



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Fármacos e Medicamentos

**ESTUDO BIOLÓGICO E DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÃO DO SAL TETRAPALMITATO DE
CLOREXIDINA PARA USO EM DOENÇAS BUCAIS**

Renato Farina Menegon

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

- 2009 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO BIOLÓGICO E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO
DO SAL TETRAPALMITATO DE CLOREXIDINA PARA USO EM
DOENÇAS BUCAIS

Renato Farina Menegon

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M541 Menegon, Renato Farina
Estudo biológico e desenvolvimento de formulação do sal tetrapalmitato de clorexidina para uso em doenças bucais / Renato Farina Menegon. – Araraquara, 2009.
96 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Chung Man Chin

Co-orientadora: Vera Lúcia Isaac Borges

1.Clorexidina. Pró-fármaco. 3Química farmacêutica. I.Chung Man Chin, orient.. II. Borges, Vera Lúcia Isaac, co-orient. III.Título.

CDD 615.19

CAPES: 40300005

Agradecimentos

À Profa. Dra. Chung Man Chin, por toda confiança em meu trabalho, sempre me dando total liberdade para a realização deste projeto, e pelo apoio inestimável em um dos momentos de mais difícil superação.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac, pelo apoio e orientação na realização do estudo reológico.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolito, e à Técnica Maria do Carmo, pela orientação e realização dos ensaios de atividade microbiana.

Ao Prof. Dr. Horácio Faig Leite, por todo o acompanhamento de meu trabalho, desde seu início no mestrado, até a conclusão final, sempre o enriquecendo com seus profundos conhecimentos em odontologia e anatomia.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa, por toda amizade e pelas ótimas sugestões dadas para a elaboração das suspensões utilizadas.

Às Professoras Doutoras Magali Monteiro da Silva e Natália Soares Janzantti, pelo apoio ao trabalho e todo auxílio desde o planejamento até a execução da análise de reconhecimento de gostos.

À Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli, pela sua presença na banca examinadora, contribuindo muito para a redação final desta tese.

À Profa. Dra. Rosângela G. P. Machado e à Técnica Sandra, por ter emprestado inúmeras vezes a centrífuga de seu laboratório, sem a qual não poderia realizar boa parte de meu trabalho!

À minha amada e sempre presente companheira, Lorena Blau, sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais e avó, por sempre incentivarem a continuidade de meu estudo, me apoiando em todos os momentos de necessidades e dificuldades.

À aluna Bruna, do Laboratório de cosmetologia, por tanto me auxiliar no ensaio reológico, sempre com muita paciência e atenção na interpretação dos resultados.

Aos Técnicos, Dudu, Osmar e Matheus, por tornarem o Laboratório um ambiente muito mais divertido (nos raros momentos em que estavam presentes...!)

Aos companheiros do Laboratório, Jean, Ednir, Diego, Thales, Itzia, Escobar, Richard e Rafael entre tantos outros... pela ajuda mútua na realização dos experimentos, assim como pelo voluntarismo nos ensaios em humano!

Aos colegas Zé Ricardo e Priscila, por toda a amizade e confiança demonstrada nestes últimos anos.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro à realização do trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
1.1. Microbiota Comensal e Doenças Bucais	08
1.2. Antissépticos Bucais	13
<i>Compostos de Amônio Quaternário (CAQs)</i>	17
<i>Bisbiguanidas</i>	19
<i>Biguanidas Poliméricas</i>	21
1.3. Clorexidina – Principais Efeitos Adversos	23
1.3.1. <i>Gustação</i>	24
<i>Papilas gustativas</i>	24
<i>Bloqueio do gosto doce por ação da quinina</i>	25
<i>Bloqueio do gosto salgado pela ação da amilorida</i>	26
<i>Bloqueio dos gostos amargo e salgado pela ação da clorexidina</i>	27
1.3.2. <i>Descoloração do esmalte</i>	30
1.4. Formulações	33
2. OBJETIVO	37
3- MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1- Materiais	38
3.2- Métodos	39
3.2.1. <i>Obtenção do sal tetrapalmitato de clorexidina</i>	39
3.2.2. <i>Caracterização estrutural</i>	40
3.2.2.1. <i>Espectrofotometria no infravermelho</i>	40
3.2.2.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	40
3.2.2.3. <i>Espectrofotometria no ultravioleta</i>	40
3.2.3. <i>Teste de atividade antimicrobiana - Hole Plate</i>	41
3.2.4. <i>Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)</i>	42
3.2.5. <i>Teste de desenvolvimento de coloração</i>	44
3.2.6. <i>Teste de reconhecimento dos gostos básicos</i>	45
3.2.7. <i>Cinética de eliminação da cavidade bucal</i>	47
3.2.8. <i>Estudo reológico</i>	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Preparação do sal tetrapalmitato de clorexidina	51
4.2. Teste de atividade antimicrobiana - <i>Hole Plate</i>	54
4.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	55
4.4. Teste de desenvolvimento de coloração	57
4.5. Teste de reconhecimento dos gostos básicos	60
4.6. Cinética de eliminação da clorexidina da cavidade bucal	69
4.6. Estudo Reológico	75
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO

A clorexidina é um dos antimicrobianos mais efetivos e amplamente empregados na medicina e odontologia. Apesar de sua excelente atividade, seu uso é limitado em cerca de 7 dias devido ao desenvolvimento de importantes efeitos adversos, como o aparecimento de manchas sobre o esmalte, língua e restaurações dentárias; alteração no paladar devido à interação com as papilas gustativas, e um gosto fortemente amargo, o qual é muito difícil de ser mascarado em preparações farmacêuticas.

Este trabalho apresenta um estudo de um novo sal hidrofóbico de clorexidina, o tetrapalmitato, que diferentemente dos outros sais existentes, apresenta-se como um íon tetracátion, e é praticamente insolúvel em soluções aquosas. Assim, sua atividade biológica frente *Streptococcus mutans*, a principal bactéria envolvida na cárie dental, foi testada *in vitro*, assim como a propriedade de formação de manchas nos dentes e alteração no reconhecimento de alguns gostos básicos. Finalmente, através de estudo cinético salivar, verificou-se a possibilidade de preparar-se uma formulação apropriada para um enxaguatório bucal.

Os resultados apontam para um importante benefício sobre as características indesejáveis da clorexidina. Assim, o sal tetrapalmitato foi capaz de diminuir o efeito de aparecimento de manchas, e diminuir o sabor amargo e a interação da clorexidina com as papilas gustativas. No entanto, a formação do sal tetracátion diminuiu a propriedade de substantividade da clorexidina, a qual pode ser compensada pela elaboração de uma suspensão aquosa com uma dosagem mais elevada do sal.

Espera-se com estes resultados obter uma formulação para higiene bucal que mantenha a excelente atividade cariostática da clorexidina, permitindo a ampliação do seu período de uso assim como a adesão dos pacientes ao tratamento.

ABSTRACT

Chlorhexidine is one of the most effective and widely employed antimicrobial in medicine and dentistry. In spite of its excellent activity, the use of chlorhexidine is limited to about 7 days, because of the development of important side effects, like staining on enamel, tongue and dental restorations, alteration on taste perception due to its interaction with taste buds and strong bitter taste, which is very hard to be masked in pharmaceutical preparations.

This work presents a study of a new hydrophobic tetrapalmitate salt of chlorhexidine, that unlike other existing salts, it comes as a tetracation ion and is almost insoluble in aqueous solution. Thus, its biological activity against *Streptococcus mutans*, the main bacteria involved in dental caries, was tested *in vitro*, as well as its staining property and alteration on taste. Finally, by the salivary kinetic study, the possibility of doing an appropriate formulation for mouth rinse was verified.

The results led to an important benefit on the undesired characteristics of chlorhexidine. So, the tetrapalmitate salt was able to diminish the staining effect, as well as its bitter taste and interactions with taste buds. However, the tetracation salt formation has diminished the chlorhexidine substantivity property, which could be compensated by the elaboration of an aqueous suspension with high dosage of the salt.

It is hoped with these results to obtain an antiseptic formulation for oral care that keeps the excellent cariostatic activity of chlorhexidine, facilitating the extension of the period of use as well as the patient compliance.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde, OMS, define a saúde bucal como parte integral da saúde geral e essencial para o bem-estar (WHO, 2008). Mais do que belos dentes, a saúde bucal implica estar livre de dores crônicas orofaciais, lesões no tecido bucal, defeitos congênitos como lábio leporino, câncer na boca e na faringe, além de outras doenças e desordens que afetam os tecidos bucais, dentais e craniofaciais. Doenças bucais restringem atividades na escola, no trabalho e em casa, provocando milhões de horas perdidas na escola e no trabalho a cada ano em todo o mundo. O impacto psicossocial destas doenças frequentemente diminui a qualidade de vida destas pessoas (WHO, 2008).

Carie dental é ainda o principal problema de saúde bucal em muitos países industrializados, afligindo 60 a 90% dos escolares e a grande maioria dos adultos. É também a doença bucal mais prevalente em muitos países Asiáticos e Latino-americanos, enquanto parece ser menos comum e menos severo em muitos países Africanos, provavelmente devido ao baixo consumo de açúcar nestas populações (WHO, 2008). Dentre os principais fatores de risco associados às doenças bucais temos o mau hábito alimentar, como grande consumo de doces, além do uso do tabaco e álcool, e o stresse a que somos submetidos todos os dias.

Uma boa higiene bucal inicia-se com uma adequada escovação dos dentes e gengivas, no entanto, para muitos pacientes, a habilidade necessária e a motivação pessoal para uma remoção mecânica eficaz da placa bacteriana, estão além de suas capacidades, sobretudo para aqueles que estão impossibilitados de movimentar seus membros superiores, ou apresentam movimento limitado (HULL, 1980).

Neste sentido, pode-se considerar o desenvolvimento de fármacos eficazes na profilaxia e tratamento de doenças bucais uma estratégia muito importante. Entre os agentes mais amplamente utilizados no controle da cárie e da gengivite está o digluconato de clorexidina (DGCHX) (figura 1.1), um antisséptico de amplo espectro e de eficácia comprovada (LÖE; SCHIOTT, 1970). No entanto, têm sido demonstrados alguns efeitos adversos devido ao seu uso durante períodos prolongados, os quais limitam sua aceitação e

adesão ao tratamento, como amarelamento dos dentes, da língua e de restaurações dentárias, aumento na deposição de cálculo salivar, gosto desagradável de difícil mascaramento farmacotécnico e lesão descamativa superficial (LÖE; et al., 1976; TILLIS, 1999).

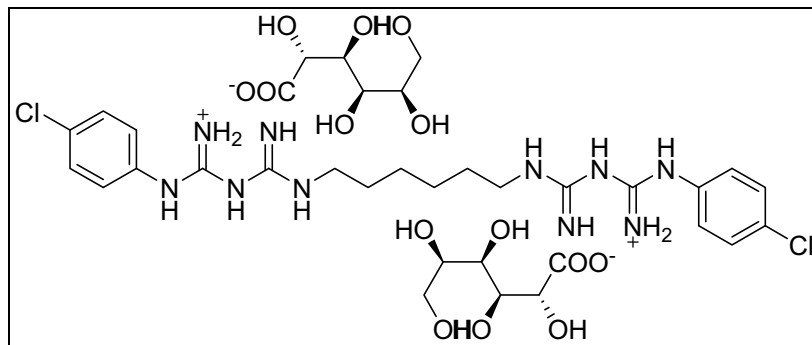


Figura 1.1. Estrutura química do digluconato de clorexidina

1.1. Microbiota Comensal e Doenças Bucais

A microbiota comensal, também denominada normal ou nativa, consiste naqueles microrganismos que estão presentes nas superfícies corpóreas recobertas por tecido epitelial, que são expostas ao ambiente externo, tais como os tratos gastrointestinal, epitelial, respiratório, e vaginal (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ; et al., 2004). A interação entre macro e microrganismos começa logo nas primeiras horas após o nascimento, sendo a pele e a mucosa dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital as principais vias de entrada dos microrganismos. Esta interação fisiológica leva à colonização das superfícies epiteliais e a coexistência harmoniosa e benéfica ao hospedeiro, o que é denominado comensalismo, e assim um complexo ecossistema aberto é alcançado (SAVAGE, 1999). No entanto, sob certas condições, esta interação com os microrganismos pode se tornar prejudicial ao hospedeiro (parasitismo) e infecções oportunistas podem ocorrer (BERG, 1999).

O número de bactérias comensais vivendo nas superfícies de mucosas e pele excede ao número de células que compõem o corpo humano, estima-se que somos compostos por cerca de 10^{13} células mamíferas e por 10^{14}

microrganismos comensais (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ; et al., 2004). A microbiota comensal é composta principalmente por bactérias, mas vírus e fungos também estão presentes. Calcula-se que cerca de 1000 espécies de bactérias fazem parte desta microbiota (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ; et al., 2004). Somente na superfície bucal estão presentes mais de 500 espécies de bactérias, somando um total de 10^{10} bactérias que habitam dentes, gengiva, mucosa bucal e língua. A superfície dos dentes acumula um complexo de bactérias em agregados ou biofilmes, e estas estão diretamente relacionadas à formação de placas dentais e cáries (RIJKOM; et al., 1996). Os principais microrganismos presentes são *Streptococcus* e *Actinomyces*, mas o sulco gengival contém um grande número de bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella* spp (WILSON; et al., 2002, KÖNÖNEN; et al., 2007).

A microbiota comensal é parte integral de um complexo de mecanismos naturais sobre as superfícies de mucosas e pele que garantem a resistência do organismo contra microrganismos patogênicos. Em uma constituição ótima, ela previne a ligação e a multiplicação de microrganismos patogênicos nestas superfícies e sua invasão para dentro das células epiteliais e circulação sanguínea (WILSON; et al., 2002).

Apesar da impossibilidade da ausência total de placa bacteriana na superfície bucal, a gengiva e demais estruturas periodontais podem ser mantidas saudáveis se a quantidade de placa for pequena, se a microbiota for pouco virulenta e ainda se os mecanismos de defesa orgânica forem eficazes (PAGE; KORNAM, 1997). Quando este equilíbrio entre o organismo hospedeiro e a microbiota comensal se rompe, situações patológicas podem surgir.

A presença de aparelhos ortodônticos fixos, por exemplo, está associada com aumento do risco de inflamação do tecido gengival, além da descalcificação do esmalte (ØGAARD, 1992). Estes aparelhos impedem uma remoção mecânica apropriada da placa bacteriana, aumentando as áreas de retenção da mesma (BOYD, 1983; OLYMPIO; et al. 2003), conseqüentemente há um aumento da quantidade de *Streptococcus mutans* na placa supragengival e na saliva, condição que pode ocasionar inflamação nesta área

(SCHEIE; et al., 1984), que está fortemente associada com a formação de cáries (RIJKOM; et al., 1996).



Figura 1.2. Fotografia mostrando a presença de múltiplas lesões de cárie dental (imagem gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Horácio Faig Leite, da Faculdade de Odontologia da Unesp/SJC)

As bactérias formadoras do biofilme são habitantes normais da cavidade bucal que recobrem a superfície dos dentes. A colonização bacteriana se dá naturalmente e em poucas horas. Não havendo interferência no processo, o biofilme dental se modificará quantitativa e qualitativamente, tornando-se mais propício ao aparecimento da doença periodontal inflamatória (LISTGARTEN, 1987; CHRISTERSSON; et al, 1989).

Nenhum outro microrganismo está tão associado à formação de cáries quanto o *S. mutans* (VAN HOUTE, 1994). Os microrganismos cariogênicos apresentam a capacidade de se fixar na superfície dentária, transportar rapidamente carboidratos fermentáveis do ambiente externo para dentro do citoplasma e transformá-los em ácidos a fim de obterem energia (ATP) e produzir polissacarídeos extracelulares, de importância na adesão bacteriana, e intracelulares, os quais poderão ser degradados em períodos em que o suprimento de nutrientes é baixo (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). A redução do pH como consequência do metabolismo dos carboidratos através da via glicolítica, com a produção final de ácido lático e acético, está fortemente associado à desmineralização e às lesões de cárie (THYLSTRUP; FEJERSKOV,

2001). A presença e a quantidade deste microrganismo nos biofilmes dentais são utilizadas como indicadores de cariogenicidade do mesmo (LOESCHE; ROWAN; STRAFFON; et al, 1975).

A placa bacteriana é sabidamente o fator iniciante do desenvolvimento de cáries e gengivites, sendo o seu controle, portanto, o ponto principal de uma boa prática de higiene bucal (MOORE; et al., 1984). A formação da placa dá-se inicialmente com a adesão de uma película de constituintes salivares à superfície dental, a película adquirida, a qual é composta por material protéico acelular derivado de componentes salivares específicos, que compreendem fosfoproteínas, glicoproteínas e lipídeos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). Acredita-se que esta película salivar seja a responsável direta pela subsequente aderência inicial das bactérias orais, as quais são principalmente *Streptococcus sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis* biótipo 1. Esta aderência ocorre provavelmente devido às interações entre receptores específicos na superfície bacteriana (adesinas) com oligossacarídeos na estrutura central protéica das glicoproteínas da película (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). Uma vez ocorrida a adesão e a colonização, dá-se início aos processos de aderência secundários, ou sucessão microbiana, onde ocorre uma troca da placa dominada por *Streptococcus* por uma placa dominada por *Actinomyces* (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). Nesta etapa, a formação de produtos bacterianos extracelulares (levanos e glucanos) podem agir aumentando a adesão entre as células e as protegendo. Se não houver nenhum distúrbio dentro de 2 a 3 dias, a placa começa a mudar. Na medida em que os depósitos bacterianos tornam-se mais espessos, o ambiente mais interno da placa torna-se anaeróbio e as bactérias inicialmente aeróbicas ou anaeróbicas facultativas vão sendo progressivamente substituídas por espécies anaeróbicas, as quais predominam dentro de 9 dias (NISENGARD; NEWMAN, 1997; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). A massa da placa cresce até 200% de seu tamanho inicial, tornando-se uma grossa massa gelatinosa sobre a superfície do esmalte. Se deixada permanecer na superfície do dente, pode ocorrer deposição de fosfato de cálcio, levando à transformação da placa em cálculo (figura 1.3) (NISENGARD; NEWMAN, 1997).



Figura 1.3. Fotografia mostrando a presença de cálculo generalizado na superfície dos dentes (imagem obtida em www.ctocri.com.br)

A microbiota na placa dental humana é diversa e muito complexa, consistindo em mais de 300 tipos de bactérias diferentes, incluindo *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Prevotella*, *Eubacterium* e *Bacterioides* (MOORE, 1987; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001), mas somente um pequeno grupo delas, denominadas microrganismos periodontopáticos, são considerados agentes etiológicos primários na doença periodontal humana (VAN WINKELHOFF, 1991).

Os principais microrganismos associados à doença periodontal são *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga sp*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum* (HAFFAJEE; et al, 1988; TANNER; BOUDIN, 1989). Embora não seja certo quais microrganismos, ou combinação deles, estejam envolvidos na indução da doença periodontal, estudos clínicos sugerem que *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, e *Treponema denticola* estejam presentes na maioria dos casos nos sítios de progressão da doença (SLOTS; LISTGARTEN, 1988; SIMONSON; et al, 1992).

As doenças periodontais são o resultado da destruição dos tecidos periodontais pela ação dos produtos tóxicos liberados na área subgingival pelos periodontopatógenos específicos, como também pela resposta inflamatória desencadeada pela presença de microrganismos e seus subprodutos tóxicos. A inflamação leva à produção local de citocinas e

mediadores biológicos (interleucinas e prostaglandinas). Estas doenças estão, portanto, associadas com a colonização da área subgengival por bactérias patogênicas específicas, algumas destas com capacidade de invadir os tecidos periodontais provocando danos. A formação de bolsas profundas, observadas nas formas graves de doença periodontal, oferece um microambiente mais propício ao crescimento microbiano anaeróbio, o que agrava o quadro da periodontopatia (BARILI, 2003).

1.2. Antissépticos Bucais

O uso de agentes antiplaca é frequentemente recomendado em situações onde a higiene bucal é dificultada, comprometida ou impossibilitada (ADDY; MORAN, 1997). A administração de clorexidina, antisséptico bucal mais comumente utilizado, seja por meio de enxágue bucal, *spray* ou gel, é ainda considerada como padrão, e em muitas situações seu uso tem sido considerado como adjunto ao controle mecânico da placa, especialmente durante terapia periodontal; como profilática após cirurgia bucal, incluindo terapia periodontal; como inibidor do desenvolvimento de placas em pacientes com fixação intermaxilar; para indivíduos fisicamente ou mentalmente incapazes de proceder com uma higiene bucal adequada; para pacientes medicamentosamente comprometidos; em pacientes muito idosos ou com quadro clínico terminal; em pacientes com elevado risco de contrair cáries; para limitar bacteremia e contaminação operatória por bactérias bucais, e para prevenir estomatite dental (QUIRYNEN; et al., 2001).

A eficácia do controle da placa bacteriana, e conseqüentemente da cárie dentária, através do emprego de agentes antimicrobianos já foi demonstrada por diversos autores em estudos *in vitro* e *in vivo* (GJERMO; et al., 1970; CURTIS; DOOLEY, 1979). Compostos de bisbiguanida, como a clorexidina, estão entre os mais efetivos no controle da placa, dada sua “substatividade”, ou seja, a capacidade de se aderir à superfície dentária e a partir daí ser lentamente liberada (GJERMO; et al., 1973). Esta propriedade da clorexidina seria seu grande diferencial sobre os demais agentes antimicrobianos (JENKINS; et al., 1988; JONES, 1997). Entretanto, esta mesma capacidade

que amplifica sua atividade biológica é também responsável por um de seus mais importantes efeitos colaterais, o desenvolvimento de manchas nos dentes (FLÖTRA; et al., 1971).

Dentre as bisbiguanidas mais estudadas e empregadas na terapêutica estão a clorexidina (1,1'-6-hexametileno-bis[*p*-clorofenil-biguanida]) e a alexidina, onde o grupo *p*-clorofenil terminal na primeira é substituído pelo etil-hexil (figura 1.4). Estes compostos não são absorvidos pela mucosa bucal ou trato gastrointestinal e são considerados não-tóxicos em animais e humanos (LOBENE; SOPARKAR, 1973; ESPOSITO, 1974; EMILSON; et al., 1975). Embora ambas as bisbiguanidas foram igualmente ativas contra *S. mutans in vitro*, a clorexidina mostrou-se mais eficaz no controle populacional de *S. mutans* implantados na cavidade bucal em ratos (CURTIS; DOOLEY, 1979).

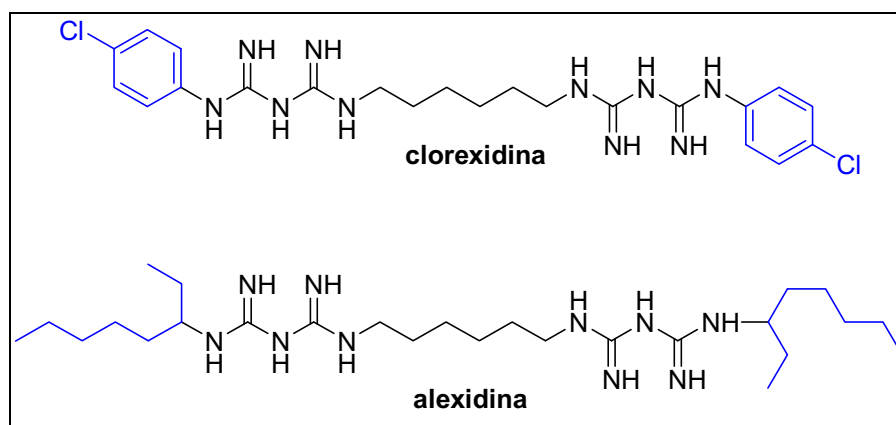


Figura 1.4. Comparação das estruturas químicas da clorexidina e alexidina

A clorexidina é um biocida bem conhecido que apresenta importante papel na redução da placa supragengival e no tratamento da gengivite (MARIS, 1995), sendo altamente ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não produtoras de cápsula (MANDEL, 1994); mesmo tendo sido introduzida na terapêutica há quase 50 anos, não há evidências de surgimento de resistência bacteriana, apenas a ocorrência de um pequeno aumento na concentração mínima necessária para inibir o crescimento de certos

microrganismos foi observado (GILBERT; McBAIN, 2002; GILBERT; McBAIN, 2003).

Dado seu caráter catiônico, é sabido que ela é capaz de formar sais de baixa solubilidade com ânions como fosfato, sulfato ou cloreto (BARKVOLL; et al., 1988). Barkvoll *et al.* (1989) demonstraram uma redução na atividade antiplaca da clorexidina quando o enxágue bucal é administrado em intervalo de até 30 minutos antes ou depois de outro enxágue com solução de laurilsulfato de sódio (LSS); uma vez que LSS é um detergente aniônico amplamente empregado em géis e cremes dentifrícios, é possível que ocorra uma interação química entre estes produtos de higiene bucal e a clorexidina, resultando na formação do sal insolúvel, limitando sua atividade biológica (BARKVOLL; et al., 1989).

Embora os antissépticos catiônicos sejam empregados desde a década de 1960 com muita eficácia e segurança, o mecanismo de ação destes compostos ainda não está completamente elucidado. Estes agentes catiônicos subdividem-se em 3 classes principais: compostos de amônio quaternário, onde fazem parte o cloreto de cetilpiridínio e de benzalcônio; as bisbiguanidas, onde temos a clorexidina e a alexidina, e por fim as biguanidas poliméricas, representada pelo polihexametilenobiguanida (PHMB) (GILBERT; MOORE, 2005). Embora todos compartilhem de um mecanismo de ação em comum, atuando provavelmente no mesmo epítopo, pequenas diferenças entre eles podem refletir em atividades diferenciadas.

