

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
FORMULAÇÃO COSMÉTICA CONTENDO DIGLUCONATO
DE CLOREXIDINA**

Mestranda: Flávia Angélica Másquio Fiorentino

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara, SP 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
FORMULAÇÃO COSMÉTICA CONTENDO DIGLUCONATO DE
CLOREXIDINA**

Flávia Angélica Másquio Fiorentino

Dissertação 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 Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orietador: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara, SP, 2009

Ficha Catalográfica

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

Fiorentino, Flávia Angélica Másquio

F518d Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética
contendo digluconato de clorexidina / Flávia Angélica Másquio Fiorentino. –
Araraquara, 2009.
194 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado
Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

. 1.Controle de qualidade – Clorexidina. 2. Sabonete líquido.
3.Clorexidina. 4.Cosmetologia. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II.
Corrêa, Marcos Antonio, co-orient.. III.Título.

CAPES: 403000005

*“Toda sabedoria vem do Senhor e está com ele para sempre
Quem poderá contar a areia das praias, as gotas da chuva e
os dias do mundo?*

*Quem poderá explorar a altura do céu, a extensão da terra e
a profundidade do abismo?*

*A sabedoria foi criada antes de todas as coisas, e a
inteligência prudente foi criada antes dos séculos*

A quem foi revelada a raiz da sabedoria?

Quem conhece os seus projetos?

*Somente um é sábio, e é por demais terrível quando se
assenta em seu trono: é o Senhor, ele que criou a sabedoria, a
conheceu, a enumerou e a derramou sobre todas as suas
obras*

*Ele a repartir entre os seres vivos, conforme sua
generosidade, e a concedeu a todos aqueles que o amam”*

Aos meus queridos e amados pais Celso e Célia...

Pelo amor em todos os dias de minha vida, pelo apoio em todos os momentos em que foi preciso, pelos incentivos, pelo carinho, pela preocupação, pelas orações, pela ajuda financeira, pela confiança de que eu seria capaz desta conquista, por sempre cuidarem do meu grande amor para que eu ficasse tranquila e realizasse minha dissertação da melhor maneira possível.

Desculpem-me pelos momentos em que ausência e a falta de atenção estiveram presentes.

Obrigada por serem meus pais. Amo vocês!!!

“... Por toda a minha vida eu vou amar vocês ...”

Ao meu grande amor, meu filho Gabriel...

*Sua existência e seu amor são os motivos para
persistir e nunca desistir dos sonhos...*

*A distância física nunca me fez deixar de pensar
em você um dia que fosse. A saudade me colocou em dúvida
muitas vezes, mas lembrar do seu rostinho lindo é a força e a
coragem para continuar a caminhar...*

*Perdoo-me pela falta de paciência e pelos momentos
ausentes, e olha que não foram poucos...*

Amo você mais do que tudo!!!

“... Eu tenho tanto pra te falar

Mas com palavras não sei dizer

Como é grande o meu amor por você ...”

À minha querida irmã, Camila...

Por sempre me incentivar na realização deste trabalho, por sempre dizer palavras de coragem quando foram necessárias, pelas orações, por sempre estar presente e ter me ajudado e apoiado.

Obrigada!!!

“... Há certas horas que só queremos a mão no ombro, o abraço apertado ou mesmo o estar ali, quietinho, ao lado...

Sem nada dizer...

Alguém que ria de nossas piadas sem graça...

Que ache nossas tristezas as maiores do mundo...

E que apesar de todas essas mentiras úteis, nos seja de uma sinceridade inquestionável...”

William Shakespeare

À Prof^a. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado...

Por ter sido minha orientadora!

Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, incentivos e por ter-me dado a chance da realização deste trabalho.

Obrigada por ser exemplo de uma profissional extremamente competente e determinada.

“... Depois de algum tempo você aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais ... Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa... por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto

Aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão... Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências

Aprende que paciência requer muita prática Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha e que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens...

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém... Algumas vezes você tem de aprender a perdoar a si mesmo E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar”.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo todos os dias me protegendo e fortalecendo, mas especialmente naqueles em que os momentos mais difíceis e complicados somados à saudade dos meus queridos me davam vontade de jogar tudo para o alto e desistir. Mas a fé, a esperança, o otimismo, a luz do Espírito Santo me iluminaram para que conseguisse dar mais este passo. “Guarda-me Deus, pois eu me abrijo em ti” (Salmo 16)

Ao meu querido filho Gabriel, por compreender e perdoar os momentos de ausência, pelo seu carinho, amor e torcida para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus queridos pais, por serem exemplos de pessoas batalhadoras e principalmente pelo amor.

À Camila, pelos incentivos para que eu tivesse coragem de começar este trabalho.

À Prof^a. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela orientação, compreensão, confiança e acima de tudo, pela amizade.

Ao Prof^o. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pela co-orientação, colaboração e sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelos ensinamentos compartilhados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCF (UNESP).

À Prof^a. Dra. Taís Maria Bauab, pela colaboração nos ensaios de atividade antimicrobiana realizados neste trabalho.

À Prof^a. Dra. Vera Lúcia Isaac Borges e à Prof^a. Dra. Maria José Vieira Fonseca por participarem da banca de qualificação e pelas observações pertinentes.

À Prof^a Dra. Maria José Vieira Fonseca e à Prof^a Dra Maria Stella Gonçalves Raddi por participarem da banca de defesa desta dissertação e pelas sugestões e críticas para melhoria deste trabalho.

Ao Renato e Francisco, da SAEPE, pelo apoio técnico com as fotografias utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, Max, Ana Cristina, Rita, Moacir, Natalina, Iraní e também aos demais, por sempre terem me ajudado prontamente nos momentos de dúvida.

Às funcionárias da Pós-graduação, Cláudia, Laura e Sônia, pelos esclarecimentos necessários.

Aos amigos e colegas deste Curso de Pós-Graduação.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, Andréia Moreno, Cristina Laignier, Débora Perez, Sandra Monteiro, Patrícia Ricarte, Daniela Vieira, Cristiani Lopes, Jaqueline Perez, Marcelo Hiene, Mariana Passoni, Adam de Oliveira, pelas conversas, dicas, críticas, auxílios e momentos de descontração para que esta caminhada fosse menos difícil.

À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e acima disso pela amizade, companheirismo, conselhos e momentos de diversão. Você é muito especial!

À minha querida estagiária Jaqueline, que muito me auxiliou na realização do teste desafio e nos ensaios de atividade antimicrobiana, e

além disso sempre foi muito companheira, dedicada e querida. Muito obrigada, Jaque!

À minha querida amiga Cristina Laignier pela amizade conquistada em um dos momentos mais difíceis deste Curso de Pós-Graduação, por muitas vezes reservar um pouquinho do seu tempo para me auxiliar contribuindo com idéias e sugestões e principalmente ter ajudado os dias serem menos cansativos com suas brincadeiras. Cris, obrigada por sua amizade, você é muito querida!

Aos meus tios Zilda e Gilberto, pelas orações, apoio e por sempre terem estado junto de mim.

A todos os outros tios, tias e primos que me fortaleceram com suas orações e apoio.

Ao meu querido amigo Wendel Cleber Soares, que, mesmo sem saber, sempre foi exemplo de dedicação, determinação, organização, competência e acima de tudo, humildade.

À querida "tia" Clarice, pelas orações e amizade desde os meus primeiros anos.

Ao meu querido amigo Marcelo Tozette, pelas descontrações para me encorajar, apoio e torcida para que tudo desse certo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

"Palavras afáveis aumentam os amigos, e fala amável encontra acolhida. Tenha muitos conhecidos, mas um só confidente entre mil ...

... Amigo fiel não tem preço e o seu valor é incalculável. Amigo fiel é remédio que cura, e os que temem ao Senhor o encontrarão. Quem teme ao Senhor tem amigos verdadeiros, pois tal e qual ele é, assim será o seu amigo"

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ix
SUMÁRIO.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xx
LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxvii
RESUMO.....	xxix
ABSTRACT.....	xxxix
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivos gerais.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Microbiota ou flora normal da pele.....	8
3.2. Lavagem e desinfecção das mãos.....	9
3.3. Sabonetes.....	10
3.4. Anti-sépticos.....	13
3.5. Clorexidina.....	14
4. CONTROLE DE QUALIDADE DA SOLUÇÃO DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	34
4.1. Descrição	35
4.1.2. Substância química de referência.....	35
4.1.3. Forma farmacêutica.....	35
4.2. Análise qualitativa da solução de digluconato de clorexidina.....	36
4.2.1. Caracteres físicos.....	36
4.2.2. Cromatografia em camada delgada.....	36
4.2.2.1. Material	36
4.2.2.2. Método.....	36
4.2.2.3. Resultados.....	37
4.2.3. Determinação de pH.....	38
4.2.3.1. Material	38
4.2.3.2. Resultados.....	38
4.2.4. Determinação da faixa de fusão.....	38

4.2.4.1. Material.....	38
4.2.4.2. Método.....	38
4.2.4.3. Resultados.....	39
4.2.5. Densidade relativa.....	39
4.2.5.1. Material.....	39
4.2.5.2. Método.....	39
4.2.5.3. Resultados.....	39
4.2.6. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho.....	40
4.2.6.1. Material.....	40
4.2.6.2. Método.....	40
4.2.6.3. Resultados.....	40
4.2.7. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	42
4.2.7.1. Material.....	42
4.2.7.2. Método.....	43
4.2.7.2.1. Preparo do padrão.....	43
4.2.7.3. Resultados.....	43
4.2.7.4. Discussão.....	45
4.3. Análise quantitativa da solução de digluconato de clorexidina	46
4.3.1. Ensaio microbiológico.....	46
4.3.1.1. Material e método.....	46
4.3.1.2. Execução do ensaio.....	47
4.3.1.3. Preparo das soluções-padrão de digluconato de clorexidina.....	48
4.3.1.4. Preparo das soluções de digluconato de clorexidina substância-amostra.....	48
4.3.1.5. Material.....	48
4.3.1.6. Preparo do inóculo.....	48
4.3.1.7. Ensaio	48
4.3.1.8. Resultados.....	49
4.3.1.9. Cálculos.....	50
4.3.1.9.1. Curva analítica.....	50
4.3.1.9.2. Cálculo da potência do anti-séptico.....	51
4.3.1.10. Análise estatística.....	52
4.3.1.11. Teste de recuperação.....	53
4.3.1.11.1. Preparo das soluções.....	53
4.3.1.11.2. Cálculo do teste de recuperação.....	55
4.3.1.12. Discussão.....	55

5. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DOS SABONETES LÍQUIDOS CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E SEU CONTROLE DE

QUALIDADE.....	58
5.1. Desenvolvimento das formulações de sabonete líquido com diferentes concentrações de digluconato de clorexidina.....	59
5.1.2. Material.....	59
5.1.3. Método.....	60
5.2. Análise qualitativa das formulações desenvolvidas.....	61
5.2.1. Aspectos físicos.....	61
5.2.1.1. Discussão.....	62
5.2.1.1.1. Formulações.....	62
5.2.1.1.2. Formulação 1.....	62
5.2.1.1.3. Formulação 2.....	63
5.2.1.1.4. Formulação 3.....	63
5.2.1.1.5. Formulação 4.....	63
5.2.2. Determinação de pH.....	64
5.2.2.1. Material e método.....	64
5.2.2.2. Resultados.....	64
5.2.3. Determinação da viscosidade.....	64
5.2.3.1. Resultados.....	64
5.2.3.2. Discussão.....	65
5.3. Controle microbiológico das formulações desenvolvidas.....	66
5.3.1. Material e método.....	66
5.3.1.1. Contagem total de microrganismos viáveis.....	66
5.3.1.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp e <i>Escherichia coli</i>	66
5.3.1.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
5.3.2. Resultados.....	67
5.3.3. Discussão.....	68
6. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS SABONETES LÍQUIDOS DESENVOLVIDOS CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	69
6.1. Métodos.....	70
6.1.1. Técnica de difusão em ágar.....	70
6.1.2. Técnica de microdiluição.....	70
6.1.3. Microrganismos utilizados.....	71
6.2. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar.....	71
6.2.1. Material e método.....	71
6.2.1.1. Preparo do inóculo.....	71
6.2.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	71
6.2.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	71

6.2.1.1.3. Padronização e adaptação dos ensaios de atividade antimicrobiana dos diferentes sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina a 1, 2, 3, e 4% pelo método de difusão em ágar.....	72
6.2.2. Resultados.....	73
6.2.3. Discussão.....	77
6.2.4. Conclusão.....	79
6.3. Determinação da atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes líquidos desenvolvidos contendo digluconato de clorexidina, através do método da microdiluição.....	80
6.3.1. Preparo do inóculo.....	80
6.3.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	80
6.3.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	80
6.3.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antimicrobiana dos sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina, pelo método da microdiluição.....	80
6.3.1.4. Leituras.....	83
6.3.2. Resultados.....	84
6.3.3. Discussão.....	99
6.3.4. Conclusão.....	104
7. TESTE DE EFICÁCIA DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	107
7.1. Microrganismos utilizados.....	108
7.2. Conservação dos microrganismos-teste.....	108
7.3. Reativação dos microrganismos.....	108
7.4. Repiques dos microrganismos para utilização nos testes.....	108
7.5. Obtenção de suspensões-mãe de microrganismos-teste e contagem do número de microrganismos viáveis.....	109
7.6. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana.....	110
7.7. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito.....	111
7.8. Resultados.....	113
7.8.1. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana.....	113
7.8.2. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito.....	115
7.9. Discussão.....	122
7.10. Conclusão.....	126
8. ANÁLISE QUANTITATIVA DE SABONETE LÍQUIDO DESENVOLVIDO CONTENDO 3% DE DIGLUCONATO DE CLOREXINA.....	127
8.1. Material.....	128

8.1.1. Preparo da substância química padrão secundário.....	128
8.1. 2. Método.....	128
8.1.2.1. Obtenção da curva de Ringbom.....	129
8.1.2.1. Obtenção da curva analítica.....	131
8.2. Análise estatística.....	133
8.3. Determinação de digluconato de clorexidina no sabonete líquido.....	134
8.3.1. Preparo do padrão.....	134
8.3.2. Preparo da amostra.....	134
8.3.3. Resultados.....	135
8.4. Teste de recuperação.....	136
8.4.1. Preparo das soluções.....	136
8.4.2. Cálculo do teste de recuperação.....	137
8.4.3. Resultados.....	137
8.5. Validação.....	138
8.5.1. Linearidade.....	138
8.5.2. Precisão.....	138
8.5.3. Exatidão.....	139
8.5.4. Especificidade e seletividade.....	139
8.5.5. Robustez.....	140
8.6. Discussão.....	140
8.7. Conclusão.....	142
9. DISCUSSÃO GERAL.....	143
10. CONCLUSÕES.....	149
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do digluconato de clorexidina.....	16
Figura 2. Cromatograma em camada delgada de solução de digluconato de clorexidina.....	37
Figura 3. Espectro na região de infravermelho obtido com cristais da solução-amostra de digluconato de clorexidina.....	40
Figura 4. Espectro na região de infravermelho obtido com cristais da solução-padrão secundário de digluconato de clorexidina.....	41
Figura 5. Sobreposição dos espectros obtidos com cristais da solução-amostra e solução-padrão secundário de digluconato de clorexidina.....	41
Figura 6. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina a 0,002% em água deionizada de 200 a 400 nm.....	44
Figura 7. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina a 0,002% em etanol de 200 a 400 nm.....	44
Figura 8. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina a 0,002% em ácido clorídrico 0,1 M de 200 a 400 nm.....	44
Figura 9. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina a 0,002% em hidróxido de sódio 0,1 M de 200 a 400 nm.....	45
Figura 10. Espectro de absorção na região de ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina, solução amostra a 0,002% em etanol, de 200 a 400 nm.....	45
Figura 11. Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3.....	49
Figura 12. Representação gráfica da curva analítica de solução de digluconato de clorexidina no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	51
Figura 13. Resultado do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, da solução de digluconato de clorexidina.....	51
Figura 14. Esquema da disposição dos sabonetes líquidos na placa de Petri para o ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.....	73
Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a <i>S. aureus</i> (a) e <i>E. faecalis</i> (b).....	75
Figura 16. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a <i>E. coli</i> (c) e <i>C. albicans</i> (d).....	75
Figura 17. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a <i>Salmonella</i> spp (e) e <i>P. aeruginosa</i> (f).....	76
Figura 18. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a <i>S. epidermidis</i> (g).....	76

Figura 19. Esquema da realização do ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.....	82
Figura 20. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>P. aeruginosa</i>	93
Figura 21. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>P. aeruginosa</i>	93
Figura 22. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>S. aureus</i>	94
Figura 23. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>S. aureus</i>	94
Figura 24. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>Salmonella</i> spp.....	95
Figura 25. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>Salmonella</i> spp.....	95
Figura 26. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>S. epidermidis</i>	96
Figura 27. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>S. epidermidis</i>	96
Figura 28. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>E. faecalis</i>	97
Figura 29. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>E. faecalis</i>	97
Figura 30. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>E. coli</i>	98
Figura 31. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>E. coli</i>	98
Figura 32. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando <i>C. albicans</i>	99
Figura 33. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando <i>C. albicans</i>	99
Figura 34. Esquema da realização do teste de neutralizante	111
Figura 35. Esquema da execução das análises microbiológicas do sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina durante o teste desafio.....	113
Figura 36. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>P. aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento e com digluconato de clorexidina.....	116
Figura 37. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>E.</i>	

<i>coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento e com digluconato de clorexidina.....	117
Figura 38. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>S. aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento e com digluconato de clorexidina.....	119
Figura 39. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>C. albicans</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento e com digluconato de clorexidina.....	120
Figura 40. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>A. niger</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento e com digluconato de clorexidina.....	121
Figura 41. Espectro de absorção na região de ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário em etanol, a 0,002%, de 200 a 400 nm.....	129
Figura 42. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de digluconato de clorexidina, utilizando etanol como solvente, no comprimento de onda de 260 nm.....	131
Figura 43. Representação da curva analítica da solução de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	133
Figura 44. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário, solução de sabonete com clorexidina e solução de sabonete sem clorexidina, utilizando etanol como solvente.....	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina e seus sais.....	2
Tabela 2. Métodos descritos na literatura para análise de impurezas e produtos de degradação da clorexidina.....	24
Tabela 3. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em fluidos biológicos.....	26
Tabela 4. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em preparações farmacêuticas.....	29
Tabela 5. Absorção de digluconato de clorexidina substância-teste e substância padrão secundário em espectro de infravermelho em pastilhas de KBr.....	42
Tabela 6. Parâmetros testados para avaliação de solução de digluconato de clorexidina no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar	47
Tabela 7. Parâmetros definidos para o ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, a serem utilizados para análise quantitativa de solução de digluconato de clorexidina.....	47
Tabela 8. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de digluconato de clorexidina, no ensaio microbiológico pelo método difusão em ágar.....	50
Tabela 9. Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução de digluconato de clorexidina no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	52
Tabela 10. Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, da solução de digluconato de clorexidina.....	53
Tabela 11. Preparação das amostras de solução de digluconato de clorexidina no teste de recuperação no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	54
Tabela 12. Teste de recuperação de amostras de digluconato de clorexidina, no ensaio microbiológico pelo método difusão em ágar.....	55
Tabela 13. Materiais utilizados para as diferentes formulações de sabonete líquido e seus nomes na INCI.....	59
Tabela 14. Preparo da formulação codificada como Formulação 1.....	59
Tabela 15. Preparo da formulação codificada como Formulação 2.....	60
Tabela 16. Preparo da formulação codificada como Formulação 3.....	60
Tabela 17. Preparo da formulação codificada como Formulação 4.....	60
Tabela 18. Valores de viscosidade obtidos com os sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina em viscosímetro de Brookfield.....	65

Tabela 19. Valores em milímetros dos halos de inibição, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.....	74
Tabela 20. Diluições utilizadas para os sabonetes líquidos no ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido pelo método da microdiluição.....	83
Tabela 21. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 1% de digluconato de clorexidina.....	84
Tabela 22. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 1% de digluconato de clorexidina.....	85
Tabela 23. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 1% de digluconato de clorexidina.....	85
Tabela 24. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 1% de digluconato de clorexidina.....	86
Tabela 25. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 2% de digluconato de clorexidina.....	86
Tabela 26. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 2% de digluconato de clorexidina.....	87
Tabela 27. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 2% de digluconato de clorexidina.....	87
Tabela 28. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 2% de digluconato de clorexidina.....	88
Tabela 29. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 3% de digluconato de clorexidina.....	88
Tabela 30. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 3% de digluconato de clorexidina.....	89
Tabela 31. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 3% de digluconato de clorexidina.....	89
Tabela 32. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 3% de digluconato de clorexidina.....	90
Tabela 33. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 4 % de digluconato de clorexidina.....	90
Tabela 34. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 4 % de digluconato de clorexidina.....	91
Tabela 35. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 4 % de digluconato de clorexidina.....	91
Tabela 36. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 4 % de digluconato de clorexidina.....	92
Tabela 37. Valores de CIM encontrados para os sabonetes líquidos desenvolvidos	

com as diferentes concentrações de digluconato de clorexidina.....	100
Tabela 38. Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>P. aeruginosa</i> após neutralização do sistema conservante.....	114
Tabela 39. Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>E. coli</i> após neutralização do sistema conservante.....	114
Tabela 40. Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>S. aureus</i> após neutralização do sistema conservante.....	114
Tabela 41. Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>C. albicans</i> após neutralização do sistema conservante.....	115
Tabela 42. Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>A. niger</i> após neutralização do sistema conservante.....	115
Tabela 43. Log de UFC/g de <i>P. aeruginosa</i> , nas formulações com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo.....	115
Tabela 44. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações com e sem a presença de digluconato de clorexidina, utilizando <i>P. aeruginosa</i>	116
Tabela 45. Log de UFC/g de <i>E. coli</i> , nas formulações com e sem clorexidina, em função do tempo.....	117
Tabela 46. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações com e sem a presença de digluconato de clorexidina, utilizando <i>E. coli</i>	118
Tabela 47. Log de UFC/g de <i>S. aureus</i> , nas formulações com e sem clorexidina, em função do tempo.....	118
Tabela 48. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações com e sem a presença de digluconato de clorexidina, utilizando <i>S. aureus</i>	119
Tabela 49. Log de UFC/g de <i>C. albicans</i> , nas formulações com e sem clorexidina, em função do tempo.....	1179
Tabela 50. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações com e sem a presença de digluconato de clorexidina, utilizando <i>C. albicans</i>	120
Tabela 51. Log de UFC/g de <i>A. niger</i> , nas formulações com e sem clorexidina, em função do tempo.....	120
Tabela 52. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações com e sem a presença de digluconato de clorexidina, utilizando <i>A. niger</i>	121
Tabela 53. Preparo da curva de Ringbom de digluconato de clorexidina por	

espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm.....	130
Tabela 54. Preparo da curva analítica de digluconato de clorexidina por espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm.....	131
Tabela 55. Valores de absorvâncias determinados para a curva analítica de digluconato de clorexidina padrão secundário por espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	132
Tabela 56. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	133
Tabela 57. Parâmetros analíticos utilizados na determinação de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	134
Tabela 58. Valores determinados para o doseamento de sabonete líquido com digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	136
Tabela 59. Preparo das soluções para o teste de recuperação do sabonete líquido com digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.....	137
Tabela 60. Valores obtidos no teste de recuperação do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente para sabonete líquido com digluconato de clorexidina.....	138
Tabela 61. Valores obtidos para a reprodutibilidade do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente para sabonete líquido com digluconato de clorexidina.....	139
Tabela 62. Valores obtidos para a robustez do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente para sabonete líquido com digluconato de clorexidina.....	140

LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

1. Cromatografia em camada delgada da solução de digluconato de clorexidina

- Placa cromatográfica Merck (Darmstadt), TLC com sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), com espessura de 0,25 mm.
- Estufa Fanem 315 SE.
- Cuba de vidro.
- Fase móvel: acetato de etila: amônia concentrada: água destilada: etanol (1:1:3:5 v/v/v/v). Os reagentes utilizados foram: acetato de etila, Synth (Diadema), amônia Synth (Diadema), etanol, Synth (Diadema).
- Fase estacionária: gel de sílica F₂₅₄ (Merck, Darmstadt).
- Agente revelador: solução de dicromato de potássio 50 g/L em solução de ácido sulfúrico 40%. Os reagentes utilizados foram: dicromato de potássio (Comercial), ácido sulfúrico (Chemis).

