0.89%	1.01%	
Gel Chlorhexidina _geladeira	0.67%	0.63%	0.61%	
Média	0.94%	0.89%	1.05%	
Desvio Padrão	0.20%	0.18%	0.34%	

A degradação da CHX em *pCA*, para o Gel_Chlorhexidina®, mantêm-se presente em todas as situações e períodos de tempo analisados, isto sugere que esta degradação é um fator intrínseco da CHX, independente das situações analisadas.

3- Gel de CHX Sigma 2 %, preparado no laboratório a partir de uma solução de CHX comercial Sigma® 20 % (Gel_Sigma)

O resultado obtido por meio do Cromatógrafo Gasoso ao qual foi submetida a extração do Gel_Sigma para a análise inicial, está ilustrado na Figura 29.

Figura 29. Análise cromatográfica inicial, da extração do Gel_Sigma.

Observa-se na Figura 29, indicado pela seta 1, um pico com TR de 6,5 min., referente a geração do ROS de $m/z = 153, 125, 63$ e 50 , sugerindo a presença do produto *Orto*-isocianato clorofenil.

O pico indicado pela seta 2, correspondente ao TR de 7,8 min., é referente a detecção da *pCA* de $m/z = 127, 65$ e 45 .

A seguir, observa-se a presença de um novo pico, indicado pela seta 3, com TR de 8,2 min., que evidencia a presença de um isômero da *pCA*, *meta* ou *orto*-cloroanilina de $m/z = 127, 65$ e 45 .

Indicado pela seta 5, observa-se a geração do ROS com TR de 13,9 min. e $m/z = 149, 105, 65$ e 50, quimicamente não detectado em nosso experimento.

Continuando com a análise da Figura 29, com TR de 14,4 min., observa-se outro pico referente a um outro ROS, de $m/z = 152, 125$ e 63, correspondente à presença do produto, 2-amino-5-clorobenzonitrila que é um organoclorado.

A análise cromatográfica inicial do Gel_Sigma, evidenciou a presença de cinco produtos de oxidação da CHX, sendo *Orto*-isocianato clorofenil, *p*CA, um isômero *orto* ou *meta*-cloroanilina, um ROS não identificado quimicamente e o ROS 2-amino-5-clorobenzonitrila.

A seguir, o Gel_Sigma foi submetido a análise após 1 mês de armazenamento nas diferentes situações (com luz, sem luz, forno 36,5 °C e geladeira 8 °C) e os resultados cromatográficos podem ser observados na Figura 30.

Figura 30. Análise cromatográfica de 1 mês, da extração do Gel_Sigma.

Os picos expressos na Figura 30, indicados pelas setas 1, 2, 3, 5 e 6 correspondem aos mesmos produtos evidenciados na análise inicial do Gel_Sigma, apresentando o ROS (*Orto*-isocianato clorofenil) com TR de 6,5 min., *p*CA com TR de 7,8 min., *orto* ou *meta*-cloroanilina com TR de 8,2 min., o ROS não identificado com TR de 13,9 min. e o ROS (2-amino-5-clorobenzonitrila) com TR de 14,4 min., respectivamente.

Nota-se uma nova formação de pico, indicado pela seta 4, com TR de 12,5 min., equivalente à detecção do metilparabeno com $m/z = 152, 121, 65$ e 45. Esse padrão de resposta repete-se em todas as situações de armazenamento para o período de análise de 1 mês.

Para o Gel_Sigma, no período de armazenamento de 1 mês, nota-se que os picos da linha vermelha, indicados pelas setas 2 e 6, aumentaram, evidenciando maior oxidação da CHX com o aumento da temperatura.

No tempo experimental de 1 mês, para todas as situação propostas, observou-se a presença de todos os produtos gerados a partir da análise inicial e ainda a detecção do metilparabeno.

Os resultados cromatográficos das análises após 3 e 6 mês de armazenamento para o Gel_Sigma, podem ser observados nas Figuras 31 e 32 respectivamente.

Figura 31. Análise cromatográfica de 3 meses, da extração do Gel_Sigma.

Figura 32. Análise cromatográfica de 6 meses, da extração do Gel_Sigma.