A camada mais externa da célula bacteriana carrega uma rede de cargas negativas, frequentemente estabilizada pela presença de cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} . Isto está associado com a presença de ácidos teicóicos e polissacarídeos da parede de espécies Gram-positiva, e à presença de lipopolissacarídeos em Gram-negativas, assim como à própria membrana celular (figura 1.5) (SINGER; NICOLSON, 1972). Esta é a razão de muitos agentes antimicrobianos serem catiônicos e se ligarem fortemente à membrana. Estes agentes antimicrobianos requerem frequentemente em sua estrutura apenas uma carga fortemente positiva juntamente a uma porção apolar, de maneira a interagirem com a parede celular e se integrarem à membrana citoplasmática (GILBERT; MOORE, 2005). Tal interação é o suficiente para “perturbar” o crescimento bacteriano e em maiores

concentrações alterar a fluidez da membrana causando perda de elementos do citoplasma. Por este motivo estes compostos foram denominados por décadas de “detergentes biológicos”.

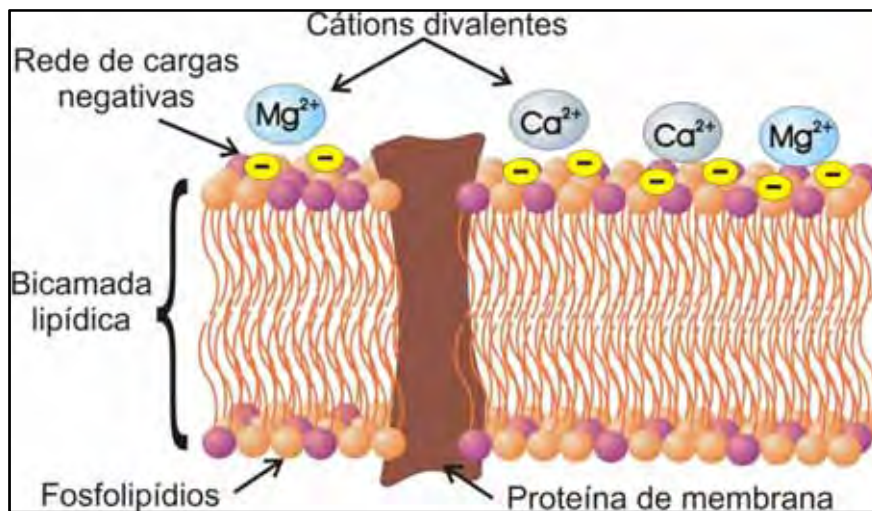


Figura 1.5. Representação da membrana celular

As membranas celulares são compostas primariamente por proteínas, envoltas por uma matriz lipídica, aproximando-se de uma bicamada. Estas proteínas tanto podem atravessar de um lado a outro a camada lipídica (proteínas integrais), como podem ser periféricas, estando associadas a apenas um dos lados da membrana. Muitas destas proteínas são requeridas para manterem a integridade estrutural da membrana, enquanto que outras são funcionais e associadas a catabolismo, produção de energia (fosforilação oxidativa) transporte celular e biossíntese da parede e produtos extracelulares (toxinas, fatores de virulência, etc.) (TRABULSI; et al., 2002). O ambiente hidrofóbico gerado pelos fosfolípidios modera a funcionalidade destas proteínas, assim cada uma delas é cercada por um fosfolípido específico capaz de interagir com ela. Em muitos casos a natureza da cabeça polar do fosfolípido auxilia na manutenção de uma configuração ativa de enzimas de membrana. A camada lipídica é então estabilizada pela presença de cátions divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} . Antimicrobianos catiônicos são relativamente hidrofóbicos, mas interagem inicialmente com a parede e a membrana celular através do deslocamento destes cátions divalentes. A interação subsequente do biocida catiônico com as proteínas de membrana e a bicamada lipídica depende da natureza específica do biocida (SINGER; NICOLSON, 1972).

Compostos de Amônio Quaternário (CAQs)

Compostos de amônio quaternário são basicamente constituídos por um grupo amônio quaternário ligado a uma cadeia *n*-alquílica, podendo conter grupamentos arílicos em sua estrutura. Uma vez que estes compostos são sintetizados a partir de óleos vegetais, eles geralmente são uma mistura de várias cadeias *n*-alquílicas (DAOUD; et al., 1983), assim, a cetrimida USP, referida como brometo de tetradeciltrimetilamônio, é constituída de uma mistura de cadeias *n*-alquílicas variando entre 8 e 18 átomos de carbonos, e o cloreto de benzalcônio constitui-se sempre de uma mistura de cadeias alquílicas de tamanho variável de *n*-alquildimetilbenzilamônio (BRANNON, 1997). A atividade destes compostos varia de acordo com a lipofilicidade gerada pela constituição das cadeias alquílicas, de tal forma que bactérias Gram-positivas e leveduras são mais sensíveis a compostos com cadeias alquílicas variando entre 12 e 14 átomos de carbono, e bactérias Gram-negativas são geralmente mais sensíveis a cadeias entre 14 e 16 átomos (GILBERT; AL-TAAE, 1985).

O modo de ação destes compostos sobre a célula bacteriana parece envolver uma perturbação da bicamada lipídica da membrana citoplasmática e da membrana externa de bactérias Gram-negativas, o que resulta numa liberação generalizada e progressiva do material citoplasmático para o meio externo. Em baixas concentrações, os CAQs ligam-se firmemente a sítios aniônicos da superfície da membrana causando a perda tanto da capacidade osmorregulatória da célula, quanto de íons potássio e prótons (LAMBERT; HAMMOND, 1973). Em níveis intermediários, estes compostos causam uma perda localizada de atividades fisiológicas da membrana, tais como respiração celular, transporte de solutos e biossíntese da parede celular (SALT; WISEMAN, 1970), e em concentrações mais elevadas, tais como as usualmente empregadas em formulações biocidas, levam à morte celular por solubilização da membrana e liberação de todos os componentes celulares (detergentes biológicos) (SALTON, 1968).

O mecanismo molecular envolvido nestas atividades engloba uma associação da carga positiva do átomo de nitrogênio carregado positivamente com a cabeça acídica dos grupos fosfolipídicos dentro da membrana e então a cauda hidrofóbica intercala-se no centro da membrana. Em baixas

concentrações, tal interação eleva a pressão superficial da área exposta da membrana diminuindo sua fluidez; a membrana passa então de um estado fluídico para líquido cristalino causando perda de muitas de suas atividades osmorregulatórias e fisiológicas. A lipofilicidade no centro da membrana é diminuída o que leva aos constituintes fosfolipídicos assumirem uma conformação hexagonal mais estável. Em concentrações usuais, soluções de CAQs formam agregados micelares que solubilizam certos constituintes hidrofóbicos da membrana, tais como fosfolípeos e lipídeo A (figura 1.6) (SALTON, 1968).

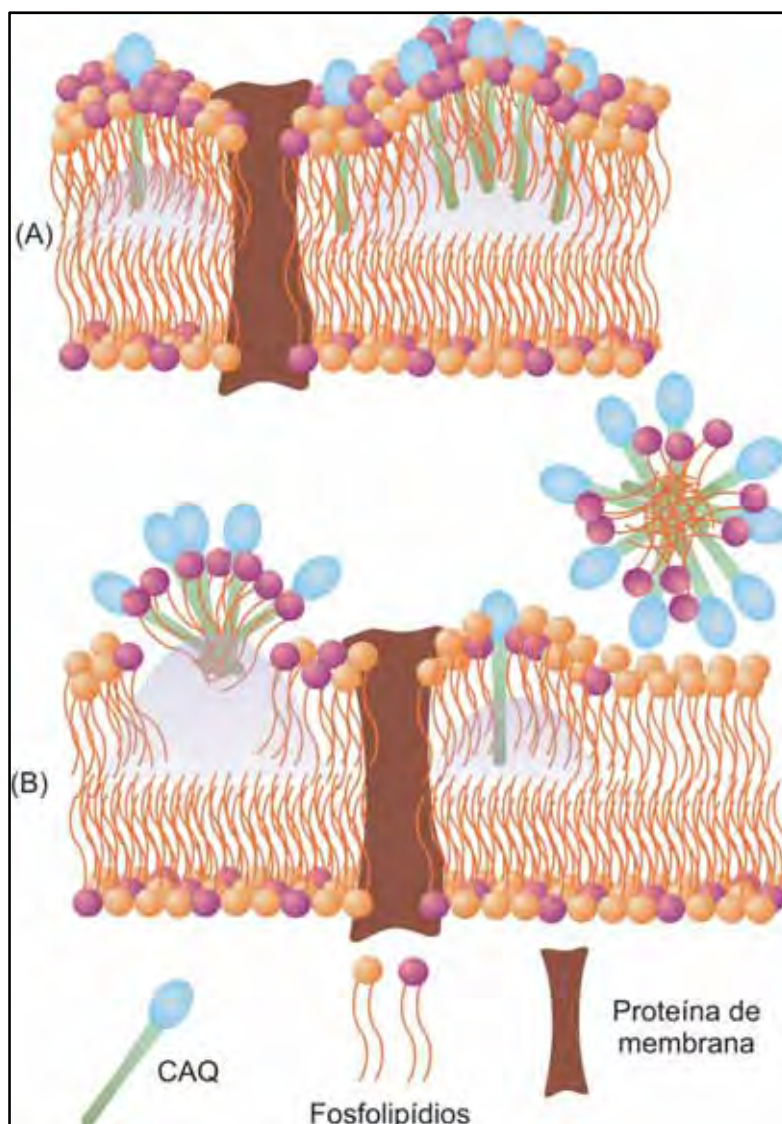


Figura 1.6. Representação da interação de um CAQ com a membrana celular. (A) Baixas concentrações de CAQ. (B) Formação de agregados micelares em concentrações mais elevadas de CAQ

Algumas espécies de bactérias, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* são relativamente insensíveis aos CAQs (SHAKER; et al., 1988). Esta baixa atividade biocida é atribuída a uma dificuldade destes compostos em penetrar através da membrana externa para alcançar a membrana citoplasmática.

Um aumento importante na atividade biocida pode ser alcançado quando o comprimento da cadeia *n*-alquílica é maior que 10 átomos de carbono. Este fenômeno está relacionado a uma dimerização independente da concentração das moléculas em solução; quando o comprimento da cadeia *n*-alquílica supera este tamanho, a atração entre as cadeias hidrofóbicas adjacentes excedem a força de repulsão provocada pelo átomo de nitrogênio carregado positivamente, mascarando sua polaridade. Tais dímeros são capazes de interagirem mais fortemente com a membrana citoplasmática que os respectivos monômeros e de se solubilizarem mais facilmente dentro dela (DAOUD; et al., 1983, GILBERT; AL-TAAE, 1985).

Um pequeno grau de resistência bacteriana a estes compostos foi demonstrado em dosagens próximas à CMI (Concentração Mínima Inibitória), e não afeta a atividade quando as concentrações usuais são empregadas (GILBERT; McBAIN, 2003). Esta resistência pode estar relacionada à atividade de bombas de efluxo (HEIR; et al., 1999). Estas bombas de efluxo podem então remover os CAQs do centro da membrana, diminuindo sua concentração para níveis sub-CMI.

Bisbiguanidas

Antissépticos bisbiguanídicos, como a clorexidina e alexidina, apresentam um mecanismo de ação muito similar ao dos CAQs, onde os grupos biguanídicos associam-se fortemente com os sítios aniônicos expostos da membrana e da parede celular, particularmente proteínas e fosfolípidios ácidos (CHAWNER; GILBERT, 1989a; CHAWNER; GILBERT, 1989b; STEINBERG; et al., 1999). Esta ligação é mais forte que aquela dos CAQs sendo capaz de deslocar cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} associados à parede e membrana (DAVIES, 1973; GENDRON; et al., 1999). A principal diferença entre os mecanismos moleculares dos CAQs e bisbiguanidas é que a

região hidrofóbica dos primeiros é intercalada dentro do centro hidrofóbico da membrana celular, enquanto que a região hidrofóbica da clorexidina não é, pois por ser constituída por apenas 6 átomos de carbonos ao invés de 12 a 16 como nos CAQs, e ainda com grupos polares ligados em cada uma das pontas desta curta cadeia, a clorexidina é incapaz de se dobrar o suficiente para intercalarse dentro da bicamada. A clorexidina forma então pontes entre “cabeças” polares de fosfolipídios adjacentes que se ligam nos grupos biguanídicos, deslocando os cátions divalentes antes associados à membrana (DAVIES, 1973). A formação desta ponte é crítica para a atividade antimicrobiana das bisbiguanidas; quando a cadeia hexametilênica é substituída por outra maior ou mais curta, a atividade é reduzida drasticamente. Este efeito deve estar relacionado com a distância entre as cabeças polares de fosfolipídios adjacentes firmemente empacotados na membrana celular, a qual é muito próxima ao comprimento da própria cadeia hexametilênica das bisbiguanidas (figura 1.7) (DAVIES; et al., 1954).

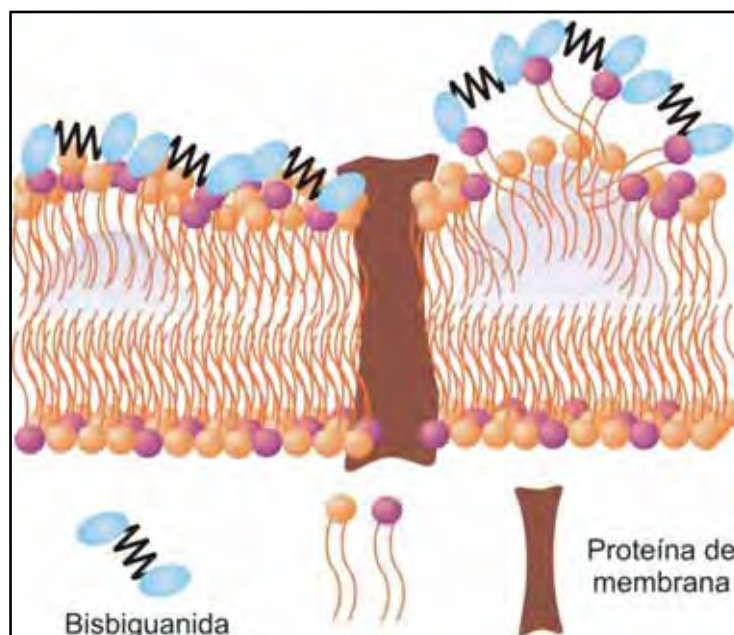


Figura 1.7. Representação da interação dos compostos bisbiguanídicos com a membrana celular. Formação de pontes entre cabeças apolares de fosfolipídios

Assim como nos CAQs, baixas concentrações de bisbiguanidas levam a uma diminuição na fluidez da membrana em ambas as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas com perda da atividade osmorregulatória e capacidade metabólica

da membrana celular e de suas enzimas, provocada pela perda de íons potássio, ATP e outros metabólitos, além da inibição da respiração celular e do transporte de solutos (HUGO; LONGWORTH, 1966; RYE; WISEMAN, 1968; TSUCHIYA, 1999). Enquanto a membrana ainda está intacta, seu potencial colapsa permitindo a passagem livre de prótons através dela (SHEPPARD; et al., 1997). Em concentrações mais elevadas (0,12%), a interação com a membrana é mais severa levando-a a adotar um estado líquido cristalino, perda da integridade estrutural e extravasamento de organelas e elementos citoplasmáticos (LONGWORTH, 1971, CHAWNER; GILBERT, 1989a; CHAWNER; GILBERT, 1989 b; MARIS, 1995).

Bactérias Gram-Negativas, por possuírem cápsulas, são mais resistentes à clorexidina e a outros antissépticos catiônicos, por dificultar a adsorção do biocida à membrana celular (SHAKER; et al., 1988). A cápsula é uma camada externa ligada à parede celular como um revestimento de extensão limitada e estrutura definida, composta por substâncias poliméricas extracelulares (SPE), geralmente de natureza polissacarídica, e desempenha os papéis de reservatório de água e nutrientes; aumento da capacidade invasiva de bactérias patogênicas; aderência e formação de biofilme, e aumento de resistência microbiana (TRABULSI; et al., 2002).

Diferentemente dos CAQs, as bisbiguanidas não sofrem ação das bombas de efluxo, uma vez que estes compostos não se intercalam completamente na membrana celular.

Biguanidas Poliméricas

Polihexametilenobiguanida (PHMB) são conhecidas por possuírem uma atividade antimicrobiana superior à dos demais antissépticos catiônicos (figura 1.8), no entanto, sua estrutura química é um tanto inexistente por ser uma mistura com cadeias polimérica variando entre 500 e 6000 daltons, o que limita seu amplo emprego na terapêutica, visto ser de difícil padronização do conteúdo (ROSE; SWAIN, 1956; KUSNETSOV; et al. 1997).

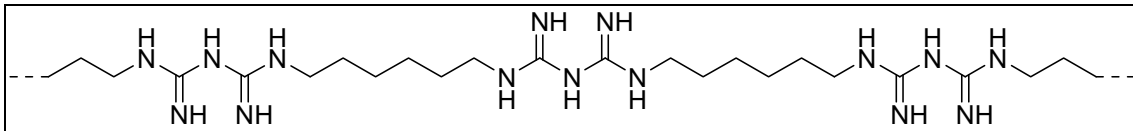


Figura 1.8. Estrutura química da PHMB

Como acontece nas bisbiguanidas, PHMB mostrou-se ligar-se rapidamente ao envelope de ambas as bactérias Gram-Positiva e Gram-Negativas, e com isto deslocando íons estabilizantes como Ca^{2+} (BROXTON et al., 1984). Esta ligação ocorre tanto na própria membrana como também em lipopolissacarídeos e peptidoglicanas da parede celular. As pontes hexametilênicas do polímero, como nas bisbiguanidas, são hidrofóbicas e suficientemente inflexíveis para impedir a intercalação no interior da membrana; uma vez mais, a interação do biocida com a membrana ocorre através da formação de uma ponte entre os grupos ácidos de fosfolípidios adjacentes. Uma particularidade desta interação é que tende a se concentrar ao redor de pontos de maior densidade de carga, que são gerados pela presença de proteínas integrais da membrana (figura 1.9) (IKEDA; et al., 1984a, 1984b). Então a interação entre a PHMB e a membrana se dá principalmente ao redor destas proteínas, levando à perda de sua funcionalidade por alterar o ambiente fosfolipídico ao seu redor. Como resultado, tem-se uma perda da capacidade biossintética, catabólica e de transporte da membrana. Dada sua natureza polimérica, a interação com a cabeça fosfolipídica não é restrita a dois fosfolípidios adjacentes como ocorre com a clorexidina, assim as pontes formadas a partir de uma mesma cadeia polimérica unem, num mesmo ponto, fosfolípidios ácidos comuns, alterando a distribuição homogênea destes ao longo da membrana, resultando na formação de um mosaico de domínios de fosfolípidios específicos (IKEDA; et al., 1985a, 1985b; IKEDA, 1991). Cada um destes domínios terá propriedades de transição de fase diferente, o que gera na membrana fragmentos de regiões fluídicas e líquido cristalinas.

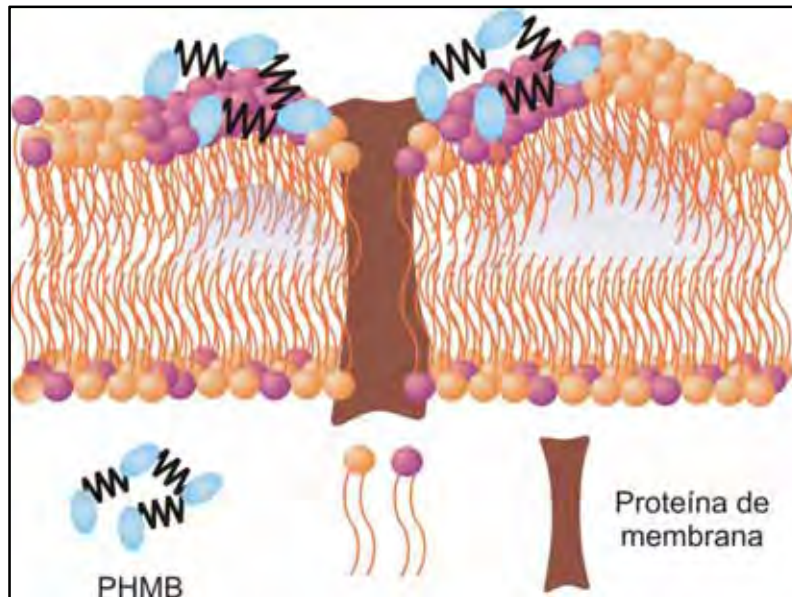


Figura 1.9. Representação da ação da PHMB sobre a membrana celular. Formação de domínios de fosfolípidios específicos

1.3. Clorexidina – Principais Efeitos Adversos

Embora a clorexidina seja um dos mais ativos e eficazes agentes antissépticos e considerada um “golden standart”, além de ser o mais amplamente recomendado em situações onde a correta higienização bucal esteja impossibilitada (ADDY; MORAN, 1997), não está livre de efeitos adversos indesejáveis (FLÖTRA; et al., 1971). Seu uso está frequentemente associado à irritação na mucosa bucal independentemente da dose empregada, à descoloração do esmalte dos dentes, levando ao desenvolvimento de manchas, sobretudo nas áreas interproximais, em restaurações dentárias e na língua (figura 1.10). Além disto, existe um efeito reversível sobre a percepção e a intensidade de gostos como salgado e quinina, e em menor extensão, doce e ácido (HELMS; et al., 1995).



Figura 1.10. Mancha na superfície da língua (imagem obtida em www.visualdx.health.com)

Somado a estes efeitos indesejáveis, os enxaguatórios contendo clorexidina apresentam mais de 10% de álcool etílico em sua constituição, o que além de gerar irritação da mucosa (BOLANOWSKI; et al., 1995), causa ainda outras manifestações bucais (SMIGEL, 1991).

1.3.1. Gustação

Papilas gustativas

As papilas gustativas são organismos receptores multicelulares presentes na mucosa da língua, formadas por distintos tipos celulares. As características morfológicas, ultraestruturais e imunohistoquímicas revelam a presença de 4 tipos celulares distintos: tipo I, II, III e células basais (FINGER; SIMON, 2000). As células do tipo II são consideradas células receptoras de gostos enquanto que as do tipo III apresentam as funções tanto receptoras quanto sinápticas, mantendo contato com o nervo aferente; as células do tipo I apresentam a função de suporte e as células basais dividem-se continuamente para a reposição das demais.

Estas células apresentam um período de vida limitado, sendo constantemente repostas através da proliferação das células basais (STONE; et al., 2002). Embora se saiba que os distintos tipos celulares originam-se das células basais, pouco foi elucidado sobre os mecanismos moleculares que regulam a gênese e a diferenciação destas células gustativas, assim, ainda há dúvida quanto a estas células serem de linhagens distintas, que mantêm seu

fenótipo ao longo de sua vida, ou serem apenas de diferentes estágios de desenvolvimento e maturação de um ou dois tipos celulares somente (STONE; et al., 2002; MIURA; et al., 2005).

Bloqueio do gosto doce por ação da quinina

Um dos fenômenos mais intrigantes de integração sensorial gustativa é a interação dos gostos amargo-doce, sendo também de grande relevância fisiológica. Enquanto a percepção de um gosto amargo sinaliza o potencial tóxico, como de alcalóides em certos vegetais, resultando num comportamento aversivo, a identificação do gosto doce, por outro lado, indica a presença de uma fonte energética alimentar. Em uma mistura de gostos doce-amargo, a diminuição da percepção do gosto final, devido à supressão do primeiro pelas substâncias amargas, representa um mecanismo de proteção adicional indicando a presença de um potencial tóxico mesmo num alimento ricamente energético (FRANK; et al., 2005). Experimentos eletrofisiológicos em hamsters demonstram que a inibição da resposta gustativa induzida do gosto doce através da ação da quinina, composto protótipo de amargo, se dá no tronco encefálico, nervo corda do tímpano, nervo facial e glossofaríngeo (FRANK; et al., 2001, 2005). Outros mecanismos múltiplos através dos quais se dá a interação de misturas gustativas doce-amargo também têm sido propostos. Tais mecanismos incluem interação química entre os compostos; competição pelos receptores; sinalização cruzada entre as cascatas de transdução dos receptores de gostos; interações laterais célula a célula dentro das papilas gustativas, e interações entre os sinais gustativos nas papilas, fibras nervosas aferentes e sistema nervoso central (VANDENBEUCH; et al., 2004; FRANK; et al., 2005).

Talavera *et al.* (2008) demonstraram que a supressão da resposta gustativa periférica do estímulo doce induzida por quinina deve-se principalmente à inibição das funções do receptor TRPM5, porém outros mecanismos também estão associados à supressão desta resposta em misturas doce-amargo (TALAVERA; et al., 2008). O receptor TRPM5 é um canal de cálcio não seletivo voltagem-dependente, pertencente à superfamília dos receptores de potencial transiente (TRP), e apresenta um papel crítico na

transdução dos gostos doce e amargo além de outros estímulos quimiossensoriais (ULLRICH; et al., 2005; TALAVERA; et al., 2005). É proposto que a ativação deste canal seja secundária à ativação da proteína-G acoplada aos receptores do gosto (LIMAN, 2007) e então gerar um potencial de despolarização necessário para a comunicação da célula receptora de gosto com as fibras aferentes (ROMANOV; et al., 2007).

Uma vez que estes receptores TRPM5 encontram-se na membrana basolateral das células gustativas, as substâncias capazes de interagir com eles deverão ser capazes de se difundir entre o espaço intersticial para assim alcançá-los.

Bloqueio do gosto salgado pela ação da amilorida

Em 1983, Schiffman *et al.* aventaram a hipótese de que o gosto salgado é percebido pela passagem direta de cátions para dentro das células gustativas, através dos canais de cátions (SCHIFMANN; et al., 1983). Amilorida é um fármaco que apresenta a capacidade de bloquear os canais de sódio epiteliais nos rins, e assim, através de ação semelhante sobre todas as papilas na boca, seria capaz de bloquear o gosto salgado de sais (KOOP; et al., 1998). Em estudo realizado por Spector *et al.* (1996), observou-se que os ratos utilizados no experimento não foram capazes de distinguir uma solução de NaCl de outra de KCl após tratamento oral com amilorida, e ainda, passaram a responder à solução de NaCl como se esta fosse solução de KCl (SPECTOR; et al., 1996). Daí inferiu-se que a amilorida interfere no mecanismo de transdução do sódio, que é crítico para o reconhecimento do NaCl, mas não impede o reconhecimento do KCl; nestes animais o NaCl parece também estimular o mesmo mecanismo que o KCl, ou algum similar, o qual não é afetado pela amilorida. Embora o mecanismo exato de inibição dos canais de cátions epiteliais pela amilorida não esteja completamente elucidado, acredita-se que esta possa ligar-se ao filtro de seletividade de cátions no lúmen externo do poro, e assim diminua o tempo em que o canal permanece em seu estado aberto (SCHILD; et al., 1997). No entanto, em humanos a amilorida não foi capaz de bloquear a percepção do gosto salgado, mas apenas diminuiu a

intensidade da resposta a este estímulo, talvez por um mecanismo distinto do bloqueio dos canais de cátions apical (HALPERN, 1998).