2. Determinação de pH da solução de digluconato de clorexidina

- Peagômetro Micronal, B 474.

3. Determinação do ponto de fusão dos cristais obtidos com da solução de digluconato de clorexidina

- Papel de filtro, tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento.
- Estufa Fanem 315 SE.
- Hidróxido de sódio (Synth, Diadema), amarelo titânio (Merck, Darmstadt).
- Equipamento: LS Logen Scientific, LS III Basic.

4. Determinação da densidade relativa da solução de digluconato de clorexidina

- Picnômetro (Hexis).
- Estufa Fabbe, 116.

5. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho dos cristais obtidos com da solução de digluconato de clorexidina

- Equipamento: espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR-8300.
- Brometo de potássio (KBr) (Reagen, Rio de Janeiro).

6. Espectrofotometria na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina

- Equipamento: espectrofotômetro de ultravioleta KAYAK XA modelo HP 8453.

- Cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.
- Solventes: etanol (Synth, Diadema), ácido clorídrico 0,1 M (Synth, Diadema), hidróxido de sódio 0,1 M (Synth, Diadema).

➤

7. Doseamento microbiológico da solução de digluconato de clorexidina

- Meio de cultura: ágar Casoy (Acumedia, Lansing); ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia, Lansing), caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD, Le Pont de Claix).
- Equipamentos: espectrofotômetro Quimis Q798 DRM, estufa de esterilização Nova Ética 400/5ND, paquímetro digital Mitutoyo IP 65, estufa bacteriológica Odonto Bras ECB 1.2 digital, autoclave vertical Phoenix AV 60.

8. Determinação de pH dos sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina

- Peagômetro Micronal, B 474.

9. Determinação da viscosidade dos sabonetes líquidos

- Equipamento: viscosímetro de Brookfield, P selecta modelo visco star-L.

10. Análise microbiológica das formulações desenvolvidas

- Equipamentos: estufa de esterilização a 180 °C Nova Ética 400/5ND, autoclave vertical Phoenix AV 60, estufa bacteriológica Odonto Brás ECB 1.2 digital, estufa Fanem 315 SE.

- Meios de cultura: ágar tioglicolato (Himedia), ágar Sabouraud (Acumedia, Lansing), caldo lactosado (Acumedia, Lansing), caldo tetrationato (Acumedia, Lansing), caldo selenito cistina (Merck, Darmstadt), ágar verde brilhante (Difco, Le Pont de Claix), ágar xilose-lisina-desoxicolato (Merck, Darmstadt), ágar bismuto sulfito (Acumedia, Lansing), ágar Mac Conkey (Merck, Darmstadt), ágar eosina-azul de metileno (Difco, Le Pont de Claix), caldo soja-caseína (Acumedia, Lansing), ágar Vogel Johnson (Acumedia, Lansing), ágar cetrímida (Acumedia, Lansing), ágar tríplice açúcar e ferro (Acumedia, Lansing).

11. Ensaios de atividade antimicrobiana

- Equipamentos: estufa bacteriológica Odonto Bras ECB 1.2 digital, espectrofotômetro Beckman DU 530, autoclave vertical Phoenix AV 75, paquímetro digital Mitutoyo IP 65, estufa de esterilização Nova Ética 400/5ND, estufa Fanem 315 SE.

- Meios de cultura: ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia, Lansing), caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD, Le Pont de Claix), ágar Sabouraud (Acumedia, Lansing), caldo Sabouraud (Merck, Darmstadt).

12. Teste de eficácia de atividade antimicrobiana

- Equipamentos: estufa bacteriológica Odonto Bras ECB 1.2 digital, autoclave vertical Phoenix AV 75, estufa Fanem 315 SE, estufa de esterilização Nova Ética 400/5ND.
- Meios de cultura: ágar Sabouraud (Acumedia, Lansing), ágar Casoy (Acumedia, Lansing).

13. Espectrofotometria na região de ultravioleta para o sabonete líquido com 3% de digluconato de clorexidina

- Solvente: etanol (Synth, Diadema).
- Equipamentos: espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu, UV mini-1240 (para realização do teste) e espectrofotômetro de ultravioleta Hitachi U2001 (para parâmetro de reprodutibilidade).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ABS	absorvância
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APIC	Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	ágar brain infusion
BP	British Pharmacopoeia
BS	ágar bismuto sulfito
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAS	Chemical Abstracts Service
CBM	concentração bactericida mínima
CCD	cromatografia em camada delgada
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CFM	concentração fungicida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
cP	Centi Poise
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DMSO	dimetilsulfóxido
DPR	desvio padrão relativo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
e.p.m	erro padrão da média
EP	European Pharmacopoeia
F. Bras	Farmacopéia Brasileira
HIPAC	Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee
IAL	Instituto Adolfo Lutz
KBr	brometo de potássio
L.E.S.S	lauriléter sulfato de sódio
L.M.S.S	lauroilmiristilsarcosinato de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PF	ponto de fusão
p/v	peso/volume
Rf	fator de refração
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T%	transmitância
TSI	ágar tríplice açúcar-ferro
UFC	unidade formadora de colônia
UI	Unidades Internacionais
USP	United States Pharmacopoeia
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume
VB	ágar verde brilhante
VJ	ágar Vogel Johnson
XLD	ágar xilose lisina desoxicolato
λ	comprimento de onda

RESUMO

Os sabonetes são preparações destinadas à higiene e conhecidos há mais de 4000 anos. São constituídos por sais de ácidos graxos com propriedades detergentes, resultantes da saponificação entre ácidos graxos superiores e seus glicerídeos à custa de um material alcalino. Podem ser incorporados com diversas substâncias que possuem algum efeito terapêutico ou preventivo sobre a pele, por facilitarem o contato de tais substâncias com o tecido alvo. Porém, isto nem sempre é possível. Por tratar-se de um tensoativo aniônico carboxilado e ter elevada alcalinidade, muitos dos materiais ou ativos a serem incorporados a este tipo de preparação podem apresentar instabilidade. Com o advento dos detergentes sintéticos tal situação pode ser contornada, e apesar de constituírem-se também em tensoativos aniônicos, e por terem origem em ácidos fortes, permitem o preparo de sabonetes líquidos não alcalinos e apresentam maior compatibilidade frente a diversos ativos. Entre as diversas possibilidades de ativos, os agentes antimicrobianos, merecem atenção especial, uma vez que encontra nos sabonetes um excelente veículo para desempenhar sua função na assepsia da pele. A clorexidina é um anti-séptico de amplo espectro de ação, sendo ativo frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras e vírus. Atua sobre a membrana celular causando perda de material intracelular, tais como ácido nucléico e potássio, inibição respiratória e coagulação citoplasmática. Pode apresentar-se na forma de diversos sais como acetato, cloridrato, gluconato e digluconato. Neste trabalho foram estudadas formulações contendo solução de digluconato de clorexidina. A solução amostra utilizada para preparação dos sabonetes foi avaliada quanto a alguns parâmetros como pH, densidade relativa, ponto de fusão, cromatografia em camada delgada, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia no ultravioleta. Foi desenvolvida metodologia analítica para a determinação de digluconato de clorexidina por ensaio microbiológico, pelo método da difusão em ágar, *templates* em placas, utilizando *S. aureus*. O método microbiológico foi validado pelos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA). As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a parâmetros de pH, viscosidade, ensaio de atividade antimicrobiana, demonstrando que as formulações empregando detergentes sintéticos possuem melhor atividade antibacteriana. Porém, a técnica de difusão em ágar não foi satisfatória para

avaliação de atividade antimicrobiana, visto que as formulações eram demasiadamente viscosas. Os resultados corroboram com a literatura, pois os microrganismos Gram-positivos mostraram-se mais susceptíveis. Foi realizada metodologia de ensaio de teste desafio para a formulação com melhor desempenho antimicrobiano e econômico. Não foi observado melhora significativa da formulação contendo digluconato de clorexidina em relação à formulação isenta de clorexidina. Foi desenvolvida metodologia analítica em espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm, na faixa de concentração de 0,001% a 0,002% para a formulação que apresentou melhores resultados microbiológicos e econômicos. A metodologia foi validada pelos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).

Palavras-chave: controle de qualidade, clorexidina, sabonete líquido, análise microbiológica, ensaio de atividade antimicrobiana, teste desafio, espectrofotometria de ultravioleta.

ABSTRACT

The soaps are preparation for hygiene and they are well known for 4000 years ago. They are constituted by salts of fatty acids with detergent properties, resulting from saponification of fatty acids superiorities and glycerides using an alkaline material. They may be incorporated with several substances that have a preventive or therapeutic effect on the skin, by facilitating the contact of such substances with the target tissue. However, this is not always possible. The soaps are anionic surfactant and carboxylic and they have high alkalinity, many of the materials or activities to be incorporated into this type of preparation may be instable. With the advent of synthetic detergents such situation can be avoided, and despite of they be also anionic surfactants, and are based on strong acids, allow the preparation of liquid soaps and alkali not have greater compatibility front of several assets. Among the various possibilities of active, antimicrobial agents deserve special attention, since the soap is an excellent vehicle to perform its function in the asepsis of the skin. The chlorhexidine is an antiseptic of wide spectrum of action, being active against the bacteria Gram-positive and Gram-negative, fungi, yeasts and viruses. Chlorhexidine is an excellent antiseptic of wide spectrum of action, being active against the bacteria Gram-positive and Gram-negative, fungi, yeasts and viruses. Acts on the cell membrane causing loss of intracellular material, such as nucleic acid and potassium, respiration inhibition and cytoplasmic coagulation. The salts of chlorhexidine can be acetate, hydrochloride, gluconate and digluconate. In this work formulation were studied with solution of chlorhexidine digluconate. The sample solution employed to prepare the liquid soaps was evaluated for some parameters such as pH, relative density, melting point, thin-layer chromatography, spectroscopy in the infrared and ultraviolet spectroscopy. Analytical methodology was developed for the determination of chlorhexidine digluconate solution for microbiological assay, through agar diffusion bioassay, using *S. aureus*. The microbiological method was validated by the parameters of linearity, accuracy, precision and reproducibility. The results were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA). The developed formulations were analyzed for parameters of pH, viscosity, assay of antimicrobial activity, indicating that the formulations using synthetic detergents have better antibacterial activity. However, the technique of diffusion in agar was not satisfactory to analyze antimicrobial activity, since the formulations presented higher viscosity. . The results corroborate the literature, since the Gram-positive microorganisms were more likely. It

was performed the test methodology for testing challenge for the formulations with antimicrobial and better economic performance. There was no significant improvement of the formulations containing chlorhexidine digluconate on the free formulations of Chlorhexidine. Analytical methodology was developed by spectrophotometry in the ultraviolet region of 260 nm in the range of concentration of 0.001% to 0.002% for the formulation which had better microbiological and economic. The method was validated by the parameters of linearity, precision, accuracy, specificity and robustness. The results were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA).

Key-words: quality control, liquid soap, chlorhexidine digluconate, microbiological assay, antimicrobial activity, challenge test, UV-spectrophotometry.

1. INTRODUÇÃO

Os sabonetes são preparações apropriadas para a limpeza da pele, fornecendo ação detergente à água, na qual se dissolvem durante o uso. São conhecidos há mais de 4000 anos, sendo o produto de higiene mais antigo utilizado pelo homem. Há documentos da Ásia Menor mostrando seu uso pelos babilônios, hebreus e romanos, que o produziam misturando substâncias graxas com cinzas ricas em carbonato de potássio ou hidrocarbonetos ácidos de sódio (BONADEO, 1963; DRAELOS, 1999).

Os sabonetes são constituídos por sais de ácidos graxos com propriedades detergentes, resultantes da saponificação entre um produto alcalino com ácidos graxos superiores e seus glicerídeos. De acordo com o produto alcalino empregado, podem se obter sabonetes sólidos ou líquidos (DRAELOS, 1999; PEYREFITTE et al., 1998; HERNANDEZ, MARCIER-FRESNEL, 1999).

Os sabonetes são produtos alcalinos, mas não danificam a pele, porque esta é capaz de retornar ao pH normal, devido ao mecanismo de tamponamento que possui. (PEYREFITTE et al., 1998). Para melhorar o pH dos sabonetes, detergentes sintéticos como laurilsulfato de sódio, lauriléter sulfato de sódio, cocoamidopropil betaína, laurilisoetionato de sódio, laurilsulfosuccinato dissódico, entre outros, estão sendo utilizados na preparação destes produtos (DRAELOS, 1999),

Além dos glicerídeos a serem saponificados, os sabonetes podem conter outros aditivos, entre eles, os agentes anti-sépticos (PEYREFITTE et al., 1998).

Anti-sépticos referem-se às substâncias químicas utilizadas como bactericidas ou bacteriostáticas em tecidos vivos, sendo designadas de desinfetantes quando usadas em objetos inanimados (Brasil, 1999)

Os anti-sépticos compreendem grande variedade de estruturas químicas e, conseqüentemente têm diversos mecanismos de ação, como coagulação ou desnaturação de proteínas protoplasmáticas, lise celular por alteração estrutural da membrana celular, diminuição da tensão de superfície, inibição de enzimas essenciais aos microrganismos e sua eficácia é dependente de concentração utilizada, pH, temperatura, tempo de exposição e presença de material orgânico como pus, sangue e tecido necrótico (KOROLKOVAS, 2001; GENARO, 2005). Quando aplicado à pele, reduzem a microbiota residente, uma vez que a ação degermante é apenas temporária e após alguns minutos ou horas há a multiplicação dos microrganismos que permaneceram (GENARO, 2005).

Os ativos anti-sépticos podem ser utilizados sozinhos ou incorporados a detergentes, sabões, desodorantes, aerossóis, talcos, dentifrícios, antiinfeciosos urinários entre outras preparações, enquanto que os desinfetantes são utilizados em saneamento caseiro e hospitalar, para desinfetar água e utensílios, para esterilizar vacinas, produtos sangüíneos e enxertos teciduais (KOROLKOVAS, 2001). A clorexidina, um tipo de anti-séptico, é utilizada em tecidos vivos, para lavagem das mãos e para tratamento de feridas (MAZZOLA et al., 2003), mas este último emprego é discutido, pois alguns autores, como Korolkovas (2001) e Alcamo (2001), discordam desta aplicação, porque a clorexidina retarda a cicatrização e pode danificar o tecido.

De acordo com Genaro (2005), os anti-sépticos melhores e mais eficazes são o iodo e a clorexidina em combinação com etanol. No entanto, a clorexidina é amplamente empregada em diversas áreas com diferentes finalidades por ter amplo espectro de atividade e relativamente poucos efeitos adversos e por ser possível incorporá-la em várias formas farmacêuticas (BRITISH CODEX, 1973, THOMAS et al., 2001, MARTINDALE, 2007).

No comércio brasileiro, há diversos produtos contendo clorexidina, sendo eles solução de gluconato de clorexidina, como, por exemplo, Peridex[®], Periochip[®], Chlorohex solução alcoólica[®] (Johnson Diversey), Chlorohex Dermo Suave sabonete líquido[®] (Johnson Diversey), Noplak[®] (Daudt), Marchlorex[®], sabonete líquido com gluconato de clorexidina 2%[®] (Cristália). Solução de digluconato de clorexidina, como por exemplo: Merthiolate[®] (DM), Prododól[®] (Deshhydrater), Asseptic[®], solução tópica 1% (Neo Química), Perioxidin enxagüatório bucal[®] (Gross), Perioxidin gel bioadesivo[®] (Gross), PerioGard elixir oral[®] com digluconato de clorexidina 0,2% (Colgate), Hibitane solução tópica[®] 4% (AstraZeneca), Riohex[®] 2% degermante (Rioquímica), Riohex[®] 4% degermante (Rioquímica), Riohex solução aquosa[®] 0,2% (Rioquímica), Riohex solução aquosa[®] 0,5% (Rioquímica), Riohex solução aquosa[®] 2,0% (Rioquímica), Riohex solução alcoólica[®] 0,5% (Rioquímica), Vetriderm clorexidina[®], (Bayer Pet) e Sabonete gel bactericida clorexidina[®] (Trilha), Savlon[®], Sommacare, Sabonete líquido com 2% de clorexidina (LM Farma), Sommacare loção anti-séptica com 0,5% de clorexidina[®] (LM Farma), Sommacare solução anti séptica com 0,2% de clorexidina[®] (LM Farma), Sommacare escova[®] (escova e esponja embebida em sabonete líquido de digluconato de clorexidina 2,0% (LM Farma), Handex degermante[®] 2,0% clorexidina (Saneativo), Handex alcoólico[®] 0,5% (Saneativo),

Cariax[®] (clorexidina com fluoreto de sódio) (Pharmakin) e Megatrat[®] Clorexidina veterinário (Centagro).

Este trabalho teve a finalidade de desenvolver formulações de sabonete líquido com diversas concentrações de clorexidina e, avaliar sua atividade antimicrobiana, bem como desenvolver e validar metodologias analíticas para o controle da qualidade tanto da solução utilizada para preparo das formulações, quanto das formulações finais, uma vez que na literatura não foram encontrados trabalhos com tal proposição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi desenvolver quatro formulações diferentes de sabonete líquido com concentrações de 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina, totalizando 16 formulações, e desenvolver métodos de avaliação microbiológica e físico-química.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

1. Realizar o controle de qualidade qualitativo da solução de digluconato de clorexidina utilizada no preparo das formulações.
2. Preparar formulações de sabonete líquido com diferentes concentrações de digluconato de clorexidina.
3. Realizar o controle microbiológico e físico-químico das formulações desenvolvidas.
4. Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana das formulações desenvolvidas.
5. Realizar o teste desafio para a formulação que apresentou melhor atividade antimicrobiana.
6. Desenvolver e validar metodologia de análise de espectrofotometria na região de ultravioleta da formulação que apresentou melhor atividade antimicrobiana.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Microbiota ou flora normal da pele

A pele íntegra é um dos maiores órgãos do corpo, em termos de área, e é responsável por aproximadamente 16% do peso corporal. É o manto de revestimento do organismo e tem por função isolar componentes orgânicos do meio exterior, impedir a ação de agentes externos, evitar a perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno, dar proteção imunológica, fazer termo-regulação, propiciar a percepção e função secretória (BRASIL, 1989; TORTORA et al., 2006).