Observando as Figuras 31 e 32, correspondentes aos períodos de 3 e 6 meses de armazenamento respectivamente, nota-se a presença dos mesmos picos e produtos gerados a partir do 1º mês de armazenamento, sendo maior a intensidade do pico da *pCA*, para a situação com luz e geladeira respectivamente.

Como a *pCA* foi detectada em todas as análises cromatográficas para o presente gel e sendo este o produto mais tóxico, realizou-se a quantificação da conversão da clorexidina (CHX) em *para*-cloroanilina (*pCA*). Esse cálculo se deu por meio da equação da reta da curva de calibração da *pCA* (Figura 11). Esses resultados estão ilustrados na tabela Tabela VI:

Tabela VI. Conversão de CHX em *pCA* exposto em % para o Gel_Sigma.

Gel_Sigma – Análise inicial de <i>pCA</i> 1.53%			
	1 Mês	3 Meses	6 Meses
Gel Sigma_com_Luz	1.01%	1.37%	1.11%
Gel Sigma_sem_Luz	0.88%	1.30%	1.09%
Gel Sigma_forno	1.31%	1.14%	1.00%
Gel Sigma_geladeira	0.96%	1.25%	1.29%
Média	1.04%	1.27%	1.12%
Desvio Padrão	0.19%	0.10%	0.12%

A degradação da CHX em *pCA*, para o Gel_Sigma, mantém-se presente em todas as situações e períodos de tempo analisados. Isso sugere que essa degradação é um fator intrínseco da CHX, independente das situações analisadas.

4- Solução de CHX Sigma 2 %, preparado no laboratório a partir de uma solução de CHX comercial Sigma® 20 % (Solução_Sigma)

O resultado obtido por meio do Cromatógrafo Gasoso ao qual foi submetida a extração da Solução_Sigma para a análise inicial está ilustrado na Figura 33.

Figura 33. Análise cromatográfica inicial, da extração da Solução_Sigma.

Observa-se na Figura 33, um pico, indicado pela seta 1, com tempo de retenção TR de 7,8 min., o qual se refere à detecção da *pCA* de $m/z = 127, 65$ e 45.

A seguir, observa-se a presença de um novo pico, indicado pela seta 2, com TR de 8,2 min., que evidencia a presença de um isômero da *pCA*, *meta* ou *orto*-cloroanilina de $m/z = 127, 65$ e 45.

Para o pico indicado pela seta 3, na Figura 33, com TR de 13,9 min., observa-se a presença do ROS de $m/z = 149, 105, 65$ e 51 , não identificado quimicamente.

Continuando com a análise da Figura 33, com TR de 14,4 min., observa-se o pico indicado pela seta 4, referente a geração do ROS, de $m/z = 152, 125$ e 63 , correspondente ao produto, 2-amino-5-clorobenzonitrila que é um organoclorado.

A análise cromatográfica inicial da Solução_Sigma, evidenciou a presença de dois tipos de ROS (um não identificado e 2-amino-5-clorobenzonitrila), bem como *pCA* e seus isômeros *oCA* e/ou *mCA*.

A seguir, a Solução_Sigma foi submetida a análise após 1 mês de armazenamento nas diferentes situações (com luz, sem luz, forno $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e geladeira $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) e os resultados cromatográficos podem ser observados na Figura 34.

Figura 34. Análise cromatográfica de 1 mês, da extração da Solução_Sigma.

Os picos expressos na Figura 34, indicados pelas setas 2, 3, 4 e 5 correspondem aos mesmos produtos evidenciados na análise inicial da

Solução_Sigma, apresentando a *p*CA com TR de 7,8 min., *orto* ou *meta*-cloroanilina com TR de 8,2 min., o ROS com TR de 13,9 min., e outro ROS (2-amino-5-clorobenzonitrila) com TR de 14,4 min., respectivamente.

Nota-se uma nova detecção de pico, indicado pela seta 1, com TR de 6,5 min., correspondente a uma nova geração de ROS apresentando valor de $m/z = 153, 125, 63$ e 50 , evidenciando a presença do composto *Orto*-isocianato clorofenil. Este padrão de resposta se repete em todas as diferentes situações de armazenamento para o período de análise de 1 mês.