Bloqueio dos gostos amargo e salgado pela ação da clorexidina

Em estudo realizado por Breslin e Tharp (2001) em humanos, a clorexidina mostrou-se capaz de diminuir em 50% a intensidade do gosto do cloreto de sódio e em 80% a percepção da sua salinidade, além de diminuir a salinidade do KCl e NH₄Cl, enquanto que o cloridrato de quinina não mostrou interferência na percepção do gosto salgado (BRESLIN; THARP, 2001). Estes resultados foram confirmados por outros autores (FRANK; et al., 2001; GENT; et al., 2002). Esta diferença entre os efeitos da clorexidina e do cloridrato de quinina tornam evidentes que as duas substâncias atuam através de mecanismos diferentes, embora ambas sejam extremamente amargas, somente a clorexidina interferiu no gosto salgado. Este achado sugere que a clorexidina possa atuar através de um mecanismo semelhante ao da amilorida, atuando direta ou indiretamente nos canais de cátions, visto que ambos os compostos apresentam em sua estrutura química um grupamento biguanida (figura 1.11). Além disto, a clorexidina também diminuiu a intensidade dos estímulos amargos do cloridrato de quinina e do octa-acetato de sacarose (BRESLIN; THARP, 2001).

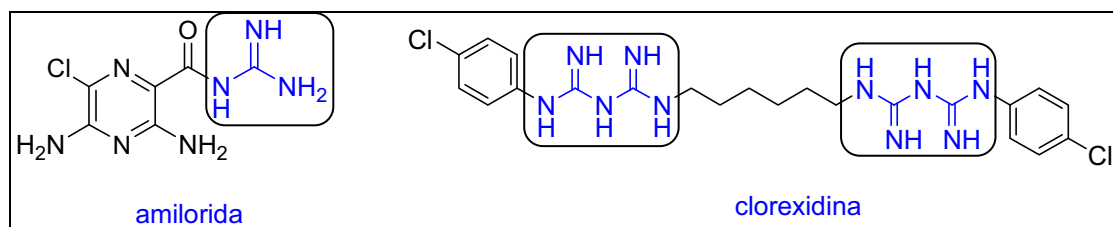


Figura 1.11. Estruturas químicas da amilorida e clorexidina, destaque para o grupo guanidina da amilorida e grupos biguanidínicos na clorexidina

Contudo, Frank *et al.* (2001) demonstraram a existência de uma resposta adaptativa recíproca entre a clorexidina e o cloridrato de quinina, indicando a possibilidade das duas substâncias atuarem em ao menos um receptor em comum para a geração do gosto amargo (FRANK; *et al.*, 2001).

Toxinas marinhas contendo grupo guanidina, tais como tetrodotoxina e saxitoxina (figura 1.12), também são capazes de inibir o gosto salgado. Esta inibição parece estar relacionada ao bloqueio do influxo de sódio através dos canais devido à interação entre os grupos guanidínicos carregados positivamente e os grupos carboxílicos do canal carregados negativamente no lado interno do lúmen externo dos canais de cátions. O grande tamanho molecular destas toxinas parece bloquear estericamente a passagem do canal. Este mecanismo geral de inibição parece ser o mecanismo pela qual a clorexidina inibe o gosto salgado em humanos (FRAVE; *et al.*, 1995; BRESLIN; THARP, 2001).

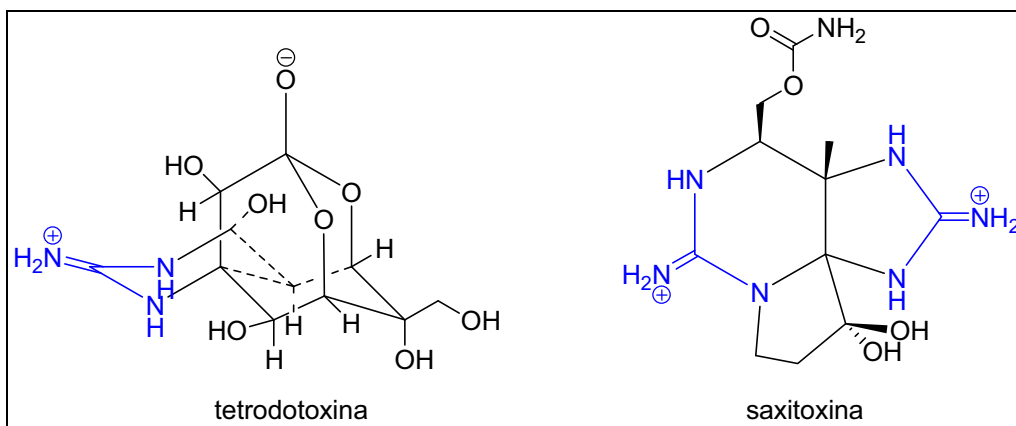


Figura 1.12. Estrutura química das toxinas marinhas

A diminuição da resposta salgada dos sais por ação da clorexidina é também explicada pela possibilidade desta fazer uma ponte entre células adjacentes, onde elevadas concentrações de Ca²⁺ diminui a permeabilidade paracelular de cátions (DESIMONE; *et al.*, 1995; KLOUB; *et al.*, 1998), o que se acredita ser devido à ligação deste cátion em sítios negativos entre células adjacentes. Efeito semelhante poderia ser atribuído à clorexidina, a qual criaria uma barreira física impedindo que os cátions das substâncias salgadas alcancem seus canais específicos (FRANK; *et al.*, 2001).

Embora a clorexidina tenha diminuído a percepção dos gostos salgado e amargo, ela não é bloqueadora de gostos, logo não foi capaz de interferir significativamente nos gostos doce, azedo e umami (BRESLIN; THARP, 2001). A clorexidina também não interfere significativamente na percepção do gosto amargo de sais amargos divalentes, tais como de cálcio ou magnésio, o que pode ser resultado do deslocamento da clorexidina de seu local de ação por estes sais (FRANK; et al., 2001). Curiosamente, um efeito pós-tratamento reportado por Frank *et al.* (2001) é a intensificação do gosto amargo mesmo de sais não amargos de sódio e lítio, e também da própria água; embora a razão deste efeito não possa ser explicada até o momento, acredita-se tratar da incapacidade dos sujeitos da pesquisa em identificar o gosto salgado, sobretudo de sais de sódio, o que os leva a perceberem outros gostos, incluindo o próprio gosto amargo da clorexidina. Este efeito de aumento da resposta amarga foi relacionado com a concentração de sódio nas soluções administradas (FRANK; et al., 2001).

Existem evidências de que a clorexidina iniba seletivamente ATPase de membrana em algumas bactérias (KUYAKANOND; QUESNEL, 1992). Com base nesta observação, sugere-se que ela tenha um impacto negativo sobre enzimas de membrana necessárias para a transdução dos sinais, particularmente do amargo, uma vez que este necessita da atuação enzimática sobre proteínas ligadas a membranas celulares. No entanto, o gosto doce também está envolvido com enzimas de membrana para a transdução, e este não é afetado pela clorexidina, o que sugere que ela seja capaz de inibir enzimas como fosfolipase C, proteína quinase C e fosfodiesterase, todas associadas à transdução do gosto amargo, enquanto que não apresenta atividade sobre a adenilato ciclase, enzima associada à transdução do gosto doce (LINDERMANN, 1996a, b). Caso a clorexidina apresentasse um efeito geral sobre a estrutura da membrana celular ou permeabilidade, o gosto da sacarose deveria ser bruscamente alterado (GENT; et al., 2002). Apenas um leve aumento na intensidade da resposta ao ácido cítrico tem sido reportado por algumas pesquisas e é atribuído à própria clorexidina, que pode causar uma suave e duradoura sensação de queimação na boca (PORTMANN; et al., 2001).

A capacidade de uma única substância inibir apenas, ou principalmente, os gostos salgado e amargo ao mesmo tempo, embora rara, não é exclusiva da clorexidina; Von Skramlik (1963) observou efeito semelhante com certos anestésicos tópicos, tais como diocaína e psicaína (figura 1.13) (VON SKRAMLIK, 1963). Este achado sugere que a transdução dos gostos amargo e salgado possa não estar relacionada a dois mecanismos bioquímicos completamente distintos, mas sim passar por ao menos um ponto em comum, por exemplo, um canal de cátion não específico em células sensíveis ao gosto salgado pode ser o caminho direto para a transdução do gosto salgado, enquanto que este mesmo canal, ou similar, possa estar envolvido na cascata de transdução do sinal amargo em células sensíveis a este gosto (BRESLIN; THARP, 2001).

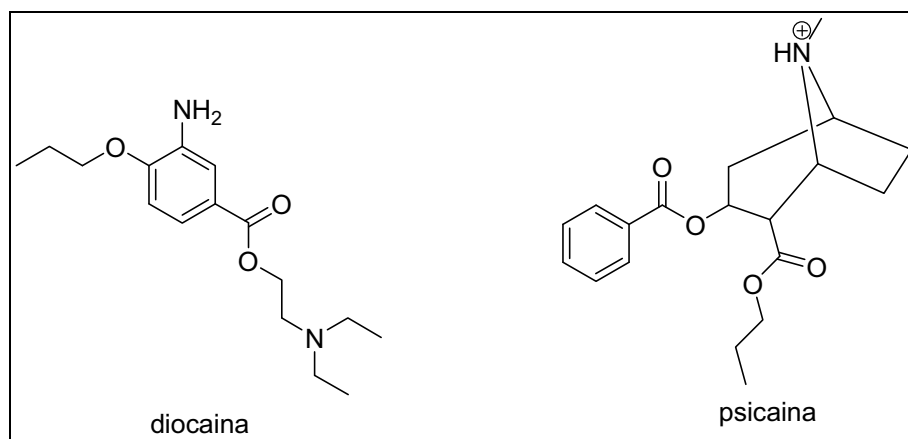


Figura 1.13. Estruturas químicas dos compostos diocaína e psicaína

1.3.2. Descoloração do esmalte

A descoloração de dentes e restaurações dentárias, assim como o aparecimento de manchas de coloração marrom sobre próteses, língua e gengiva é um dos efeitos adversos mais frequentemente relacionado ao uso contínuo de produtos para higiene bucal contendo clorexidina. Este efeito aparece tanto na administração de enxaguatório bucal, géis, gomas de mascar contendo clorexidina, *spray* e dentifrícios, limitando a aplicação deste antisséptico na odontologia preventiva (FLÖTRA; et al., 1971; ADDY, 1986;

SMITH; et al., 1996). As manchas adquiridas são extrínsecas por natureza, e uma vez estabelecidas, a remoção usualmente requer um tratamento profissional (ADDY; et al., 1991). Na tentativa de se reduzir este efeito, tem-se estudado a aplicação de dosagens menores de clorexidina (AINAMO; ETEMADZADEH, 1987; SMITH; et al., 1996), ou sua associação a agentes químicos capazes de minimizar a descoloração (YATES; et al., 1993; SANZ; et al., 1994).

Claydon *et al.* (2006) compararam a descoloração provocada pela administração diária durante 6 semanas de gel dentífrico sob dois regimes de tratamento diferentes: mantendo-se a concentração normal de 1% de clorexidina em duas escovações diárias; e alternando com uma escovação empregando-se um dentífrico fluorado comum. Neste experimento, foi observado que mesmo reduzindo-se a dosagem diária de clorexidina, 30% dos 157 voluntários reclamaram do surgimento das manchas. Ambos os regimes de tratamento produziram mais descoloração que quando somente dentífrico fluorado comum foi empregado (CLAYDON; et al., 2006).

Em um estudo *in vitro*, Addy *et al.* (2005) compararam a eficácia de um sistema anti-descoloramento (*anti-discoloration system* – ADS) empregado em enxaguatório bucal. Neste estudo não houve diferença entre o enxaguatório contendo apenas clorexidina e aquele contendo ADS. Baseados neste estudo e em outros publicados sobre o tema, os autores concluem então que não é possível obter um enxaguatório que, mantendo a eficácia da clorexidina, seja capaz de não produzir este efeito indesejado (ADDY; et al., 2005).

Embora quase todos os trabalhos publicados estudem apenas a influência de cromógenos exógenos, advindos principalmente do chá preto, a descoloração e surgimento de manchas também estão associados a fatores endógenos individuais, ou seja, a substâncias orgânicas intrabucais e, conseqüentemente, suas interações com os agentes químicos utilizados (LEE; POWERS, 2006). Neste sentido, é de grande importância conhecer a constituição da saliva e da película salivar adquirida.

A saliva é uma secreção exócrina produzida pelas glândulas salivares, levemente acídica, com valores normais de pH entre 5,8 e 7,1. Sua composição exata é difícil de ser determinada, uma vez que se trata de um fluido variável cuja constituição varia em razão do próprio fluxo salivar e da

saúde bucal do indivíduo. O muco da cavidade nasal e faringe também contribuem para a formação da saliva integral (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001). É composta por cerca de 99,0 a 99,5% de água e 0,5 a 1% de compostos orgânicos e inorgânicos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Estes compostos compreendem imunoglobulinas, proteínas, enzimas, compostos nitrogenados e principalmente mucina, a qual é o principal componente do muco, recobrando toda a superfície mucosa (TABAK; et al., 1982). A película salivar formada sobre o esmalte da superfície do dente é o resultado da adsorção seletiva de proteínas salivares (albumina, γ -globulina, mucoproteína, fosfoproteínas e glicoproteínas) e lipídeos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001), e está envolvida na proteção da superfície do esmalte (SKJORLAND; et al., 1995).

A película salivar assim formada constitui-se de 80% de proteínas e 20% de carboidratos (glicose); adquire sua espessura inicial em cerca de 2 a 3 minutos, torna-se 3 vezes mais espessa nos próximos 30 minutos e permanece assim por cerca de 10 horas, protegendo a superfície do esmalte contra erosão provocada por ácidos orgânicos (NEKRASHEVYCH; STOSSER, 2003).

O mecanismo de formação das manchas vem sendo discutido por inúmeros autores, sendo o mais aceito uma interação entre antissépticos dicatiônicos com cromógenos aniônicos alimentares, principalmente aqueles presentes em sucos, molho de soja, café, chá preto e vinho tinto, causando precipitação da clorexidina adsorvida (ADDY; et al., 1985). Este mecanismo explica também o aparecimento de efeito semelhante com o emprego de outros antissépticos catiônicos e de compostos de metais polivalentes (ADDY, 2003; WATTS; ADDY, 2001). Com menor divulgação, tem-se a hipótese da aceleração da reação não enzimática de escurecimento (Reação de Maillard) dentro da película salivar, e a desnaturação desta película com a formação de sulfitos pigmentados de estanho ou ferro (WATTS; ADDY, 2001).

Com o uso de técnicas elipsométricas, tem sido possível acompanhar cineticamente a adsorção da película salivar sobre superfícies específicas, tais como a hidroxiapatita, e observar em detalhes o efeito da adição de várias soluções sobre esta película formada. A elipsometria é uma técnica óptica que se usa para determinar certas propriedades físicas de camadas de um material,

tal como a espessura e as propriedades ópticas de um filme extremamente fino, tal como o índice de refração e a magnitude da absorção de luz.

Assim, componentes do chá preto e do vinho tinto mostraram-se capazes de se ligar rapidamente à película salivar formada *in vitro*, alterando substancialmente sua maturação (JOINER; et al., 2003). Em um estudo elipsométrico realizado por Joiner *et al.* (2006), foi demonstrado que a adição de clorexidina sobre a película salivar eleva grandemente a quantidade de componentes do chá preto adsorvida nesta película, quando comparado com a adsorção na ausência do antisséptico. Este efeito é sugerido ser resultado da interação eletrostática entre as cargas positivas do antisséptico com as cargas negativas dos cromógenos. Quando a ordem de adição das soluções é considerada, verifica-se que a quantidade de componentes do chá preto adsorvido na película salivar é muito maior quando se administra primeiro a solução de clorexidina seguida da solução de chá preto, e não o inverso; este efeito deve resultar da maior “perturbação” da clorexidina sobre a carga superficial da película salivar, assim, a adição primeira de chá preto não altera a quantidade de clorexidina adsorvida subsequencialmente, ao passo que o inverso é verdadeiro (JOINER; et al., 2006). Desta forma, a partir deste e de outros estudos (FREITAS; et al., 1993; CARPENTER; et al., 2005), fica demonstrada a capacidade da clorexidina adsorvida na película de aumentar a adsorção de cromógenos alimentares, assim como de acelerar sua adsorção.

1.4. Formulações

Inúmeras formulações contendo clorexidina empregam este agente em diversas concentrações, entre elas temos dentifrícios (0,4%), soluções (0,12% e 0,2%), géis (1%) e vernizes (1%, 10%, 20% e 35%), além de gomas de mascar contendo as mais variadas quantidades do agente (PERSSON; et al., 1991; GERARDU; et al., 2003; WAN; et al., 2003; DE ALBUQUERQUE; et al., 2004; OLYMPIO; et al., 2006).

Ribeiro *et al.*(2007) fizeram uma revisão sistemática da literatura disponível nas bases de dados Pubmed e Lilacs, de modo a comparar o efeito das formulações sobre o período de tempo em que o nível de *S. mutans*

permanece diminuído na superfície bucal (RIBEIRO; et al., 2007). Com base nos trabalhos levantados, observou-se que o efeito da clorexidina em soluções, como em enxaguatórios bucais, afeta somente a concentração de *S. mutans* salivar, apresentando uma ação mais pronunciada nas primeiras 24h após o tratamento, e ainda, estas formulações não apresentam efeito em longo prazo no nível deste microrganismo. O uso de formulações de géis dentifrícios em concentrações inferiores a 1%, não apresentou diferença quando comparado ao placebo, porém em concentração mais elevada, entre 1 e 5%, para uso profilático profissional, a ação do antisséptico pode ser observada por um período de 4 a 14 semanas após tratamento intensivo de até 14 dias, o que também levou ao aparecimento dos efeitos indesejáveis da clorexidina. Por fim, formulações de vernizes contendo 40% de clorexidina apresentaram resultados muito divergentes quanto ao período de inibição do crescimento de *S. mutans*, variando de 1 semana até 3 meses, dependendo do número de aplicações administradas, porém o gosto amargo torna-se insuportável e perdura por horas após a aplicação.

Outras formulações não tão usuais contendo clorexidina compreendem apresentação em *spray* ou em gomas de mascar. Francetti *et al.*, em 2004, avaliaram a eficácia de *spray* de clorexidina em pacientes após cirurgia bucal, neste estudo ficou demonstrado a eficácia do *spray* comparado a enxágues convencionais e ainda foi notada uma diminuição no aparecimentos de manchas nos dentes e na língua. Esta diminuição, no entanto, deve-se ao fato de que o *spray* é administrado somente na região recém operada, onde a escovação convencional é muito prejudicada dada a ocorrência de dor, assim, as demais regiões da boca não recebem o tratamento com clorexidina e desta forma, não desenvolvem as manchas (FRANCETTI; et al., 2004).

A eficácia de goma de mascar contendo clorexidina foi avaliada por Cosyn e Verelst (2006), em pacientes ortodônticos (COSYN; VERELST, 2006). Embora neste experimento não tenha sido comprovada uma melhoria nos níveis de placa dos pacientes estudados quando comparado ao placebo, outros trabalhos envolvendo populações de outros grupos de risco demonstram uma melhora significativa (SABZEVAR, 1996, SIMONS; et al., 2001). No entanto, é notável que no caso dos pacientes ortodônticos estudados por Cosyn e Verelst (2006), o uso dos aparelhos fixos impede uma correta remoção da placa por

meio mecânico, através da escovação diária dos dentes, enquanto que nos demais trabalhos a escovação foi repetidamente reiterada durante o experimento, o que mostra a ineficácia deste tipo de apresentação isoladamente no combate à cárie. Ademais, em nenhum dos casos o uso da goma de mascar foi capaz de evitar o aparecimento de manchas nos dentes.

Muitas composições para uso oral são propostas para eliminar ou mascarar o gosto amargo de diversos agentes farmacêuticos. Anaebonan *et al.* (1999) empregaram uma solução ou dispersão do agente ativo em um meio totalmente aquoso, isento de etanol, e composto por cerca de 5 a 30% em peso de polivinilpirrolidona (PVP), 35 a 55% de C₃ – C₆ polioliol (compostos orgânicos que apresentam entre 3 e 6 grupos hidroxílicos, como a glicerina – C₃ polioliol, e o sorbitol – C₆ polioliol) e entre 0,01 a 0,5% em peso de glicirrizinato de amônia (ASCENT PEDIATRICS INC, 1999). Noponen e Tyysalo (1985) propuseram o emprego de xilitol entre 2 a 15% para soluções contendo de 0,1 a 0,2% de clorexidina (ORION YHTYMAE OY, 1985). O uso de manitol ou eritritol entre 0,1 a 30% foi proposto por Alexander *et al.* (2001) para composições de higiene bucal compreendendo um agente catiônico, tal como a clorexidina (SMITHKLINE BEECHAM P.L.C., 2001). E por fim o emprego de agentes bloqueadores ou competidores de receptores de gosto, empregando agentes como éster hidrogenado e etoxilado de glicerol (agente bloqueador) e citrato de sódio (agente competidor), foi proposto por Stier em 2006, para impedir a percepção do gosto amargo de diversos agentes farmacêuticos como clorexidina, dextrometorfano, guaifenesina e pseudoefedrina (FIRMENICH & CIE, 2006).

Uma apresentação sólida para mascaramento de gosto é constituída por polímeros formadores de filmes solúveis em água, ou filmes dissolúveis. Estes filmes são preparados a partir de uma emulsão água-óleo contendo os ingredientes ativos além dos agentes flavorizantes e edulcorantes. O filme é seco e cortado em tiras contendo a quantidade desejada do agente farmacêutico, o qual será lentamente liberado conforme o filme se dissolve na saliva (PFIZER INC, 2003).

Apesar da possível diminuição da percepção do gosto amargo da clorexidina nestas formulações, elas não apresentam nenhuma eficácia na minimização do desenvolvimento de manchas nos dentes e na língua e, muito

provavelmente, não eliminam o efeito de alteração ou “confusão” na percepção de gostos como salgado e amargo.

Embora a clorexidina seja um antisséptico de comprovada eficácia, seus efeitos adversos ainda hoje são praticamente impossíveis de serem mascarados ou evitados somente por meio de desenvolvimento de formulações. Assim, ao mesmo tempo em que um aumento na concentração da clorexidina nestas formulações aumenta sua ação em longo prazo sobre microrganismos da microbiota bucal, seu gosto fortemente amargo torna-se ainda mais perceptível, assim como o surgimento de manchas e alteração no paladar ficam mais pronunciados. Da mesma forma, ao diminuirmos a concentração administrada deste agente, levando a uma minimização de suas características indesejáveis, sua atividade biológica torna-se mais curta ou ineficiente.

Nestas situações, onde o desenvolvimento farmacotécnico é insuficiente para corrigir ou mascarar problemas sensoriais relacionados ao fármaco, modificações químicas estruturais em sua molécula podem ser consideradas (WERMUTH, 1996). Assim, a obtenção de sais com propriedades físico-químicas diferenciadas, como hidrossolubilidade e ionização, pode gerar compostos com menor interação com as papilas gustativas e atração eletrostática por substâncias cromógenas dos alimentos, sem o comprometimento da atividade biológica do agente farmacêutico.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial uso do sal tetrapalmitato de clorexidina (TPCHX) em enxaguatório bucal como agente anti-placa.

Objetivos específicos

- Obtenção do sal e caracterização química da substância formada;
- Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana do sal obtido;
- Avaliação do potencial de depósito de cromóforos alimentares na superfície bucal;
- Avaliação da alteração no reconhecimento dos gostos provocada pela clorexidina;
- Avaliação do efeito da formulação na reologia da suspensão e no tempo de retenção do sal TPCHX na cavidade bucal.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais

Obtenção do sal tetrapalmitato de clorexidina: clorexidina base (Aldrich), ácido palmítico (Fluka), tetraidrofurano (THF - Merck).

Atividade antimicrobiana: Placas Acumedian®; meio de cultura BHF (fusão de células do coração) e solução de *Streptococcus mutans* (10^8 UFC/mL)

Desenvolvimento de coloração: Placas de metilmetacrilato de 50 mm x 10 mm x 3 mm.

Cinética de eliminação: Heptanossulfonato de sódio (Acros) e acetonitrila grau HPLC (Merck), carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade (CMC), hidroximetilcelulose (HMC) e polivinilpirrolidona (PVP K30).