A estrutura básica da pele inclui, da camada externa para a interna, epiderme, derme e hipoderme (BRASIL, 2008b). A epiderme, quando íntegra, funciona como barreira física eficaz contra microrganismos, por estar em contato direto com o ambiente externo. A derme contém os folículos pilosos, ductos de glândulas sudoríparas e sebáceas, os quais possibilitam a passagem de microrganismos da pele para os tecidos mais profundos. A superfície íntegra da epiderme saudável raramente é penetrada por microrganismos, porém, quando rompida, infecção subcutânea, muitas vezes, se desenvolve (ALCAMO, 2005; TORTORA et al., 2006).

Devido à sua extensão e localização, constantemente a pele é exposta a diversos microrganismos do meio ambiente. A fim de prevenir a transmissão de microrganismos pelas mãos, são essenciais alguns cuidados como: uso de agente tópico com eficácia antimicrobiana, procedimento adequado ao utilizá-lo e adesão regular no seu uso (BRASIL, 2008b).

A maioria das bactérias cutâneas reside na superfície do estrato córneo, parte superior dos folículos pilosos, sulcos da pele e ductos das glândulas sebáceas (flora transitória). Entretanto, a microbiota residente se encontra mais profundamente. O simples ato de lavar as mãos com água e sabão pode diminuir em 90% o número de microrganismos pertencentes principalmente à microbiota transitória. No entanto, em média 8 horas após este procedimento, a população bacteriana é reconstituída pela flora residente (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005; BUCALEM, WEI, 2008).

A microbiota cutânea residente, estende-se por toda a pele, concentrando-se nas áreas mais úmidas e quentes como axilas e períneo, chegando em torno de 10^6 UFC/cm² e nas demais regiões, em torno de 10^4 UFC/cm². Os microrganismos da flora residente não são totalmente removidos através do processo de lavagem das mãos, no entanto alguns autores relatam que os anti-sépticos conseguem inativá-los. Fazem parte da flora residente os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, sendo os microrganismos mais comuns o *S. epidermidis*, o *S.*

aureus e o *P. acnes*. A flora residente possui baixa virulência e raramente causa infecção, contudo pode ocasionar infecções sistêmicas em pacientes imunodeprimidos e após procedimentos invasivos, sendo responsável por infecções cirúrgicas (BRASIL, 1989; ALCAMO, 2001; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005; BUCALEM, WEI, 2008).

A flora transitória adere fracamente à pele por contato e encontra-se mais superficialmente, junto à gordura e às sujidades e sobrevive por curto período de tempo, sendo freqüentemente constituída por *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* (BRASIL, 2007; BUCALEM, WEI, 2008) e é responsável pelas infecções hospitalares de origem cruzada (BRASIL, 1989).

3.2. Lavagem e desinfecção das mãos

O hábito de lavar as mãos constitui uma medida primária mais importante, mais simples e menos dispendiosa que existe para a redução dos riscos de transmissão de microrganismos. Destaca-se como sendo um dos pilares para prevenção tanto de infecção hospitalar de origem cruzada, disseminação de doenças infecciosas quanto para o controle de infecção cruzada em consultórios médicos, odontológicos, clínicas, hospitais e demais unidades de saúde (BRASIL, 1989; MARTINS, SOARES, 1993; SILVA et al., 2000; HAAS et al., 2005; BRASIL, 2008b).

Deste modo, a lavagem das mãos consiste no simples ato que deve ser seguido por todos os profissionais de saúde que mantêm contato direto ou indireto com os pacientes, fluidos corpóreos, procedimentos invasivos, que atuam na manipulação de medicamentos, alimentos e material estéril ou contaminado (COHEN et al., 2003; BRASIL, 2007; BRASIL, 2008b).

Para a lavagem das mãos, preferencialmente, deve-se utilizar sabonete líquido, pois a probabilidade de contaminação através de seu uso é menor em relação ao sabonete em barra. No entanto, se o sabonete sólido for empregado, deve ter tamanho pequeno, para que seja substituído mais frequentemente (BRASIL, 1989; BRASIL, 2007).

Há estudos demonstrando que, nem todos os profissionais da saúde aderiram à prática de higienização das mãos de maneira constante em sua rotina de trabalho, devendo este hábito ser conscientizado e estimulado (COHEN et al., 2003; BRASIL, 2008b).

Entre 1975 e 1985, foram publicados guias sobre práticas de lavagem das mãos em hospitais pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), que recomendavam lavar as mãos com sabonete não associado a anti-séptico antes e após contato com pacientes e lavá-las com sabonete associado a anti-séptico antes e após a realização de procedimentos invasivos ou contato com pacientes de alto risco. Entre 1988 e 1995, guias para lavagem e anti-sepsia de mãos, publicados pela Associação para Profissionais de Controle de Infecções (APIC, *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*), foram similares às orientações dos CDC. Em 1995 e 1996, o Comitê Consultivo em Práticas de Controle de Infecções (HIPAC, *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee*) dos CDC recomendava que um sabonete associado a anti-séptico ou um agente não-hidratado fosse empregado para higienizar as mãos ao deixar os quartos de pacientes com patógenos multirresistentes (BRASIL, 2008b).

Em 1989, o Ministério da Saúde, no Brasil, publicou o manual “Lavar as mãos: Informações para profissionais de saúde”, a fim de orientar quanto às normas e aos procedimentos de lavagem das mãos, visando a prevenção e o controle de infecções. Recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), disponibilizou o guia “Higienização das mãos em serviços de saúde”, com atualizações sobre o tema (BRASIL, 2008b).

Em 2002, o CDC substituiu o termo “lavagem das mãos” por “higienização das mãos”, devido à maior abrangência deste procedimento. O termo engloba a higienização simples (lavagem simples das mãos usando sabão), a higienização anti-séptica (lavagem simples das mãos com uso de anti-séptico), a fricção anti-séptica (para remoção microbiana, após remoção de sujeira, com uso de solução alcoólica a 70%, por exemplo) e a anti-sepsia cirúrgica das mãos (elimina a microbiota transitória e diminui a residente, além de efeito residual, empregando degermante e maior tempo de procedimento) (BRASIL, 2007; BRASIL, 2008a; BRASIL, 2008b).

A anti-sepsia inadequada da pele pode resultar na perda de atividade antimicrobiana do anti-séptico utilizado propiciando o surgimento de patógeno resistente (WEBER et al., 2007).

3.3. Sabonetes

Existem vários tipos e apresentações de sabão: em barra, pó, líquido e escamas. O sabonete é um tipo de sabão em barra destinado à limpeza corporal,

fornecendo ação detergente à água na qual se dissolve durante o uso. É conhecido há mais de 4000 anos, sendo o produto de higiene mais antigo utilizado pelo homem. Há documentos da Ásia Menor mostrando seu uso pelos babilônios, hebreus e romanos, que o produziam misturando substâncias graxas com cinzas ricas em carbonato de potássio ou hidrocarbonetos ácidos de sódio (BONADEO, 1963; DRAELOS, 1999).

Nos séculos VIII e IX, passou a ser produzido na Itália, Espanha, França e Inglaterra (BONADEO, 1963). Durante a Idade Média, a Igreja Católica proibiu seu uso, por crer que expor a pele, mesmo durante o banho, era demoníaco. Todavia, a necessidade de medidas sanitárias e conhecimentos sobre processos infecciosos induzidos por bactérias valorizaram sua utilização (DRAELOS, 1999).

Quimicamente, os sabonetes são constituídos por sais alcalinos de ácidos graxos com propriedades detergentes, resultantes da saponificação entre um produto alcalino com ácidos graxos superiores e seus glicerídeos. De acordo com o produto alcalino empregado podem-se obter sabonetes duros ou líquidos (DRAELOS, 1999; PEYREFITTE et al., 1998; HERNANDEZ, MARCIER-FRESNEL, 1999).

Os corpos gordurosos ou triglicerídeos podem ser de origem animal ou vegetal. Além dos triglicerídeos a serem saponificados, os sabonetes podem conter sobreengordurantes, umectantes, opacificantes, corantes, perfumes, antioxidantes e anti-sépticos (PEYREFITTE et al., 1998; HERNANDEZ, MARCIER-FRESNEL, 1999; FONSECA, PRISTA, 1993).

Os sabonetes assim obtidos são tensoativos aniônicos e alcalinos. A alcalinidade, apesar de indesejável pela pele, não é capaz de danificá-la graças ao mecanismo de tamponamento existente que faz com que o pH da pele retorne ao normal, em média, 2 horas após o uso do sabonete (PEYREFITTE et al., 1998).

De acordo com Draelos (1999), tem-se tentado ajustar o pH dos sabonetes para diminuir a irritação cutânea. Deste modo, os detergentes sintéticos, materiais que permitem o preparo de sabonetes líquidos ou sólidos não alcalinos, com valores de pH condizentes aos da pele, vêm sendo acrescentados ao arsenal de materiais importantes para obtenção de preparações de limpeza. Os principais detergentes empregados na obtenção de sabonetes com estas características são: laurilsulfato de sódio, lauriléter sulfato de sódio, cocoamidopropilbetaína, laurilisoetionato de sódio, lauroilsarcosinato de sódio, entre outros.

Quando lançados nos anos de 1940, os sabonetes líquidos eram baseados em sabão de potássio e se destinavam ao uso industrial e institucional e, embora nas décadas de 1950 e 1960, tenham ocorrido melhoras nos detergentes empregados nestes produtos, foi apenas nos anos de 1970 que chegaram ao mercado doméstico (LUNDMARK, 1992).

Inicialmente, os sabonetes eram uma mistura de detergentes sintéticos, condicionadores e agentes finalizantes sendo utilizados apenas para limpeza. Após anos de evolução, a tecnologia destes produtos inclui cuidados especiais para a pele como ação microbiana, realce da suavidade e enfatizam a sua estética (que passou de sabão transparente para perolado, o chamado *soft soap*), além de possuírem agentes engordurantes e melhor característica espumógena. Vale lembrar que o advento de embalagens mais sofisticadas e do tipo refil ajudou a melhorar a aceitação destes produtos e mantê-los no mercado com vendas crescentes (LUNDMARK, 1992).

Segundo Martins e Soares (1993), os sabões comuns têm apenas ação mecânica de remoção dos microrganismos, por reduzirem a tensão superficial, o que eleva o poder umectante da água na qual estão dissolvidos. Outro fator importante é o tempo de contato necessário para que o sabão possa remover as bactérias contaminantes presentes nas mãos, que é de 7 a 8 minutos ou ainda quando se trata de microrganismos presentes nas camadas mais profundas da pele, estes só podem ser removidos após 15 minutos de lavagem com água e sabão.

Os sabonetes medicinais são preparados pela adição de fármacos e ou ativos aos sabonetes base para ação sobre a superfície cutânea. No entanto, os produtos a incorporar devem ser compatíveis química e fisicamente e não devem perder eficácia durante armazenamento e uso. Os sabonetes líquidos podem ser usados com maior facilidade como sabonetes medicinais e podem ser incorporados com substâncias antiparasitárias e antimicrobianas usadas na prática médica e veterinária (BONADEO, 1963). O primeiro sabão líquido antibacteriano foi lançado em 1987 e continha triclosan como agente ativo (LUNDMARK, 1992).

Haas e colaboradores (2005) referem que produtos tópicos para as mãos contendo antimicrobianos têm sido cada vez mais utilizados pelo público em geral e sabões com agentes antimicrobianos são mais eficazes que sabonetes regulares. Os autores referem também que os sabonetes contendo gluconato de clorexidina foram mais eficazes que outros antimicrobianos como, por exemplo, o triclosan.

3.4. Anti-sépticos

A palavra *sepsis* vem do grego *seps* e significa pútrido. Refere-se à contaminação por microrganismos e é o passo inicial para septicemia. Desta forma, anti-séptico significa contra infecção (ALCAMO, 2001).

A anti-sepsia é um processo de desinfecção em que se empregam usualmente substâncias químicas (anti-sépticos). Tais substâncias devem destruir ou inibir os microrganismos nocivos vegetativos, não formadores de endosporos em tecidos vivos, pele e mucosas (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005; TORTORA et al., 2006).

Anti-sépticos são substâncias geralmente bactericidas, mas ocasionalmente podem ser bacteriostáticos, com baixa causticidade e hipoalergenicidade, destinados a aplicações em pele e mucosa, podendo estar incorporados em sabões e impregnados em cateteres (ALCAMO, 2001; IMBERT et al., 2003; BRASIL, 2008a).

O uso de anti-sépticos iniciou-se em 1847, quando Semmelweis comprovou a diminuição de casos de febre puerperal empregando solução de hipoclorito na lavagem das mãos antes de procedimentos clínico-cirúrgicos (SILVA et al., 2000). A técnica anti-séptica em cirurgias foi introduzida por Joseph Lister, em 1867, que utilizou o vapor de fenol dirigido para o campo cirúrgico, o que reduziu o número de infecções pós-operatórias (SILVA et al., 2000; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005).

As unidades de saúde utilizam anti-sépticos a fim de reduzir a microbiota transitória das mãos dos trabalhadores, diminuir a transmissão de microrganismos, preparar a pele para procedimentos invasivos e anti-sepsia cirúrgica das mãos (WEBER et al., 2007).

Os anti-sépticos devem atender aos seguintes requisitos: amplo espectro de ação antimicrobiana; ação rápida; efeito residual cumulativo; baixa ou nenhuma toxicidade; não possuir absorção sistêmica; não causar hipersensibilidade, ressecamento, manchas, irritação, corrosão ou fissuras; possuir odor agradável ou ausente; boa solubilidade; adequada estabilidade química, para impedir sua decomposição por efeito da luz e calor; baixo custo e veiculação funcional em dispensadores ou embalagens de pronto uso (BRASIL, 2008a).

Existem surtos de doenças relacionados ao uso de preparações anti-sépticas contaminadas que ocorrem principalmente por uso de água não esterilizada para seu preparo, reutilização de frascos para armazenamento sem que tenham sido completamente esvaziados e limpos adequadamente, erro de preparo (diluição acima do indicado) sendo, portanto, indispensáveis as normas de Boas Práticas de

Fabricação (BPF) e Boas Práticas de Laboratório (BPL) no momento do preparo do anti-séptico bem como seu armazenamento e uso (WEBER et al., 2007)

Atualmente, os procedimentos cirúrgicos são realizados de maneira asséptica, pelo uso de instrumental cirúrgico e aventais esterilizados, escovação das mãos do cirurgião com anti-sépticos e uso de luvas estéreis. A lavagem das mãos e antebraços com sabões e anti-sépticos é indispensável antes do calçamento das luvas, pois este material fura-se com grande frequência durante as cirurgias. Além disto, a perfuração das luvas aumenta após duas horas de trabalho. É descrito que por um único furo de agulha na luva podem passar até 18.960 estafilococos num período de 20 minutos (SILVA et al., 2000; BUCALEM, WEI, 2008).

A lavagem das mãos utilizando sabões degermantes é primordial para diminuição do risco de infecções e desse modo, o ideal é o emprego de sabões degermantes (associação de anti-séptico a um detergente) de clorexidina 2% a 4% (CYRILLO, 2008).

Em estudos comparativos de ação microbiológica de anti-sépticos empregados para lavagem das mãos, a clorexidina tem demonstrado resultados satisfatórios em relação a outros anti-sépticos como PVPI, álcool 70% e triclosan, inclusive devido à sua ação residual (SILVA et al., 2000; MAGRO-FILHO et al., 2000).

Em relação ao custo, os produtos anti-sépticos possuem valores maiores que os sabonetes comuns. Entretanto, é claro até o momento, que elevar a adesão da higienização das mãos pode reduzir infecções e conseqüentemente os custos, na maioria dos serviços de saúde (BRASIL, 2008b).

3.5. Clorexidina

A clorexidina é um composto químico biguanídico catiônico com molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1'-hexametenobis{5-(4-*p*-clorofenil) biguanida}) (EP, 2005; MARTINDALE, 2007; USP, 2007). Foi sintetizada em laboratório em 1954 por Davies, Francis, Martin, Rose e Swain e aprovada para uso nos Estados Unidos em 1976 (SILVA et al., 2000).

A clorexidina é um anti-séptico, desinfetante não específico de segunda geração e conservante. Embora seja bactericida de uso tópico com largo espectro de ação, sua eficácia difere em relação aos tipos de microrganismos. É efetiva contra bactérias Gram-positivas e menos eficaz para bactérias Gram-negativas, fungos e

algumas espécies de *Proteus*. Quanto aos vírus, possui atividade apenas para alguns tipos de vírus envelopados, entre eles vírus da hepatite, herpes simples, HIV, citomegalovírus, influenza e vírus sincicial respiratório. Para as micobactérias, a clorexidina apresenta mínima atividade; contra endósporos e cistos de protozoários a atividade é nula (BRITISH CODEX, 1973; NEIDLE, YAGIELA, 1991; BONACORSI et al., 2000; THOMAS et al., 2000; TORTORA et al., 2006; MARTINDALE, 2007; WEBER et al., 2007; BRASIL, 2008b).

A atividade antimicrobiana contra esporos é bem discutida, uma vez que alguns autores dizem que possui pouca ação (NEIDLE, YAGIELA, 1991; TORTORA et al., 2006), enquanto outros dizem que não possui (BRITISH CODEX, 1973; WU, LIU, 2007; BRASIL, 2008b). Bambace e colaboradores (2003) e MARTINDALE (2007) complementam que a clorexidina é efetiva contra esporos apenas em elevadas temperaturas.

Atua sobre a membrana celular causando seu rompimento e conseqüente perda de material intracelular como potássio (quando a clorexidina está em baixa concentração), inibição respiratória e perda de ácido nucléico (quando a clorexidina está em alta concentração) e coagulação citoplasmática (coagulação ou precipitação de proteínas e ácidos nucléicos), em razão da interação da clorexidina com proteínas citoplasmáticas (BONACORSI et al., 2000; THOMAS et al., 2000). As ligações na membrana celular provavelmente ocorrem entre a carga positiva da clorexidina com a carga negativa dos grupos carboxilas disponíveis dos proteoglicanos e os grupos fosfatos dos ácidos teicóico e lipoteicóico na parede interna bacteriana. Em relação ao metabolismo, a clorexidina inibe os sistemas glicosiltransferase e 2-fosfoenolpiruvato fosfotransferase, sendo esta última, uma enzima vital para o processamento e a manutenção da via glicolítica, uma vez que integra o sistema de fosfotransferência, responsável pela incorporação de glicose às células bacterianas (ARAÚJO et al., 2001).

Embora tenha ação residual, sua atividade é reduzida na presença de pus e sangue. Entre as bactérias Gram-negativas, a *P. aeruginosa* é mais resistente, por restringir seu acesso ao alvo de ação, devido à adaptação fisiológica da parede celular, que previne a entrada do biocida (por aumentar os componentes do envelope celular tais como lipopolissacarídeos ou fosfolipídeos causado pela mutação progressiva e também trocas nos processos biomecânicos intracelulares) e há um

mecanismo para eliminar as substâncias nocivas de seu interior (BRITISH CODEX, 1973; THOMAS et al., 2000).

A atividade antimicrobiana imediata é mais lenta em relação aos álcoois e por isso considerada de nível intermediário, entretanto, seu efeito residual (por ter forte afinidade aos tecidos), torna-a o melhor dos anti-sépticos disponíveis (BRASIL, 2008b). De acordo com Southern e colaboradores (2006), é considerada como padrão de referência em cremes orais antimicrobianos devido ao largo espectro de ação e substantividade (8 a 12 horas).

A ação biocida da clorexidina é inibida pelo ácido nicotínico e, embora não se saiba exatamente como ocorre esta inibição, acredita-se que seja pelo bloqueio dos receptores de clorexidina pelo ácido (BAKER et al., 1994).

Pode apresentar-se na forma de diversos sais como acetato, cloridrato, gluconato, digluconato, sendo este último mais solúvel em água e em pH fisiológico, liberando o componente catiônico. As soluções aquosas dos sais alcançam sua máxima atividade microbiológica e estabilidade química em pH 5 a 8 (THOMAS et al., 2000; GLUCONATO, 2006).

A solução de digluconato de clorexidina é uma solução aquosa, que contém não menos que 19% (190 g/L) e não mais que 21% (210 g/L) de digluconato de clorexidina. É um líquido amarelo-pálido límpido, quase inodoro, miscível em água e ácido acético glacial, solúvel em álcool e em acetona. Em solução aquosa a 5% v/v tem pH 5,5 a 7,0. Sua densidade relativa a 20 °C é 1,06 a 1,07 g/mL; deve ser armazenada protegida da luz e em temperatura máxima de 25 °C (BP, 2005; MARTINDALE, 2007; USP, 2008).

A Figura 1 apresenta a estrutura do digluconato de clorexidina.

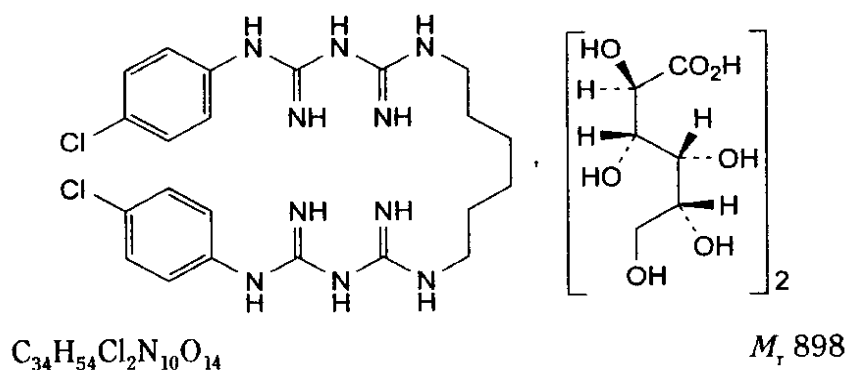


Figura 1. Estrutura química do digluconato de clorexidina

Fonte: EP, 2005.