Para a Solução_Sigma, no período de armazenamento de 1 mês, nota-se que os picos da linha vermelha, indicados pelas setas 2, 3, 4 e 5 aumentaram, havendo ainda a formação de um novo pico, indicado pela seta 1, evidenciando maior oxidação da CHX com o aumento da temperatura.

No tempo experimental de 1 mês, para todas as situação propostas, observou-se a presença de todos os produtos gerados a partir da análise inicial e ainda a formação de um novo ROS.

Os resultados cromatográficos das análises após 3 e 6 mês de armazenamento para a Solução_Sigma podem ser observados nas Figuras 35 e 36 respectivamente.

Figura 35. Análise cromatográfica de 3 meses, da extração da Solução_Sigma.

Figura 36. Análise cromatográfica de 6 meses, da extração da Solução_Sigma.

Observando as Figuras 35 e 36, correspondentes aos períodos de 3 e 6 meses de armazenamento respectivamente, nota-se a presença dos mesmos picos e produtos gerados a partir do 1º mês de armazenamento, sendo maior a intensidade do pico da *pCA*, para as situações com luz e geladeira respectivamente.

Como a *pCA* foi detectada em todas as análises cromatográficas para o presente gel e sendo este o produto mais tóxico, realizou-se a quantificação da conversão da clorexidina (CHX) em *para*-cloroanilina (*pCA*). Esse cálculo se deu por meio da equação da reta da curva de calibração da *pCA* (Figura 11). Esses resultados estão ilustrados na Tabela VII:

Tabela VII. Conversão de CHX em *pCA* exposto em % para a Solução_Sigma.

Solução_Sigma – Análise inicial de <i>pCA</i> 0.68%			
	1 Mês	3 Meses	6 Meses
Solução Sigma_com_Luz	0.68%	1.75%	1.71%
Solução Sigma_sem_Luz	0.76%	1.50%	1.50%
Solução Sigma_forno	0.79%	1.48%	1.62%
Solução Sigma_geladeira	0.74%	1.53%	2.21%
Média	0.74%	1.57%	1.76%
Desvio Padrão	0.05%	0.13%	0.31%

A degradação da CHX em *pCA*, mantém-se presente em todas as situações e períodos de tempo analisados. Isso sugere que essa degradação é um fator intrínseco da CHX; contudo nota-se que a porcentagem de *pCA* encontrada nas amostras é maior com o passar do tempo. Isso indica que o fator tempo é diretamente proporcional à quantidade de *pCA* encontrada nas amostras da solução de CHX.

A CHX, quando preparada em gel ou solução, degrada-se em produtos tóxicos independentemente das situações armazenadas. Os produtos oriundos de sua degradação podem ser vistos na Tabela VIII:

Tabela VIII. Produtos de degradação da CHX encontrados nas amostras analisadas.

Produtos de degradação da CHX
<i>orto</i> -isocianato clorofenil
<i>para</i> -cloroanilina
<i>orto</i> ou <i>meta</i> -cloroanilina
ROS*
2-amino-5-clorobenzonitrila

* produto de degradação da CHX quimicamente não definido no presente estudo.

2.Verificação da homogeneidade do gel de CHX

1-Preparo do gel de CHX de maneira convencional

Os resultados encontrados, por meio da Espectrofotometria UV/Vis, para o gel de CHX à 2 % preparado pela maneira convencional, podem ser observados na Figura 37.

Figura 37. Análises através de espectrofotometria UV/Vis das extrações do Gel de CHX à 2 % produzido da maneira convencional.

Nota-se na Figura 37, a presença de picos de respostas desuniformes. A CHX, quando analisada por meio de espectrofotometria UV/Vis possui pico ideal com comprimento de onda de 253 nm; após 6 análises, notou-se irregularidade de resposta frente as extrações realizadas. As absorbâncias demonstram diferentes índices de concentração, confirmando a hipótese da não homogeneidade da CHX no gel.

2- Preparo do gel de CHX da maneira sugerida

Os resultados encontrados por meio da Espectrofotometria UV/vis, para o gel de CHX à 2 % produzido pela maneira sugerida, podem ser observados na Figura 38.