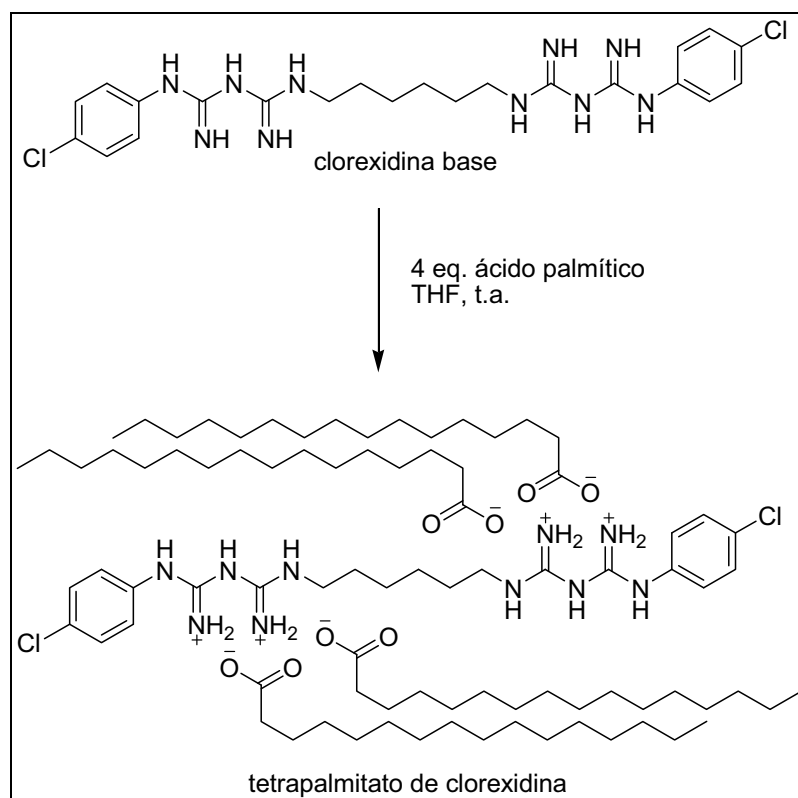
Teste de reconhecimento dos gostos básicos: carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade (CMC), sacarose (Synth), ácido cítrico (Merck), cloridrato de quinina (Fluka), cloreto de sódio (Synth), cloreto de potássio (Synth) e glutamato monossódico (GMS – Ajinomoto).

Estudo reológico. carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade (CMC), hidroximetilcelulose (HMC) e polivinilpirrolidona (PVP K30).

Em todos os ensaios, a solução de digluconato de clorexidina (DGCHX) a 0,12% sempre se refere ao produto comercial PerioGard®.

3.2- Métodos

3.2.1. Obtenção do sal tetrapalmitato de clorexidina



Esquema 1.1. Obtenção do sal TPCHX

Este procedimento foi realizado de acordo com Menegon (2005).

Para uma solução de 1,024 g (4 mmol) de ácido palmítico em 30 mL de THF adicionou-se 0,505 g (1 mmol) de clorexidina e aguardou-se a solubilização a temperatura ambiente.

O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo lavado posteriormente com água gelada em abundância, obtendo-se um produto branco, livre de impurezas e com rendimento aproximado de 100%.

3.2.2. Caracterização estrutural

3.2.2.1. Espectrofotometria no infravermelho

As análises por infravermelho foram realizadas em pastilhas de KBr utilizando-se espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo FTIR-8300. A varredura espectral foi feita entre 400 e 4000 cm^{-1} .

3.2.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise de RMN foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), em equipamento DPX-300, de 300MHz.

3.2.2.3. Espectrofotometria no ultravioleta

As absorções de luz ultravioleta foram medidas em espectrofotômetro UV-VIS da marca Hitachi, modelo U-2001, e cubeta de quartzo de 1 cm, empregando etanol absoluto como solvente.

Para o cálculo da absorvidade molar foi realizada inicialmente uma varredura das absorções no espectro de ultravioleta entre 200 e 450 nm. Desta forma, a absorvidade molar foi calculada no comprimento de onda de maior absorvidade, em 258,4 nm. O cálculo da absorvidade molar foi realizado seguindo a equação I dada a seguir:

$$\epsilon = A/cb$$

equação I

Onde **A** é a absorbância medida, **c** a concentração do soluto em mol.L^{-1} , **b** o comprimento do caminho ótico em centímetros e **ϵ** a absorvidade molar. A intensidade de uma banda de absorção em um espectro de ultravioleta é

usualmente expressa como a absorvidade molar no máximo de absorção, ϵ_{max} .

As medidas de absorção foram realizadas a partir de solução etanólica na concentração de $20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2.3. Teste de atividade antimicrobiana – *Hole Plate*

O sal tetrapalmitato de clorexidina (TPCHX) foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana frente *S. mutans*, empregando-se a técnica “*Hole Plate*” com a substância antimicrobiana na forma sólida. Neste ensaio, orifícios feitos na placa com o meio de cultura são preenchidos com a substância em pó, e observa-se a inibição do crescimento bacteriano após 24 horas em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com meio microaerófilo.

Para este ensaio empregaram-se três placas acumedian® com meio de cultura BHF. Nas placas I e II foram feitos dois orifícios em cada uma nas dimensões de 5 mm de diâmetro x 5 mm de profundidade. A terceira placa (controle) permaneceu sem orifícios, como mostra a figura 3.1.

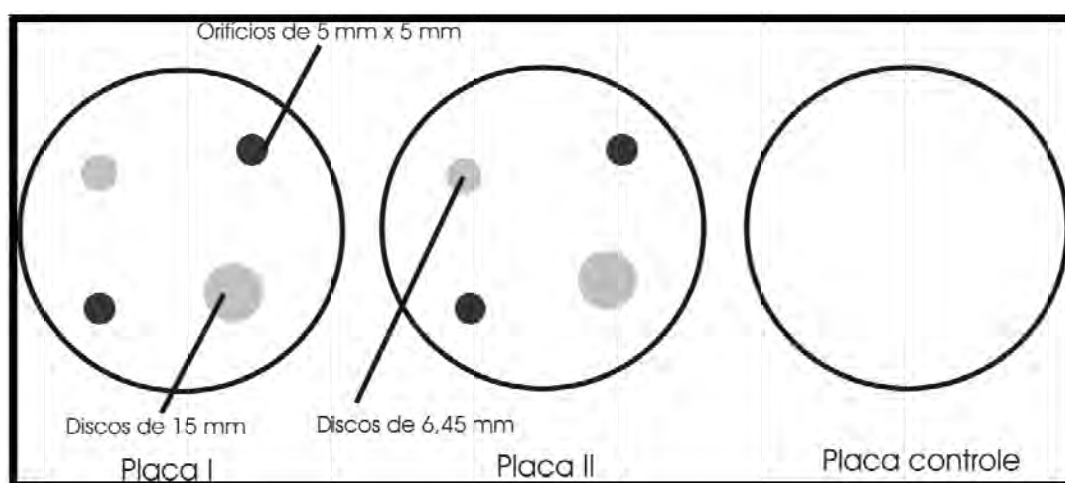


Figura 3.1. Placas perfuradas para realização do teste de atividade antimicrobiana

Todas as placas foram semeadas com meio de cultura com *S. mutans* na concentração de 10^8 UFC/mL .

Nas placas I e II foram adicionados discos de 6,45 e 15 mm de diâmetro embebidos com 20 µL e 50 µL de solução de digluconato de clorexidina (DGCHX) 20%, respectivamente. Os orifícios foram completamente preenchidos com o sal tetrapalmitato sólido.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C em meio microaerófilo durante 24 horas, para observação da inibição do crescimento bacteriano.

3.2.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

O sal TPCHX é comparado à clorexidina base quanto ao CMI, distinguindo-se a atividade bactericida da bacteriostática.

Soluções estoques foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL contendo 50 mg de clorexidina base (5.000 µg/mL – 9,9 mM) e 150 mg do sal TPCHX (15.000 µg/mL – 9,8 mM). As substâncias foram solubilizadas em DMSO.

0,2 mL destas soluções foram transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de meio de cultura BHF. Após homogeneização, transferiu-se um mL para novo tubo de ensaio contendo mais um mL do meio de cultura, e assim prosseguiu-se até o último tubo, finalizando com o descarte do último mL. As concentrações de cada série de diluição estão representadas no quadro 3.1.

Tubo	Clorexidina base		TPCHX	
	[µg/mL]	[mM]	[µg/mL]	[mM]
01	500	0,989	1500	0,980
02	250	0,495	750	0,490
03	125	0,247	375	0,245
04	62,5	0,124	182,5	0,123
05	31,25	0,062	91,25	0,062
06	15,6	0,031	45,15	0,031
07	7,8	0,016	22,75	0,016
08	3,9	0,008	11,40	0,008
09	1,95	0,004	5,7	0,004
10	0,95	0,002	2,85	0,002
11	0,45	0,001	1,43	0,001
12	0,23	$0,5 \times 10^{-3}$	0,72	$0,5 \times 10^{-3}$
13	0,12	$0,25 \times 10^{-3}$	0,36	$0,25 \times 10^{-3}$
14	0,06	$0,125 \times 10^{-3}$	0,18	$0,125 \times 10^{-3}$
15	0,03	$0,062 \times 10^{-3}$	0,09	$0,062 \times 10^{-3}$
16	0,015	$0,031 \times 10^{-3}$	0,045	$0,031 \times 10^{-3}$
Controle -	DMSO		DMSO	
Controle +	Meio cultura		Meio cultura	

Quadro 3.1. Diluições para determinação da CMI

Depois de realizadas as diluições, adicionou-se 50 µL de solução contendo 10^8 UFC/mL de *S. mutans*. Os tubos foram mantidos por 48 horas em estufa a 37 °C, com meio microaerófilo para verificação da atividade bacteriostática.

Após este período, nos tubos onde não foi evidenciado crescimento bacteriano, as soluções foram semeadas em placas de petri contendo somente

o meio de cultura BHF, e novamente incubadas em estufa a 37 °C, com meio microaerófilo por 48 horas para verificação da atividade bactericida.

3.2.5. Teste de desenvolvimento de coloração

Este teste baseia-se no trabalho de Addy *et al.* (1979), e objetiva estimar a capacidade da substância a ser testada em formar complexos amarelados com cromóforos presentes em alimentos e se depositar no esmalte do dente.

O teste *in vitro* realizado utiliza uma solução padrão de chá preto como fonte de cromógenos e placas de metilmetacrilato como substituto do esmalte dentário. As placas de metilmetacrilato foram eleitas por se comportarem quimicamente de modo semelhante ao principal componente do esmalte envolvido na formação dos depósitos, a hidroxiapatita (SHEEN, *et al.*, 2001). Estas placas, medindo 50 mm x 10 mm x 3 mm, foram preparadas para encaixar na câmara do espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo (Hitachi - modelo U-2001).

O ensaio é realizado empregando-se seis placas de metilmetacrilato para cada amostra estudada: clorexidina base, DGCHX e TPCHX. Para cada grupo de placas, realizou-se 8 ciclos antes da leitura espectrofotométrica (absorbância em 295 nm), cada ciclo consistiu em submersão das placas por 2 minutos nas seguintes soluções (e nesta ordem exata): *Pool* de saliva, solução do antisséptico estudado e solução padrão de chá preto (neste por 60 minutos). As placas foram enxaguadas com água deionizada (D.I.) após cada submersão e seca livremente ao ar antes da leitura espectrofotométrica.

As concentrações das soluções empregadas foram:

- Solução de clorexidina base: 0,068%
- Solução de DGCHX: 0,12%
- Solução de TPCHX: 0,205%

Estas concentrações foram escolhidas de modo a manter a mesma concentração molar de clorexidina em cada ensaio (aproximadamente 1,34 mM).

- Solução padrão de chá preto: infusão de 1 g de folhas em 100 mL de água fervente durante 3 minutos

Ao final dos 8 ciclos as placas foram colocadas diretamente no espectrofotômetro e a densidade ótica (DO) medida em 295 nm. Realizou-se um ensaio em branco, empregando-se água D.I. ao invés de solução antisséptica.

O tratamento estatístico foi realizado por teste T a um nível de significância de 5%.

3.2.6. Teste de reconhecimento dos gostos básicos

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo CEP/FCF/CAR nº 14/2007), estando em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

O teste de reconhecimento dos gostos básicos avalia mudanças na percepção dos gostos provocado pelo uso de clorexidina, e objetiva comparar a influência do sal TPCHX em relação à clorexidina base e ao DGCHX, na identificação dos gostos básicos como salgado, doce, amargo, azedo e umami. O método foi adaptado de Gent *et al.* (2002).

Antes do teste propriamente dito, foi realizado um treinamento dos voluntários em relação à correta identificação dos gostos básicos. Neste treinamento, os voluntários receberam, em duas sessões, as 10 soluções em copos plásticos codificados com seus respectivos estímulos (quadro 3.2). Foi solicitado ao voluntário que provasse o estímulo e memorizasse o mesmo. Após a familiarização dos estímulos, os voluntários receberam novamente os 10 estímulos, desta vez em copos plásticos codificados com números de três dígitos. Foram selecionados os voluntários que em duas sessões acertaram 100% dos estímulos apresentados. A ficha de avaliação está representada na figura 3.2. Assim, 9 indivíduos adultos, 5 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idade entre 20 e 32 anos, estavam aptos a prosseguir com o experimento.

Antes da apresentação das soluções (estímulos), cada voluntário realizou dois enxágues com 5 mL da solução testada por 1 minuto cada, e então mais 10 mL de água foi fornecido para enxaguar a boca a vontade. Após a apresentação das primeiras 5 bandejas, aproximadamente 30 minutos após o enxágue, uma nova seção de enxágues com a solução testada foi realizada para reforçar a atividade da substância analisada.

Todos os 9 voluntários realizaram os testes com solução de CMC a 0,2% (controle negativo), DGCHX (controle positivo), clorexidina base (0,07%) e TPCXD 0,4% em solução de CMC a 0,2%. As seções foram realizadas com intervalo de 48h para não haver interferência da clorexidina residual na superfície bucal.

3.2.7. Cinética de eliminação da cavidade bucal

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo CEP/FCF/CAR nº 14/2007), estando em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Este experimento visa estudar a cinética de eliminação da clorexidina da superfície bucal, comparando as preparações contendo o sal TPCHX com o produto comercial contendo DGCHX. A análise foi realizada de acordo com o método analítico proposto por Pesonen *et al.* (1995).

Amostras de salivas (200 μ L) são coletadas e a clorexidina extraída em acetonitrila com meio básico. A quantidade do composto recuperado foi medida por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) após 15, 30, 45, 60 e 90 minutos ao enxágue bucal com 30 mL da preparação ensaiada.

O estudo farmacocinético foi realizado em 3 voluntários não fumantes e não usuários de enxaguatórios bucais.

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise por CLAE foi utilizado um sistema cromatográfico da Shimadzu SCL-10A, detector UV-VIS SPD-10A, sistema de bombeamento de

fase móvel quaternário LC-10AD, degaseificador DGU-14A (à vácuo), e loop do injetor de 20 μ L.

A CLAE em fase reversa foi realizada a temperatura ambiente, a coluna utilizada foi a shim-pack CLC-ODS (M), de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno 5 μ m de diâmetro de partícula. A fase móvel empregada foi 40% acetonitrila e 60% tampão (heptanossulfonato de sódio 5 mM, fosfato dissódico dodecahidratado 0,1 M, trietilamina 0,05 M e ácido fosfórico até pH 2,5), em fluxo 2 mL/min e com detector selecionado em 260 nm.

Procedimento de extração

200 μ L de saliva foram introduzidos em um tubo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 400 μ L de NaOH 4,5 N e 400 μ L de acetonitrila. O tubo foi agitado em vórtex por um minuto e centrifugado a 1620 g por 10 minutos. Após a separação das fases, 200 μ L da fase orgânica foi coletada em outro tubo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 300 μ L de tampão da fase móvel antes de ser analisado por CLAE.

Curva de calibração

A curva de calibração de clorexidina foi feita utilizando seis concentrações (1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 50,0 e 75,0 μ g/mL) e em triplicata. A curva de calibração foi gerada pela regressão linear da área do pico da clorexidina *versus* a concentração.

Preparação dos padrões:

Preparou-se uma solução padrão de trabalho de concentração 10 μ g/mL, para isto, pesou-se exatamente 0,0100 g de TPCHX em um balão volumétrico de 100 ml e adicionou-se cerca de 80 mL de metanol, agitou-se por 20 minutos a 250 rpm e manteve-se por 10 minutos em banho ultrassônico, e então se completou o volume com metanol. Transferiu-se volumetricamente 10

mL desta solução para um novo balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol obtendo a *solução padrão de trabalho* (SPT).

Os padrões foram obtidos nas concentrações desejadas pela transferência volumétrica da alíquota necessária da solução SPT e deixada evaporar à secura, e então o resíduo foi ressuscitado com 200 μ L de saliva e prosseguiu-se com a extração como descrita anteriormente.

Taxa de recuperação

A taxa de recuperação da clorexidina a partir da saliva foi determinada em triplicata na concentração de 5 μ g/mL. A média das áreas obtidas através da injeção direta de solução de clorexidina a 5 μ g/mL foi comparada com a média obtida pela injeção do padrão 5 μ g/mL, preparado conforme procedimento já descrito. A razão entre as duas áreas médias reflete a porcentagem de recuperação de clorexidina a partir de uma amostra de saliva.

Estudo farmacocinético

A concentração dos sais estudados na saliva foi medida ao longo de 90 minutos após o enxágue bucal com um dos produtos a seguir: DGCHX a 0,12%; TPCHX a 0,20% em água; TPCHX a 0,30% em água; TPCHX a 0,20% em suspensão de CMC 0,2%; TPCHX a 0,30% em suspensão de CMC 0,2%; TPCHX a 0,20% em suspensão de HMC 0,2%; TPCHX a 0,30% em suspensão de HMC 0,2%; TPCHX a 0,3% em suspensão de CMC 0,2% e PVP 0,4%, e TPCHX a 0,3% em suspensão de HMC 0,2% e PVP 0,4%.

Amostras de salivas (200 μ L) foram coletadas e a clorexidina extraída em acetonitrila. A quantidade do produto recuperado foi medida por CLAE após 15, 30, 45, 60 e 90 minutos ao enxágue bucal com 30 mL do enxaguatório estudado.

3.2.8. Estudo reológico

O comportamento de fluxo das soluções suspensoras empregadas no ensaio cinético foi medido através da avaliação do fluxo destas ao serem submetidas a tensões de cisalhamento.

Para analisar a área de histerese das amostras, foi determinada a curva de fluxo, com uma taxa de cisalhamento de 0 a 100 Pa⁻¹ por um período de 120 segundos para a curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente, obtendo dados de 1 ponto por segundo, a uma temperatura de 25 °C (RIBEIRO; et al., 2004; GREGOLIN; et. al., 2010). O sensor utilizado foi do tipo cilindro coaxial (Z20) em reômetro HAAKE modelo RS-1, e os dados foram tratados pelo software HAAKE Rheowin 3.50.0000.

As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra estudada: água, solução de CMC a 0,2%, solução de HMC a 0,2%, solução de CMC a 0,2% e PVP K30 0,4%, e solução de HMC a 0,2% e PVP K30 0,4%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção do sal tetrapalmitato de clorexidina

A obtenção do sal TPCHX (figura 4.1) foi realizada de acordo com método descrito por Menegon (2005), mantendo-se uma proporção molar de quatro equivalentes de ácido palmítico para um equivalente de clorexidina. Dado que a clorexidina nestas concentrações só é solúvel em THF quando o sistema é aquecido, a sua solubilização à temperatura ambiente do laboratório pode significar a associação daquela com o ácido presente, levando à formação do sal desejado. Com a evaporação do solvente, um resíduo pastoso é obtido, e ao ser abundantemente lavado com água, obtêm-se um produto sólido na cor branca.

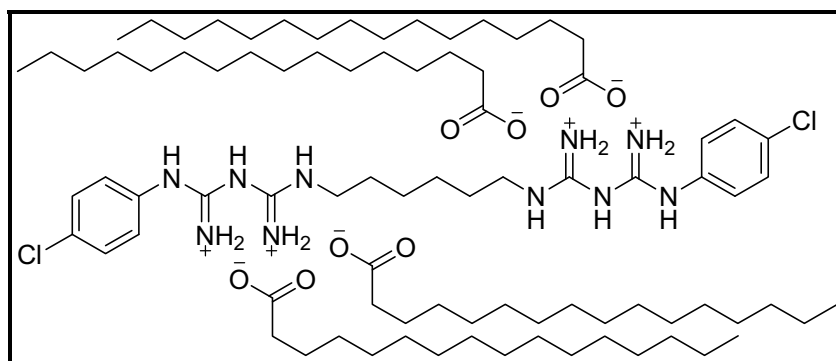


Figura 4.1. Fórmula estrutural do composto TPCHX

Após seco, o composto foi analisado por infravermelho em pastilha de KBr, faixa de fusão aparente (figura 4.2), e por RMN ^1H 300 MHz (figura 4.3).

Pela análise do espectro de infravermelho é possível perceber a presença dos grupamentos guanidínicos, absorvendo entre 3400 a 3300 cm^{-1} aproximadamente, e também uma importante e intensa absorção dos grupos metilênicos alifáticos em 2918 e 2847 cm^{-1} , o que caracteriza a presença da longa cadeia alifática do ácido palmítico, não se observando absorção na região de 1700 a 1720 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila do ácido, indicando que este encontra-se ionizado na forma de carboxilato, com deformação axial assimétrica em 1578 cm^{-1} e simétrica em 1420 cm^{-1} . O

espectro de RMN (figura 4.3) confirma a proporção de um equivalente de clorexidina para 4 equivalentes do ácido palmítico, visto a comparação entre as integrações dos deslocamentos químicos relativos à porção aromática da clorexidina, como 8 hidrogênios em 7,3 ppm, e os deslocamentos dos grupos metílicos terminais do ácido palmítico, apresentando 12 hidrogênios em 0,89 ppm. As atribuições dadas aos deslocamentos encontrados da clorexidina estão em acordo com as encontradas por Revelle *et al.* (1993).

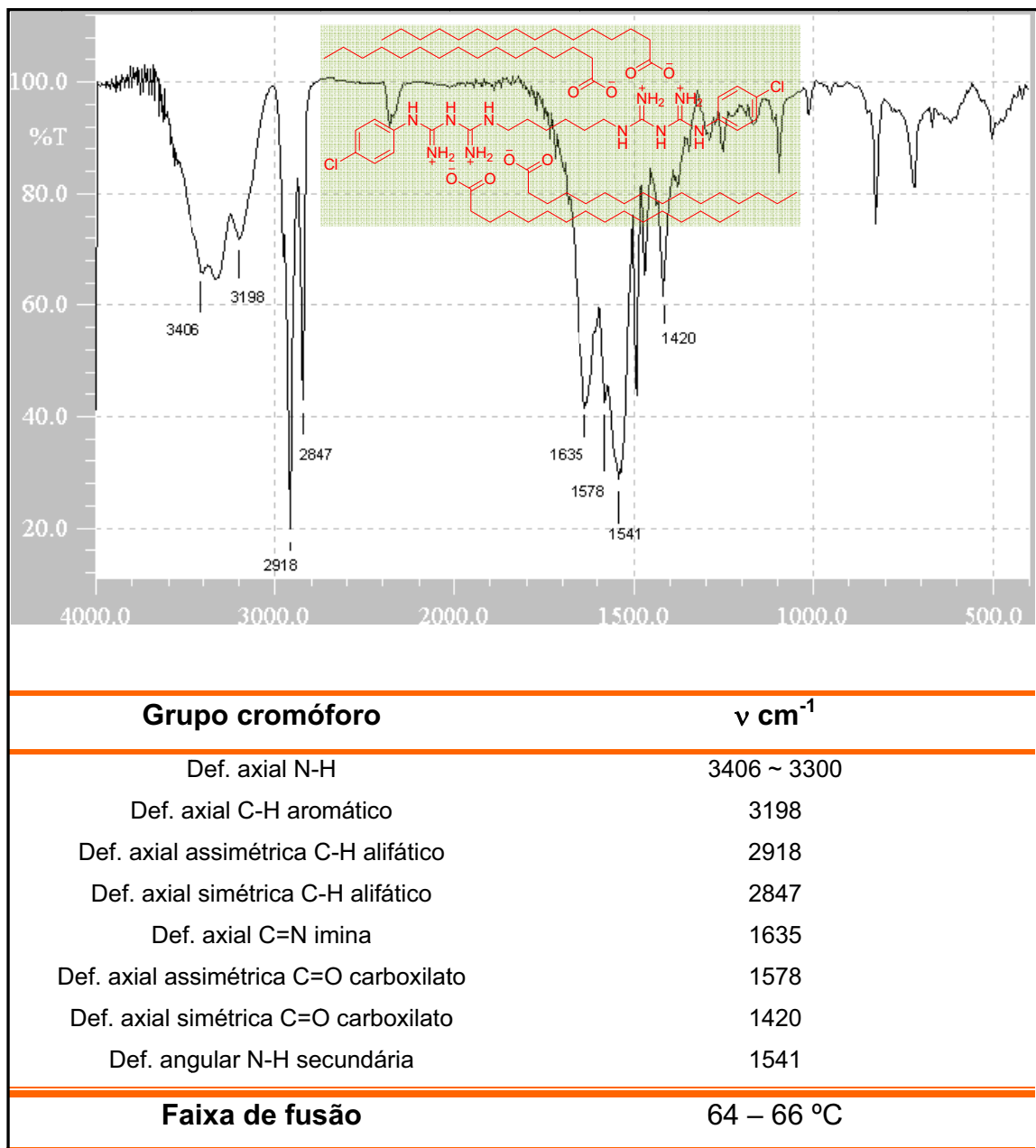


Figura 4.2. Espectro de infravermelho e tabela dos grupos cromóforos e faixa de fusão do composto TPCHX

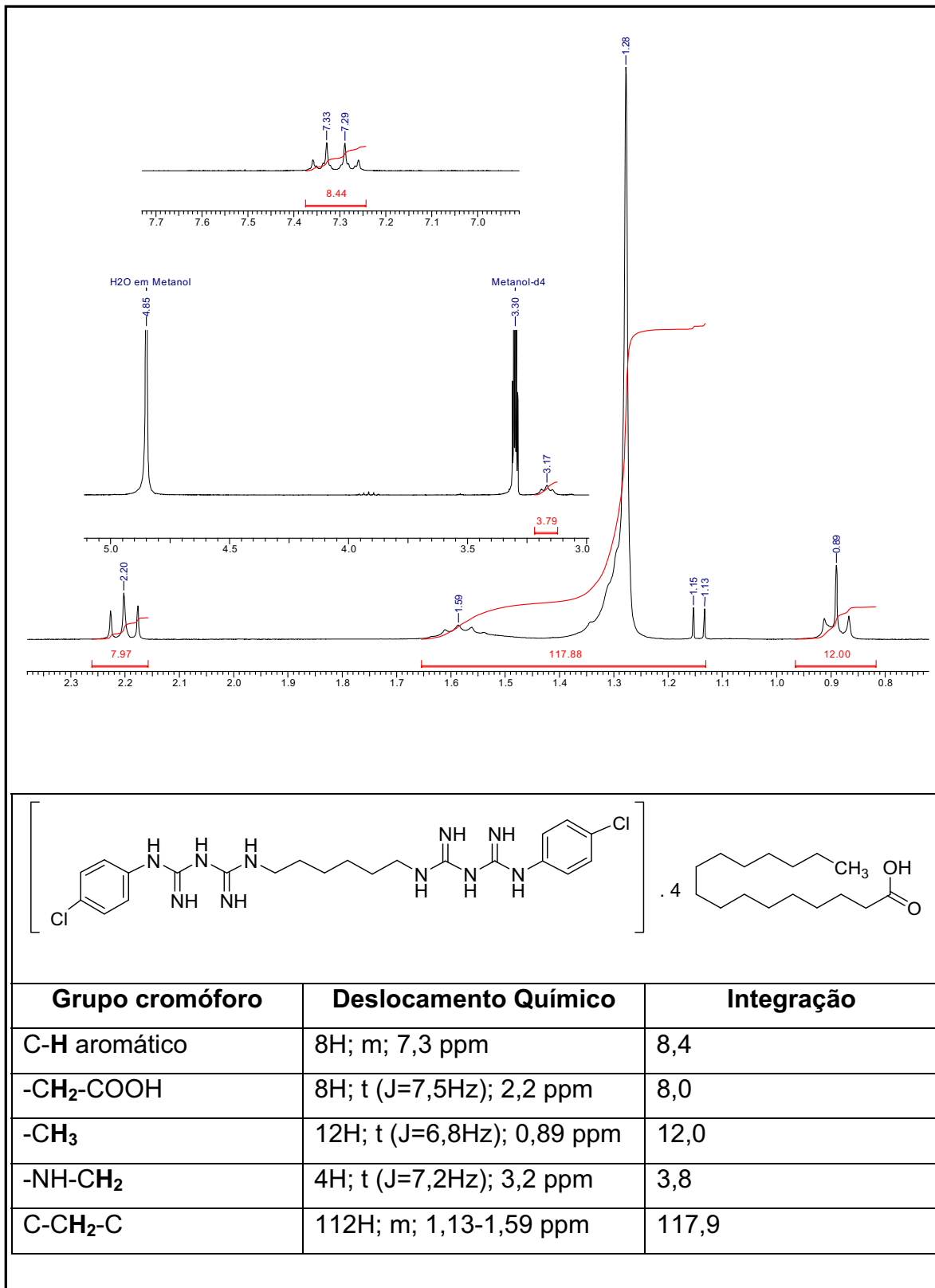


Figura 4.3. Espectro de RMN ¹H (300 MHz) do composto TPCHX, CH₃OH-d₄

De modo a garantir uma rápida confirmação do sal obtido a partir de novas preparações, um breve cálculo de absortividade molar, a partir do sal TPCHX previamente caracterizado, foi realizado. O quadro 4.1 demonstra o resultado obtido.