Por se tratar de um material com caráter catiônico, apresenta incompatibilidade com preparações aniônicas inorgânicas como sulfato, carbonato e fosfato e orgânicos como os sabões, podendo resultar em turvação, precipitação e perda do poder anti-séptico. Desta maneira, os tensoativos indicados para formulações com digluconato de clorexidina são os catiônicos, os anfóteros e os não-iônicos (BRITISH CODEX, 1973; BONACORSI et al., 2000; MARTINDALE, 2007).

Os sais de clorexidina podem ter atividade reduzida em presença de agentes suspensores e compostos insolúveis de cálcio, magnésio e zinco. A decomposição dos sais de clorexidina em soluções aquosa, influenciada pela temperatura elevada e pH alcalino, evidencia traços de 4-cloroanilina (MARTINDALE, 2007; USP, 2008).

De acordo com a literatura, o uso da clorexidina é bastante amplo e tem sido empregada para limpeza de superfícies, equipamentos e roupas em hospitais, consultórios odontológicos e outras unidades de saúde (GAJADHAR et al., 2003); para anti-sepsia da pele, mãos e membranas mucosas; para tratamento de feridas e queimaduras. Combinada a um detergente ou álcool, é usada para escovação cirúrgica das mãos e preparo pré-operatório da pele em pacientes (BRITISH CODEX, 1973; TORTORA et al., 2006).

Trabulsi e Alterthum (2005) relatam que é usada para preparo de pacientes em urologia, obstetrícia e ginecologia e de acordo com Galice e col. (2006) para lavagem vaginal antes e durante o parto para prevenir infecção causada por estreptococos de grupo B na mãe e no recém-nascido. Também é prescrita para terapia tópica de dermatites fúngicas e piodermites em cães e gatos, podendo ser associada ao miconazol (PEDRINI, MARGATHO, 2003; PERRINS, BOND, 2003).

Seu uso também tem sido sugerido em espermicidas, a fim de prevenir a transmissão do vírus HIV, por possuir atividade *in vitro* contra o vírus; prevenir a contracepção por difundir no muco cervical em concentrações em torno de 1 mg/mL, formando uma barreira e impedindo a entrada do esperma (MARTINDALE, 2007). O gel de clorexidina associado à lidocaína pode ser utilizado em cateterização e citoscopia; a solução aquosa de clorexidina tem se mostrado muito eficaz para controlar sepsis peritoneal na anti-sepsia de pacientes que fazem diálise. O tratamento local com solução de clorexidina é efetivo para prevenção de infecções nosocomiais do trato respiratório, redução de infecção maternal e morbidade neonatal durante o nascimento e diminuição da mortalidade em sepsi intra-abdominal experimental (KÖLJALG et al., 2002; MARTINDALE, 2007).

A clorexidina começou a ser empregada para irrigação de canais radiculares em 1964, entretanto, seu uso mais sistemático em endodontia e avaliação de suas propriedades ocorreu a partir de 1982 (SOUZA et al., 2006). Tem sido muito utilizada em odontologia veiculada na forma de elixir, chiclete, dentifrício, enxagüatório, *spray* ou gel, sendo muito eficaz como agente antiplaca e antigengivite, devido à acentuada capacidade de adsorção aos dentes, às superfícies mucosas e mucina salivar, com liberação na cavidade oral em níveis terapêuticos, em 24 horas, podendo chegar a 48 horas (LEONARDO et al., 1999).

A faixa de concentração da solução de clorexidina empregada em odontologia é bastante ampla, sendo utilizada em concentrações entre 0,12 e 2,0%. De acordo com a literatura, altas concentrações oferecem efeito bactericida e baixas concentrações, bacteriostático na placa bacteriana (QUIRYNEN et al., 2001; VASCONCELOS, 2001; BAMBACE et al., 2003; SOUTHERN et al., 2006).

Também é indicada para tratamento de estomatite, candidíase oral, manutenção da higiene bucal em deficientes físicos ou mentais, em que o controle da placa é difícil de ser atingido, e em procedimentos pré-cirúrgicos (para irrigação de campos operatórios em cirurgias periodontais e periapicais), para evitar bacteremia, aplicação pós-cirúrgica para auxiliar a cicatrização, embora alguns autores como Bonacorsi e colaboradores (2000) e Korolkovas (2001) relatem que a clorexidina retarda este processo por causar danos ao tecido. A clorexidina é indicada em implantes dentais, higienização de próteses, pacientes com grande propensão à cárie, pacientes com aparelho ortodôntico, instrumentação de canal, paciente imunologicamente comprometido, idoso ou doente terminal (QUIRYNEN et al., 2001; VASCONCELOS, 2001).

Ao controlar a formação do biofilme dental através da alteração da composição bacteriana do biofilme supragengival, reduz o risco de cárie e doença periodontal, reduzindo o número de *Streptococcus mutans* por períodos prolongados em consequência de sua liberação lenta na cavidade bucal e ação inibidora sobre enzimas glicosídicas e proteolíticas (BAMBACE et al., 2003; PEREIRA et al., 2006).

O uso de clorexidina para a higienização das mãos é seguro e a absorção pela pele é mínima, senão nula. Porém, pode haver irritação na pele, sendo que esta irritação é concentração-dependente, com probabilidade maior para produtos que contêm 4% de clorexidina e quando utilizados com frequência (BRASIL, 2008b).

Efeitos colaterais importantes são: descoloração dos dentes, restaurações e dorso da língua, descamação e sensibilidade oral, os quais podem ser diminuídos pela redução da concentração da solução, além do gosto amargo e interferência no paladar por algumas horas após o bochecho (QUIRYNEN et al., 2001; VASCONCELOS, 2001).

Quando associada a um sabonete, pode causar toxicidade local, alteração na flora normal da pele predispondo-a à colonização por bactérias Gram-negativas (GONTIJO-FILHO et al., 1984).

Contato de soluções com altas concentrações de clorexidina com os olhos e tecidos sensíveis pode causar irritação (TORTORA et al., 2006; MARTINDALE, 2007). Há registro na literatura de um recém-nascido que desenvolveu cianose e bradicardia após sua mãe ter administrado *spray* de clorexidina em seus seios para prevenir mastite. Após acidental administração intravenosa, têm sido relatados casos de hemólise (MARTINDALE, 2007).

Embora Bonacorsi e colaboradores (2000) apresentem citotoxicidade *in vitro* para clorexidina mesmo em baixas concentrações e demonstrem literatura com dados de toxicidade da clorexidina para várias células humanas, pois seu mecanismo de ação é o mesmo para células procarióticas e eucarióticas, Kudo e colaboradores (2002) relatam que a toxicidade da clorexidina é baixa para administração oral (DL₅₀ 1800 mg/kg, em rato), mas alta para administração intravenosa (DL₅₀ 22 mg/kg, em rato). Diversos testes toxicológicos têm mostrado que a molécula de clorexidina é altamente estável, e, quando ingerida, é quase totalmente eliminada pelas fezes (SINNES et al., 1997).

De acordo com Martindale (2007), quando ingerida, a clorexidina pode causar irritações gastrintestinais, vômito, tontura, enquanto que toxicidade sistêmica é rara. Entretanto, Hirata e Kurokawa (2002) relatam que um paciente de 89 anos morreu após aspiração e ingestão acidental de solução de gluconato de clorexidina no Japão, embora acredita-se que a morte tenha ocorrido devido à grave síndrome de angústia respiratória (causada pela aspiração e conseqüente adsorção pelos pulmões) e não devido aos efeitos gastrintestinais. Kudo e colaboradores (2002) também relatam a morte de uma japonesa após acidental administração intravenosa de solução de digluconato de clorexidina a 20%.

Hipersensibilidade severa, incluindo choque anafilático, foi relatada após aplicação tópica de clorexidina e de seu uso em lubrificantes para cateterização

urinária ou citoscopia e há consenso que reações similares podem ocorrer quando se utilizam produtos médico-cirúrgicos como cateteres intravenosos impregnados com tal produto (MARTINDALE, 2007).

Ainda de acordo com USP DI (2003), a carcinogenicidade não foi observada em estudo utilizando ratos, que receberam água com alta dose de clorexidina (38 mg/kg/dia), sendo esta dose, pelo menos, quinhentas vezes a quantidade que pode ser ingerida pelo homem na dose diária de clorexidina em enxágüatório bucal.

A ação dos anti-sépticos sobre os microrganismos e os efeitos tóxicos que podem causar ao hospedeiro são dependentes, por exemplo, da concentração utilizada. Deste modo, o uso dessas substâncias é recomendado em concentrações consideradas seguras para aplicação sobre pele e mucosas (CURY, 1986). Segundo Imbert e colaboradores (2003), a concentração de clorexidina utilizada em mucosas normalmente é 500-1000 mg/L e em superfícies plásticas é 5000 mg/L.

De acordo com Tambe e colaboradores (2001), o uso de anti-sépticos em produtos médicos e domésticos aumentou na última década e o uso indiscriminado sugere o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos anti-sépticos.

A resistência ao germicida, na maioria dos casos, está relacionada com constituição da parede celular bacteriana, sendo mais freqüente em microrganismos que não são sensíveis aos anti-sépticos e desinfetantes utilizados normalmente na prática clínica (MELO et al., 2000; KÖLJALG et al., 2002), com o surgimento de mutação do gene cromossomal ou pela aquisição de material genético na forma de plasmídeos (KÖLJALG et al., 2002; WEBER et al., 2007). Kõljalg e colaboradores (2002) concordam que dados sobre espécies microbianas e susceptibilidade a antimicrobianos de agentes infecciosos podem sugerir susceptibilidade à clorexidina.

Al-Masaudi e colaboradores (1988) descrevem que naquela época não havia relatos de resistência à clorexidina em *S. aureus* antibiótico resistente e em *Pseudomonas* spp. Entretanto, nos anos de 1990 e 2000, a literatura descreve casos de resistência à clorexidina (SULLER, RUSSELL, 1999; TAMBE et al., 2001). Thomas e colaboradores (2005) complementam que a resistência à clorexidina pode ser adquirida devido ao uso de soluções diluídas, adaptações fenotípicas induzidas por exposição a baixos níveis de biocida ou ainda quando há competição com outro agente antimicrobiano pelo mesmo alvo de ação.

Algumas precauções devem ser seguidas para o emprego de solução de clorexidina, como, por exemplo, não deve ser utilizada em cérebro, meninges, ouvido

médio, olhos e outros tecidos sensíveis. Alguns cuidados também devem ser seguidos ao preparar a solução de clorexidina, como utilizar água esterilizada, utilizar soluções que foram recentemente preparadas, preparar soluções em concentrações corretas e armazená-las adequadamente (MARTINDALE, 2007).

Em 2003, Farias e colaboradores compararam nistatina 100.000 UI e solução de digluconato de clorexidina 0,2% sobre o cultivo de *C. albicans* (ATCC 1031) em ágar BHI. O halo de inibição formado pela clorexidina foi de 27 mm e o formado pela nistatina foi de 17 mm, demonstrando que a clorexidina pode ser utilizada para auxílio de prevenção e tratamento de candidíase oral.

Amorin e colaboradores (2004) determinaram a concentração inibitória mínima (CIM), por difusão em ágar, de digluconato de clorexidina e *p*-monoclorofenol, frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica*. Os valores de CIMs para clorexidina variaram de 2,67 a 80,0 µg/mL, enquanto que para *p*-monoclorofenol as CIMs foram 46,67 a 213,33 µg/mL. Assim, de acordo com os autores, a clorexidina deve ser a primeira escolha por ser usada em menor concentração e ser menos tóxica que o *p*-monoclorofenol.

Em 2006, Gonçalves e colaboradores avaliaram (*in vivo*) a contaminação bacteriana gerada pelo aerossol de procedimentos em consultórios odontológicos e a eficácia da solução de digluconato de clorexidina 0,12% para diminuir o número de microrganismos obtidos neste procedimento. O número médio de UFC coletado em placa com meio de cultura que ficou afixada ao profissional do consultório odontológico, foi de 54,93 na primeira fase (sem profilaxia com bochecho de solução de clorexidina) e 18,93 na segunda (com bochecho); em relação às placas coletadas com a auxiliar e com o paciente, também houve redução significativa do número de UFC na segunda fase, o que corrobora com outros autores que também encontraram redução no número de UFC após bochechos com clorexidina 0,12%.

Apesar de a clorexidina possuir efeito antimicrobiano, a solução de clorexidina pode ser contaminada por bactérias. Gajadhar e colaboradores (2003), em uma pesquisa realizada em hospitais de Trinidad (Caribe), verificaram que o anti-séptico/desinfetante mais utilizado em 11 instituições de saúde desta ilha foi a clorexidina. Porém, a qualidade microbiológica das soluções utilizadas em quatro dos maiores hospitais, demonstrou contaminação por *Pseudomonas* spp., que prevaleceu

em 6,1% das amostras analisadas. Portanto, são essenciais as BPF e as BPL durante seu preparo, uso e conservação.

O método oficial de análise para sais de clorexidina descritos na literatura é titulação com ácido perclórico 0,1 M (BP, 2005; EP, 2005) e cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (USP, 2008). Para solução de irrigação e enxagüatório bucal de clorexidina, o método descrito nas farmacopéias britânica (2005) e européia (2005) é CLAE. A farmacopéia americana (2008) descreve CLAE para análise de creme oral com gluconato de clorexidina. Todos estes compêndios oficiais descrevem o método de CLAE para análise de substâncias relacionadas. A farmacopéia americana (2008), descreve CLAE para análise de *p*-cloroanilina e as farmacopéias britânica (2005) e européia (2005) descrevem método colorimétrico. Para análise de clorexidina e seus sais, os métodos apresentados na literatura são cromatografia gasosa (SIEFERT et al., 1975) e CLAE (DOUB et al., 1996) e para análise de impurezas e substâncias relacionadas, são oxidação catalítica e CLAE (STEVENS et al., 1986), cromatografia gasosa (GAVLICK, DAVIS, 1994) e CLAE (REVELLE et al., 1993) . Os parâmetros utilizados nas análises estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina e seus sais

referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
USP (2008)	CLAE	239	Solução A: tampão fosfato de sódio pH 3,0 com trietilamina em água, misturando com acetonitrila Solução B: acetonitrila	L1		gluconato
EP (2005), BP (2005)	potenciometria		ácido perclórico			sais
Siefert et al. (1975)	Cromatografia a gás		detector Ni	Supelco	50 – 200 ppm	acetato
Doub et al. (196)	CLAE, gradiente	230	Fase A: acetato de amônio pH 5,0 Fase B: acetonitrila	Nucleosil C ₁₈	10 µg/mL a 10 mg/mL	gluconato

Tabela 2. Métodos descritos na literatura para análise de impurezas e produtos de degradação da clorexidina

referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	produto encontrado
USP (2008)	CLAE	239	Solução A: tampão fosfato de sódio pH 3,0 com trietilamina em água, L1 misturando com acetonitrila	OV – 225		substâncias relacionadas e <i>p</i> -cloroanilina
			Solução B: acetonitrila			
EP (2005), BP (2005)	CG* e reação colorimétrica		nitrogênio	OV – 225		4-cloroanilina
EP (2005), BP (2005)	CLAE	254	Octanesulfato de sódio: ácido acético: água: metanol	Nucleosil C ₁₈		substâncias relacionadas
Gavlick, Davis (1994)	CG		hélio	J&W Scientific DB-1	0,956 – 10 ppm	<i>p</i> -cloroanilina
Revelle et al. (1993)	CLAE isocrático com detector diodo array, CLAE-EM*, RMN***	CLAE e CLAE-EM: EM**: 230 RMN: 299,92 MHz	CLAE e CLAE-EM: tampão pH 5,0: metanol acetato RMN: D ₂ O ou CD ₃ OD	CLAE e CLAE-EM: Zorbax CN		11 impurezas, chamadas de: B, B1, C, D, D1, D2, E, F, G, G1, H
Stevens et al. (1986)	CLAE-UV Oxidação catalítica (OC)	220	H ₃ PO ₄ : heptanesulfato de sódio: CH ₃ CN, pH 2,2	Regis Chemical C ₆ oxigênio 300 mL/min para OC	1 – 80 µg/mL	<i>p</i> -cloroanilina, biguanida e fenil biguanida

* cromatografia a gás; ** espectrometria de massas, *** ressonância magnética nuclear

Em fluidos biológicos, a clorexidina é determinada por espectrometria de cintilação (BOSNEVOLL et al., 1974), por espectrofotometria (JENSEN, CHRISTENSEN, 1971; VRIES et al., 1991), CLAE (LAM et al., 1993; MEDLICOTT et al., 1994; PESONEM et al., 1995) e micro-extração em fase sólida (MUSTEATA, PAWLISZYN, 2005) em saliva; por CLAE em urina, (GAFFNEY, COOKE, 1984; WAINWRIGHT, COOKE, 1986), em urina e soro (HUSTON, et al., 1982; BROUGHAM et al., 1986; BELOW et al., 2004), em soro (KUDO et al., 2002), LC-ESI-MS para sangue hemolizado (USUI et al., 2006) e CLAE para a determinação de resíduos de clorexidina em leite de vaca (HEBERT et al., 2003). Os parâmetros adotados para estas análises estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em fluidos biológicos

Referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
Bosnevoll et al. (1974).	Espectrometria de cintilação líquida				6,9 ± 1,4 mg	saliva
Jensen et al. (1971)	UV	250	Clorofórmio		5-25 µg/mL e 25-200 µg/mL	saliva
Vries et. al. (1991)	fluorescência	541	Tintura eosin-Y		6,7-20 µg/mL	saliva
Lam et al. (1993)	CLAE - UV	260	Acetonitrila: tampão acetato de sódio e ácido heptanesulfônico pH 5,0	Bekman Ultrasphere ODS C ₁₈	0,05 - 20 µg/mL	saliva
Medlicott et al. (1994).	CLAE com duplo detector	254	Acetonitrila: ácido acético glacial: laurilsulfato de sódio	Exsil ODS-B C ₁₈	2 - 30 µg/mL	saliva
Pesonem et al. (1995)	CLAE com detector variável	260	Acetonitrila: tampão fosfato hidrogênio dissódico, ácido heptanesulfônico e triethileneamine pH 2,5	LiChrospher 100 RP-18	0,5 - 100 µg/mL	saliva
Musteata et al. (2005)	CLAE-ESI-MS		Água acidificada com ácido fórmico (pH 3,2): acetonitrila	Zorbax Eclipse C ₁₈	0,05 - 40 µg/mL	saliva
Gaffney, Cooke (1984)	CLAE -UV	260	metanol: tampão acetato de sódio pH 5,0	µBondapak C ₁₈	1 - 10 µg/mL	urina

Tabela 3. cont. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em fluidos biológicos

Referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
Wainwright, Cooke (1986)	CLAE -UV	260	metanol: solução de amônia: nitrato de amônia	Partisil sílica	50 - 200 µg/mL	urina
Huston et al. (1982)	CLAE -UV	238	yolueno-4-ácido sulfônico em metanol: água	ODS Waters	1 - 20 µg/mL	urina e sangue
Brougham et al. (1986)	CLAE -UV	260	metanol: água com heptanosulfato de sódio	Bondapak C ₁₈	20,2 - 808 ng/mL	soro e urina
Below et al. (2004)	CLAE-UV, gradiente, combinado com extração em fase sólida	250	A: acetonitrila: tampão de solução de amônia e ácido acético pH 8,7 B: acetonitrila: ácido acético	Coluna de separação Luna C ₁₈	2,5 mg/L e 25 mg/L	soro e urina
Kudo et al. (2002)	CLAE -UV	260	acetonitrila: água com 0,05% de ácido trifluoroacético, 0,05% de ácido heptafluorobutírico e 0,1% de trietilamina	Capcell Pak C ₁₈	0,05 - 50 µg/mL	soro
Usui et al. (2006)	LC-ESI-MS* LC-MS: HPLC isocrático		LC-MS: acetonitrila: água: ácido trifluoro acético	LC-MS: TSK gel ODS 100 V	0,10 - 11,0 µg/mL	sangue hemolizado
Hebert et al. (2003)	CLAE -PDA	258	tampão acetato (pH 3,6): acetonitrila	Supelco Discovery RP-Amide C ₁₆	1 - 100 µg/mL	saliva