Figura 38. Análises através de espectrofotometria UV/Vis das extrações do Gel de CHX à 2 % produzido da maneira sugerida.

Observa-se na Figura 38, a presença de picos de respostas regulares para as cinco amostras extraídas e analisadas. Os picos se corresponderam frente ao comprimento de onda e a absorbância apresentada, evidenciando real homogeneidade da CHX no gel.

O modo como o gel de CHX é preparado pode explicar os resultados obtidos com as amostras na forma de gel, justificando as diferentes porcentagens de *pCA* independente das situações analisadas.

DISCUSSÃO

1. Da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

Cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma estacionária, enquanto a outra se movimenta numa direção definida. A mistura que contém os componentes a serem separados é dissolvida na fase móvel. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, alguns componentes são fortemente retidos e por isso se movem lentamente com o fluxo da fase móvel; enquanto isso, outros componentes interagem fracamente com a fase estacionária, sendo transportados mais facilmente pela fase móvel. Devido a essas diferenças em mobilidade, os componentes da mistura podem ser separados e analisados de forma qualitativa e/ou quantitativa, pela própria técnica de cromatografia ou em conjunto com outras técnicas experimentais, tais como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (IUPAC, 2007).

Em um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, as amostras são bombardeadas por elétrons e quebradas gerando íons

positivos, negativos e radicais. A diferença na relação massa / carga dos íons gerados irá separá-los (ATKINS, 2001; EWING, 2002).

A Cromatografia Gasosa e a Espectrometria de Massas mostraram-se eficazes na identificação da pCA isolada ou presente nas amostras dos géis e da solução de CHX. Além disso, a tarefa de detalhar os picos derivados da degradação da CHX está em concordância com Basrani et al., 2007; Pizon et al., 2009; Basrani et al., 2010, que também obtiveram resultados semelhantes com estes equipamentos.

O Espectrômetro de Massas acoplado ao Cromatógrafo Gasoso utilizado neste trabalho foi o de impacto eletrônico “E. I.”, onde uma corrente é aplicada a um filamento, que é aquecido resistivamente até a incandescência, emitindo vários elétrons simultaneamente, placas colimadoras são empregadas para o controle do feixe de elétrons emitidos, os elétrons passam através das placas colimadoras com uma energia média de 70 eV (este é um valor comum, pois a probabilidade de ionização, dos compostos orgânicos, é maximizada). Os subprodutos encontrados nos espectros são originados da decomposição da CHX em função da instabilidade da molécula e não em função da técnica de ionização (SILVERSTEIN et al., 2007).

2. Da análise das amostras

Optou-se em analisar o gel de CHX 2 %, pois esta concentração é mais freqüentemente utilizada na endodontia como substância e/ou medicação intracanal (FERRAZ et al., 2001; BASRANI et al., 2002; GOMES et al., 2003; BASRANI et al., 2004; DAMETTO et al., 2005; GOMES et al., 2006; FERRAZ et al., 2007; VALERA et al., 2010).

A análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) mostrou-se eficaz na identificação dos produtos de degradação da CHX. Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização destes aparelhos por BASRANI et al. (2007), PIZON et al. (2009) e BASRANI et al. (2010).

A eficiência da CHX contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos garantiu sua ampla adoção em diversas áreas médicas. Ela é utilizada em procedimentos médicos e na odontologia como inibidor da placa bacteriana, no tratamento de doenças periodontais, em enxaguatórios bucais e na endodontia como substância auxiliar e/ou medicação intracanal (RÖLLA et al., 1970;

SIQUEIRIA; USEDÁ 1997; BASRANI et al., 2002; ZAMANY et al., 2003; GOMES et al., 2003; ZEHNDER, 2006; GOMES et al., 2006; PAQUETTE et al., 2007; MCCLURE et al., 2007; MOHAMMADI; ABBOTT 2009), mostrando-se eficaz como agente antimicrobiano, entretanto, seu uso gera preocupação devido a relatos de formação de produtos de degradação de alta toxicidade (CHHABRA et al., 1991; VALENTOVIC et al., 1996; BELOW et al., 2004; BASRANI et al., 2007; GRASSI et al., 2007; YEUNG et al., 2007; BARBIN, 2008a; BARBIN et al., 2008; PIZON et al., 2009; BASRANI et al., 2010; THOMAS; SEM, 2010; KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010; NOWICKI; SEM, 2011).