Concentração	Absorbância (258 nm)	ϵ máxima
$20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	0,767	38.835

Quadro 4.1. Absortividade molar (ϵ) do composto TPCHX

A partir desta informação, sabe-se que uma certa massa do sal TPCHX deve sempre apresentar esta mesma absortividade molar, ou então o composto obtido deve tratar-se de uma molécula com diferente grau de ionização, e conseqüentemente, diferente número de grupos palmitatos ligados ionicamente à molécula.

4.2. Teste de atividade antimicrobiana - *Hole Plate*

Os discos contendo solução de DGCHX foram capazes de inibir o crescimento bacteriano conforme o esperado, gerando halos de inibição cujo raio variou de acordo com a quantidade de solução empregada, sendo então maiores para os discos de 15 mm.

Neste ensaio de atividade antimicrobiana, empregando-se a técnica *Hole Plate*, foi possível verificar que o sal TPCHX, apesar de ser extremamente hidrofóbico e conseqüentemente insolúvel em meio aquoso, também foi capaz de desenvolver sua atividade antimicrobiana. Neste experimento, em que o sal TPCHX foi adicionado em sua forma sólida dentro de buracos feitos no meio de cultura, observou-se o aparecimento de halo de inibição, evidenciando sua atividade frente *S. mutans*, mostrando a difusão do sal através do meio BHF mesmo estando insolúvel.

4.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Uma vez constatada a atividade do composto mesmo insolúvel, novo experimento foi realizado para determinar as concentrações mínimas para atividades bactericida e bacteriostática. Neste experimento, tubos de ensaio contendo meio de cultura e *S. mutans* foram tratados com diversas concentrações do sal TPCHX ou da base livre da clorexidina, mantendo-se a mesma concentração molar das duas substâncias em seus respectivos tubos. Após as 48 horas de incubação em ambiente microaerófilo, foi possível observar que em muitos tubos não houve crescimento bacteriano, e em outros houve a turvação do meio indicando crescimento, assim, a concentração mínima inibitória de crescimento (atividade bacteriostática) foi calculada no intervalo de concentração entre o último tubo límpido e o primeiro turvado. A fim de se diferenciar uma atividade bacteriostática de outra bactericida, uma alíquota dos tubos onde não houve crescimento foi semeada em meio de cultura isenta de antimicrobianos e incubada por mais 48 horas. Ao final da incubação, foi possível perceber que não houve crescimento a partir de alguns tubos de ensaio, o que evidencia uma atividade bactericida dos agentes, enquanto que naqueles onde foi observado crescimento, houve apenas ação bacteriostática, assim pode se determinar a faixa de concentração onde encontramos a concentração mínima de atividade bactericida. O quadro 4.2 traz os resultados indicando em cinza a faixa onde se encontra a CMI para atividade bacteriostática e com hachuras a CMI para atividade bactericida.

Não foi observada a inibição do crescimento bacteriano no tubo controle, composto por 0,2 mL de DMSO, o que indica que este solvente não interferiu no ensaio. Os tubos “controle +” apresentaram crescimento normal.

O crescimento bacteriano foi constatado a partir do tubo 10 da clorexidina (0,95 µg/mL) e do tubo 11 do sal TPCHX (1,43 µg/mL). Na atividade bactericida, visualizada em placas de petri, foi encontrado crescimento a partir do tubo 6 para a clorexidina (15,6 µg/mL) e do tubo 8 do TPCHX (11,40 µg/mL).

Tubo	Clorexidina base		TPCHX	
	[$\mu\text{g/mL}$]	[mM]	[$\mu\text{g/mL}$]	[mM]
01	500	0,989	1500	0,980
02	250	0,495	750	0,490
03	125	0,247	375	0,245
04	62,5	0,124	182,5	0,123
05	31,25	0,062	91,25	0,062
06	15,6	0,031	45,15	0,031
07	7,8	0,016	22,75	0,016
08	3,9	0,008	11,40	0,008
09	1,95	0,004	5,7	0,004
10	0,95	0,002	2,85	0,002
11	0,45	0,001	1,43	0,001
12	0,23	$0,5 \times 10^{-3}$	0,72	$0,5 \times 10^{-3}$
13	0,12	$0,25 \times 10^{-3}$	0,36	$0,25 \times 10^{-3}$
14	0,06	$0,125 \times 10^{-3}$	0,18	$0,125 \times 10^{-3}$
15	0,03	$0,062 \times 10^{-3}$	0,09	$0,062 \times 10^{-3}$
16	0,015	$0,031 \times 10^{-3}$	0,045	$0,031 \times 10^{-3}$
Controle -	DMSO		DMSO	
Controle +	Meio cultura		Meio cultura	

Coloração verde: CMI bacteriostática; Coloração vermelha: CMI bactericida

Quadro 4.2. Resultados do teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Este resultado demonstra que o sal hidrofóbico de clorexidina apresentou atividades bacteriostática e bactericida em concentrações molares cerca de 50% menores que as respectivas para a clorexidina base.

4.4. Teste de desenvolvimento de coloração

Muito tem sido dito a respeito da impossibilidade de se ter um enxaguatório bucal de clorexidina sem o desenvolvimento de manchas nos dentes, restaurações e língua, e ainda ser ativo como antimicrobiano (ADDY; et al., 2005). Estes trabalhos relatam tentativas fracassadas de formulações “anti-descolorantes”, as quais muitas vezes resultaram em real ineficácia do agente antimicrobiano (ADDY; et al., 1989).

Porém, a partir do sal TPCHX, podemos observar pelos resultados apresentados no quadro 4.3 e figura 4.4 que este sal apresentou um mínimo desenvolvimento de coloração quando comparado ao produzido pela clorexidina base (também insolúvel em meio aquoso) e pelo DGCHX.

	branco	clorexidina base	DGCHX	TPCHX
1	0,665	1,300	0,951	0,674
2	0,65	1,282	0,998	0,678
3	0,665	1,355	0,94	0,666
4	0,662	1,290	0,885	0,67
5	0,648	1,290	0,901	0,681
6	0,647	1,331	0,947	0,681
média	0,656	1,308	0,937	0,675

Quadro 4.3. Leitura espectrofotométrica das placas de metilmetacrilato

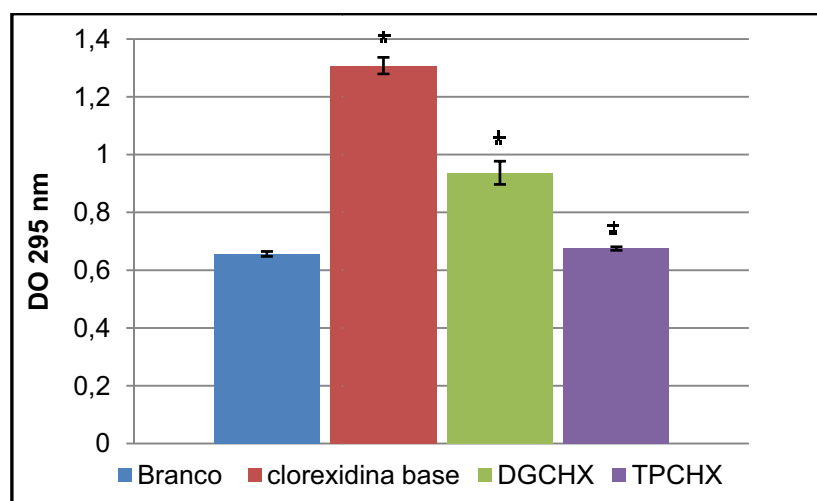


Figura 4.4. Densidade óptica (DO) em 295 nm das placas de metilmetacrilato ($P \leq 0,002$)

A partir de tratamento por Teste-T estatístico, foi possível observar que houve diferença significativa entre as médias obtidas para as soluções contendo clorexidina ou seus sais e a água. Embora o sal TPCHX também tenha apresentado uma tendência ao desenvolvimento de manchas nos dentes, a DO para este composto foi apenas 2,89% maior que a da água, enquanto que a DO para o DGCHX foi 42,84% maior que a da água e a clorexidina base 99,39% maior. A média para o sal TPCHX foi significativamente diferente, num nível de confiança de 5%, que as obtidas para a clorexidina base e para o sal DGCHX ($P \leq 0,00002$).

Assim, evidencia-se a grande tendência tanto da clorexidina base quanto de seu sal digluconato em desenvolver manchas na superfície bucal, enquanto que no sal TPCHX este efeito está grandemente reduzido.

Estudos sugerem que a clorexidina é capaz de interagir eletrostaticamente com a película salivar, propiciando a fixação de agentes cromógenos dos alimentos (JOINER; et al., 2006), assim quanto maior o número de grupos guanidínicos não ionizados (não protonados), mais intensa será a força de atração entre a clorexidina e a película salivar, aumentando tanto sua fixação na superfície bucal, quanto a adesão de cromógenos alimentares. Desta forma, criou-se o estigma de que “se não mancha, não funciona” (ADDY; et al., 2005), uma vez que as mesmas forças de atração eletrostáticas que são responsáveis por promover a fixação de cromógenos alimentares na película salivar também são responsáveis pela fixação da clorexidina na boca, o que é crucial para uma atividade cariostática.

Tendo em vista este importante papel das forças eletrostáticas atrativas sobre as atividades da clorexidina, muito é discutido acerca da inativação da clorexidina por interação com agentes aniônicos tais como laurilsulfato de sódio (LSS) (BARKVOLL, et al., 1989). Segundo estes autores, a interação resultaria em um sal insolúvel, e assim incapaz de exercer sua atividade antimicrobiana. Nestes trabalhos onde a inativação é discutida, a clorexidina em sua forma de sal digluconato ou dicloridrato é administrada através de enxágue bucal antes ou depois da escovação dos dentes com dentifício contendo LSS.

No entanto, o ensaio de atividade antimicrobiana realizado com o sal TPCHX, também insolúvel em meio aquoso, demonstrou valores de CMI inferiores aos da clorexidina base, a que mais gera coloração, o que indica que esta insolubilidade não inativa o antimicrobiano, contradizendo em parte a hipótese da inativação da clorexidina por agentes aniônicos. Uma vez que os grupos ácidos do LSS interagem formando sais com os grupos guanidínicos básicos livres da clorexidina, têm-se uma diminuição da atração eletrostática com a película salivar, o que favorece a remoção do sal da superfície bucal e, conseqüentemente, leva à diminuição da atividade cariostática, porém não necessariamente à sua inatividade biológica.

A relação entre o grau de ionização da clorexidina e a atividade de descoloração da película é evidenciada pelos resultados mostrados na figura 4.4, onde a clorexidina base, apresentando seus 4 grupamentos guanidínicos não ionizados, ou seja, com elétrons disponíveis para interação eletrostática, apresentou o maior potencial de descoloração, seguida pelo sal digluconato, com apenas dois grupos ionizados, enquanto que o sal TPCHX apresenta todos os seus grupos guanidínicos ionizados, ou seja, praticamente incapazes de interagir eletrostaticamente com componentes da película salivar. Se subtrairmos o valor da DO obtida para o branco (água) dos valores encontrados para cada substância testada, e cruzarmos este valor num gráfico contra o número de grupos guanidínicos não ionizados presentes em cada estrutura, então poderemos visualizar que existe uma relação direta entre estes dois parâmetros, como mostra a figura 4.5. Uma análise estatística a um nível de significância de 5% indica que há regressão linear dos valores de DO a 295 nm sobre o número de grupos guanidínicos livres em cada estrutura estudada (coeficiente de correlação de Pearson (r) = 0,9901; t calculado=28,18; t crítico(0,05; 16) = 2,12).

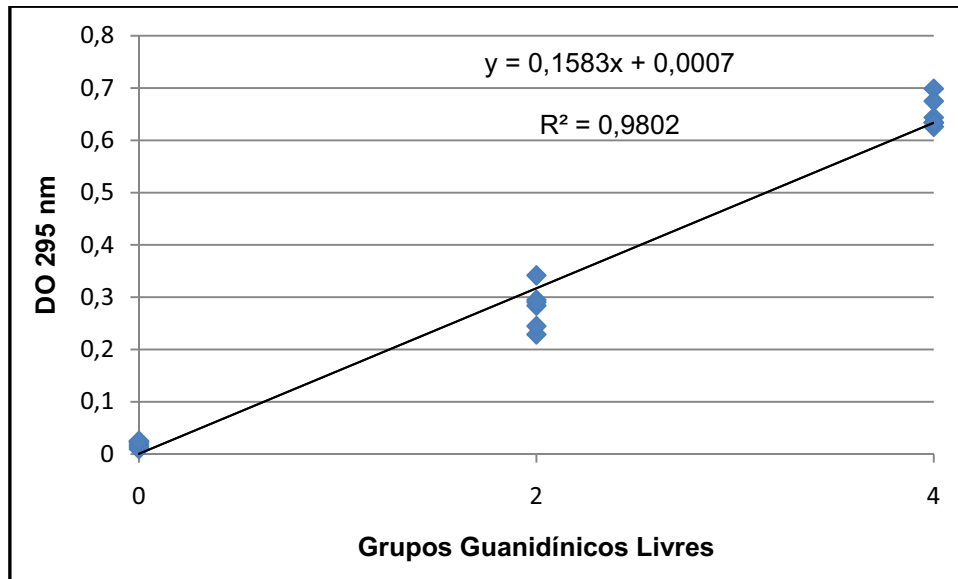


Figura 4.5. Regressão linear da densidade óptica obtida em 295 nm *versus* o número de grupos guanidínicos livres

Estes resultados sugerem que, embora o sal TPCHX seja ativo biologicamente, ele pode não ter eficácia clínica por ser incapaz de se fixar à superfície bucal mantendo sua atividade neste local por longas horas, o que é denominado de “substantividade” da clorexidina. No entanto, é razoável pensar que a partir deste sal de baixa tendência à descoloração do esmalte dos dentes podemos desenvolver uma formulação farmacêutica que propicie um maior tempo de fixação deste sal na boca, e sem ocasionar o indesejável efeito colateral próprio da clorexidina.

4.5. Teste de reconhecimento dos gostos básicos

É sabido que o DGCHX, o sal mais hidrossolúvel de clorexidina, é caracterizado por um gosto extremamente amargo e por interferir na identificação de gostos básicos como de sais e o amargo da quinina (GENT; et al., 2002; FRANK; et al., 2001). Outros fármacos de gosto amargo tiveram esta característica muito atenuada através da formação de derivados menos hidrossolúveis, tal como o palmitato de cloranfenicol (WILSON; et al., 1998). Assim como neste exemplo, a diminuição da solubilidade em água da

clorexidina, através da obtenção de um sal com elevada lipofilicidade deverá diminuir a interação da molécula bioativa com as papilas gustativas e principalmente com as células receptoras de gosto. Desta forma, o estudo realizado de reconhecimento dos gostos básicos visou avaliar se o sal obtido apresenta uma menor interação com as papilas gustativas, através da comparação entre a confusão na identificação dos gostos provocada pelo uso de DGCHX com a provocada pelo uso do sal TPCHX.

Por se tratar de um sal de baixa hidrossolubilidade, avaliou-se também a confusão provocada pelo uso da própria clorexidina base, pois ela deve ter um menor contato com as células receptoras de gosto do que seu derivado hidrossolúvel, embora esta molécula ainda apresente gosto muito amargo.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.1. Na coluna da esquerda encontram-se os títulos dos gostos apresentados, enquanto que na linha superior estão as respostas dadas pelos voluntários. A diagonal em negrito representa a porcentagem de respostas corretas.

Tabela 4.1. Matriz de porcentagem de respostas corretas nos grupos tratados (n=9)

ESTÍMULO	ENXÁGUE	Respostas										
		sal	sal - açúcar	sal substituto	quinina	quina- açúcar	açúcar	ácido	ácido- açúcar	glutamato	água	
Sal	CMC	92,2	1,1	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0
	TPCHX	91,1	1,1	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1
	CHX base	67,8	1,1	20,0	0,0	1,1	0,0	2,2	1,1	5,6	1,1	10,0
	DGCHX	43,3	4,4	30,0	4,4	0,0	1,1	2,2	0,0	4,4	0,0	0,0
Sal-açúcar	CMC	0,0	92,2	3,3	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
	TPCHX	0,0	96,7	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CHX base	3,3	85,6	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	DGCHX	1,1	72,2	0,0	0,0	23,3	1,1	1,1	1,1	1,1	0,0	0,0
Sal substituto	CMC	2,2	0,0	81,1	4,4	2,2	0,0	0,0	2,2	0,0	10,0	0,0
	TPCHX	1,1	0,0	85,6	11,1	1,1	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	CHX base	5,6	0,0	77,8	10,0	0,0	0,0	4,4	0,0	1,1	1,1	1,1
	DGCHX	10,0	0,0	63,3	16,7	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	8,9
Quinina	CMC	0,0	0,0	1,1	96,7	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	TPCHX	0,0	0,0	2,2	88,9	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	2,2
	CHX base	0,0	0,0	1,1	87,8	1,1	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	4,4
	DGCHX	2,2	0,0	6,7	58,9	1,1	0,0	4,4	1,1	0,0	0,0	25,6
Quina-açúcar	CMC	0,0	0,0	0,0	2,2	91,1	0,0	0,0	2,2	4,4	0,0	0,0
	TPCHX	0,0	1,1	0,0	1,1	88,9	3,3	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0
	CHX base	0,0	1,1	0,0	2,2	81,1	10,0	2,2	3,3	0,0	0,0	0,0
	DGCHX	0,0	3,3	0,0	0,0	50,0	34,4	0,0	12,2	0,0	0,0	0,0
Açúcar	CMC	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	98,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TPCHX	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CHX base	0,0	1,1	0,0	1,1	3,3	94,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	DGCHX	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	93,3	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0
Ácido	CMC	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	97,8	1,1	0,0	0,0	0,0
	TPCHX	0,0	1,1	0,0	3,3	0,0	1,1	94,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	CHX base	0,0	0,0	0,0	2,2	1,1	0,0	94,4	2,2	0,0	0,0	0,0
	DGCHX	1,1	0,0	1,1	1,1	0,0	88,9	2,2	2,2	2,2	3,3	
Ácido-açúcar	CMC	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	2,2	94,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	TPCHX	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	96,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	CHX base	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	96,7	1,1	0,0	0,0	0,0
	DGCHX	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	7,8	85,6	0,0	0,0	0,0	
Glutamato	CMC	1,1	1,1	8,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	86,7	2,2	
	TPCHX	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	97,8	0,0	
	CHX base	4,4	1,1	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	92,2	0,0	
	DGCHX	8,9	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	85,6	2,2	
Água	CMC	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	96,7	
	TPCHX	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	98,9	
	CHX base	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	97,8	
	DGCHX	2,2	0,0	2,2	4,4	0,0	2,2	2,2	0,0	1,1	87,8	

Dos 10 gostos apresentados, somente 5 deles sofrem grande interferência da clorexidina, a saber: sal, sal substituto, sal-açúcar, quinina e quinina-açúcar (HELMS; et al., 1995; BRESLIN; THARP, 2001; FRANK, et al., 2001). Água e misturas de açúcar foram incluídas para proverem uma resposta apropriada quando os voluntários acharem o estímulo apresentado “sem gosto”.

Separando os estímulos em dois grupos, aqueles afetados pela ação da clorexidina e aqueles não afetados, podemos comparar as médias de respostas corretas (valor máximo de 10, referente às 10 replicatas para cada indivíduo) encontrada em cada grupo de estímulos, realizando teste T estatístico para comparar os grupos “afetados” e “não afetados” dentro de um mesmo tratamento. A partir do histograma apresentado na figura 4.6 podemos observar a forte influência que o DGCHX exerce sobre os estímulos do grupo afetado ($P=0,0004$) e em menor escala o efeito da clorexidina base, que embora seja de baixíssima solubilidade em água, apresentou um valor $P=0,007$, confirmando a diferença estatística entre os grupos num nível de significância de 5%. O sal TPCHX também apresentou uma diferença entre os grupos ($P=0,01$) que, embora seja muito mais discreta que aquela apresentada pelos demais tratamentos, revela um fato surpreendente, a diferença evidenciada não reflete um maior índice de erros no grupo “afetados”, visto não apresentar diferença estatística com o mesmo grupo no controle negativo de CMC 0,2% ($P=0,95$). Assim, esta diferença pode representar um ganho na identificação dos gostos ditos “não afetados”, sugerindo um possível efeito benéfico na identificação dos gostos deste grupo. O grupo de CMC (controle negativo) não apresentou diferença entre as médias de ambos os grupos ($P=0,25$).

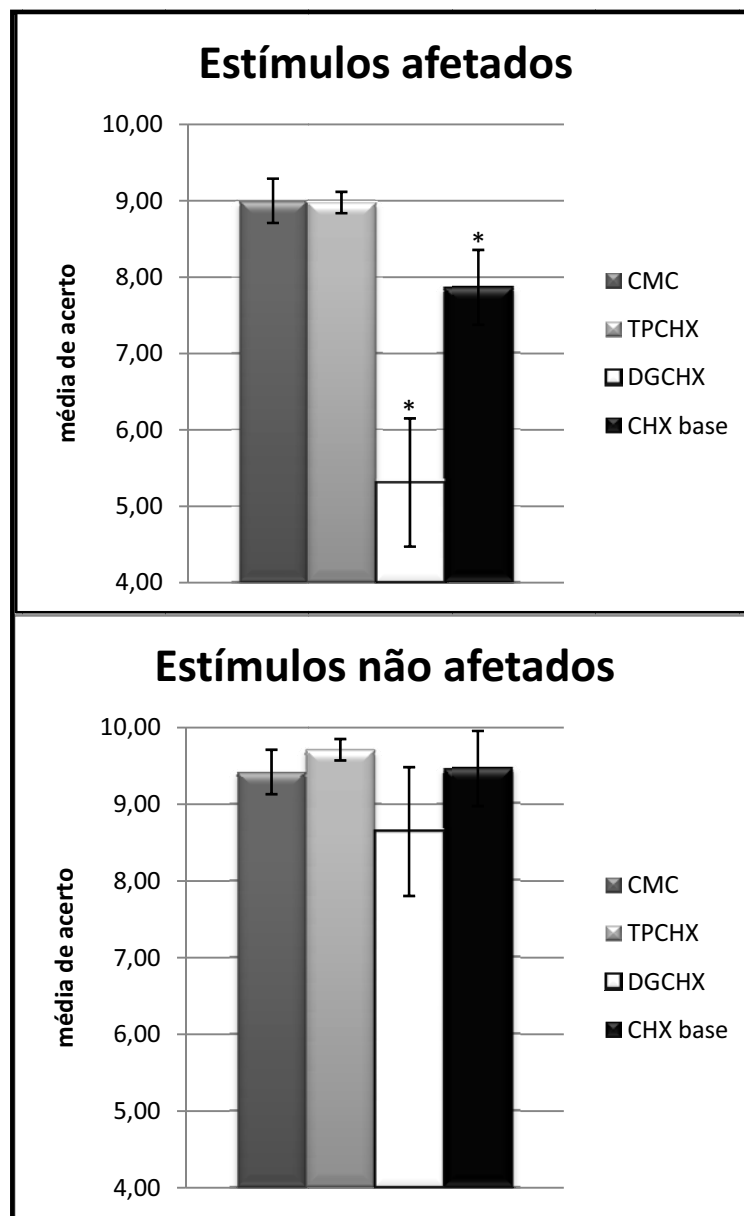


Figura 4.6. Histogramas da média de acertos entre os grupos dos estímulos “afetados” e “não afetados” pela clorexidina
(barra de erro representa a variância dentro de cada tratamento - $P \leq 0,049$)

Quando comparamos a influência de cada um dos tratamentos sobre cada gosto em particular, podemos notar diferenças importantes entre os grupos. A figura 4.7 mostra os histogramas obtidos a partir das médias de acerto para cada um dos 5 gostos afetados pela ação da clorexidina. Nesta figura podemos observar que em todos os gostos estudados não há diferença

entre as médias encontradas para o grupo CMC daquelas encontradas para o grupo TPCHX, comprovando desta forma que o sal TPCHX não foi capaz de interferir na identificação dos gostos considerados “afetados” pela clorexidina; por outro lado, em todos os casos houve diferença entre os grupos CMC e DGCHX, comprovando sua forte influência sobre este grupo de gostos. No entanto, apesar da clorexidina base (CHX base) ter apresentado uma média inferior para o grupo “afetados” como mostrado na figura 4.6, somente foi possível perceber sua influência em dois dos 5 estímulos, sal ($P=0,017$) e quinina-açúcar ($P=0,016$), nos outros estímulos não foi possível verificar uma diferença significativa ($P \geq 0,057$) entre as médias, porém em todos os casos a média obtida para cada estímulo está sempre abaixo da obtida pelo controle CMC, mostrando uma tendência em influenciar a identificação destes gostos, o que é justificado pela observação inicial comparando-se os grupos de um modo geral, “afetados” *versus* “não afetados”. A tabela 4.2 traz os resultados estatísticos (valor P) empregando teste T para amostras pareadas, sempre em comparação com o controle negativo CMC.