*cromatografia líquida – ionização eletrospray e espectrometria de massas

Em preparações farmacêuticas, a clorexidina tem sido determinada pelo método de CLAE (BAILEY et al., 1975; BAUER et al., 1983; BAUER et al., 1984; RICHARD et al., 1984; GAGLIARD et al., 1985; HU et al., 1990; GAVLICK, 1992; HÁ, CHEUNG, 1996; HAVLIKOVÁ et al., 2007), extração em fase sólida combinada com análise espectrofotométrica (BONAZZI et al., 1995), cromatografia gás-líquida, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (MIRIBEL et al., 1983) e eletroforese capilar (ABAD-VILLAR et al., 2006). Os parâmetros utilizados nestas análises estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em preparações farmacêuticas

referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
Bailey et al. (1975)	CLAE -UV	254	acetonitrila: ácido sulfúrico 0,02 N	Partisil	0 - 600 $\mu\text{g/mL}$	solução degermante, loção, talco e creme obstétrico, gel dental
Bauer et al. (1984)	CLAE com detector variável	294	acetonitrila: tampão com cloreto de sódio e sulfato hidrogênio tetrabutil amonio pH 5,9	$\mu\text{Bondapack C}_{18}$	0,64 - 2,56 $\mu\text{g/mL}$	pastilha
Bauer et al. (1983)	CLAE com detector variável	262	tampão acetato de sódio pH 3,5: acetonitrila com laurilsulfato de sódio	$\mu\text{Bondapack CN}_{10}$	0,6 – 1,4 $\mu\text{g/mL}$	pastilhas
Gagliard et al. (1985)	CLAE -UV	264	acetonitrila: água com perclorato de sódio	Erbasil C_{18}	0,02 – 6 $\mu\text{g/mL}$	creme
Hu et al. (1991)	CLAE -UV	254	tampão fosfato de dihidrogênio pH 3,5	Nucleosil C_{18}	2,72 - 436 $\mu\text{g/mL}$	solução anti-séptica para lentes de contato
Gavlick (1992)	CLAE PDA	239	Fase A: acetonitrila Fase B: tampão TFA pH 2,0	Suples pkb- 100	9,1 – 146 ppm	produto de limpeza das mãos
Há, Cheung (1996)	CLAE gradiente, com UV-VIS e PDA	235	Fase A: acetonitrila: tampão acetato de amônio pH 5,0 Fase B: tampão fosfato: acetonitrila	Hamilton PRP-1	30 ppm	soluções oftálmicas

Tabela 4. cont. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em preparações farmacêuticas

referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
Fase A: tampão acetato de sódio pH 4,0: ácido acético: metanol: solução de heptanesulfonato de sódio (92,1 0,2: 4,8: 2,9)						
Richard et al. (1984)	CLAE – UV gradiente,	254	Fase B: tampão acetato de sódio pH 4,0: ácido acético: metanol: solução de heptanesulfonato de sódio (4,8: 0,4: 91,9: 2,9)	μBondapck C ₁₈	0,312 – 10 mg/100mL	colírio e soluções anti-sépticas para lente de contato
Zorbax SB						
Havlíková et al. (2007)	CLAE - UV-VIS	239	Acetonitrila: tampão fosfato de sódio em trietilamina pH 3,0	Phenyl column	51,2- 178,5 μg/mL	pomada veterinária
Extração em fase sólida (EFS)						
Bonazzi et al. (1995)	com espectrofotometria derivada			SPE C ₁₈ (para EFS)	7,3 – 36,5 μg/mL	cremes
Abad-Villar et al. (2006)	Eletroforese capilar			capilares de sílica fundida	10 μg/mL – 20 mg/mL	colírio

Tabela 4. cont. Métodos descritos na literatura para análise de clorexidina em preparações farmacêuticas

referência	método	λ (nm)	fase móvel ou solvente	coluna	linearidade	amostra
Cromatografia						
Miribel et al. (1983)	gás-líquida,			3% OV-101		
	espectrofotometria		Nitrogênio (para cromatografia gasosa)	on	0,2 – 2 mg/mL	creme e pomada
	de massas e ressonância magnética nuclear			Chromosorb W HP (gás)		
BP (2005), EP (2005)	CLAE	254	Octanesulfato de sódio: ácido acético: água: metanol	Nucleosil C ₁₈		solução de irrigação, enxagüatório bucal
USP (2008)	CLAE	239	Solução A: tampão fosfato de sódio pH 3,0 com trietilamina em água, misturando com acetonitrila Solução B: acetonitrila	L1		creme oral

Na literatura não foi encontrado método de ensaio microbiológico pela técnica de difusão em ágar para análise quantitativa de solução de digluconato de clorexidina e também não foi encontrado método espectrofotométrico na região de ultravioleta para análise quantitativa de sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina. Por estes motivos, este trabalho se propôs a desenvolver e validar tais metodologias analíticas.

Publicação

FIorentino, F.A.M.; CORREA, M.A.; SALGADO, H.R.N.

Clorexidina, uma revisão.

Revista Bio Farma, (São Paulo), v. 3, n. 6, p. 62-72, 2008.

4. CONTROLE DE QUALIDADE DA SOLUÇÃO DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

4.1. Descrição

4.1.1. Descrição geral

Nome genérico: digluconato de clorexidina, registro número 02437 na DCB, (Brasil, 2006).

Descrição: solução aquosa amarelo-pálido, límpida e quase inodora com sabor amargo (BRITISH, 2005; USP, 2007).

Nome químico: 1,1'-(hexane-1,6-diyl)bis[5-(4-*p*-chlorophenyl)biguanide] di-D-gluconate (BRITISH, 2005).

Nomes: Chlorhexidine digluconate; Chlorheksidino digliukonato tirpalas; Chlorhexidin-diglukonát; Chlorhexidine, Gluconate de; Chlorhexidini Digluconatis Solutio; Chlorhexidini Gluconas; Gluconato de clorhexidina (MARTINDALE, 2007).

Nome comercial: solução aquosa de digluconato de clorexidina[®], Peridex[®], PerioGard[®] (USA); Oro-Clense[®], Peridex[®] (Canadá); Corsody[®], Chlorohex[®] (Reino Unido); Chlorhexamed[®] (Alemanha); Savacol[®] (Austrália); PerioGard[®], Cariax[®], Megatrat[®], Clorexidina[®] (Brasil).

CAS: 18472-51-0

DCI: 0500

Categoria: Anti-séptico bis-biguanida.

Fórmula química: $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2C_6H_{12}O_7$

Massa molecular: 898

Faixa de fusão: Os cristais obtidos com a solução de digluconato de clorexidina fundem entre 132 °C a 136 °C (BRITISH, 2005; USP, 2007).

4.1.2. Substância química de referência

Foi utilizada solução aquosa de digluconato de clorexidina padrão secundário, gentilmente doada pela indústria Rioquímica Ltda, na pessoa da Dra. Greici Cristiani Gomes Tozo, com teor rotulado de 20,98% e identificada pelo lote de número 07/1306, validade 13/06/2009.

4.1.3. Forma farmacêutica

Foi utilizada solução aquosa de digluconato de clorexidina, gentilmente doada pelo Laboratório de Cosmetologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, sob nome comercial

de Solução de Digluconato de Clorexidina (Henrifarma) e identificada pelo lote CS 0120705.

4.2. Análise qualitativa da solução de digluconato de clorexidina

4.2.1. Caracteres físicos

A solução de digluconato de clorexidina utilizada na preparação dos sabonetes foi avaliada em relação ao aspecto, cor e odor.

De acordo com os resultados, a solução de digluconato de clorexidina apresentou-se amarelo-pálida, límpida e quase inodora, demonstrando estar de acordo com o especificado na literatura consultada (BP, 2005; EP, 2005; USP, 2008).

4.2.2. Cromatografia em camada delgada

O objetivo desta análise foi verificar se a solução de digluconato de clorexidina a ser incorporada aos sabonetes líquidos apresenta impurezas.

4.2.2.1. Material

Foram utilizadas solução de digluconato de clorexidina padrão secundário, solução de digluconato de clorexidina amostra e gluconato de cálcio (Henrifarma, São Paulo).

Os solventes utilizados foram de grau analítico e estão relacionados na lista de materiais (p. xxv, item 1): acetato de etila, amônia concentrada, água destilada e etanol, dicromato de potássio, ácido sulfúrico, cromatoplaça de gel de sílica 60 F₂₅₄.

4.2.2.2. Método

A placa utilizada (p. xxv, item 1) para identificação foi ativada a 105 °C por 1 hora em estufa. Foi diluído 1,0 mL da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina em 5,0 mL de água deionizada. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução amostra de digluconato de clorexidina. A solução referência de gluconato de cálcio foi preparada dissolvendo 25,0 mg de gluconato de cálcio em 1 mL de água deionizada (BP, 2005; EP, 2005; USP, 2007).

A cuba foi saturada com o sistema de fase móvel. Após migração de 10 cm da fase móvel, a placa foi seca a 100 °C por 20 minutos, e em seguida, borrifada com solução de dicromato de potássio em solução de ácido sulfúrico para comparação

dos cromatogramas (EP, 2005; USP, 2007). Foram determinados os valores de Rf de cada solução.

4.2.2.3. Resultados

Finalizado o processo cromatográfico, as manchas detectadas com as soluções de digluconato de clorexidina padrão secundário e amostra e solução de referência foram compatíveis, entre si, quanto ao tamanho, local e cor, estando em concordância com o especificado nas monografias e entre si, como pode ser visto na Figura 2.



Figura 2. Cromatograma em camada delgada de solução de digluconato de clorexidina. (1) solução de referência, (2), solução teste, (3), solução padrão secundário, no sistema solvente: acetato de etila: amônia concentrada: água: etanol (1:1:3:5, V:V:V:V). Valor de Rf da solução referência é 0,56, Rf da solução padrão é 0,60 e Rf da solução teste é 0,60.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através de sua distribuição entre duas fases (móvel e estacionária). Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes da mistura se distribuem entre as fases, de forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes compostos. É um método de fácil execução útil na separação, identificação, análise semi-quantitativa das espécies químicas e requer o uso modesto de equipamentos sendo um procedimento importante para locais com pouca infra-estrutura e com treinamento limitado dos operadores, além de ser um método rápido, preciso e com baixo custo (F. Bras., 1988; GIL, 2007).

4.2.3. pH

4.2.3.1. Material

Foi utilizada solução de digluconato de clorexidina padrão secundário e solução de digluconato de clorexidina amostra, descritas no item 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente. A análise foi realizada em peagômetro especificado na lista de equipamentos (p.xxv, item 2).

4.2.3.2. Resultados

O pH obtido com a solução amostra foi 5,94 e com a solução padrão secundário foi 5,75, estando ambas as soluções de acordo com a literatura consultada, que especifica pH entre 5,5 e 7,0 (BP, 2005; USP, 2008) e também estão de acordo entre si.

4.2.4. Determinação da faixa de fusão

O objetivo foi verificar se a solução de digluconato de clorexidina a ser incorporada nos sabonetes apresenta impurezas e se o material cumpre com o requisito farmacopéico.

4.2.4.1. Material

Foram utilizadas solução padrão secundário de digluconato de clorexidina, solução amostra de digluconato de clorexidina, descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.3 respectivamente, solução de hidróxido de sódio 10 N, álcool 70%, papel de filtro, solução de amarelo titânio, conforme descritos em lista de materiais (p. xxv, item 3).

4.2.4.2. Método

A 1,0 mL da solução padrão secundário, foram adicionados 40 mL de água deionizada e isenta de gás carbônico. Foi adicionada solução de hidróxido de sódio 10 N, até que produzisse cor vermelha em papel amarelo titânio, e 1,0 mL da solução de hidróxido de sódio foi adicionado em excesso. O precipitado foi filtrado e lavado com água até que as lavagens estivessem livres de álcalis. O resíduo foi recristalizado com álcool (70% v/v). Os cristais foram secos a 100 °C - 105 °C em estufa por 1 hora, colocados em tubos capilares e introduzidos no equipamento para verificação da faixa de fusão (BP, 2005; EP, 2005; USP, 2008).

A solução amostra de digluconato de clorexidina foi preparada da mesma maneira que a solução padrão. Foram realizadas três determinações para os cristais obtidos com a solução teste e três determinações para a solução padrão secundário.

4.2.4.3. Resultados

O faixa de fusão dos cristais obtidos da solução teste foi 134,03 °C e o PF dos cristais obtidos da solução padrão foi 133,97 °C, estando estes valores de acordo com a literatura consultada que especifica faixa de fusão para cristais de solução de digluconato de clorexidina entre 132 °C - 136 °C (BP, 2005; EP, 2005; USP, 2008). Além disso, estes valores indicam conformidade entre ambas as soluções.

A faixa de fusão é importante tanto para a caracterização de compostos quanto para indicar pureza quando se compara com padrões de referência, pois a presença de impurezas, mesmo que em pequenas quantidades, pode alterar a faixa de fusão de um composto ou diminuir o seu ponto de fusão (GIL, 2007).

Os resultados obtidos sugerem que a solução amostra pode ser identificada como digluconato de clorexidina, e não apresenta impurezas precipitáveis por NaOH 10 N.

4.2.5. Densidade relativa

4.2.5.1. Material

Foi utilizada solução padrão secundário de digluconato de clorexidina e solução amostra de digluconato de clorexidina descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente.

4.2.5.2. Método

Foi realizado conforme o método do picnômetro (F. Bras., 1988). Foram realizadas três determinações para cada solução.

4.2.5.3. Resultados

A densidade relativa da solução-teste foi 1,066 e da solução padrão secundário foi 1,065, estando estes valores de acordo com o especificado pela literatura, que é de 1,06 a 1,07 (BP, 2005; USP, 2008) e em conformidade entre si.

4.2.6. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

O objetivo deste estudo foi verificar se a solução de digluconato de clorexidina a ser incorporada aos sabonetes apresenta impurezas.

4.2.6.1. Material

Foram utilizadas solução padrão secundário de digluconato de clorexidina e solução amostra de digluconato de clorexidina descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente, espectrofotômetro de infravermelho (p. xxv, item 5) e brometo de potássio.

4.2.6.2. Método

Os cristais foram obtidos da mesma maneira como descrito em determinação do ponto de fusão, item 4.2.4.3 e analisados em espectrofotômetro de infravermelho (BP, 2005; EP, 2005; USP, 2008), utilizando KBr como diluente. Foram pesados 100,0 mg de KBr e 1,0 mg de cristal obtido da solução teste do digluconato de clorexidina. O mesmo procedimento foi realizado para solução padrão secundário.

4.2.6.3. Resultados

Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 3 e 4. A Figura 5 apresenta a sobreposição de ambos os espectros.

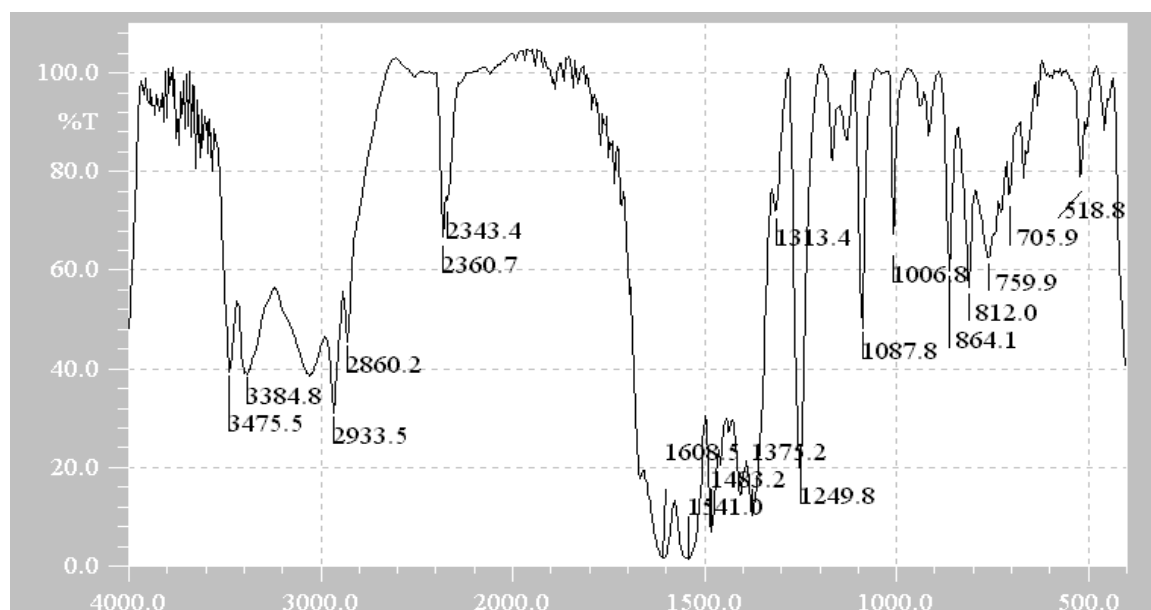


Figura 3. Espectro na região de infravermelho obtido com cristais da solução amostra de digluconato de clorexidina, em pastilhas de KBr.

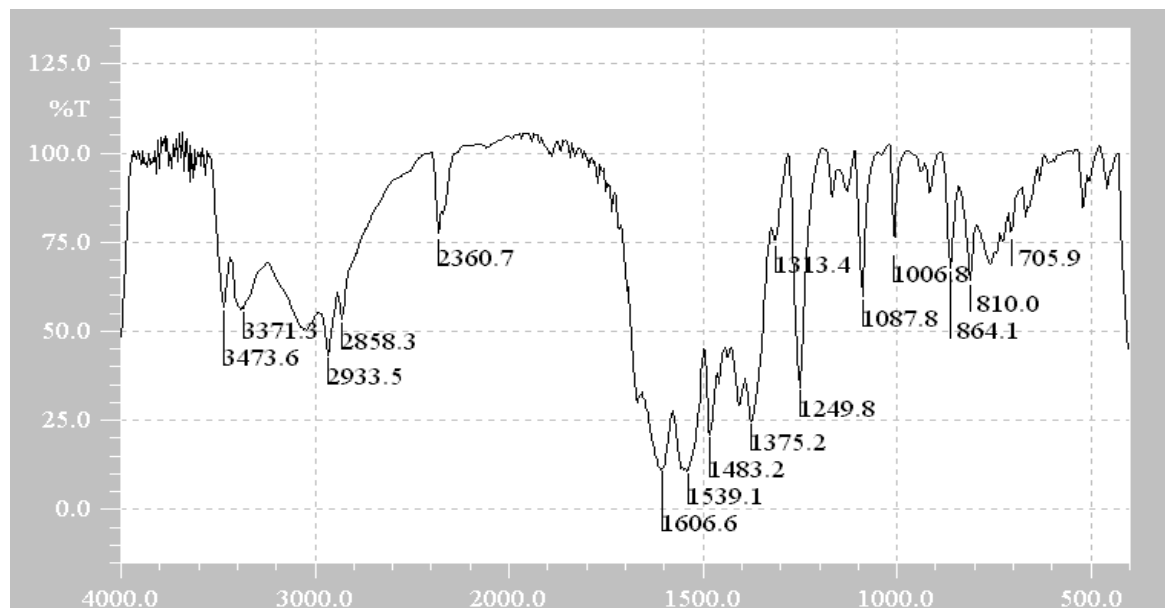


Figura 4. Espectro na região de infravermelho obtido com cristais da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina, em pastilhas de KBr.



Figura 5. Sobreposição dos espectros obtidos com cristais da solução amostra (azul) e solução padrão secundário de digluconato de clorexidina (vermelho), em pastilhas de KBr.

A substância em análise refere-se à clorexidina, pois os picos obtidos no espectro do infravermelho são característicos dos grupamentos químicos presentes

na molécula da clorexidina, como apresentado na Tabela 5, e não demonstra a presença de impurezas precipitáveis por NaOH 10 N.

Tabela 5. Absorção de digluconato de clorexidina substância-teste e substância padrão secundário em espectro de infravermelho em pastilhas de KBr

cm⁻¹	grupo responsável
3470- 3380	Deformação axial dos grupos N-H
2930-2800	Deformação axial do grupo sp^3CH
1600-1540-1480	Deformação axial do anel benzênico
1240	Deformação axial do grupo C-O

Os espectros de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentam picos de absorção característicos como: absorção em 3470 – 3380 cm^{-1} características de presença de N-H; absorção em 1600 – 1540 – 1480 cm^{-1} característica de anel benzênico; absorção em 1240 cm^{-1} característica de C-O, sendo todos condizentes com a estrutura do digluconato de clorexidina como mostrado na Figura 1.

A espectrofotometria no infravermelho situa-se entre as regiões do visível e das microondas. Neste espectro, a correlação pico a pico é uma ótima evidência para a identidade da amostra. O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos originam picos de absorção que ocorrem em frequência próxima independente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN et al., 1994). Este método tem fundamental importância para ensaios de identificação e de fins qualitativos, porém, para ensaios de doseamento sua aplicação é bem limitada (GIL, 2007).

4.2.7. Espectrofotometria na região ultravioleta

4.2.7.1. Material

Foram utilizadas solução padrão secundário e solução amostra de digluconato de clorexidina, descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente. Os solventes utilizados foram de grau analítico.

Os espectros na região de ultravioleta foram obtidos utilizando-se equipamento descrito no item 6, p.xxv, e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

4.2.7.2. Método

A partir da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20% (p/v), foi preparada solução a 0,1%. Uma alíquota de 500,0 μL da solução padrão foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se água deionizada para obtenção de solução a 0,1% (solução A).

4.2.7.2.1. Em água deionizada

A partir da solução A, uma alíquota de 500,0 μL , foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se água deionizada para obtenção de solução a 0,002% (QUITETE et al., 2007).

4.2.7.2.2. Em etanol

A partir da solução A, uma alíquota de 500,0 μL , foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se etanol para obtenção de solução a 0,002%.

4.2.7.2.3. Em ácido clorídrico 0,1 M

A partir da solução A, uma alíquota de 500,0 μL , foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se ácido clorídrico 0,1 M para obtenção de solução a 0,002%.

4.2.7.2.4. Em hidróxido de sódio 0,1 M

A partir da solução A, uma alíquota de 500,0 μL , foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se hidróxido de sódio 0,1 M para obtenção de solução a 0,002%.

4.2.7.3. Resultados

Os espectros de absorção da solução de digluconato de clorexidina na região de ultravioleta estão representados nas Figuras 6 a 9.