No presente estudo, em todos os géis e na solução de CHX analisadas, foram detectadas *pCA* e um isômero (*orto* ou *meta*-cloroanilina). Os picos de resposta foram comparados ao pico da *pCA* da solução padrão, evidenciando a presença desta substância (*pCA*). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (BASRANI et al., 2007; PIZON et al., 2009; BASRANI et al., 2010).

O pico característico do metilparabeno (conservante utilizado nas amostras) com TR = 12,5 min., foi detectado em todas as amostras, com exceção das análises da Solução_Sigma, que foi preparada sem a adição deste conservante. Na análise inicial do Gel_Chlorexidina®, não houve a detecção deste pico, mesmo sendo um produto presente em sua formulação, fato este que pode ser atribuído à falta de homogeneidade do gel.

Para todos os géis, independente das diferentes situações propostas (com e sem presença de luz, forno 36,5 °C e geladeira 8 °C) não houve discrepância na conversão da CHX em *pCA*. Contudo, foram observados aumentos relevantes na produção dos ROS e dos isômeros *oCA* / *mCA* em função do tempo nas diferentes situações analisadas. Estes produtos, segundo (YEUNG et al., 2007), apresentam propriedades pró-oxidativas capaz de promover alteração em DNA (YEUNG et al., 2007; GRASSI et al., 2007).

A solução de CHX preparada no laboratório a partir da solução comercial de CHX 20 % Sigma® (Solução_Sigma) apresentou, de forma gradual, maior aumento de *pCA*, diferentemente dos resultados encontrados nas análises dos géis. Isto nos leva a concluir que o gel é capaz de dificultar a decomposição da CHX em *pCA*. Essa diminuição da velocidade de oxidação da CHX pode ser atribuída ao impedimento estérico das partículas sólidas presentes na dispersão coloidal do gel. Isso não ocorre em solução aquosa onde as partículas estão homogeneamente

dissolvidas. A falta do impedimento estérico em nossa solução, provavelmente foi a causa do aumento na velocidade de oxidação da CHX. Gel é uma dispersão coloidal na qual o dispersante é o sólido e o disperso é o líquido. Solução é uma dispersão coloidal na qual o dispersante é o líquido e o disperso é o sólido.

Além da evidenciação da *pCA* e de seus isômeros, observou-se para todas as amostras a geração de dois ROS identificados neste trabalho, como sendo os organoclorados *orto*-isocianato clorofenil e 2-amino-5-clorobenzonitrila. Estes produtos são altamente tóxicos e podem causar alterações celulares (INDEX MERCK, 2001; CHHABRA et al., 1991; VALENTOVIC et al., 1996; BASRANI et al., 2007; GRASSI et al., 2007; YEUNG et al., 2007; PIZON et al., 2009). A quantidade de *pCA* encontrada nas amostras dos géis não permite concluir que o fator tempo, calor e/ou presença de luz, aumente a oxidação da CHX. Isso porque, em análises realizadas com 6 meses de armazenamento, evidenciaram-se porcentagens menores de *pCA* em comparação com as análises iniciais. Essa diferença poderia ser explicada pela formação e/ou aumento de subprodutos, originados a partir da estrutura da *pCA*, como por exemplo, o aumento na quantidade de seus isômeros (*oCA* e/ou *mCA*) ou o aumento dos ROS, o que não ocorreu uniformemente. Dessa maneira constatou-se a não homogeneidade do gel neste experimento (Figuras 37 e 38).

A formação de *pCA* foi mais uniforme e gradual quando analisada em solução. A degradação da CHX em *pCA* mostrou ser fator intrínseco da CHX, independente de fatores externos.

Para solução Sigma analisada, concluiu-se que a geração *pCA* é diretamente proporcional ao tempo do produto.