Este comportamento da clorexidina base pode ser explicado pela sua baixa hidrofiliabilidade, o que diminui a interação com os receptores de gostos, e assim diminui sua influência sobre a identificação destes. Já o sal TPCHX, ainda mais hidrofóbico que a base livre, não interfere significativamente ($P \geq 0,088$) na identificação de nenhum gosto deste grupo.

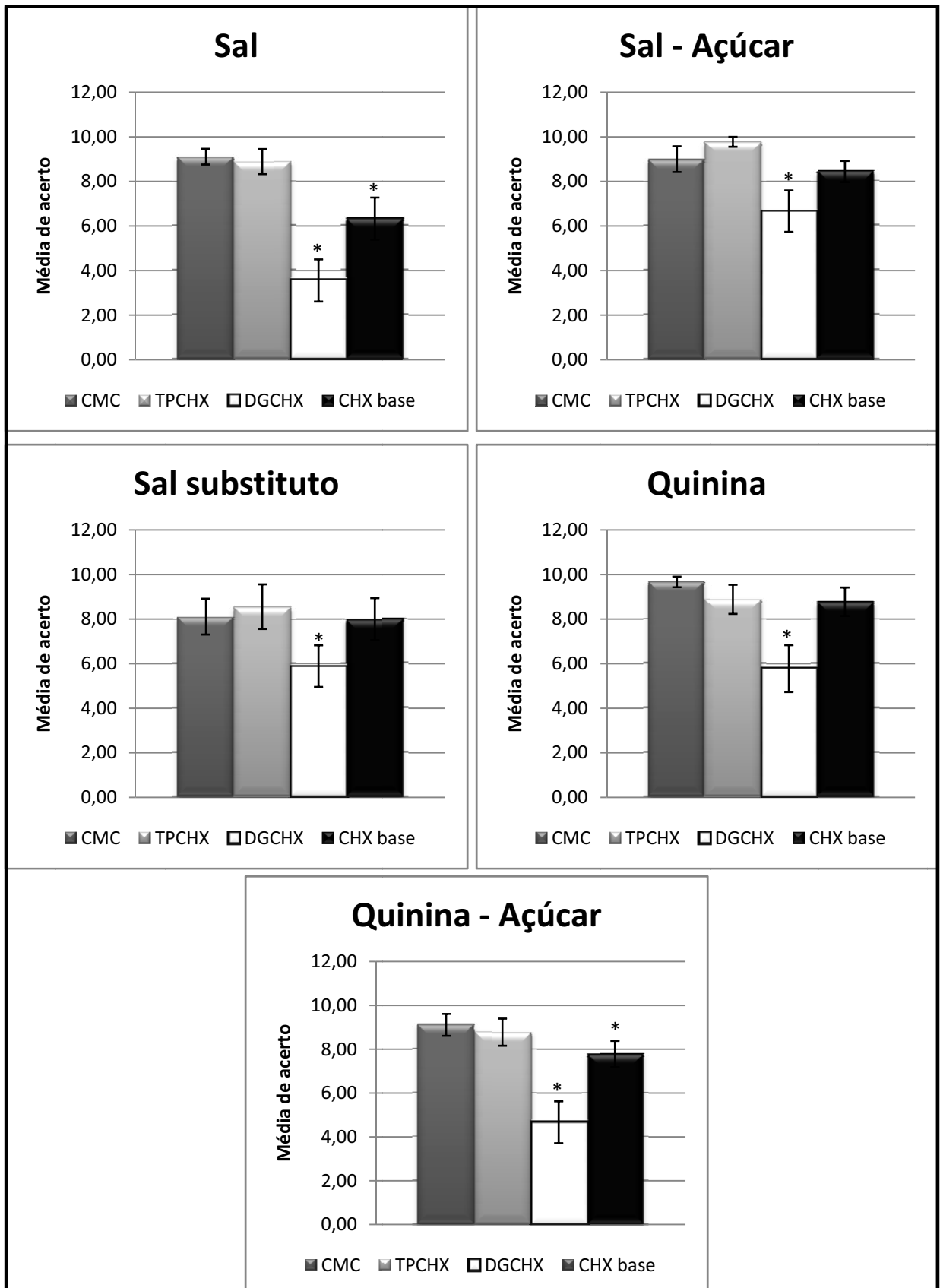


Figura 4.7. Histogramas dos gostos afetados pela clorexidina (barra de erro representa o erro padrão)

Tabela 4.2. Valores P calculados por teste T para amostras pareadas (em relação à CMC)

GRUPO	ESTÍMULO	TPCHX	DGCHX	CHX BASE
Afetados	Sal	0,745	0,001	0,017
	Sal substituto	0,548	0,038	0,874
	Sal-Açúcar	0,088	0,041	0,430
	Quinina	0,133	0,004	0,057
	Quinina-Açúcar	0,347	0,001	0,016
Não Afetados	Açúcar	0,169	0,347	0,347
	Ácido	0,397	<0,001	0,50
	Ácido-Açúcar	0,195	0,086	0,282
	Glutamato	0,195	0,842	0,426
	Água	0,347	0,030	0,594

Valores em negrito significam diferença significativa (alfa=0,05)

A análise dos resultados referente ao grupo “não afetados” demonstra a baixa influência da clorexidina sobre os gostos deste grupo (figura 4.8). O teste estatístico T para amostras pareadas revela que não houve diferenças ($P \geq 0,50$) entre as médias dos diversos tratamentos em relação à obtida pelo controle negativo (CMC), senão pela diferença encontrada nos gostos ácido ($P < 0,001$) e água ($P = 0,030$), entre o DGCHX e o controle CMC. O efeito sobre o gosto ácido é consistente com observações de alguns autores sobre uma menor influência da clorexidina na sua percepção (MARINONE; SAVOLDI, 2000), em 3,3% das respostas, os indivíduos não foram capazes de identificar nenhum gosto na amostra, enquanto que em 2,2% dos casos houve uma confusão com o gosto do glutamato monossódico (tabela 4.1). Com relação à água, este efeito está relacionado com o fato de que os indivíduos ao não perceberem nenhum gosto na amostra, acabam identificando o gosto amargo residual da clorexidina, daí uma porcentagem 4,4% das respostas atribuídas à quinina (FRANK, et al., 2001) (tabela 4.1).

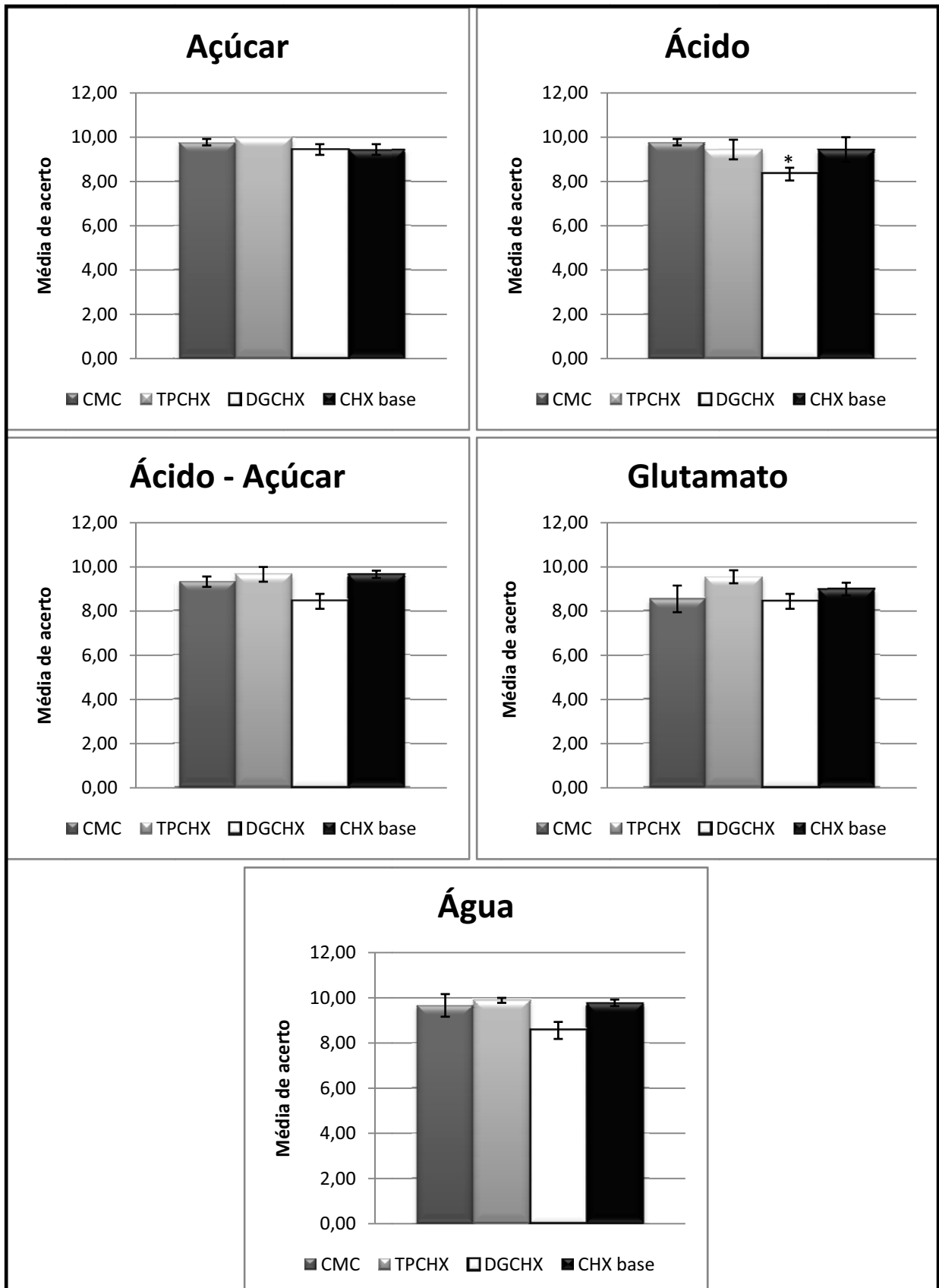


Figura 4.8. Histogramas dos gostos não afetados pela clorexidina (barra de erro representa o erro padrão)

Este experimento foi capaz de demonstrar o efeito do sal hidrossolúvel de clorexidina, o DGCHX, sobre as células receptoras de gostos, e ainda nos permite comparar o efeito da diminuição da hidrossolubilidade sobre a atividade destas mesmas células, mostrando que a própria clorexidina base apresentou um efeito de “confusão” na identificação destes gostos menor que a provocada pelo DGCHX, porém ainda mais pronunciado que o efeito do sal hidrofóbico TPCHX, onde nenhuma diferença estatística foi observada numa comparação direta com o controle negativo realizado com solução de CMC a 0,2%.

É importante notar que embora a clorexidina base tenha apresentado uma menor influência, ela permaneceu com seu gosto amargo e, principalmente, é a forma que mais produz manchas na superfície bucal, impossibilitando seu emprego em qualquer apresentação farmacêutica. Por outro lado, o sal TPCHX foi ensaiado aqui numa concentração de 0,4%, o que equivale ao dobro da concentração molar usada no produto comercial PerioGard®, de forma que seja possível elevar sua concentração numa formulação sem comprometer o paladar.

4.6. Cinética de eliminação da clorexidina da cavidade bucal

O objetivo deste ensaio foi avaliar a influência da formulação empregada no preparo do enxaguatório bucal contendo o sal TPCHX, no tempo de permanência da clorexidina na superfície bucal. O sal TPCHX foi incorporado em duas concentrações diferentes (0,2 e 0,3%) e em 5 preparações distintas: água; 0,2% de CMC; 0,2% de HMC; 0,2% de CMC com 0,4% de PVP, e 0,2% de HMC com 0,4% de PVP. Desta forma podemos comparar o efeito da concentração do sal TPCHX empregado em cada formulação e a influência das formulações entre si.

Como agentes suspensores foram escolhidos dois espessantes hidrofílicos derivados de celulose, a carboximetilcelulose (CMC) e a hidroximetilcelulose (HMC) (figura 4.9). Estes espessantes apresentam a capacidade de intumescer em presença de água produzindo viscosidade ao meio. O composto polivinilpirrolidona (PVP) (figura 4.9) é uma resina sintética

que, além da propriedade espessante, também apresenta a característica de formar um filme (película) nos fios de cabelo quando empregada como fixadores e modeladores capilar (ROBINSON, 1990). Quando substâncias que apresentam um grande número de ligações intermoleculares, tais como forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, são adicionadas à solução de PVP, materiais altamente associados podem ser obtidos (MEAURIO, et. al., 1996). Desta forma, espera-se que o sal TPCHX seja capaz de associar-se ao PVP através de suas numerosas interações hidrofóbicas, e este formar uma camada sobre a película salivar por meio de interações eletrostáticas, dado seu caráter catiônico, aumentando desta forma a retenção do sal na superfície bucal.

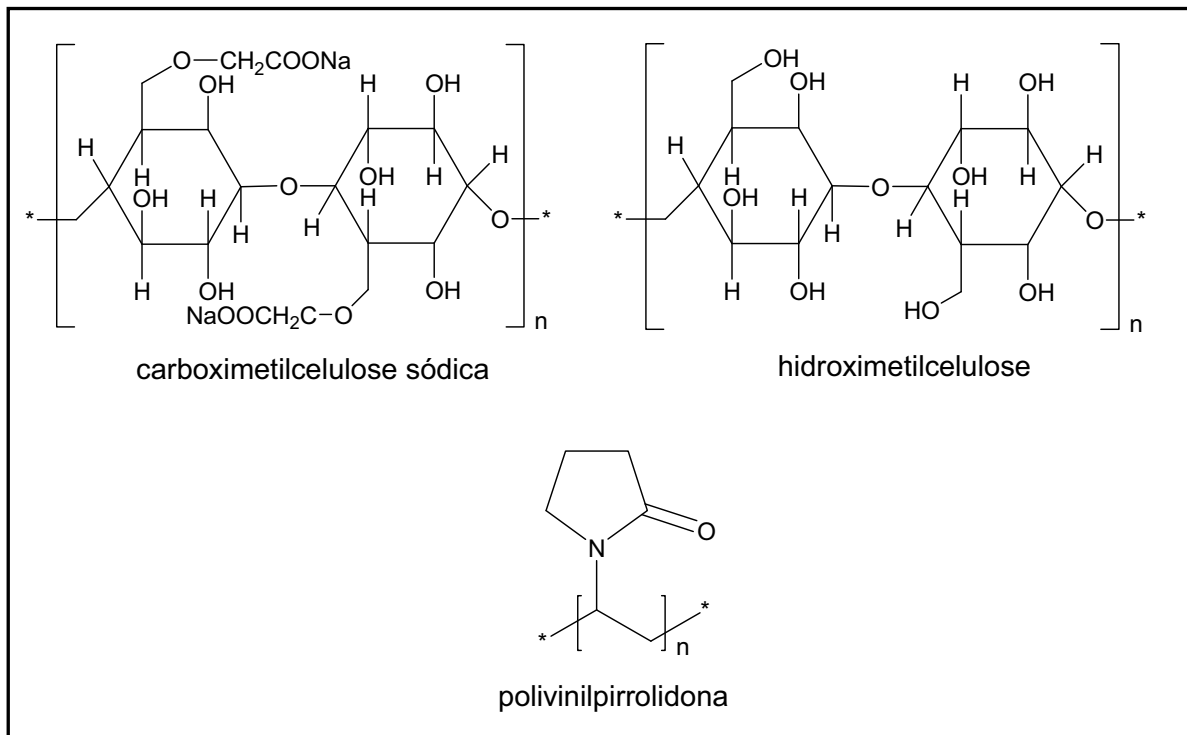


Figura 4.9. Estruturas químicas dos compostos HMC, CMC e PVP

Inicialmente preparou-se uma curva de calibração (área sob o pico *versus* concentração) empregando-se a clorexidina base em concentrações variando de 1 a 75 µg/mL. A curva resultante obtida está mostrada na figura 4.10.

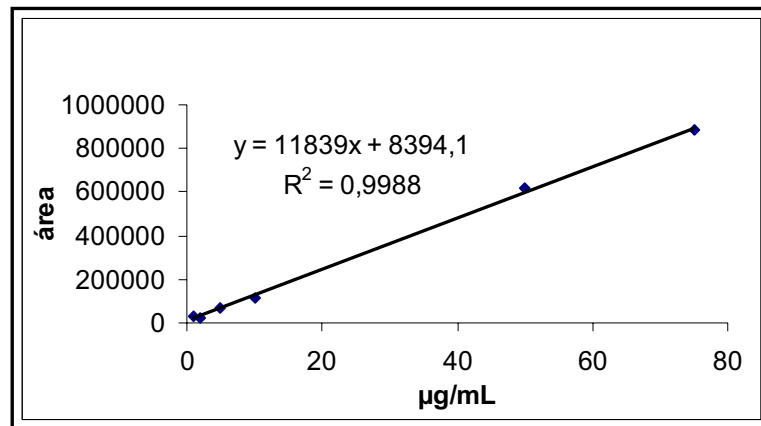


Figura 4.10. Curva de calibração de clorexidina

Os resultados estão apresentados na tabela 4.3 e representam as concentrações de clorexidina recuperada a partir da saliva após o enxágue bucal com cada uma das seguintes preparações: DGCHX (0,12% do sal digluconato); água com 0,2% ou 0,3% de TPCHX; suspensão de CMC com 0,2% ou 0,3% de TPCHX; suspensão de HMC com 0,2% ou 0,3% de TPCHX; suspensão de CMC e PVP com 0,3% de TPCHX, e suspensão de HMC e PVP com 0,3% de TPCHX.

Tabela 4.3. Concentrações de clorexidina na saliva

Preparação	Concent. TPCHX	Tempo				
		15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Água	0,2%	14,6 µg/mL	6,7 µg/mL	5,3 µg/mL	2,8 µg/mL	1,6 µg/mL
	0,3%	36,9 µg/mL	24,5 µg/mL	9,8 µg/mL	9,6 µg/mL	7,7 µg/mL
CMC	0,2%	30,1 µg/mL	13,3 µg/mL	5,6 µg/mL	4,7 µg/mL	3,5 µg/mL
	0,3%	57,3 µg/mL	19,1 µg/mL	17,9 µg/mL	12,7 µg/mL	9,1 µg/mL
HMC	0,2%	16,2 µg/mL	13,5 µg/mL	6,7 µg/mL	4,3 µg/mL	6,2 µg/mL
	0,3%	44,1 µg/mL	27,5 µg/mL	15,5 µg/mL	10,8 µg/mL	11,0 µg/mL
CMC PVP	0,3%	35,3 µg/mL	24,4 µg/mL	25,2 µg/mL	23,4 µg/mL	16,8 µg/mL
HMC PVP	0,3%	35,5 µg/mL	30,3 µg/mL	26,3 µg/mL	23,1 µg/mL	19,9 µg/mL
DGCHX		40,8 µg/mL	39,7 µg/mL	21,5 µg/mL	21,9 µg/mL	17,9 µg/mL

A partir destes resultados, podemos gerar curvas de concentração *versus* tempo, como mostradas nas figuras 4.11 e 4.12, e assim visualizar a influência da presença de agentes suspensores bem como de formadores de filme.

Na figura 4.11 podemos observar que em ambas as séries de preparações, aquelas que contêm CMC e aquelas que contêm HMC como agentes suspensores, a presença do agente PVP representou uma maior concentração salivar de clorexidina ao final de 90 minutos após o enxágue bucal, quando comparado às respectivas preparações onde o agente formador de filme está ausente. É possível notar também uma maior linearidade no decaimento da concentração salivar de clorexidina com o uso do PVP.

A influência do PVP nas formulações torna-se mais evidente ao compararmos as formulações com a água. A figura 4.12 mostra que quando temos somente o agente suspensor, CMC ou HMC, as curvas de decaimento da concentração de clorexidina tornam-se muito semelhantes às preparações contendo somente água destilada.

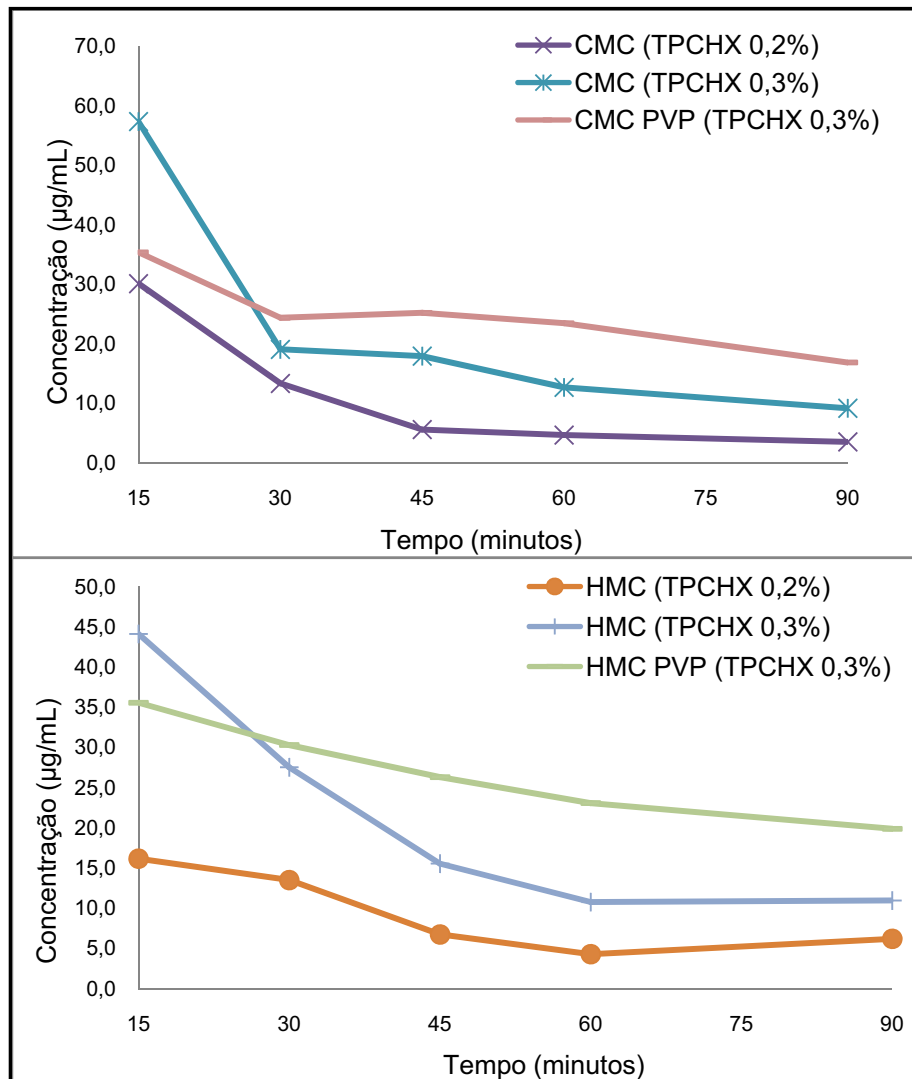


Figura 4.11. Concentração de clorexidina *versus* tempo (acima: preparações contendo CMC. abaixo: preparações contendo HMC)