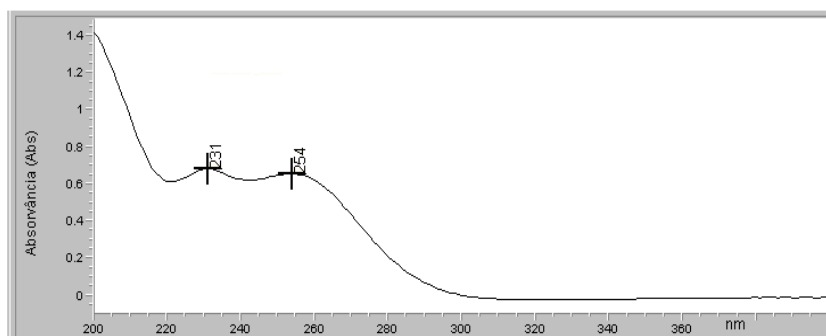


Figura 6. Espectro de absorção na região de ultravioleta de 200 – 400 nm, da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário a 0,002% em água deionizada.

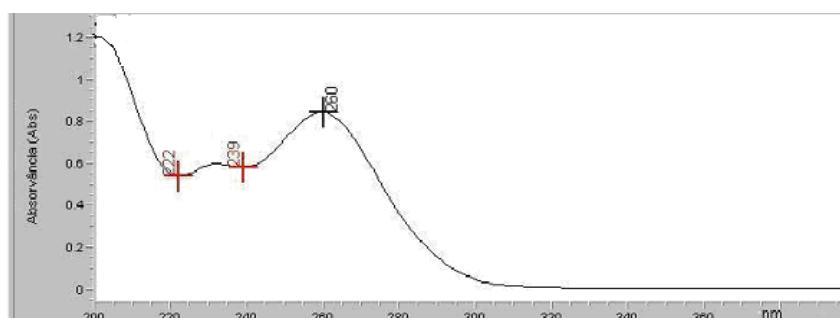


Figura 7. Espectro de absorção na região de ultravioleta de 200 – 400 nm, da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário a 0,002%, em etanol.

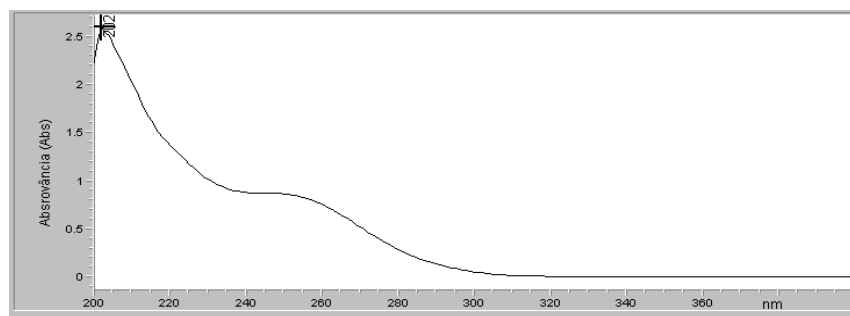


Figura 8. Espectro de absorção na região de ultravioleta de 200 – 400 nm, da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário a 0,002%, em ácido clorídrico 0,1 M.

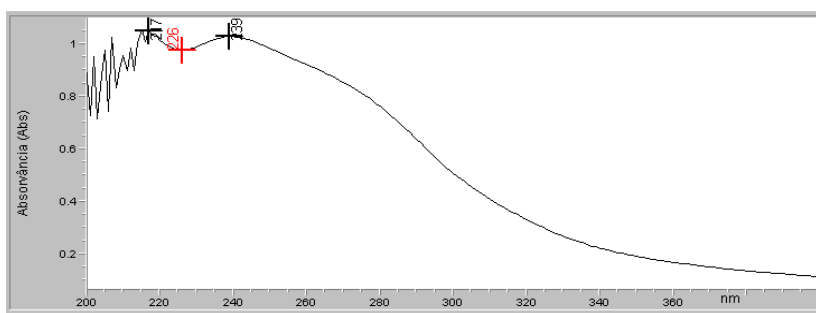


Figura 9. Espectro de absorção na região de ultravioleta de 200 – 400 nm, da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário a 0,002% em hidróxido de sódio 0,1 M.

Para o preparo da solução amostra de digluconato de clorexidina a 0,1%, uma alíquota de 500,0 μL da solução amostra foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se água deionizada como solvente (solução A). A partir da solução A, uma alíquota de 500,0 μL , foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se etanol para obtenção de solução a 0,002%.

O espectro de absorção de digluconato de clorexidina solução amostra obtido em etanol, em concentração de 0,002% na região UV está apresentado na Figura 10. As leituras foram realizadas entre 200 e 400 nm em espectrofotômetro de ultravioleta, utilizando-se cubeta com 1 cm de caminho óptico.

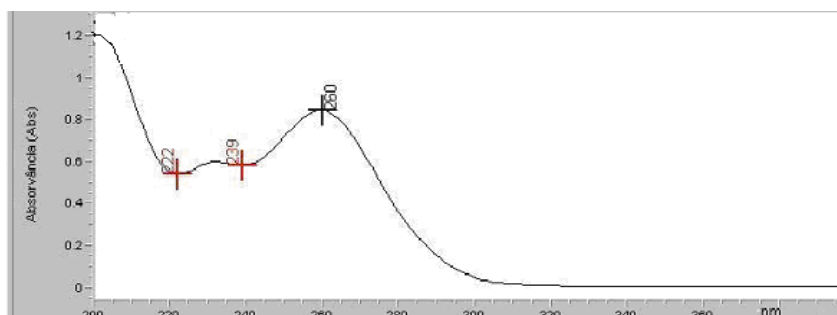


Figura 10. Espectro de absorção na região de ultravioleta de 200 – 400 nm, da solução amostra de digluconato de clorexidina a 0,002% em etanol.

4.2.7.4. Discussão

Diante dos espectros obtidos com os diferentes solventes, optou-se por fazer a identificação da solução amostra de digluconato de clorexidina utilizando etanol como solvente, pois além de apresentar picos bem definidos, possui facilidade de aquisição, baixo custo e poucos resíduos. O ensaio de quantificação do digluconato de

clorexidina no sabonete líquido, utilizou etanol uma vez que o ativo apresentou maior absorção.

Os espectros obtidos com ácido clorídrico 0,1 *M* e hidróxido de sódio 0,1 *M* não foram adequados para identificação da clorexidina, pois para estes solventes não ocorreram sinais que permitissem caracterizar a substância.

De acordo com os resultados obtidos nas análises qualitativas das soluções padrão secundário e amostra de digluconato de clorexidina, concluiu-se que o produto em estudo é realmente a clorexidina pois não houve presença de interferentes precipitáveis por NaOH 10 *N* detectados nos testes de faixa de fusão e espectroscopia no infravermelho e as análises realizadas com a solução também cumpriram com os requisitos farmacopéicos. Portanto, esta solução apresentou-se adequada para ser incorporada às formulações desenvolvidas.

4.3. Análise quantitativa da solução de digluconato de clorexidina

4.3.1. Ensaio microbiológico

O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento e a validação de ensaio de quantificação de solução de digluconato de clorexidina, utilizando o ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

4.3.1.1. Material e método

A partir de parâmetros especificados em ensaios com agentes antimicrobianos como esparfloxacino (MARONA e SCHAPOVAL, 1998), gatifloxacino (SALGADO et al., 2006), lomefloxacino (GOMES e SALGADO 2006), foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem empregadas. Os parâmetros estudados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros testados para avaliação de solução de digluconato de clorexidina no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Meios de cultura	ágar Mueller Hinton ágar Brain Heart Infusion (BHI)
Diluyente	solução tampão fosfato pH 6,8 água deionizada
Concentração da solução padrão	1,0; 2,0 e 4,0% 1,5; 3,0 e 6,0% 0,25; 1,0 e 4,0% 0,5; 1,5 e 4,5% 0,33; 1,0 e 2,0%
Concentração do inóculo	0,5% e 1,0%

4.3.1.2. Execução do ensaio

De acordo com os resultados obtidos com os diferentes microrganismos e meios de cultura foi possível estabelecer parâmetros para realização do doseamento microbiológico, que estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros definidos para o ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, a serem utilizados para análise quantitativa de solução de digluconato de clorexidina

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Meio de cultura	ágar Brain Heart Infusion (BHI)
Diluyente	água deionizada
Concentração da solução padrão	0,5; 1,5 e 4,5%
Concentração do inóculo	1,0%
Temperatura de incubação	35 ± 1 °C
Tempo de incubação	20 horas

4.3.1.3. Preparo das soluções-padrão da solução de digluconato de clorexidina

Foram transferidos 250,0 µL, 750,0 µL e 2250,0 µL de solução de digluconato de clorexidina padrão secundário a 20% para balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com água deionizada estéril, obtendo-se concentrações finais de 0,5; 1,5 e 4,5%.

4.3.1.4. Preparo das soluções de digluconato de clorexidina substância amostra

As soluções amostras foram preparadas como no item 4.3.1.3, porém, utilizando solução amostra de digluconato de clorexidina a 20%.

4.3.1.5. Material

Para o doseamento microbiológico, foi utilizado o meio de cultura ágar Casoy para manutenção da cepa do microrganismo em tubos com meio inclinado, meio de cultura ágar BHI como camada base e camada de superfície contendo o inóculo e caldo BHI para preparo e padronização do inóculo. Os meios de cultura, água deionizada e ponteiros foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Foram empregadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro, sendo que nas tampas foi colocado papel de filtro para impedir que gotículas de condensação invalidassem ou dificultassem a leitura dos halos de inibição. Estes materiais e vidraria não volumétrica foram esterilizados em estufa a 180 °C por 1 hora.

4.3.1.6. Preparo do inóculo

O microrganismo-teste *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mantido em ágar Casoy inclinado em tubo de ensaio, foi repicado para caldo BHI e incubado por 24 horas a $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ para padronização do inóculo realizada em espectrofotômetro a 580 nm com transmitância de $25\% \pm 2\%$ (F. Bras., 1988). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 1% em ágar BHI, mantido em banho a $46\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Os meios de cultura foram preparados como indicado no rótulo do fabricante.

4.3.1.7. Ensaio

A camada base de 20,0 mL de ágar BHI foi adicionada às placas de Petri. Após sua solidificação, foram adicionados 5,0 mL de ágar BHI com inóculo a 1% (v/v), com auxílio de pipetador automático. Após a solidificação desta camada, foi colocado

o *template* em cada placa, cujos orifícios foram preenchidos com 200,0 µL das soluções descritas nos itens 4.3.1.3 e 4.3.1.4, como apresentado na Figura 11. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C e após 20 horas foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, com auxílio de paquímetro digital. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Foram preparadas 12 placas.

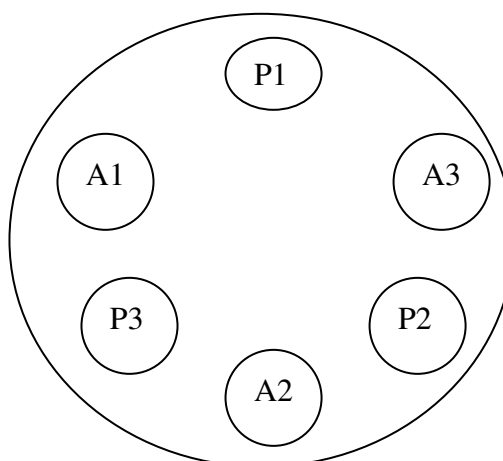


Figura 11. Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções-padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, donde P1 (0,5%); P2 (1,5%); P3 (4,5%) e A1 (0,5%); A2 (1,5%) e A3 (4,5%).

4.3.1.8. Resultados

Os resultados dos valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos para as soluções de diferentes concentrações de solução padrão secundário e solução amostra de digluconato de clorexidina estão na Tabela 8.

Tabela 8. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos com a solução de digluconato de clorexidina, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

	concentração (%)	diâmetro dos halos de inibição (mm)*	diâmetro médio $\pm$ e.p.m. **	DPR%***
P1	0,5	19,32 – 19,31	19,30 $\pm$ 0,0079	0,09
		19,28 – 19,27		
		19,30 – 19,31		
P2	1,5	20,81 – 20,79	20,81 $\pm$ 0,0084	0,09
		20,79 – 20,83		
		20,84 – 20,82		
P3	4,5	22,33 – 22,37	22,37 $\pm$ 0,0087	0,09
		22,39 – 22,38		
		22,36 – 22,38		
A1	0,5	19,24 – 19,27	19,24 $\pm$ 0,0070	0,08
		19,23 – 19,23		
		19,22 – 19,24		
A2	1,5	20,78 – 20,79	20,78 $\pm$ 0,0088	0,09
		20,80 – 20,81		
		20,75 – 20,77		
A3	4,5	22,30 – 22,29	22,30 $\pm$ 0,0048	0,05
		22,32 – 22,31		
		22,30 – 22,29		

(*) cada valor do halo de inibição corresponde à média de 6 determinações; (**) e.p.m. - erro padrão da média e (***) DPR% - desvio padrão relativo percentual

4.3.1.9. Cálculos

4.3.1.9.1. Curva analítica

A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração *versus* diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da

substância padrão secundário. A curva analítica foi construída com os valores da média do diâmetro das concentrações 0,5; 1,5 e 4,5% (Figura 12).

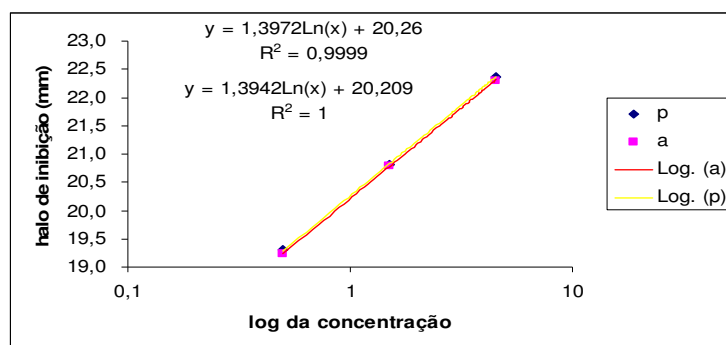


Figura 12. Representação gráfica da curva analítica de solução de digluconato de clorexidina padrão e amostra, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

Para a construção da curva analítica foram utilizados 3 pontos como preconizado pela Farmacopéia (1988) com delineamento 3 x 3. A disposição das soluções-padrão secundário (P) e soluções amostras na placa de Petri após o ensaio está demonstrada na Figura 13.



Figura 13. Resultado do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, da solução de digluconato de clorexidina em concentrações de 0,5; 1,5 e 4,5% utilizando *S. aureus*.

4.3.1.9.2. Cálculo da potência do anti-séptico

A potência do anti-séptico foi calculada através da equação de HEWITT (1977) apresentada na equação 1. Os ensaios foram realizados em dias diferentes, durante 3 dias consecutivos sendo cada ensaio a média de seis determinações, e em cada dia o teste foi realizado em duplicata, denominando-se ensaios I, II, III, IV, V e VI.

Equação de HEWITT

$$T/R (\%) = \text{Antilog } M \times 100$$

$$M = F/b \quad b = E/I$$

Equação 1

Em que: $F = 1/3\{(\overline{A_1} + \overline{A_2} + \overline{A_3}) - (\overline{P_1} + \overline{P_2} + \overline{P_3})\}$

$I = \text{logaritmo da razão das doses}$

$$E = 1/4 \{ \overline{A_3} + \overline{P_3} - (\overline{A_1} + \overline{P_1}) \}$$

Os resultados obtidos na determinação de digluconato de clorexidina em solução no ensaio microbiológico, calculados pela fórmula de HEWITT (1977) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução de digluconato de clorexidina, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

dias	teor de digluconato de clorexidina * (%)	teor médio ± e.p.m.**	DPR (%)***
1	92,54		
2	92,59	92,57 ± 0,03	0,05
3	92,61		

(*) cada valor encontrado é a média de duas leituras, (**) e.p.m., erro padrão da média, (***) DPR%, desvio padrão relativo percentual.

4.3.1.10. Análise estatística

A equação da reta para representação gráfica da curva analítica foi determinada através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva analítica foram utilizados três pontos, cada um representando a média de três determinações.

A validação da metodologia foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopéia (1988) para ensaio 3 x 3 (Tabela 10).

Tabela 10. Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico com a solução de digluconato de clorexidina, pelo método de difusão em ágar

Fontes de variação	GL	SG	QM	F _{calc}	F _{tab}
Preparação	1	0,025	0,025	67,1*	4,24
Regressão	1	56,427	56,427	154264,9*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,00007	0,00007	0,182	4,24
Quadrático	1	0,00009	0,00009	0,243	4,24
Diferença de quadrático	1	0,00222	0,00222	6,075*	4,24
Desvio de linearidade	2	0,002	0,001	3,159	3,38
Entre doses	5	56,454	11,291	30867,7*	2,6
Entre placas	5	0,00166	0,00033	0,905	2,6
Dentro (erro)	25	0,00914	0,00037		
Total	35	56,46			

significativo para $p < 0,5\%$.

4.3.1.11. Teste de Recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; BRASIL, 2003).

4.3.1.11.1. Preparo das soluções

O teste de recuperação do método microbiológico foi realizado como no item 4.3.1.7.

No desenvolvimento do teste de recuperação do doseamento microbiológico foram padronizados valores de 5, 10 e 15% de substância padrão secundário adicionado na amostra. A solução de substância padrão secundário está com concentração de 20%. As soluções amostras foram preparadas transferindo-se 250,0; 750,0 e 2250,0 µL de solução de digluconato de clorexidina amostra a 20% para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume foi completado com água deionizada estéril, obtendo-se concentrações finais de 0,5; 1,5 e 4,5%, respectivamente.

Para a recuperação 1, foram transferidos analiticamente 500,0 µL de solução padrão secundário para balões volumétricos de 10,0 mL contendo 250,0; 750,0 e 2250,0 µL de solução amostra e os volumes foram completados com água deionizada. Para a recuperação 2, foram transferidos 1000,0 µL de solução padrão secundário para cada balões volumétricos de 10,0 mL contendo 250,0; 750,0 e

2250,0 µL de solução amostra e os volumes foram completado com água deionizada. Para a recuperação 3, foram transferidos 1500,0 µL de solução padrão secundário para cada balões volumétricos de 10,0 mL contendo 250,0; 750,0 e 2250,0 µL de solução amostra e os volumes foram completados com água deionizada.

Desta maneira, foram obtidas concentrações teóricas de (amostra + padrão):

- **Para o teste de recuperação 1:** concentrações de 1,5; 2,5 e 5,5%, representando os 5% adicionados de padrão secundário.
- **Para o teste de recuperação 2:** concentrações de 2,5; 3,5 e 6,5%, representando os 10% adicionados de padrão secundário.
- **Para o teste de recuperação 3:** concentrações de 3,5; 4,5 e 7,5%, representando os 15% adicionados de padrão secundário.
- **Soluções padrão secundário e amostra:** 0,5; 1,5 e 4,5%.

As soluções foram preparadas conforme Tabela 11.

Tabela 11. Preparação das amostras de solução de digluconato de clorexidina no teste de recuperação no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

	volume de solução amostra adicionada (µL) (20%)	volume de solução padrão secundário adicionada (µL) (20%)	concentração teórica de amostra + padrão (%)
Recuperação 1			
Amostra a 0,5%	250	500	1,5
Amostra a 1,5%	750	500	2,5
Amostra a 4,5%	2250	500	5,5
Recuperação 2			
Amostra a 0,5%	250	1000	2,5
Amostra a 1,5%	750	1000	3,5
Amostra a 4,5%	2250	1000	6,5
Recuperação 3			
Amostra a 0,5%	250	1500	3,5
Amostra a 1,5%	750	1500	4,5
Amostra a 4,5%	2250	1500	7,5

Após a execução do ensaio, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C $\pm$ 1 °C por 20 horas. Em seguida, os halos de inibição de crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro. A potência do anti-séptico foi calculada pela equação de HEWITT (1977), e a partir do valor encontrado foi calculado o teor de recuperação.

4.3.1.11.2. Cálculo do teste de recuperação

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada de acordo com a expressão descrita em AOAC (1990) e BRASIL (2003).

$$R\% = [(P_F - P_A)/P_P] \times 100$$

Equação 2

Em que: P_F = potência da substância padrão secundário + amostra

P_A = potência da amostra

P_P = potência da substância padrão secundário adicionada

Os resultados do método microbiológico para determinação de digluconato de clorexidina estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Teste de recuperação de amostras de digluconato de clorexidina, no ensaio microbiológico pelo método difusão em ágar

	atividade percentual de padrão adicionada	recuperação (%)	recuperação média (%)
Recuperação 1	5,00	98,6	
Recuperação 2	10,00	98,0	99,03
Recuperação 3	15,00	100,5	

4.3.1.12. Discussão

O ensaio microbiológico é um método físico em que um microrganismo é utilizado como revelador. Emprega-se meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, onde a substância teste se difunde (PINTO et al., 2003).

A fim de assegurar a validade do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar na determinação da potência de solução de digluconato de clorexidina, foram utilizadas três concentrações diferentes para a amostra, idênticas às da

solução padrão secundário, em delineamento 3 x 3. Estas doses estão em progressão geométrica (razão 3), já que o sistema utilizado possui relação linear entre o logaritmo da concentração da substância testada e o diâmetro dos halos de inibição.