Detectaram-se, a partir das análises, cinco produtos oriundos da degradação da CHX: *orto*-isocianato clorofenil; *pCA*; *oCA* ou *mCA*, 2-amino-5-clorobenzonitrila e um ROS quimicamente não identificado. O gel de CHX formulado de maneira convencional demonstrou não possuir homogeneidade de CHX. O modo sugerido para formulação do gel mostrou-se eficiente na promoção da homogeneidade da CHX. Isso nos leva a concluir que a homogeneidade do gel é dependente do modo de preparo.

Fica claro, frente aos resultados encontrados neste estudo e na literatura revista, que mais trabalhos necessitam ser realizados para análise mais precisa e conclusiva sobre o potencial genotóxico e de dano tecidual promovido pela CHX e

seus subprodutos. Talvez os resultados antimicrobianos obtidos em estudos de monoculturas *“in vitro”* não reportem os mesmos resultados encontrados na prática clínica; contudo, mesmo sendo comprovado seu amplo efeito antimicrobiano *“in vivo”*, se testes citotóxicos e genotóxicos continuarem a comprovar danos em DNA, talvez sua aplicação clínica não seja indicada.

CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é lícito concluir que:

- 1- Os produtos contendo 2 % de CHX na forma de gel e solução, evidenciaram a sua degradação em produtos tóxicos como *pCA*; *oCA* ou *mCA* (isômeros da *pCA*); ROS e os organoclorados *orto*-Isocianato Clorofenil e 2-amino-5-clorobenzonitrila, independente das condições de armazenagem;
- 2- A solução e os géis de CHX a 2 %, já apresentavam-se degradados no frasco encontrado à venda no comércio, dentro do prazo de validade, em todos os períodos de tempo e situações de armazenamento estudados;
- 3- O gel de CHX 2 %, à base de hidroxietilcelulose, seja comercial ou manipulado, não apresentou homogeneidade da CHX em sua formulação. A homogeneidade da CHX no gel de hidroxietilcelulose é diretamente dependente do modo da sua manipulação;
- 4- A quantidade de *pCA* encontrada nas amostras em solução é diretamente proporcionais ao tempo de análise do produto, o que não se observa nos géis devido às suas não homogeneidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre, 2001. **Editora Bookmam**.

BARBIN, L. E.; SAQUY, P. C.; GUEDES, D. F. C.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C.; PÉCORA, J. D. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **J Endod.**, v. 34, p. 1508 – 14, 2008.

BARTHEL, C. R.; ZIMMER, S.; WEST, G.; ROULET, J. F. Bacterial leakage in obturated root canals following the use of different intracanal medicaments. **Endod Dent Traumatol.**, v. 16, p. 282 – 86, 2000.

BASRANI, B. R.; SANTOS, J. M.; TJÄDERHANE, L.; GRAD, H.; GORDUYSUS, O.; HUANG, J.; LAWRENCE, H. P.; FRIEDMAN, S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine treated human root dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 94, p. 240 – 45, 2002.

BASRANI, B. R.; GHANEM, A.; TJADERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J Endod.**, v. 30, p. 413 – 17, 2004.

BASRANI, B. R.; LEMONIE, C. Chlorhexidine Gluconate. **Australian Endodontic Journal**, v. 31, n. 2, p. 48 – 52, 2005.

BASRANI, B. R.; MANEK, S.; SODHI, R. N. S.; FILLERY, E.; MANZUR, A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J Endod.**, v. 33, p. 966 – 69, 2007.

BASRANI, B. R.; MANEK, S.; MATHERS, D.; FILLERY, E.; SODHI, R. N. S. Determination of 4-Chloroaniline and Its Derivatives Formed in the Interaction of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine by Using Gas Chromatography. **J Endod.**, v. 36, p. 312 – 14, 2010.

BELOW, H.; LEHAN, N.; KRAMER, A. HPLC determination of the antiseptic agent chlorhexidine and its degradation products 4-chloroaniline and 1-chloro-4-nitrobenzene in serum and urine. **Microchim. Acta**, v. 146, p. 129 – 35, 2004.

CHHABRA, R.; HUFF, J.; HASEMAN, J.; ELWELL, M.; PETERS, A. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, p. 119 – 24, 1991.

DAMETTO, F. R.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 99, p. 768 – 72, 2005.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J.; MARTIN, A. R.; ROSE, F. L.; SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Br J Pharmacol Chemother.**, v. 9, n. 2, p. 192 – 96, 1954.