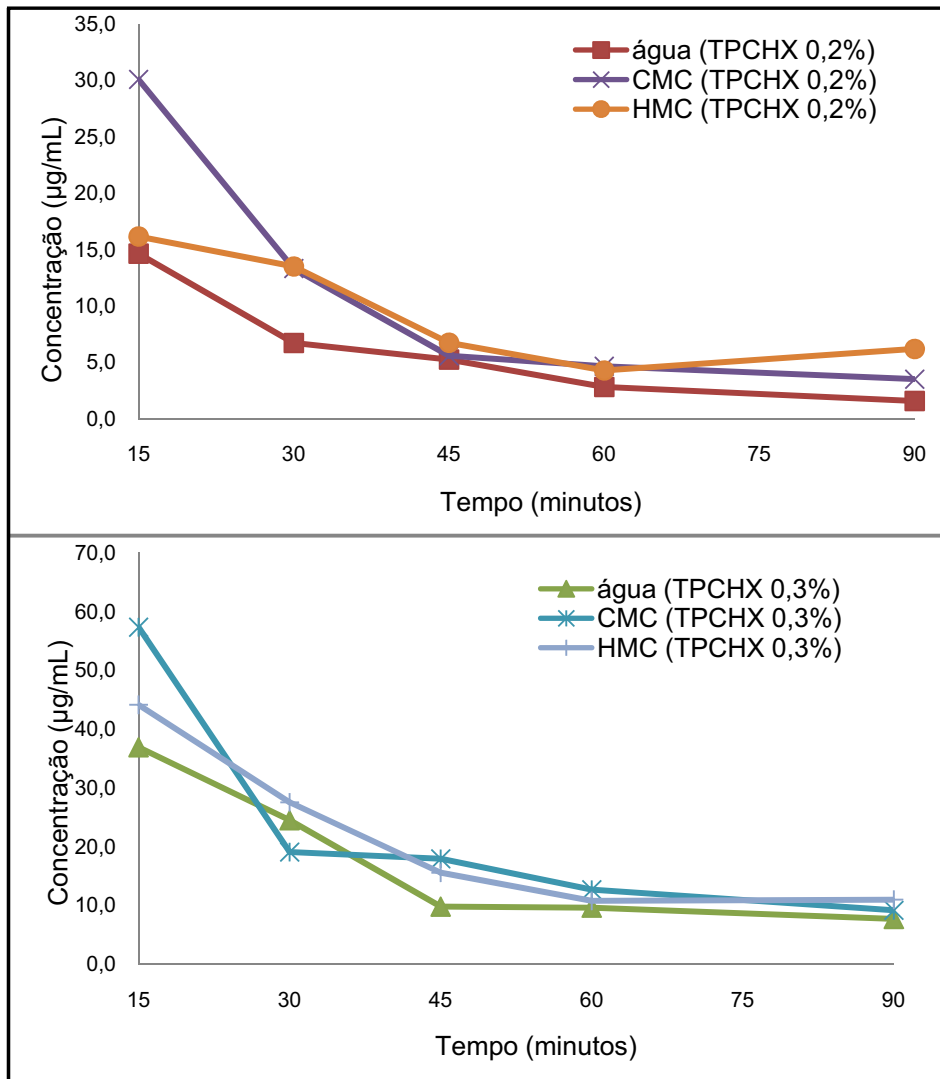


Figura 4.12. Concentração de clorexidina *versus* tempo (acima: preparações contendo 0,2% de TPCHX. abaixo: preparações contendo 0,3% TPCHX)

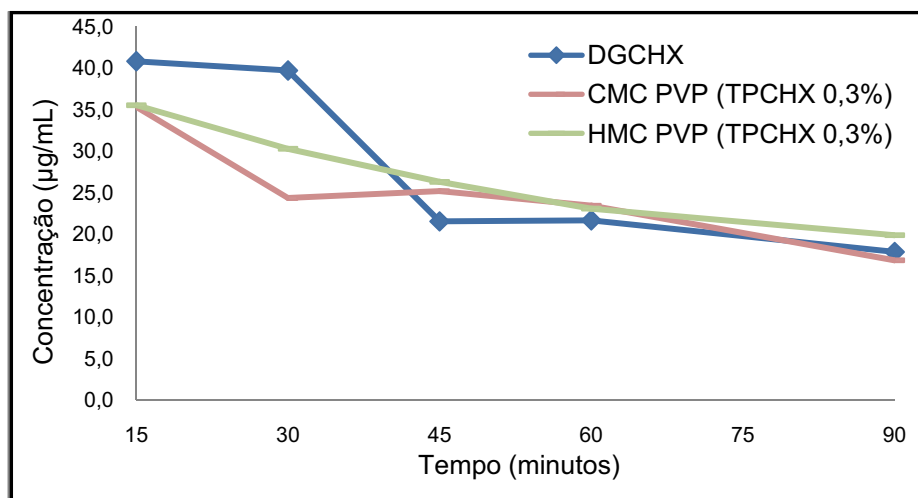


Figura 4.13. Concentração de clorexidina *versus* tempo, comparação do DGCHX com as preparações contendo PVP

Quando comparamos as formulações contendo PVP com a solução de DGCHX, observa-se que as 3 preparações apresentam-se bastante semelhantes quanto à velocidade de eliminação da clorexidina da superfície bucal (figura 4.13). A comparação estatística das médias das concentrações encontradas no tempo de 90 minutos evidencia mais uma vez a importância do PVP nestas formulações (figura 4.14)

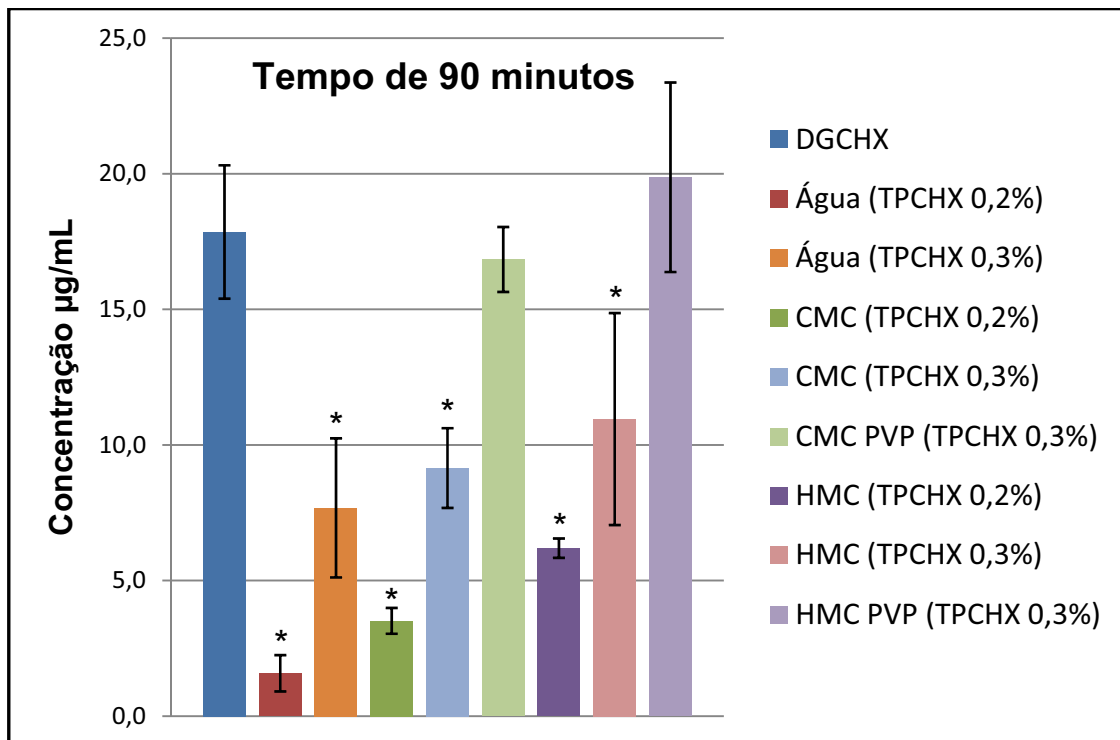


Figura 4.14. Histograma da concentração de clorexidina nas preparações ($P \leq 0,03$)

No histograma representado na figura 4.14, percebemos que as médias encontradas após 90 minutos ao enxágue bucal para DGCHX e para as formulações contendo PVP foram iguais a um nível de significância de 5%. Podemos observar na tabela 4.3 que logo após os primeiros 30 minutos ao enxágue, com exceção da formulação de HMC com 0,3% de TPCHX, a concentração de clorexidina encontrada já estava abaixo do valor das preparações com DGCHX e com PVP, este fato reflete a perda da substantividade da clorexidina, ou seja, sua capacidade de permanecer na superfície bucal, quando em sua forma completamente ionizada. Como já dito anteriormente, esta capacidade deve estar associada às cargas eletrônicas na molécula da clorexidina, a qual apresenta dois grupos não ionizados no sal

digluconato e nenhum grupo no sal tetrapalmitato, o que fez com que este último fosse rapidamente eliminado da superfície bucal pela atividade salivar. Porém, a presença de uma substância catiônica que apresenta característica de formação de filmes ou camadas sobre uma superfície específica, como o PVP, serviu, aparentemente, como um suporte ao TPCHX, prolongando sua permanência na boca.

4.7. Estudo Reológico

Reologia é a ciência que estuda o comportamento deformacional e do fluxo de matéria quando submetida a tensões, sob condições termodinâmicas específicas ao longo de um intervalo de tempo.

De acordo com o comportamento de cada fluido, pode-se classificá-los em dois grandes grupos: Fluido Newtoniano, quando a viscosidade do material é igual, independente da tensão de cisalhamento (força aplicada em uma determinada área do fluido) aplicada a uma dada temperatura, e Fluidos Não Newtonianos, os quais são subdivididos em Dependentes do Tempo, Independentes do Tempo, e Viscoelásticos (figura 4.15).

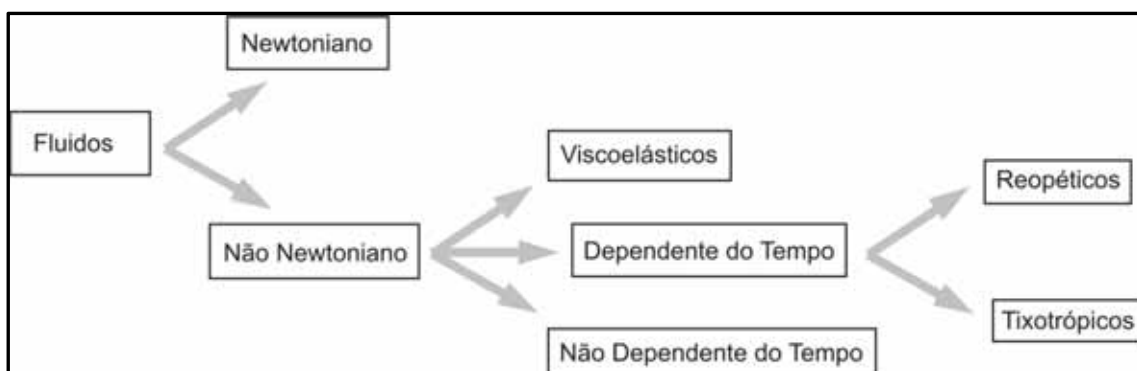


Figura 4.15. Classificação dos fluidos de acordo com seu comportamento reológico

No grupo dos fluidos Dependentes do Tempo, ou seja, aqueles que apresentam mudança na viscosidade em função do tempo em que a tensão de cisalhamento é aplicada, existem dois comportamentos distintos: Fluidos Tixotrópicos e Reopéticos. No primeiro caso, o fluido tem sua viscosidade

diminuída com o tempo de aplicação da tensão, voltando a ficar mais viscoso quando esta acaba, e no segundo a viscosidade é aumentada com o tempo de aplicação da tensão, retornando à sua viscosidade inicial com o fim da aplicação da tensão (CHENG; EVANS, 1975).

Para o preparo de um enxaguatório bucal na forma de suspensão, é desejável que esta seja suficientemente viscosa de modo que as partículas suspensas não decantem durante o período de armazenamento do produto, porém esta viscosidade deverá ser diminuída na medida em que o enxágue bucal é realizado, permitindo um melhor espalhamento do produto ao longo da superfície bucal e também a liberação do ingrediente ativo de sua matriz. Ou seja, é desejável que esta formulação apresente propriedade tixotrópica, com diminuição da viscosidade durante o período de cisalhamento, ou enxágue bucal.

Através da plotagem em um gráfico dos valores da tensão de cisalhamento *versus* a taxa de deformação, obteremos para um fluido não newtoniano de propriedade dependente do tempo de cisalhamento uma curva de escoamento semelhante ao representado na figura 4.16, onde uma área, denominada área de histerese, é delimitada entre as curvas ascendente e descendente.

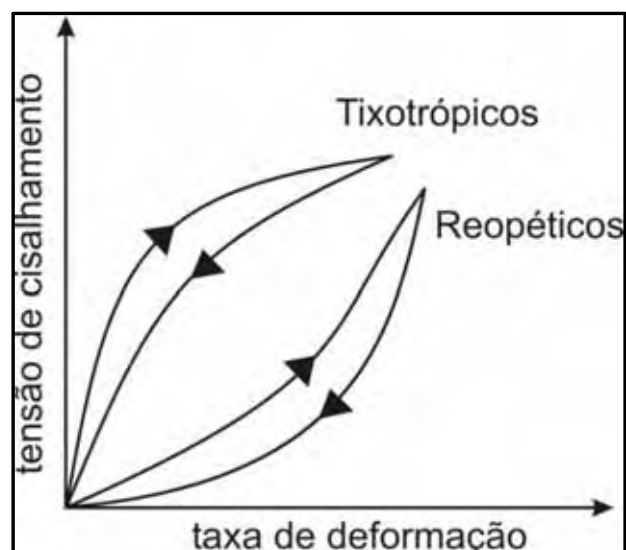


Figura 4.16. Curvas de escoamento de fluidos não newtonianos de propriedade dependente do tempo de cisalhamento

A área de histerese caracteriza o grau de quebra da estrutura interna ocorrida no produto; uma vez que ocorra quebra estrutural, as curvas ascendente e descendente não deverão coincidir, criando o ciclo de histerese (WELTMANN, 1943), e então reflete o quanto a viscosidade do material é alterada pela tensão de cisalhamento aplicada. Assim, quanto menor esta área, mais o fluido se aproxima de um comportamento newtoniano, enquanto que quanto maior a área de histerese, maior é a alteração de sua estrutura interna. No caso de fluidos tixotrópicos, a área de histerese reflete uma perda de viscosidade, período em que a substância ativa poderá ser mais facilmente difundida para a superfície bucal no caso de um enxaguatório.

Os reogramas apresentados na figura 4.17 trazem as relações entre tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de deformação (s^{-1}) para cada amostra estudada. É possível observar que em todos os casos houve um comportamento tixotrópico e, de acordo com o quadro 4.4 e figura 4.18, vemos que em nenhuma preparação houve diferença estatística entre si. Outra importante observação é que no caso da solução de CMC, a tensão de cisalhamento apresentou-se um pouco mais elevada que nas demais soluções, o que indica que a CMC foi capaz de formar uma estrutura interna mais consistente que nos demais casos, mas quando se incorporou PVP nesta solução a uma concentração 2 vezes mais elevada que a de CMC, o comportamento reológico gerado pelo PVP tornou-se predominante nesta solução, obtendo-se valores de tensão de cisalhamento semelhantes às soluções de HMC e HMC com PVP, porém sua adição não representou uma alteração na área de histerese comparada às soluções simples de CMC ou HMC a 0,2%.

Em todas as soluções estudadas, vemos que as viscosidades dos sistemas foram muito baixas, estando próximas a zero Pas, o que é bastante desejável para o preparo de um enxaguatório bucal (figura 4.19).

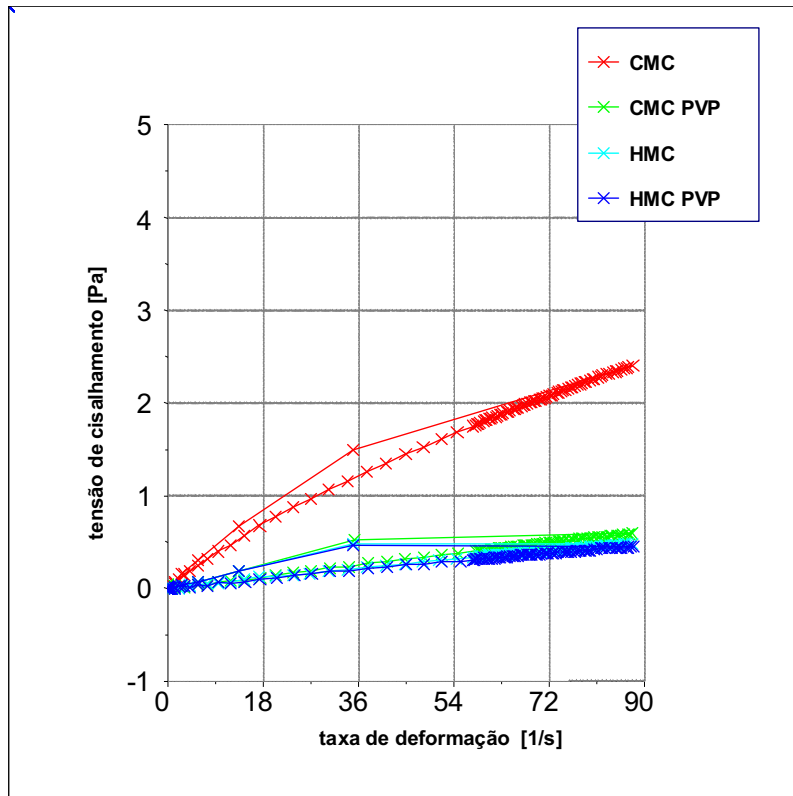


Figura 4.17. Reograma comparativo da tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação entre as amostras estudadas

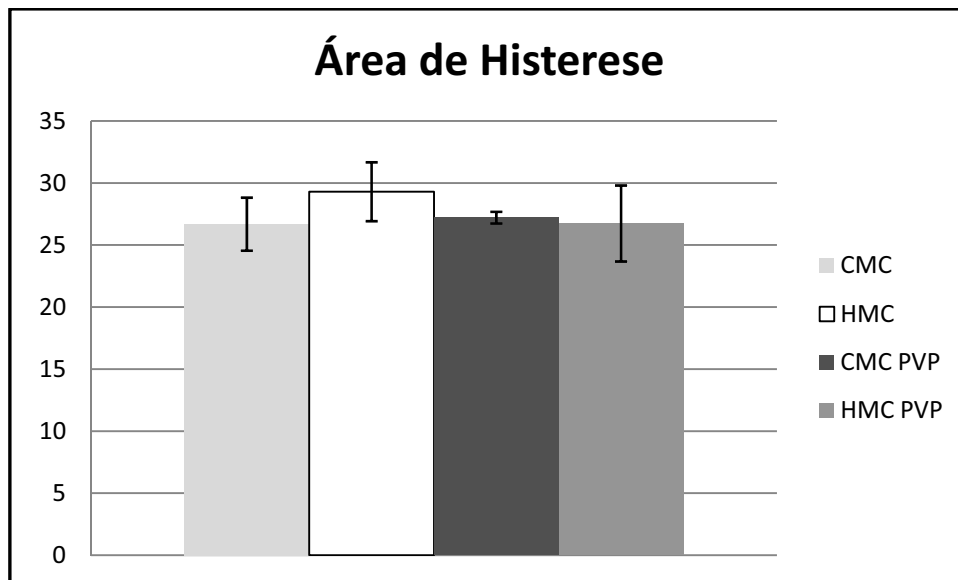


Figura 4.18. Histograma comparativo das áreas médias de histerese ($P \leq 0,472$)

Amostra	Área de Histerese (média)
CMC a 0,2%	26,69
HMC a 0,2%	29,30
CMC a 0,2% e PVP K30 0,4%	27,21
HMC a 0,2% e PVP K30 0,4%	26,74

Quadro 4.4. Relação das áreas médias de histerese a partir dos reogramas tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação

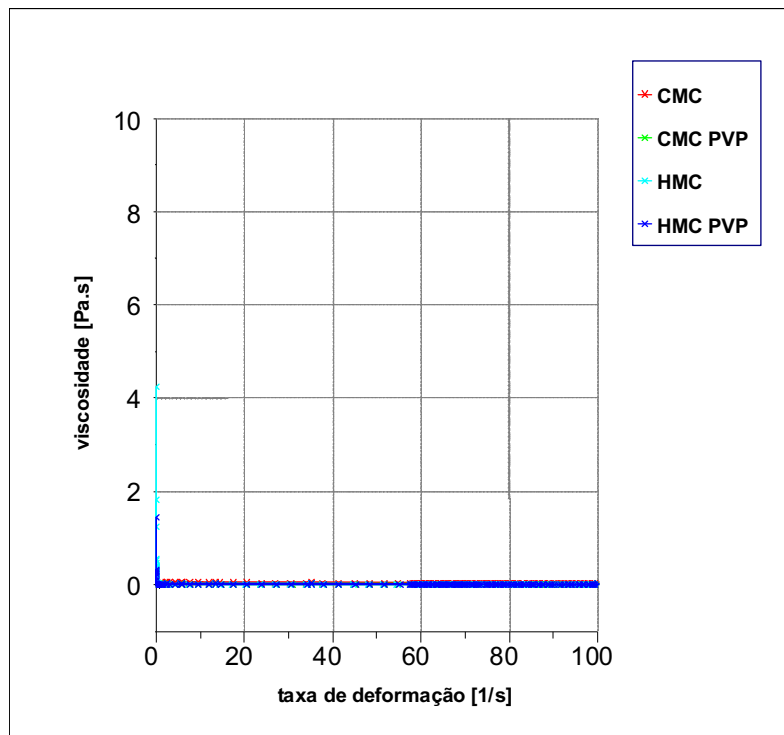


Figura 4.19. Reograma comparativo da tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação entre as amostras estudadas

Estes resultados indicam que todas as soluções apresentaram a desejável característica tixotrópica, mas que a adição de PVP não altera as áreas de histerese encontradas nas demais formulações deste estudo reológico.

Baseando-se nestes resultados e naqueles obtidos pelo estudo da cinética de eliminação pela saliva, podemos observar que o efeito das formulações propostas foi significativo sobre o tempo de permanência da

clorexidina na superfície bucal. Uma vez que as formulações contendo PVP apresentaram maior resistência à remoção da clorexidina pela atividade salivar, é bastante provável que este polímero tenha de fato formado uma camada ligada eletrostaticamente à película salivar, pois o PVP não foi capaz de aumentar as áreas de histerese comparadas às demais formulações sem PVP. Uma elevação nesta área poderia sugerir que esta substância torna a estrutura interna da solução suspensora mais sensível à ação do cisalhamento no ato do enxágue bucal, e assim facilitaria a transposição do sal TPCHX da suspensão para a superfície bucal; porém, como esta área não foi aumentada, outro efeito deve estar concorrendo para a melhora no perfil de eliminação salivar, o que reforça a hipótese da formação de um filme contendo o sal sobre a película salivar.

No entanto, para se propor uma formulação final adequada à finalidade de enxaguatório bucal, um importante parâmetro deverá ser medido, a estabilidade da suspensão. Neste aspecto duas frentes de interesse se conflitam, por um lado, quanto maior a viscosidade do meio, melhor a estabilidade da suspensão; por outro lado, este aumento na viscosidade torna mais desagradável o enxágue bucal.

Frente a esta questão de estabilidade *versus* palatabilidade, e ainda, considerando que as suspensões a partir de HMC mostraram uma leve incompatibilidade química com o sal TPCHX, visualizado pelo desenvolvimento de coloração rósea após alguns dias ao preparo, um possível enxaguatório na forma de suspensão compreenderia uma preparação extemporânea, onde a partir de uma suspensão de CMC e PVP mais viscosa e concentrada, realiza-se uma diluição no momento da tomada do enxágue, de modo que a concentração final de TPCHX seja igual a 0,3%, e a viscosidade o mais próxima possível à da água.

5. CONCLUSÕES

O sal tetrapalmitato de clorexidina (TPCHX) foi obtido e caracterizado por espectrofotometria no infravermelho e por ressonância magnética nuclear. O rendimento da preparação foi adequado (~100%), e esta se mostrou bastante repetível.

O composto TPCHX apresentou-se ativo frente *Streptococcus mutans* mesmo sendo insolúvel em meio aquoso, e com concentrações mínimas inibitórias (CMI) cerca de metade da encontrada com a clorexidina base para atividade bacteriostática, e um quarto daquela encontrada para atividade bactericida, indicando uma potencialização de sua atividade cariostática frente a *S. mutans*.

A interação cromogênica entre os alimentos e a película salivar contendo clorexidina, visualizada pela densidade ótica em placas de metilmetacrilato, mostrou ter uma relação direta com o número de grupos guanidínicos livres na estrutura do antisséptico. Com seus grupamentos guanidínicos completamente ionizados, o sal TPCHX apresentou-se pouco propenso ao desenvolvimento de manchas na superfície bucal, um dos principais efeitos colaterais encontrados com o uso da clorexidina.

O aumento da hidrofobicidade no sal TPCHX resultou na diminuição da percepção do gosto extremamente amargo e nas interações com as papilas gustativas quando comparado à forma hidrossolúvel da clorexidina, diminuindo sua capacidade de interferir com o reconhecimento dos gostos básicos após o tratamento bucal com esta substância.

Uma vez que o sal TPCHX tem suas interações eletrostáticas com a película salivar diminuídas, este se tornou facilmente removido da superfície bucal pela ação da saliva. O polímero polivinilpirrolidona (PVP) mostrou ter um efeito benéfico sobre a retenção do sal na boca. O estudo reológico apontou para a possibilidade deste polímero formar um filme contendo o sal TPCHX sobre a película salivar, uma vez que sua adição em soluções simples de carboximetilcelulose (CMC) ou hidroximetilcelulose (HMC) não alterou

significativamente ($P \geq 0,3159$) o tempo de desorganização do sistema polimérico interno destas soluções, determinada pelo cálculo da área de histerese formada. Embora o comportamento das suspensões compostas por CMC ou HMC foram muito semelhantes em todos os ensaios, esta última apresentou indícios de incompatibilidade química com o sal TPCHX, evidenciado pelo desenvolvimento de coloração rósea nas partículas suspensas após alguns dias ao preparo. Por esta razão, dá-se preferência ao uso da CMC.

Dada a baixa viscosidade das soluções propostas, com a finalidade de proporcionar uma adequada palatabilidade ao usuário do enxaguatório, as suspensões obtidas apresentaram baixa estabilidade. Assim, para uma adequada apresentação farmacêutica, poderá ser formulada uma suspensão mais concentrada do agente suspensor CMC, do polímero PVP e do sal TPCHX, de modo que numa preparação extemporânea a suspensão seja diluída no momento do uso para concentrações finais de 0,2% de CMC, 0,4% de PVP e 0,3% de TPCHX.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Em acordo com normas estabelecidas pela ABNT (NBR6023 e NBR10520)

ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 13, p. 957–964, 1986.