As diluições foram estipuladas de acordo com o tamanho do halo produzido, sem que houvesse sobreposição dos halos e que fosse mantida a distância entre eles. O diluente utilizado para preparar as soluções foi água, pois em solução tampão fosfato pH 6,8, houve precipitação da solução de clorexidina, devido à incompatibilidade de cargas catiônicas da clorexidina com o fosfato presente na solução tampão. O *B. subtilis* mostrou-se menos sensível à clorexidina com formação de halos menores e não reprodutíveis, por isso deu-se preferência ao *S. aureus*. A concentração do inóculo utilizada, previamente padronizado em espectrofotômetro em 580 nm com $25\% \pm 2\%$ de transmitância, foi 1%, porque quando se utilizou 0,5% o crescimento de microrganismos não foi homogêneo. Desta forma, padronizou-se o ensaio com *S. aureus* a 1% utilizando-se água como diluente das soluções testadas.

Com os resultados obtidos foi construída a curva analítica das soluções de clorexidina com concentrações de 0,5%; 1,5% e 4,5%, apresentando coeficiente de correlação para o padrão igual a 0,9999, sendo que a equação da reta foi $y = 1,3972\text{Ln}(x) + 20,26$. A amostra apresentou coeficiente de correlação igual a 1, sendo que a equação da reta foi $y = 1,3942\text{Ln}(x) + 20,209$. O valor obtido com os coeficientes de correlação demonstra que o método é linear.

A precisão do método foi obtida empregando-se 6 determinações de digluconato de clorexidina em solução aquosa. O desvio padrão relativo foi 2,94% e o teor de digluconato de clorexidina determinado nas soluções foi calculado pela equação de HEWITT obtendo teor médio de 92,58% (BRASIL, 2003). Para a solução de digluconato de clorexidina foi aceito como limite de variação 10%, baseado na USP (2008), que adota como limite de variação 10% de digluconato de clorexidina em creme oral. Por se tratar também de um produto não estéril e de uso externo, este valor foi utilizado como limite.

A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação pelo método de adição, no qual quantidades conhecidas da substância padrão secundário foram adicionadas às soluções amostras de digluconato de clorexidina para sua quantificação. A média obtida de 99,03%, demonstrou a exatidão do método proposto, que é outro requisito obrigatório dos métodos analíticos (BRASIL, 2003).

4.3.1.13. Conclusão

Diante dos resultados encontrados, o método proposto consiste de uma técnica simples, sem exigir grande infra-estrutura e que permite indicar a potência do produto uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas, de acordo com a F. Bras. (1998) e BRASIL (2003).

**5. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DOS
SABONETES LÍQUIDOS CONTENDO DIGLUCONATO DE
CLOREXIDINA**

5.1. Desenvolvimento das diferentes formulações de sabonete líquido com diferentes concentrações de digluconato de clorexidina

Foram desenvolvidas 4 formulações contendo 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina, totalizando 16 preparações. Houve variação nos tensoativos utilizados nas formulações, a fim de verificar a atividade anti-séptica da clorexidina associada a compostos aniônicos e anfóteros.

5.1.2. Material

Os materiais utilizados para preparação das diferentes formulações de sabonete líquido, bem como seu nome INCI, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Materiais utilizados para as diferentes formulações de sabonete líquido e seus nomes na INCI

Componentes	Nome INCI
Lauriléter sulfato de sódio	Sodium laureth sulfate
Cocoamidopropilbetaína	Cocamidopropyl betaine
Dietanolamida de ácido graxo de coco	Cocamide dea
Lauroilsarcosinato de sódio	Sodium lauroyl sarcosinate
Digluconato de clorexidina	Digluconate chlorhexidine

As formulações foram preparadas conforme apresentado nas Tabelas 14 a 17.

Tabela 14. Preparo da formulação codificada como Formulação 1

Lauriléter sulfato de sódio (L.E.S.S.)	25%
Dietanolamida de ácido graxo de coco (amida 90)	3%
Digluconato de clorexidina	1%, 2%, 3%, 4%
Solução de ácido cítrico a 10%	qsp pH 6,0 – 6,5
Água (q.s.p.)	100%

Tabela 15. Preparo da formulação codificada como Formulação 2

Lauriléter sulfato de sódio (L.E.S.S.)	25%
Cocoamidopropilbetaína	5%
Dietanolamida de ácido graxo de coco (amida 90)	3%
Digluconato de clorexidina	1%, 2%, 3%, 4%
Solução de ácido cítrico a 10%	qsp pH 6,0 – 6,5
Água (q.s.p.)	100%

Tabela 16. Preparo da formulação codificada como Formulação 3

Lauroilmiristilsarcosinato de sódio (L.M.S.S.)	25%
Dietanolamida de ácido graxo de coco (amida 90)	3%
Digluconato de clorexidina	1%, 2%, 3%, 4%
Solução de ácido cítrico a 10%	qsp pH 6,0 – 6,5
Água (q.s.p.)	100%

Tabela 17. Preparo da formulação codificada como Formulação 4

Lauroilmiristilsarcosinato de sódio (L.M.S.S.)	25%
Cocoamidopropilbetaína	5%
Dietanolamida de ácido graxo de coco (amida 90)	3%
Digluconato de clorexidina	1%, 2%, 3%, 4%
Solução de ácido cítrico a 10%	qsp pH 6,0 – 6,5
Água (q.s.p.)	100%

5.1.3. Métodos

Foram preparados 50 g de cada formulação.

Formulação 1. L.E.S.S., amida 90, água e solução de digluconato de clorexidina foram adicionados em béquer de vidro, com agitação manual com auxílio de bastão de vidro.

Como o digluconato de clorexidina está em solução a 20%, foi necessário correção da concentração, ou seja, 1% de digluconato de clorexidina corresponde a 2,5 g de solução de digluconato de clorexidina a 20%; 2% de digluconato de clorexidina correspondem a 5,0 g de solução de digluconato de clorexidina a 20%; 3% de digluconato de clorexidina correspondem a 7,5 g de solução de digluconato de

clorexidina a 20% e 4% de digluconato de clorexidina correspondem a 10,0 g de solução de digluconato de clorexidina a 20%.

Formulação 2. L.E.S.S., amida 90 e água foram adicionados em béquer de vidro, fase (A). Em outro béquer de vidro, foram colocados cocoamidopropilbetaína e a solução de digluconato de clorexidina (B). A fase A foi vertida sobre a fase B com agitação manual com ajuda de bastão de vidro.

Foi feita a correção da concentração como descrito na formulação 1.

Formulação 3. L.M.S.S., amida 90, água e a solução de digluconato de clorexidina foram adicionados em béquer de vidro, com agitação manual, com ajuda de bastão de vidro.

Foi realizada a correção da concentração como descrito na formulação 1.

Formulação 4. L.M.S.S., amida 90 e água foram adicionados em um béquer de vidro, (A). Em outro béquer de vidro, foram colocados cocoamidopropilbetaína e a solução de digluconato de clorexidina (B). A fase A foi vertida sobre a fase B com agitação com auxílio de bastão de vidro.

Foi realizada a correção da concentração como descrito na formulação 1.

5.2. Análise qualitativa das formulações desenvolvidas

5.2.1. Aspectos físicos

Na formulação 1, as preparações com 1 e 2% de digluconato de clorexidina apresentaram-se transparentes, enquanto que as formulações com 3 e 4% de digluconato de clorexidina apresentaram-se turvas.

Na formulação 2, as preparações com 1 e 2% de digluconato de clorexidina, apresentaram-se transparentes, enquanto que as formulações com 3 e 4% de digluconato de clorexidina apresentaram-se turvas.

Na formulação 3, os sabonetes com 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina apresentaram-se transparentes, com ausência de turvação.

Na formulação 4, os sabonetes com 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina apresentaram-se transparentes com ausência de turvação.

5.2.1.1. Discussão

5.2.1.1.1. Formulações

Apesar de a clorexidina ser considerada um excelente agente anti-séptico, seu caráter catiônico traz ressalvas à sua associação a sistemas com caráter aniônico como os sabões e os detergentes sintéticos. A manifestação deste tipo de interação pode ser normalmente visualizada por uma simples turvação do sistema, até situações em que o sistema perde a homogeneidade e pode-se detectar visualmente nítida precipitação. Em tais situações, o principal questionamento diz respeito ao poder anti-séptico. Como os sabonetes líquidos atuais são baseados em concentrações significativas de detergentes aniônicos, e considerando-se a possível interação do detergente com a clorexidina, a possibilidade de interação com manifestada turvação e ou precipitação constitui-se em uma realidade que somente pode ser contornada pelos ajustes de concentração da clorexidina e ou pela inclusão de matérias-primas capazes de sustentarem homogeneidade do sistema e manutenção da possível transparência. Os ajustes quantitativos da clorexidina podem, do ponto de vista técnico, ser realizados com bastante facilidade. Porém, isto não garante a manutenção da atividade antibacteriana e antifúngica.

A adição de tensoativo anfótero pode contribuir para manutenção da atividade da substância ativa, uma vez que contribui para minimizar a interação do complexo aniônico-catiônico formado entre a substância ativa e o tensoativo utilizado, mas esta atividade será averiguada posteriormente no ensaio de determinação da atividade antimicrobiana dos sabonetes líquidos preparados.

Os tensoativos sarcosinatos são agentes de limpeza com boa substantividade para pele e cabelo, sendo usados em xampus e vários tipos de produtos para limpeza das mãos (RIEGER, 1993).

A associação da clorexidina com o tensoativo sarcosinato pode resultar em um complexo inativo, mas solúvel no excesso de tensoativo aniônico ou então a clorexidina permanece ativa em combinação com o sarcosinato (HART, LEVY, 1977).

5.2.1.1.2. Formulação 1

O LESS é tensoativo aniônico e por isso é incompatível com a clorexidina causando a turvação no sabonete; já a dietanolamida do ácido graxo de coco (amida 90) é um tensoativo não iônico, importante para manutenção de viscosidade,

sobreengorduramento e qualidade de espuma da preparação, melhorando a formulação. Possivelmente, o excesso de tensoativo aniônico, frente à baixa concentração de clorexidina (1% e 2%), consiga solubilizar o complexo aniônico-catiônico formado, fato que já não é mais verificado a partir de concentrações mais elevadas de clorexidina, como no caso de 3% e 4%, resultando em turvação (HART, LEVY, 1977).

5.2.1.1.3. Formulação 2

Ocorrem as mesmas interações observadas na formulação 1, entretanto a presença de cocoamidopropilbetaína, que é um tensoativo anfótero, permite uma melhor compatibilidade entre a clorexidina e o LESS, o que possivelmente contribua para manutenção de sua atividade. A turvação é verificada quando se aumenta a concentração de clorexidina, porque o tensoativo já não mais consegue solubilizar o complexo aniônico-catiônico formado (HART, LEVY, 1977).

Os detergentes anfóteros são mais caros, com baixo poder de espuma e pouca viscosidade. Portanto, se fosse preparado o sabonete líquido apenas com esta substância, seria obtido um produto com menos interação com a substância ativa. No entanto, este produto tem elevado custo, dificultando a sua projeção comercial. Desta forma é necessária, a sua associação aos detergentes aniônicos que são economicamente mais acessíveis, com alta qualidade de espuma e alta reserva de viscosidade.

5.2.1.1.4. Formulação 3

O LMSS é um tensoativo aniônico, que, teoricamente, também possibilita a formação de complexo aniônico-catiônico, permitindo, porém que o sistema receba maiores concentrações de clorexidina sem manifestação de turbidez e ou precipitação para as concentrações propostas (HART, LEVY, 1977). Possivelmente sua estrutura química consegue solubilizar tal complexo produzido, até mesmo quando se têm concentrações mais elevadas de clorexidina e por isso não se visualiza a turvação nesta formulação.

5.2.1.1.5. Formulação 4

As interações são as mesmas observadas na formulação 3, mas com a adição de cocoamidopropilbetaína pode haver uma melhora ainda maior na manutenção do

sistema, manifestado visualmente pela ausência de turvação e, sugerindo que a atividade anti-séptica da clorexidina seja menos prejudicada. Entretanto, se fosse preparado o sabonete líquido apenas com esta substância, as mesmas condições em relação aos detergentes anfóteros apresentadas na formulação 2 seriam verificadas.

5.2.2. Determinação de pH

5.2.2.1. Material e método

O pH dos sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina foi medido em peagômetro especificado na lista de equipamentos (p. xxvi, item 8), e para tal os sabonetes foram diluídos 1:10 em água, por serem viscosos e não permitir a leitura pelo eletrodo.

5.2.2.2. Resultados

O pH dos sabonetes líquidos estava entre 8,0 e 9,0. Como este valor de pH não é o ideal para clorexidina (o ideal é entre 5,5 e 7,0 como foi visto no item 2.1), e para a pele, então foi realizada a correção do pH com solução de ácido cítrico a 10% até que atingisse valor entre 6,0 e 6,5, que é condizente com o ativo e com a pele.

5.2.3. Determinação da viscosidade

Foi verificada em viscosímetro de Brookfield, utilizando-se haste L1 para os sabonetes das formulações 1, 3 e 4 e haste L2 para a formulação 2, que por ser mais viscosa e não permitiu leitura com haste L1.

5.2.3.1. Resultados

Os resultados da viscosidade obtida com os sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de viscosidade obtidos com os sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina em viscosímetro de Brookfield

Amostra *	Valor de viscosidade em mili Pascal
1a	20
1b	547
1c	590
1d	499
2a	9859
2b	220
2c	219
2d	109
3a	7
3b	8
3c	38
3d	1231
4a	8
4b	10
4c	159
4d	1080

* Os números indicam a formulação e as letras indicam a concentração da solução de digluconato de clorexidina presente em cada sabonete líquido, assim, 1 é formulação 1; 2 é formulação 2; 3 é formulação 3 e 4 é formulação 4; a, b, c, d indicam a concentração de 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina respectivamente.

5.2.3.2. Discussão

A diferença entre as viscosidades deve-se à presença da clorexidina nas diferentes formulações, em diferentes concentrações.

Na formulação 1, o aumento de viscosidade nas preparações com 1% e 2% de digluconato de clorexidina é devido ao sistema micelar do tensoativo que intumescce suas micelas, e ao adicionar maior quantidade de clorexidina, o sistema permanece estável porque as micelas não incham mais por já terem atingido sua estabilidade (WILLIAMS, SCHIMITT, 1996).

Na formulação 2 ocorrem as mesmas interações observadas na formulação 1, entretanto a presença de cocoamidopropilbetaína aumenta o tamanho das micelas, favorecendo a organização do sistema e, conseqüentemente, o aumento de

viscosidade (com 1% de clorexidina). A partir de concentrações mais elevadas de substância ativa, as micelas do componente anfótero não suportam o excesso de clorexidina e o sistema perde viscosidade (WILLIAMS, SCHIMITT, 1996).

Nas formulações 3 e 4 com 1% e 2% de dilguconato de clorexidina não há aumento considerável da viscosidade, pois as micelas ainda não incharam suficientemente, entretanto, ao elevar a concentração de clorexidina para 3% e 4% há aumento da viscosidade devido ao sistema micelar do tensoativo que intumescce suas micelas.

A viscosidade se mantém mais estável nas formulações 3 e 4, provavelmente devido à melhor manutenção do sistema com uso de tensoativo aniônico sarcosinato, que possibilita a formação de complexo aniônico-catiônico estruturalmente mais compatível com a clorexidina (WILLIAMS, SCHIMITT, 1996).

5.3. Controle microbiológico das formulações desenvolvidas

O objetivo deste ensaio foi avaliar a qualidade microbiológica dos sabonetes líquidos, bem como verificar a sua concordância com a legislação vigente.

5.3.1. Material e método

5.3.1.1. Contagem do número total de microrganismos viáveis

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g de cada formulação para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. As amostras 1:10 foram agitadas em vortex por 10 min. Após, em placas de Petri previamente esterilizadas, foi pipetado 1,0 mL de cada amostra 1:10 e adicionado 20,0 mL ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras, previamente esterilizados e mantidos a $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após solidificação dos meios, as placas foram colocadas em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h para a pesquisa de bactérias e $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para fungos. Este ensaio foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas em posição invertida (PINTO et al., 2003). Os meios de cultura foram preparados como indicado no rótulo pelo fabricante.

5.3.1.2. Pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g de cada formulação para 90,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, incubados a

35 °C $\pm$ 1 °C durante 24 h. Após, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para 1 tubo contendo caldo tetrationato e 1 tubo contendo caldo selenito cistina, e incubados a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h. Após, a amostra foi semeada do caldo tetrationato para 1 tubo contendo ágar verde brilhante (VB) e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e duas placas de Petri com ágar bismuto sulfito (BS). Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h, sendo que as placas foram incubadas em posição invertida. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* spp, quando presente, é feita pela técnica de Gram.

Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina-azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h. A confirmação de *E. coli*, quando presente, é feita pelo método de Gram. As placas foram incubadas em posição invertida (PINTO et al., 2003). Os meios de cultura foram preparados como indicado no rótulo pelo fabricante.

5.3.1.3. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g de cada formulação para 90 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e incubados a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h. Após, 1,0 mL foi semeado em placa de Petri contendo ágar Vogel Johnson (VJ), para a pesquisa de *S. aureus* e em placa de Petri com ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a 35 °C $\pm$ 1 °C por 24 h, sendo que as placas foram incubadas em posição invertida (PINTO et al., 2003). Os meios de cultura foram preparados como indicado no rótulo pelo fabricante. A confirmação das bactérias foi feita pelo método de Gram.

5.3.2. Resultados

Os resultados obtidos na análise microbiológica das formulações desenvolvidas permitiram observar que não houve crescimento de microrganismos na contagem do número total de bactérias e fungos e também não houve presença das bactérias pesquisadas.

5.3.3. Discussão

Em produtos não estéreis é aceitável a presença de carga microbiana dentro dos limites recomendados pela RDC 481 de 23 de setembro de 1999, da ANVISA, mas com ausência de determinadas cepas patogênicas. O controle de qualidade microbiológico destes produtos assegura que a carga microbiana presente não comprometa sua qualidade final, e nem coloque em risco a saúde do consumidor.

Para produtos farmacêuticos, o número total de microrganismos presentes deve ser inferior a 10^2 a 10^3 UFC/g (mL) ou, no máximo, 5×10^2 a 5×10^3 UFC/g (mL) de amostra e não apresentar *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp e *E. coli*. Para produtos cosméticos, há uma classificação, na qual produtos cosméticos tipo I (para área dos olhos, para bebês e para peles com acne), o limite é 10^2 ou, no máximo, 5×10^2 UFC/g (mL) de microrganismos totais aeróbicos e no caso de talcos, ausência de clostrídios sulfito-redutores; e para produtos do tipo II (produtos para demais áreas do corpo), é 10^3 ou, no máximo, 5×10^3 UFC/g (mL) de amostra. Para os dois tipos é exigida a ausência de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp e *E. coli* (F. Bras., 1988; BRASIL, 1999; PINTO et al., 2003; ANDRADE et al., 2005).

A contagem do número total de microrganismos foi realizada pela técnica de *pour plate* por proporcionar crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios.

**6. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
SABONETES LÍQUIDOS DESENVOLVIDOS CONTENDO
DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a atividade antimicrobiana *in vitro* das formulações desenvolvidas de sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina em diferentes concentrações sobre bactérias patogênicas e fungos de importância em saúde pública tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, pois, embora a clorexidina tenha eficácia antimicrobiana comprovada, é necessário demonstrar se tal eficácia se mantém no produto desenvolvido, tendo em vista a possibilidade de inativação da clorexidina por componentes da formulação.

6.1. Métodos

6.1.1. Técnica de difusão em ágar

É também chamada de método indireto para determinação da atividade antimicrobiana ou método de Kirby e Bauer, que a desenvolveu nos anos de 1960 (TRABULSI, 1991). O potencial antimicrobiano se mostra nas áreas de inibição de crescimento, em que uma placa com ágar nutriente é inoculada com o microrganismo-teste e o antimicrobiano é disposto em pontos equidistantes na placa com auxílio de discos de papel ou cilindros de aço inoxidável ou de vidro. Após incubação por 24 a 48 h, se observa a formação de halo de inibição de crescimento ao redor da substância testada (ALCAMO, 2001; TORTORA et al., 2005).

6.1.2. Técnica de microdiluição

Este método foi validado em 1992 e constitui uma técnica que emprega placas de 96 poços com a transferência seriada de 100 µL entre produto a ser analisado e caldo, totalizando 200 µL de volume em cada poço entre o microrganismo a ser testado e a concentração do produto a ser analisado. A microplaca é incubada a 36 °C ± 1 °C durante 24-48 h. Depois deste período, é analisada visualmente e/ou espectrofotometricamente quanto ao crescimento microbiano, através da turvação do meio de cultura (KOLODZIEJ et al., 1999). Também pode ser realizada leitura através do uso de corante. A diluição que não apresentar turvação indica a concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste (PELCZAR et al., 1997).

6.1.3. Microrganismos utilizados

Foram utilizados isolados de bactérias e leveduras de coleções padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) Instituto Adolfo Lutz (IAL) (IAL 1606), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228 IAL 2150), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 IAL 1028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541), *Escherichia coli* (ATCC 25922 IAL 2393), *Salmonella* spp (ATCC 19196) e *Candida albicans* (ATCC 64548).