DELANY, G. M.; PATTERSON, S. S.; MILLER, C. H.; NEWTON, C. W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 53, n. 5, p. 518 – 23, 1982.

EL-KARIM, I.; KENNEDY, J.; HUSSEY, D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 103, p. 560 – 69, 2007.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, R. G.; ESTRELA, C. R. A.; PÉCOR, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Antimicrobial Effect of 2 % Sodium Hypochlorite and 2 % Chlorhexidine Tested by Different Methods. **Braz Dent J.**, v. 14, n. 1, p. 58 – 62, 2003.

EWING, G. W. Métodos Instrumentais de Análise Química. São Paulo, 2002. **Editora Edgar Blücher**.

FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod.**, v. 27, n. 7, p. 452 – 55, 2001.

FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Comparative Study of the Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine Gel, Chlorhexidine Solution and Sodium Hypochlorite as Endodontic Irrigants. **Braz Dent J.**, v. 18, n. 4, p. 294 – 98, 2007.

FOULKES, D. M. Some toxicological observations on chlorhexidine. **J. periodont. Res. 8; Suppl.**, v. 12, p. 55 – 57, 1973.

GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 424 – 28, 2001.

GOMES, B. P. F. A.; SOUZA, S. F. C.; FERRAZ, C. C. R.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A. A.; VALDRIGHI, L.; SOUZA-FILHO, F. J. Effectiveness of 2 % chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus Faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 267 – 75, 2003.

GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 102, p. 544 – 50, 2006.

GRASSI, T. F.; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, M. E. A.; RIBEIRO, D. A. DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 210, p. 163 – 67, 2007.

HELING, I.; CHANDLER, N. P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 8 – 14, 1998.

HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J. Periodont. Res. 8; Suppl.**, v. 12, p. 61 – 67, 1973.

HULL, P. S. Chemical inhibition of plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 7, p. 431 – 42, 1980.

INDEX MERCK. Merck & Company, Inc., 3ª Edition, **White House Station**, New York, 2001.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Gold Book. 2007. Disponível em <<http://goldbook.iupac.org/A00496.html>>. Acessado em out. 2011

JAMINET, T. F.; DELATTRE, L.; DELPORTE, J. P.; MOES, A. Effect of temperature of sterilization and of pH on stability of chlorhexidine in solution. **Pharm Acta Helv.**, v. 45, n. 1, p 60 – 3, 1970.

KRISHNAMURTHY, S.; SUDHAKARAN, S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J Endod.**, v. 36, p. 1154 – 57, 2010.

KOHLBECKER, G. Toxic contaminants in chlorhexidine digluconate. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 44, n. 4, p. 273 – 76, 1989.

LAFFORGUE, C.; CARRET, L.; FALSON, F.; REVERDY, M. E.; FRENEY, J. Percutaneous absorption of a chlorhexidine digluconate solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 147, p. 243 – 46, 1997.

LEONARDO, M. R.; TANOMARU-FILHO, M.; SILVA, L. A. B.; NELSON-FILHO, P.; BONIFACIO, K. C.; ITO, I. Y. In Vivo antimicrobial activity of 2 % chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J Endod.**, v. 25, p. 167 – 71, 1999.

LÖE, H.; SCHIOTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodontal Res.**, v. 5, n. 2, p. 79 – 83, 1970.

MCCLURE, E.; GOLDENBERG, R.; BRANDES, N.; DARMSTADT, G.; WRIGHT, L. The use of chlorhexidine to reduce maternal and neonatal mortality and morbidity in low-resource settings. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 97, p. 89 – 94, 2007.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 42, p. 288 – 302, 2009.

NOWICKI, J. B.; SEM, D. S. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J Endod.**, v. 37, p. 983 – 88, 2011.

PAQUETTE, L.; LEGNER, M.; FILLERY, E. D.; FRIEDMAN, S. Antibacterial Efficacy of chlorhexidine Gluconate Intracanal Medication In Vivo. **J Endod.**, v. 33, p. 788 – 95, 2007.