ADDY, M. The use of antiseptics in periodontal therapy. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, K. (Ed.). **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. Copenhagen: Blackwell Munksgaard. 2003. p. 464–493.

ADDY, M.; AL-ARRAYED, F.; MORAN, J. The use of an oxidizing mouthwash to reduce staining associated with chlorhexidine. Studies in vitro and in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p. 267-271, 1991.

ADDY, M.; MORAN, J. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. **Periodontol.** 2000, v. 15, p. 52–54, 1997.

ADDY, M.; MORAN, J.; GRIFFITHS, A. A.; WILLS-WOOD, N. J. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine I. Surface protein denaturation or dietary precipitation? **Br. Dent. J.**, v. 159, p. 281–285, 1985.

ADDY, M.; PRAYITNO, S.; TAYLOR, L.; CADOGAN, S. An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **J. Periodont. Res.**, v. 14, p. 403–410, 1979.

ADDY, M.; SHARIF, N.; MORAN, J. A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: a study in vitro. **Int. J. Dent. Hyg.**, v. 3, p. 59–63, 2005.

ADDY, M.; WADE, W. G.; JENKINS, S.; GOODFIELD, S. Comparison of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. I. Staining and anti-microbial effects. **Clin. Prev. Dent.**, v. 11, p.10–14, 1989.

AINAMO, J.; ETEMADZADEH, H. Prevention of plaque growth with chewing gum containing chlorhexidine acetate. **J. Clin. Periodontol.** v. 14, p. 524–527, 1987.

ASCENT PEDIATRICS INC. Anaebonan, A. O; Emmett, C.; Abdel, A. F., **Pleasant-tasting aqueous liquid composition of a bitter-tasting drug**. US 5,962,461. Jun 18th, 1998, Oct. 05th, 1999.

BARILI, A. L. de A. **Prevalência das doenças periodontais em pacientes com doença isquêmica coronariana aterosclerótica, em Hospital**

Universitário. Ribeirão Preto, SP, 2003. Apresentada como dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2003.

BARKVOLL, P.; RÖLLA, G.; BELLAGAMBA, S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 96, p. 30-33, 1988.

BARKVOLL, P.; RØLLA, G.; SVENDSEN, A. K. Interaction between chlorhexidine and sodium lauryl sulfate in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, v.16, p. 593-595, 1989.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v. 4, p.430–435, 1999.

BOLANOWSKI, S. J.; GESCHEIDER, G. A.; SUTTON, S. V. Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. **J. Periodont. Res.**, v. 30, p. 192–197, 1995.

BOYD, R. L. Longitudinal evaluation of a system for self-monitoring plaque control effectiveness in orthodontic patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 10, p. 380–388, 1983.

BRANNON, D. K. **Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook.** Boca Baton (ed.). FL: CRC Press, 1997.

BRESLIN, P. A. S.; THARP, C. D. Reduction of saltiness and bitterness after chlorhexidine rinse. **Chem. Sense.** v. 26, p. 105-116, 2001.

BROXTON, P.; WOODCOCK, P. M.; GILBERT, P. Binding of polyhexamethylene biguanides to the cell envelope of *Escherichia coli*. **Microbios**, v. 41, p. 15–22, 1984.

CARPENTER, G. H.; PRAMANIK, R.; PROCTOR G. B. An in vitro model of chlorhexidine-induced tooth staining. **J. Periodontal. Res.**, v. 40, p. 225–230, 2005.

CHAWNER, J. A.; GILBERT, P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 253–258, 1989a.

CHAWNER, J. A.; GILBERT, P. Adsorption of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* cells and to isolated membrane components. **Int. J. Pharm.**, v. 55, p. 209–215, 1989b.

CHENG, D. C. H.; EVANS, F. Phenomenological characterization of the rheological behaviour of inelastic reversible tixotropic and antithixotropic fluids. **Brit. J. Appl.**, v.16, p. 1599-1617, 1975.

CHRISTERSSON, L. A; ZAMBON, R. G; DUNFORD, R, G; GROSSI, S. G; GENCO, R. J. Specific subgingival bacteria and diagnosis of gingivitis and periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 68 (Spec. Iss), p. 1633-1639, 1989.

CLAYDON, N. C. A.; ADDY, M.; ADAMS, G.; SMITH, S. R.; BOSMA, M. L.; NORTH, M.; MORAN, J. A comparison of two chlorhexidine gel brushing regimens and a conventional toothpaste brushing regimen for the development of tooth staining over a 6-week period. **Int. J. Dent. Hyg.**, v. 4, p. 183–188, 2006.

COSYN, J.; VERELST, K. An efficacy and safety analysis of a chlorhexidine chewing gum in young orthodontic patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, p. 894–899, 2006.

CURTIS, S. N.; DOOLEY, C. L. Cariostatic Activity of (1,6-Bis-[2-Ethylhexylbiguanido]-Hexane) in Conventional Rats. **J. Dent. Res.**, v. 58, p. 1405-1412, 1979.

DAOUD, N. N. D.; DICKINSON, N. A.; GILBERT, P. Antibacterial activity and physico-chemical properties of some alkyl-dimethylbenzyl ammonium chlorides. **Microbios**, v. 37, p. 75–85, 1983.

DAVIES, A. The mode of action of chlorhexidine. **J. Periodontol.**, v. 8, p. 68–75, 1973.

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.**, v. 9, p. 192–196, 1954.

DE ALBUQUERQUE JR., R. F.; HEAD, T. W.; MIAN, H.; RODRIGO, A.; MULLER, K.; SANCHES, K. Reduction of salivary *S. aureus* and *mutans* group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. **Quintessence Int.**, v. 35, p. 635–40, 2004.

DESIMONE, J. A.; CALLAHAN, E, M.; HECK, G, L. Chorda tympani taste response of rat to hydrochloric acid subject to voltage-clamped lingual receptive field. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C1295– C1300, 1995.

EMILSON, C. G.; KRASSE, B.; ROLLA, G. The effect of some bis-biguanides on experimental dental caries in the hamster. **Caries Res.**, v. 10, p. 352-362, 1975.

ESPOSITO, E. J. Effect of daily rinsing with alexidine on supragingival plaque pH. **J. Periodontol.**, v. 45, p.833-834, 1974.

FINGER, T. E.; SIMON, S. A. Cell biology of taste epithelium. In: FINGER, T. E.; SILVER, W. L.; RESTREPO, D. (Ed.). **The neurobiology of taste and smell**. 2. ed. New York:Wiley-Liss, 2000. p. 287-314.

FIRMENICH & CIE. Stier, R. E. **Oral composition which mask the bitter taste of a bitter-tasting agent**. WO2006/013416. Jul. 19th, 2005, Feb. 9th, 2006.

FLÖTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 79, p. 119–125, 1971.

FRANCETTI, L.; FABBRO, DEL M.; BASSO, M.; TESTORI, T.; TASCHIERI, S.; WEINSTEIN, R. Chlorhexidine spray versus mouthwash in the control of dental plaque after implant surgery. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 857–862, 2004.

FRANK, M. E.; FORMAKER, B. K.; HETTINGER, T. P. Peripheral gustatory processing of sweet stimuli by golden hamsters. **Brain Res. Bull.**, v. 66, p. 70–84, 2005.

FRANK, M. E.; GENT, J. F.; HETTINGER, T. P. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Physiol. Behav.**, v. 74, p. 85-99, 2001.

FRAVE, I.; MOCZYDLOWSKI, E.; SCHLD, L. Specificity for block by saxitoxin and divalent cations at a residue wich determines sensitivity of sodium channel subtypes to guanidinium toxins. **J. Gen. Physiol.**, v. 106, p. 203-229, 1995.

FREITAS, L. B.; VASSILAKOS, N.; ARNEBRANT, T. Interactions of chlorhexidine with salivary films adsorbed at solid/liquid and air/liquid interfaces. **J. Periodont. Res.**, v. 28, p. 92–97, 1993.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, p. 437-439, 1999.

GENT, J. N.; FRANK, M. E.; HETTINGER, T. P. Taste confusion following chlorhexidine treatment. **Chem. Sense.**, v. 27, p. 73-80, 2002.

GERARDU, V. A.; BUIJS, M. J.; TEN CATE, J. M.; VAN LOVEREN, C. The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. **Caries Res.**, v. 37, p. 369–73, 2003.

GILBERT, P.; AL-TAAE, A. N. A. Antimicrobial activity of some alkyl-trimethyl ammonium bromides. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 1, p. 101–105, 1985.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J. Literature-based evaluation of the potential risks associated with impregnation of medical devices and implants with Triclosan. **Surg. Infect.**, v. 3 (Suppl.), p. 55–63, 2002.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J. An evaluation of the potential impact of the increased use of biocides within consumer products upon the prevalence of antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 189–208, 2003.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 703–715, 2005.

GJERMO, P.; BAASTAD, K. L.; ROLLA, G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. **J. Periodont. Res.** v. 5, p.102-109, 1970.

GJERMO, P.; ROLLA, G.; ARKSKAUG, L. Effect on dental plaque formation and some in vitro properties of 12 bis-biguanides. **J. Periodont. Res.**, v. 8 (Suppl. 12), p. 81-88, 1973.

GREGOLIN, M. T.; CHIARI, B. G.; RIBEIRO, H. M.; ISAAC, V. L. B. Rheological characterization of hydrophylic gels. **J. Dispers. Sci. Technol.**, in press, 2010.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; DZINK J. L.; TAUBMAN, M. A.; EBERSOLE, J. L.; SMITH, D. J. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, p. 240-246, 1988.

HALPERN, B. P. Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 5-47, 1998.

HELMS, J. A.; DELLA-FERA, M. A.; MOTT, A. E.; FRANK, M. E. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, p. 913–920, 1995.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 378–388, 1999.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 18, p. 569–578, 1966.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J. Prosthet. Dent.**, v. 85, p. 162–169, 2001.

Hull, P. S. Chemical inhibition of plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 7, p. 431–442, 1980.

IKEDA, T. Antibacterial activity of polycationic biocides. **High Perform. Biomat.**, v. 7, p. 743–764, 1991.

IKEDA, T.; TAZUKE, S.; BAMFORD, C. H. Interaction of membrane active biguanides with negatively charged species. A model for their interaction with target sites in microbial membranes. **J. Chem. Res.**, v. 6, p. 180–181, 1985a.

IKEDA, T.; TAZUKE, S.; LEDWITH, A.; BAMFORD, C. H. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocides with phospholipid membranes. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 58, p. 705–709, 1985b.

IKEDA, T.; LEDWITH, A.; BAMFORD, C. H.; HANN, R. A. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 769, p. 57–66, 1984a.

IKEDA, T.; TAZUKE, S.; WATANABE, M. Interaction of biologically active membranes with phospholipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 735, p. 380–386, 1984b.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, p. 415–424, 1988.

JOINER, A.; ELOFSSON, U. M.; ARNEBRANT, T. Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 114, p. 337–342, 2006.

JOINER, A.; MULLER, D.; ELOFSSON, U. M.; MALMSTEN, M.; ARNEBRANT, T. Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 111, p. 417–422, 2003.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol.** 2000, v. 15, p. 55–62, 1997.

KLOUB, M. A.; HECK, G. L.; DESIMONE, J. A. Self-inhibition in Ca^{2+} -evoked taste responses: a novel tool for functional dissection of salt taste transduction mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v. 79, p. 911–921, 1998.

KÖNÖNEN, E.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infant. **Oral Microbial. Immunol.**, v. 7, p. 28-31, 2007.

KOOP, U. C.; MATSUSHITA, K.; SIGMUND, R. D.; SMITH, L. A.; WATANABE, S.; STOKES, J. B. Amiloride-sensitive Na^{+} channels in pelvis uro epithelium involved in renal sensory receptor activation. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. R1780-R1792.

KUSNETSOV, J. M.; TULKKI, A. I.; AHONEN, H. E.; MARTIKAINEN, P. J. Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 763–768, 1997.

KUYYAKANOND, T.; QUESNEL, L. B. The mechanism of action of chlorhexidine. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 211-216, 1992.

LAMBERT, P. A.; HAMMOND, S. M. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in microorganisms. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 54, p. 796–799, 1973.

LEE, Y-K.; POWERS, J. M. influence of salivary organic substances on the discoloration of esthetic dental materials – a review. **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.**, v. 76B, p. 397–402, 2006.

PFIZER INC. Leung, S-H. S.; Leone, R. S.; Kumar, L. D.; Kulkarni, N.; Sorg, A. F. **Fast dissolving orally consumable films**. US 20030206941, Apr. 17th, 2003, Nov. 6th, 2003.

LIMAN, E. R. TRPM5 and taste transduction. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 287–298, 2007.

LINDERMANN, B. Chemoreception: tasting the sweet and the bitter. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1234-1237, 1996a.

LINDERMANN, B. Taste reception. **Physiol. Rev.**, v. 3, p. 718-766, 1996b.

LISTGARTEN, M. A. Nature of periodontal disease: pathogenic mechanisms. **J. Periodontal. Res.**, v. 22, p. 172-178, 1987.

LOBENE, R. R.; SOPARKAR, P. M. The effect of an alexidine mouthwash on human plaque and gingivitis, **JADA**, v. 87, p. 848-851, 1973.

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. Periodont. Res.**, v.5, p.79. 1970.

LÖE, H.; SCHIOTT, C. R.; KARRING, T. Two years use on chlorhexidine in man. (I) General and clinical effect **J. Periodont. Res.**, v. 11, p. 135, 1976.

LOESCHE, W. J.; ROWAN, J.; STRAFFON, L. H.; LOOS, P. J. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. **Infec. Immun.**, v. 11, p. 1252–1260, 1975.

LONGWORTH, A. R. Chlorhexidine. In: HUGO, W. B. (ed). **Inhibition and destruction of the microbial cell**. London: Academic Press, 1971. p. 95–106.

MANDEL, I. E. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 125, p. 2S-10S, 1994.

MARINONE, M. G.; SAVOLDI, E. Chlorhexidine and taste, influence of mouthwashes concentrations and of rinsing time. **Minerva Stomatol.**, v. 49, p. 221-226, 2000.

MARIS, P. Mode of action of disinfectants. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v. 14, p. 47-55, 1995.

MEAURO, E.; VELADA, J. L.; CESTEROS, L. C.; KATIME, I. Blends and complexo of poly(monomethyl itaconate) with polybases poly(N,N-dimethylacrilamide) and poly(ethyloxazoline). Association and thermal behavior. **Macromolecules**, v. 29, p. 4598-4604, 1996.

MENEGON, R. F. **Latenciação de clorexidina para uso potencial em periodontites**. Araraquara, SP, 2005. Apresentada como dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp, 2005.

MIURA, H.; KATO, H.; KUSAKABE, Y.; NINOMIYA, Y.; HINO, A. Temporal changes in NCAM immunoreactivity during taste cell differentiation and cell lineage relationships in taste buds. **Chem. Senses.**, v. 30, p. 367-375, 2005.

MOORE, W. E. C. Microbiology of periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v. 22, p. 335-341, 1987.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V.; SMIBERT, R. M.; CATO, E. P.; BURMEISTER, J. A.; PALCANIS, K. G.; RANNEY, R. R. Bacteriology of experimental gingivitis in children. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 1-6, 1984.

NEKRASHEVYCH, Y.; STOSSER, L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. **Caries Res.**, v. 37, p. 225–231, 2003.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunológica**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

ORION YHTYMAE OY. Noponen, A. K.; Tyysalo, T. **Mouthwash compositions containing xylitol**, BE902056. Mar. 29th, 1985, Jul. 16th, 1985.

ØGAARD, B. Cariological aspects of treatment with fixed orthodontic appliances. I. Epidemiological data. **Kieferorthopadie. Mitt.**, v. 5, p. 13–18, 1992.

OLYMPPIO, K. P. K.; BARDAL, P. A. P.; DE M. BASTOS, J. R.; BUZALAF, M. A. R. Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. **J. Clin. Periodontol.**, v.33, p. 421–426, 2006.

OLYMPPIO, K. P. K.; DE M. BASTOS, J. R.; HENRIQUES, J. F. C.; CARDOSO, V. E. S.; SILVA, P. A.; BARDAL, P. A. P.; RAMIRES, I. Caries y enfermedad periodontal causadas por tratamiento ortodontico em ausencia de un programa educativo-preventivo. **Rev. Odontol. Dominic.**, v. 9, p. 31–38, 2003.

PERSSON, R. E.; TRUELOVE, E. L.; LERESCHE, L.; ROBINOVITCH, M. R. Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 72, p. 184–91, 1991.

PESONEN, T.; HOLMALAHTI, J.; POHJOLA, J. Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 665, p. 222-225, 1995.

PORTMANN, M. O.; McCONVILLE, P.; ALEXANDER, S.; BRESLIN, P.; BEAUCHAMP, G. Amelioration of chlorhexidine digluconate bitterness and oral sensation of sodium gluconate and sodium propionate salts. **Chem. Senses**, v. 26, p. 1036-1037, 2001.

QUIRYNEN, M.; AVONTROODT, P.; PEETERS, W.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; VAN STEENBERGHE, D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 1127-1136, 2001.

REVELLE, L. K.; DOUB, W. H.; WILSON, R. T.; HARRIS, M. H.; HUTTER, A. M. Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. **Pharm. Res.**, v. 10, p. 1777-1784, 1993.

RIBEIRO, L. G. M.; HASHIZUME, L. N.; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **J. Dent.**, v. 35, p. 359-370, 2007.

RIBEIRO, H. M.; MORAIS, J. A.; ECCLESTON, G. M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 26, n.2, p. 47-52, 2004.

RIJKOM, H. M.; TRUIN, G. J.; VAN'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. **J. Dental Res.**, v. 75, p. 790–795, 1996.

ROBINSON, B. V. **PVP: A critical review of the kinetics and toxicology of polyninylpyrrolidone (povidone)**. Chelsea:Lewis Publishers, 1990. 232 p.

ROMANOV, R. A.; ROGACHEVSKAJA, O. A.; BYSTROVA, M. F.; JIANG, P.; MARGOLSKEE, R. F.; KOLESNIKOV, S. S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. **EMBO J.**, v. 26, p. 657–667, 2007.

ROSE, F. L.; SWAIN, G. Bisdiguanydes having antibacterial activity. **J. Chem. Soc. Part IV**, p. 4422–4425, 1956.

RYE, R. M.; WISEMAN, D. Release of P32-containing compounds from *Micrococcus lysodeikticus* treated with chlorhexidine. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 20, p. 14s–17s, 1968.

SABZEVAR, M. M. **Quantitation of supragingival plaque, extrinsic tooth staining and gingival recession by Automatic Image Analysis. III. Quantitation of extrinsic tooth staining by Automatic Image Analysis.** Bruxelas, 1996. Apresentada como tese de doutorado, Free University of Brussels (VUB), Brussels, Belgium. 1996.

SALT, W. D.; WISEMAN, D. Relationship between uptake of cetyltrimethylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 22, p. 261–264, 1970.

SALTON, M. R. J. Lytic agents, cell permeability and monolayer permeability. **J. Gen. Physiol.**, v. 52, p. 227–252, 1968.

SANZ, M.; VALLCORBA, N.; FABREGUES, S.; MULLER, I.; HERKSTROTTER, F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. **J. Clin. Periodontol.**, v. 21, p. 431–437, 1994.

SCHEIE, A. A.; ARNEBERG, P.; KROGSTAD, O. Effects of orthodontic treatment on prevalence of *Streptococcus mutans* in plaque and saliva. **Scand. J. Dental Res.**, v. 92, p. 211–217, 1984.

SCHIFMANN, S. S.; LOCKHEAD, E.; MAES, F. W. Amiloride reduces the taste intensity of Na⁺ and Li⁺ salts and sweetness. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 6136-6140. 1983.

SCHILD, L.; SCHNEEBERGER, E.; GAUTSCHI, I.; FIRSOV, D. identification of amino acid residues in the alfa, beta and gama subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and permeation. **J. Gen. Physiol.**, v. 109, p. 15-26, 1997.

SHAKER, L. A.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Mechanism of resistance of *Bacillus subtilis* spores to clorexidine. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 64, p. 531-539, 1988.

SHEEN, S.; OWENS, J.; ADDY, M. The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride to produce staining in vitro: a possible predictor of inactivation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 46-51, 2001.

SHEPPARD, F. C.; MASON, D. J.; BLOOMFIELD, S. F.; GANT, V. A.; Flow cytometric analysis o chlorhexidine action. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 154, p. 283-288, 1997.

SIMONS, D.; BRAILSFORD, S.; KIDD, E. A. M.; BEIGHTON, D. The effect of chlorhexidine acetate/xylitol chewing gum on the plaque and gingival indices of elderly occupants in residential homes. A 1-year clinical trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 1010–1015, 2001.

SIMONSON, L. G.; ROBINSON, P. J.; PRANGER, R. J.; COHEN, M. E.; MORTON, H. E. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 270-273, 1992.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720–731, 1972.

SKJORLAND, K. K.; RYKKE, M.; SONJU, T. Rate of pellicle formation in vivo. **Acta Odontol. Scand.** v. 53, p. 358 –362, 1995.

SLOTS, J.; LISTGARTEN, M. *Bacterioides gingivalis*, *Bacterioides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, p. 85-93, 1988.

SMIGEL, K. High-alcohol mouthwashes are under scrutiny. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 751, 1991.

SMITH, A.; MORAN, J.; DANGLER, L. V.; LEIGHT, R. S.; ADDY, M. The efficacy of an antigingivitis chewing gum. **J. Clin. Periodontol.**, v. 23, p. 19–23, 1996.

SMITHKLINE BEECHAM P.L.C. McConville, P. S.; ALEXANDER, S. E.; PORTMANN, M. **Oral composition comprising chlorhexidine and maltitol ou erythritol or a mixture thereof.** GB 0007760.2, mar. 30th, 2000, mar. 23th, 2001.

SPECTOR, A. C.; GUAGLIARDO, N. A.; St. JOHN, S. J. Amiloride disrupts NaCl versus KCl discrimination performance: implication for salt taste codes in rats. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 8115-8122, 1996.

STEINBERG, D.; HELING, I.; DANIEL, I.; GINSBURG, I. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. **J. Oral. Rehabil.**, v. 26, p. 151-156, 1999.

STONE, L. M.; TAN, S-S.; TAM, P. P. L.; FINGER, T. E. Analysis of the cell lineage relationships in taste buds. **J. Neurosc.**, v. 22, p. 4522-4529, 2000.

TABAK, L. A.; LEVINE, M. J.; MANDEL, I. D.; ELLISON, S. A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. **J. Oral. Pathol.**, v. 11, p. 1–17, 1982.

TALAVERA, K.; YASUMATSU, K.; VOETS, T.; DROOGMANS, G.; SHIGEMURA, N.; NINOMIYA, Y.; MARGOLSKEE, R. F.; NILIUS, B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. **Nature**, v. 438, p. 1022–1025, 2005.

TALAVERA, K.; YASUMATSU, K.; YOSHIDA, R.; MARGOLSKEE, R. F.; VOETS, T.; NINOMIYA, Y.; NILIUS, B. The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interactions **FASEB J.**, v. 22, p. 1343-1355, 2008.

TANNER, A.; BOUDIN, H. The microbiota of early periodontitis lesions in adults. **J. Clin. Periodontol.**, v. 16, p. 461-471, 1989.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2001. 421 p.

TILLIS, T. S. I. Use of whitening dentifrice for control of chlorhexidine stain. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 1, n. 1, 1999.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; ŠTEPÁNKOVÁ, R.; HUDCOVIC, T.; TUCKOVÁ, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVÁ-ŽÁDNIKOVÁ, R.; KOZÁKOVÁ, H.; ROSSMANN, P.; BÁRTOVÁ, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D. P.; BOROVSÁ, D.; REHÁKOVÁ, Z.; ŠINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P, E.; KOKEŠOVÁ, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunol. Lett.**, v. 93, p. 97-108, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.

TSUCHIYA, H. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. **Pharmacol.**, v. 59, p. 34-44, 1999.

ULLRICH, N. D.; VOETS, T.; PRENEN, J.; VENNEKENS, R.; TALAVERA, K.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Comparison of functional properties of the Ca²⁺-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. **Cell Calcium**, v. 37, p. 267–278, 2005.

- VANDENBEUCH, A.; PILLIAS, A. M.; FAURION, A. Modulation of taste peripheral signal through interpapillar inhibition in hamsters. **Neurosci. Lett.**, v. 358, p. 137–141, 2004.
- VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. Dental Res.**, v. 73, p. 672–81, 1994.
- VAN WINKELHOFF, A. J. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 406-410, 1991.
- VON SKRAMLIK, E. The fundamental substrates of taste. In: ZOTTERMAN, Y (ed.). **Olfaction and taste**. New York: MacMillan. 1963. p. 125-132.
- WAN, A. K.; SEOW, W. K.; PURDIE, D. M.; BIRD, P. S.; WALSH, L. J.; TUDEHOPE, D. I.; The effects of chlorhexidine gel on Streptococcus mutans infection in 10-month-old infants: a longitudinal, placebo-controlled, double-blind trial. **Pediatr. Denti.**, v. 25, p. 215–22, 2003.
- WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. **Brit. Dent. J.**, v. 190, p. 309–316, 2001.
- WELTMANN, R. N. Breakdown of thixotropic structure as function of time. **J. Appl. Phys.**, v. 14, p.343-350, 1943.
- WERMUTH, C.C. **The practice of medicinal chemistry**. San Diego: Academic Press, 1996.
- WHO (World Health Organization). **Oral Health**. Disponível em: <www.who.int/oral_health/en/>. Acesso em: dez. 2008.
- WILSON, C. O.; GISVOLD, O.; DELGADO, J. N.; REMERS, W. A. **Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. Philadelphia:Lippincott-Raven, 1998. 974 pp.
- WILSON, M.; McNAB, R.; HENDERSON, B. (ed.). **Bacterial disease mechanisms**, Cambridge:Cambridge University Press, 2002.
- YATES, R.; JENKINS, S.; NEWCOMBE, R. G.; WADE, W. G.; MORAN, J.; ADDY, M. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. 1. Effects on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, p.130–138, 1993.