PIZON, A. F.; SCHWARTZ, A. R.; SHUM, L. M.; RITTENBERGER, J. C.; LOWER, D. R.; GIANNOUTSOS, S.; VIRJI, M. A.; KRASOWSKI, M. D. Toxicology laboratory analysis and human exposure to p-chloroaniline. **Clinical Toxicology**, v. 47, p. 132 – 36, 2009.

RÖLLA, G.; LÖE, H.; SCHIØTT, C. R. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. **J Periodontal Res.**, v. 5, n. 2, p. 90 – 95, 1970.

RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine. **J Dent Res Special Issue**, v. 54, p. 57 – 62, 1975.

ROSENTHAL, S.; SPA°NGBERG, L.; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 98, p. 488 – 92, 2004.

SEMENOFF, T. A. D. V.; ARAÚJO, P. C.; PEDRINI, D. L.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; PEDRO, F. L. M.; MAMEDE-NETO, I.; BORGES, A. H. Efetividade antimicrobiana da clorexidina a 0,12% adquirida em diferentes farmácias de manipulação da região de Cuiabá – MT. Estudo “*in vitro*”. **UNICIÊNCIAS**, v.13, p. 181 – 91, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª Ed., 2007 Rio de Janeiro: p. 490, **Ed. LTC**.

SIQUEIRA, J. F.; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J Endod.**, v. 23, n. 3, p.167 – 69, 1997.

SOARES, J. A.; LEONARDO, M. R.; TANOMARU-FILHO, M.; SILVA L. A. B.; ITO, I. Y. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated P-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. **Braz Dent J.**, v. 18, n. 1, p. 8 – 15, 2007.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. 2. Ed., 1995 São Paulo: **Ed. Santos**.

THOMAS, J. E.; SEM, D. S. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J Endod.**, v. 36, p. 315 – 17, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Controle do crescimento microbiano. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 181 – 206, 2000.

VALERA, M. C.; CHUNG, A.; MENEZES, M. M.; FERNANDES, C. E. F.; CARVALHO, C. A. T.; CAMARGO, S. E. A.; CAMARGO, C. H. R. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 110, p. e82 – e87, 2010.

VALENTOVIC, M. A.; BALL, J. G.; HONG, S. K.; ROGERS, B. A.; MEADOWS, M. K.; HARMON, R. C.; RANKIN, G. O. In Vitro toxicity of 2- and 4-chloroaniline: comparisons with 4-amino-3-chlorophenol, 2-amino-5-chlorophenol and aminophenols. **Toxicology in Vitro**, v. 10, p. 713 – 20, 1996.

VIANNA, M. E.; HORZ, H. P.; CONRAD, G.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F.J.; GOMES, B. P. F. A. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 22, p. 411 – 18, 2007.

YEUNG, S. Y.; HUANG, C. S.; CHAN, C. P.; LIN, C. P.; LEE, P. H.; JIA H. W. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. **Int Endod J.**, v. 40, n. 11, p. 837 – 44, 2007.

ZAMANY, A.; SAFAVI, K.; SPÅNGBERG, L. S. W. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 96, p. 578 – 81, 2003.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Chlorhexidine: action's mechanisms and recent evidences of it's efficacy over supragingival biofilm context. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35 – 43, 2007.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. **J Endod.**, v. 32, n. 5, p. 389 – 98, 2006.

WINROW, M. J. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. **J. Periodont. Res. 8; Suppl.**, v. 12, p. 45 – 48, 1973.

ANEXO

Os produtos em forma de gel e solução, o lote e a data de validade das amostras utilizadas neste experimento estão listados na Tabela IX:

Tabela IX. Produtos, lote e data de validade dos produtos utilizados no experimento.

Produtos	Lote	Data de validade
Gel Chlorhexidina®	055 10	02/2012
Digluconato de Clorexidina 20 % All Chemistry®, utilizado no preparo do Gel Uniararas	ALL 32220	07/2011
Digluconato de Clorexidina 20 % Sigma®, utilizado no preparo do Gel e Solução Sigma	065K0691	Sem especificação
Gel Natrosol (Hidroxietilcelulose) utilizado no preparo dos Géis Uniararas e Sigma	XC27558651	03/2012