6.2. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar

6.2.1. Material e método

6.2.1.1. Preparo do inóculo

6.2.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O inóculo de cada bactéria utilizada neste ensaio foi adaptado e padronizado de acordo com os trabalhos realizados por Melo e colaboradores (2006), Souza e colaboradores (2007), Alvarenga e colaboradores (2007) e segundo o documento do NCCLS (2003). Cultura de colônias isoladas de cada bactéria foi obtida em caldo BHI por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foi transferida uma alíquota deste inóculo para solução salina estéril e então foi ajustada a turvação até o tubo 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

6.2.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica

O inóculo da levedura utilizada neste ensaio foi adaptado dos trabalhos realizados por Lima e colaboradores (2006) e por Antunes e colaboradores (2006). Cultura de colônias isoladas de *C. albicans* foi obtida em caldo Sabouraud por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foi transferida uma alíquota deste inóculo para solução salina estéril e então foi ajustada a turvação até o tubo 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

6.2.1.1.3. Padronização e adaptação dos ensaios de atividade antimicrobiana dos diferentes sabonetes líquidos contendo 1, 2, 3, e 4% de digluconato de clorexidina, pelo método de difusão em ágar

Os ensaios de atividade antimicrobiana dos diferentes sabonetes líquidos contendo 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina, pelo método de difusão em ágar, foram realizados de acordo com método de Kirby-Bauer, porém modificado, no qual foram utilizados ágar BHI e ágar Sabouraud para bactérias e fungos, respectivamente. Foram utilizados *templates* de aço inoxidável, em que 200 µL de cada sabonete foram adicionados em cada orifício. Foi realizado um controle adicionando 200 µL de solução de digluconato de clorexidina a 1%, a fim de verificar se tais microrganismos são sensíveis a este anti-séptico e também foram adicionados 200 µL de cada preparação de sabonete líquido sem o anti-séptico, a fim de verificar se apenas o sabonete possui alguma atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados.

Foram preparados, para cada placa, 20 mL de ágar como camada base e 5,0 mL de ágar para camada de superfície. Ao ágar superfície esterilizado e mantido líquido a $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram adicionados 10% do inóculo previamente padronizado. Após solidificação, foi colocado em cada placa o *template* sobre o ágar. Em cada orifício foi transferida uma alíquota de cada amostra como descrito anteriormente. As placas foram deixadas em geladeira a $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas para que ocorresse difusão dos sabonetes no ágar, e impedisse o desenvolvimento microbiano. A seguir, as placas foram incubadas por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram feitas três placas para cada formulação com 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina, solução de clorexidina a 1% e sabonete sem o anti-séptico para cada microrganismo testado, totalizando 72 placas para bactérias e 12 placas para fungo. Os resultados dos halos de inibição de crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro digital.

O esquema da distribuição das amostras está apresentado na Figura 14.

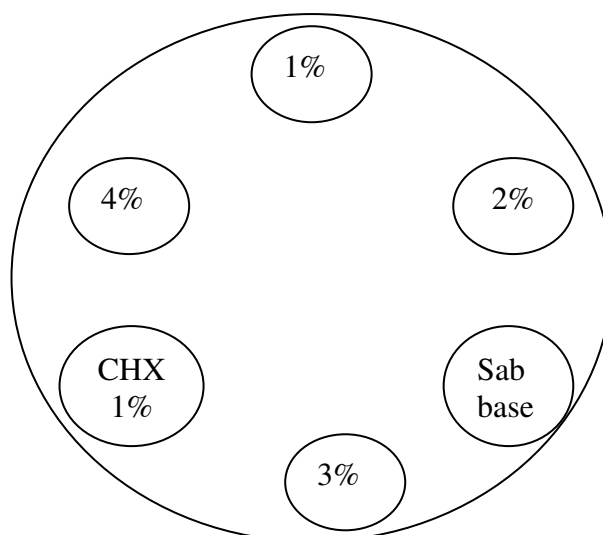


Figura 14. Esquema da disposição dos sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina, sabonete líquido base (sem o ativo) e a solução de digluconato de clorexidina a 1%, na placa de Petri para o ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

6.2.2. Resultados

A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Tabela 19. Valores em mm dos halos de inibição de crescimento obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

diâmetro dos halos de inibição (mm)							
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
	spp						
Sab. 1	-	-	-	-	-	-	-
1a	-	-	-	-	-	-	-
1b	-	-	-	-	-	-	-
1c	-	-	-	-	-	-	-
1d	-	-	-	-	-	-	-
CHX 1%	18,57 ± 0,03	14,20 ± 0,01	12,72 ± 0,03	14,90 ± 0,02	20,09 ± 0,02	29,15 ± 0,01	8,30 ± 0,03
Sab. 2	-	-	-	-	-	-	-
2a	-	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-
2c	-	-	-	-	-	-	-
2d	-	-	-	-	-	-	-
CHX 1%	18,53 ± 0,04	14,18 ± 0,03	12,80 ± 0,04	14,92 ± 0,03	20,12 ± 0,02	29,26 ± 0,03	8,14 ± 0,02
Sab. 3	21,32 ± 0,03	-	-	-	20,24 ± 0,03	29,24 ± 0,03	-
3a	17,35 ± 0,02	-	-	-	22,57 ± 0,04	23,91 ± 0,03	-
3b	15,60 ± 0,02	-	-	-	16,49 ± 0,03	18,04 ± 0,04	-
3c	-	-	-	-	-	-	-
3d	-	-	-	-	-	-	-
CHX 1%	18,55 ± 0,02	14,15 ± 0,02	12,88 ± 0,01	14,80 ± 0,02	20,14 ± 0,04	29,27 ± 0,02	8,36 ± 0,03
Sab. 4	21,90 ± 0,02	16,30 ± 0,02	-	-	19,80 ± 0,02	28,32 ± 0,04	-
4a	17,80 ± 0,02	15,90 ± 0,03	-	-	18,16 ± 0,04	22,74 ± 0,03	-
4b	13,60 ± 0,03	12,60 ± 0,02	-	-	10,65 ± 0,03	17,10 ± 0,04	-
4c	-	-	-	-	-	-	-
4d	-	-	-	-	-	-	-
CHX 1%	18,48 ± 0,03	14,11 ± 0,03	12,50 ± 0,03	14,96 ± 0,02	20,20 ± 0,03	29,20 ± 0,05	8,28 ± 0,02

(Sab. 1), Sabonete base, sem adição de digluconato de clorexidina; (Sab. 2), Sabonete base, sem adição de digluconato de clorexidina; (Sab. 3), Sabonete base, sem adição de digluconato de clorexidina, (Sab. 4), Sabonete base, sem adição de digluconato de clorexidina; (-), indica ausência de halo de inibição; (CHX 1%), solução de digluconato de clorexidina a 1%; os números indicam a formulação; as letras indicam a concentração de clorexidina, ou seja, a, 1%; b, 2%; c, 3% e d, 4% de clorexidina presente em cada formulação. Os valores são médias de três determinações.

Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 15 a 18.

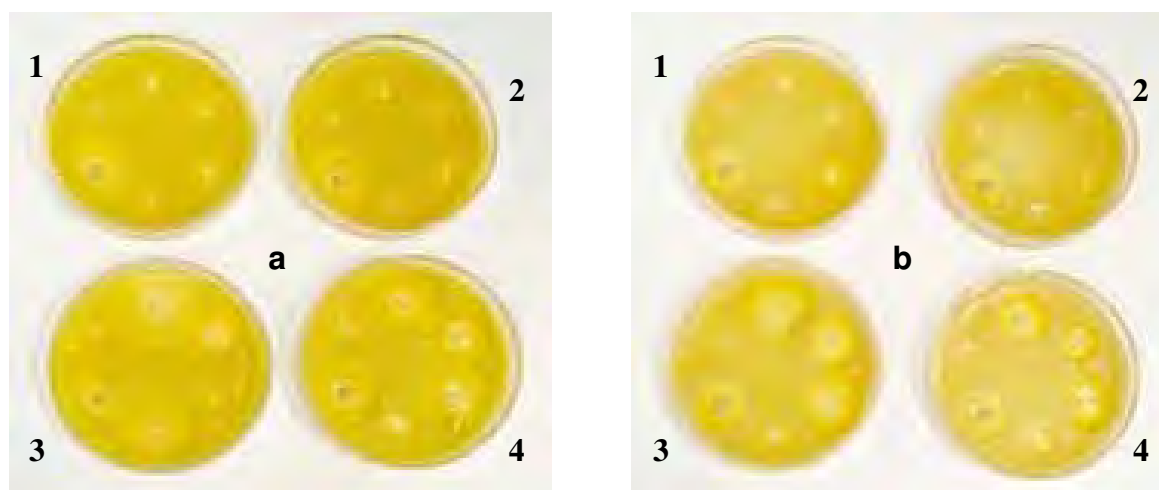


Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a *S. aureus* (a) e *E. faecalis* (b), em que: 1, sabonetes base e formulação 1 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 2, sabonetes base e formulação 2 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 3, sabonetes base e formulação 3 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 4, sabonetes base e formulação 4 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina e em todos há solução de digluconato de clorexidina a 1% conforme esquema apresentado na Figura 14.

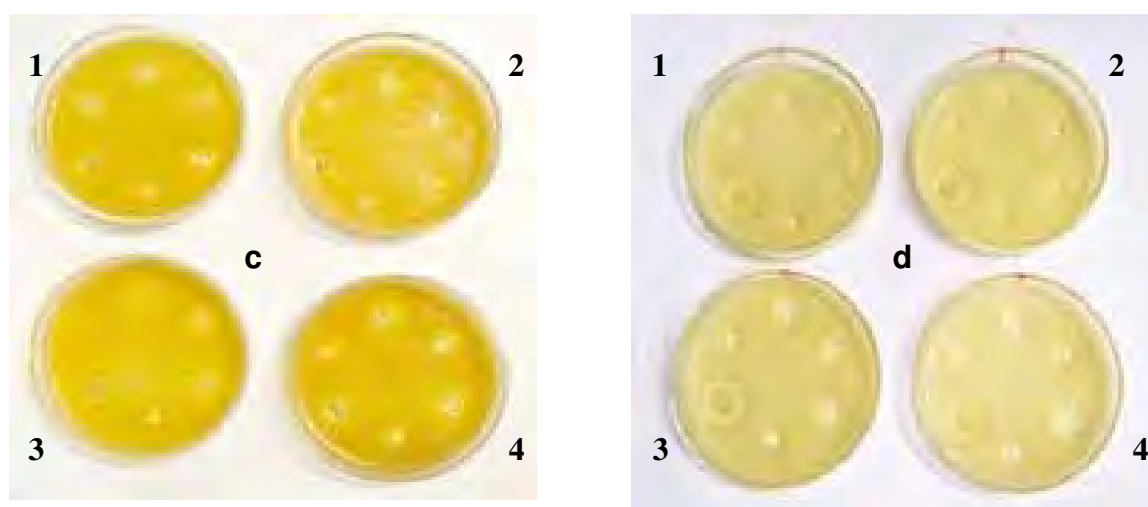


Figura 16. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a *E. coli* (c) e *C. albicans* (d), que: 1, sabonetes base e formulação 1 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 2, sabonetes base e formulação 2 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 3, sabonetes base e formulação 3 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 4, sabonetes base e formulação 4 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina e em todos há solução de digluconato de clorexidina a 1% conforme esquema apresentado Figura 14.

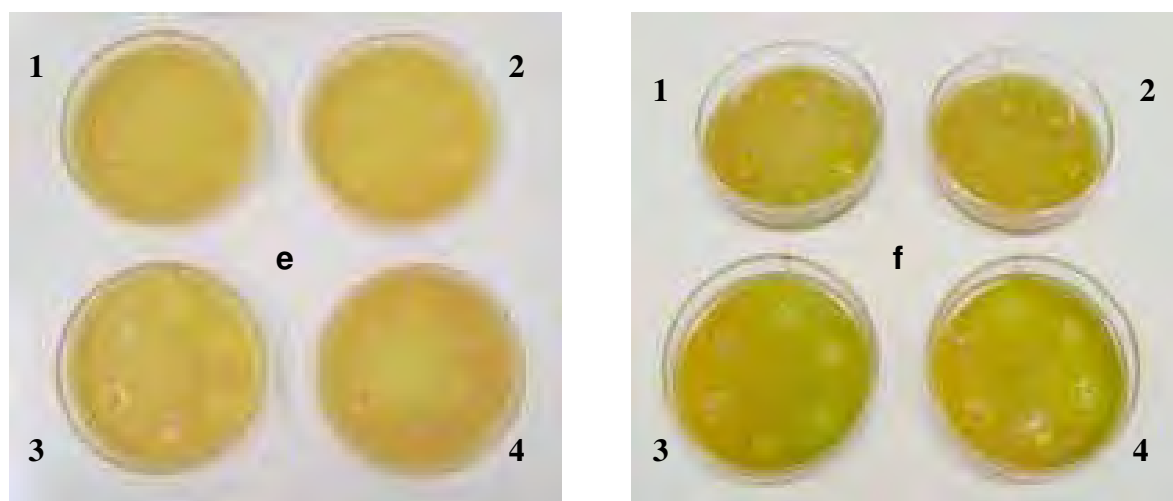


Figura 17. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a *Salmonella* spp (e) e *P. aeruginosa* (f), em que: 1, sabonetes base e da formulação 1 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 2, sabonetes base e da formulação 2 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 3, sabonetes base e da formulação 3 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 4, sabonetes base e da formulação 4 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina e em todos há solução de digluconato de clorexidina a 1% conforme esquema apresentado na Figura 14.

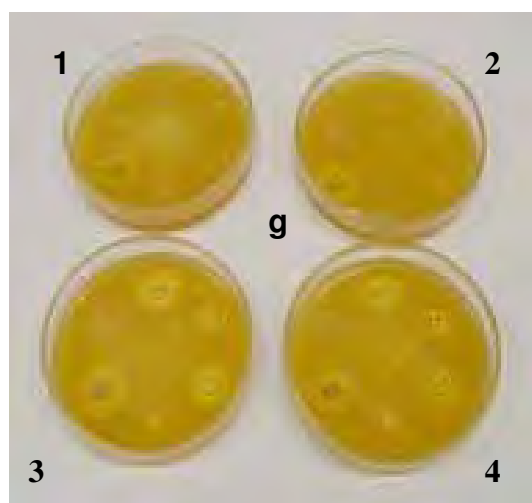


Figura 18. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar frente a *S. epidermidis* (g), em que: 1, sabonetes base e da formulação 1 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 2, sabonetes base e da formulação 2 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 3, sabonetes base e da formulação 3 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina; 4, sabonetes base e da formulação 4 contendo 1%, 2%, 3% e 4% de clorexidina e em todos há solução de digluconato de clorexidina a 1% conforme esquema apresentado na Figura 14.

6.2.3. Discussão

A escolha do produto ideal com a finalidade de impedir ou inibir o crescimento microbiano tem sido motivo de grande preocupação entre os profissionais da saúde, especialmente, considerando a diversidade de produtos, grande oferta de mercado e variações de orientações quanto às indicações e ao uso (ANDRADE et al., 2007). Os produtos com este objetivo devem apresentar amplo espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana (ALVARENGA et al., 2007). Alguns são ativos contra um grande número de microrganismos, enquanto outros podem ser ativos contra poucas espécies. Entretanto, não há um antimicrobiano ideal para todas as finalidades, por isso se faz necessário o estudo de vantagens e desvantagens de certo antimicrobiano em cada situação em que seu uso se faz útil (PELCZAR et al., 1997).

A clorexidina é um anti-séptico com largo espectro de ação como já foi dito na introdução deste trabalho e diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar sua atividade antimicrobiana (GOMES et al., 2001; SASSONE et al., 2003; ESTRELA et al., 2004; SEABRA et al., 2005; MOREIRA, WANDERLEY-CRUZ, 2005; TANOMARU et al., 2005; BUXBAUM et al., 2006; TANOMARU et al., 2007).

Os sabonetes foram preparados sem adição de conservantes para que não houvesse interferência nos resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana.

No ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, as formulações 1 e 2, que contêm lauriléter sulfato de sódio, não apresentaram halo de inibição de crescimento frente aos microrganismos testados, provavelmente por não conseguirem se difundir no ágar devido à viscosidade destas formulações com maiores concentrações de clorexidina, pode ter havido interferência entre a carga do tensoativo e o pH do meio de cultura sólido, entre a concentração de clorexidina e o pH do meio de cultura sólido e entre o tensoativo e a clorexidina, formando um complexo aniônico-catiônico que impediu a difusão da clorexidina no ágar.

A solução aquosa de digluconato de clorexidina a 1% formou halo de inibição de crescimento demonstrando que tal substância possui atividade sobre estes microrganismos, como é citado na literatura (GOMES et al., 2001; ESTRELA et al., 2003 b; ESTRELA et al., 2004; RADEVA et al., 2005; TANOMARU et al., 2005; BUXBAUM et al., 2006), e que em baixa concentração neste veículo não há interferência com o meio de cultura sólido.

Para os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*, as formulações 3 e 4, que contêm lauroilmiristilsarcosinato de sódio, apresentaram halos de inibição de crescimento microbiano para o sabonete sem adição do anti-séptico, com 1 e 2% de clorexidina, em tamanho decrescente respectivamente. Esta diminuição da atividade inclusive em relação ao sabonete base pode ser devido ao aumento da viscosidade ao elevar a concentração de clorexidina e isso dificultou a difusão, ao aumento das interações das maiores concentrações da clorexidina com o pH do meio de cultura sólido e devido às interações da clorexidina com o tensoativo, pois apesar de o lauroilmiristil ser estruturalmente mais compatível com a clorexidina, pode ser que com as concentrações mais elevadas do ativo houve formação de complexo aniônico-catiônico que impediu a difusão da clorexidina no ágar. Estas dificuldades podem ser a causa de também não ter havido formação de halo de inibição de crescimento para os sabonetes líquidos com 3 e 4% de clorexidina.

Frente à *P. aeruginosa* (Figura 17 f), apenas a formulação 4 mostrou halo de inibição de crescimento no ensaio por difusão em ágar para os sabonetes base, sabonetes com 1 e 2% de clorexidina, entretanto para o sabonete líquido contendo 2% de ativo, o halo de inibição de crescimento foi menor, provavelmente pelo motivo do aumento da viscosidade e das interações destas formulações com aumento de princípio ativo.

Em nenhuma formulação houve formação de halo de inibição de crescimento frente aos microrganismos *E. coli*, *Salmonella* spp e *C. albicans*, mas houve formação de halo de inibição de crescimento para a solução de digluconato de clorexidina a 1%, evidenciando que estes microrganismos são sensíveis ao anti-séptico em estudo. Entretanto, a *C. albicans* mostrou halo de inibição de crescimento menor, mas de acordo com a literatura, este microrganismo também é sensível à clorexidina (KABARA, 1984; CANDIDO et al., 1996; FARIA et al., 2003; ESTRELA et al., 2003b; IMBERT et al., 2003; ESTRELA et al., 2004).

O fato de ter havido formação de halo de inibição de crescimento para os sabonetes das formulações 3 e 4 (que contêm lauroilmiristilsarcosinato de sódio) e não ter havido halo de inibição de crescimento microbiano para os sabonetes das formulações 1 e 2 (que contêm lauriléter sulfato de sódio), pode ser porque o tensoativo sarcosinato apresentou menor interação com o meio de cultura sólido e melhor atividade antimicrobiana em relação ao lauriléter, uma vez que Balsam e colaboradores (1972), relatam a redução de 20 a 30% na incidência de cáries quando os indivíduos

utilizaram dentifrícios contendo 2% de lauroilmiristilsarcosinato de sódio em relação ao grupo controle com outros dentifrícios.

O excesso de clorexidina eleva o custo do produto, eleva o risco de toxicidade ao paciente e eleva o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana. Thomas e colaboradores (2000) mencionam que uma maneira de haver resistência à clorexidina é o modo como é usada, por exemplo, clorexidina a 4% geralmente é especificado, mas após o uso, uma concentração residual pode permanecer abaixo da concentração inibitória mínima para algumas bactérias, que podem desenvolver resistência.

Os microrganismos mais sensíveis aos sabonetes foram *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*, enquanto que os mais resistentes foram *Salmonella* spp, *E. coli* e *P. aeruginosa*, dados que corroboram com a literatura, que diz que a clorexidina é mais ativa frente a microrganismos Gram-positivos e menos ativa frente a microrganismos Gram-negativos (HENESSEY, 1973; SILVA et al., 2000; SILVA, JORGE, 2002; ESTRELA et al., 2003a).

Com a finalidade de facilitar a difusão dos sabonetes no ágar, foi adicionado 1% e 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) aos sabonetes, entretanto os resultados obtidos não demonstraram alteração nos valores dos halos de inibição microbiana encontrados.

6.2.4. Conclusão

Diante dos resultados, a técnica de difusão em ágar foi ineficaz para analisar as formulações pelo fato de a difusão no ágar ter sido prejudicada pela viscosidade, pelas possíveis interações entre o tensoativo e o meio de cultura, entre o excesso de clorexidina e o pH do meio de cultura e entre a clorexidina e o tensoativo. O resultado apresentado pode ser falso negativo, sendo que a ausência de formação de halo de inibição de crescimento pode ser devido à dificuldade de difusão dos produtos no ágar e não devido realmente à falta de atividade dos produtos em análise.

Os halos de inibição de crescimento microbiano apresentados pelas formulações 3 e 4 são devido ao tensoativo sarcosinato que interagiu menos com o meio de cultura sólido e possui atividade antimicrobiana superior à do tensoativo lauriléter, pois ao adicionar maior quantidade de clorexidina, houve diminuição do tamanho dos halos de inibição de crescimento por causa da interação da clorexidina com o meio de cultura sólido e com o tensoativo sarcosinato.

6.3. Determinação da atividade antimicrobiana dos sabonetes líquidos desenvolvidos contendo 1, 2, 3 e 4% de digluconato de clorexidina, pelo método da microdiluição em caldo

Este ensaio foi realizado no laboratório de Fisiologia de microrganismos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) com a colaboração da Prof^a. Dra. Taís Maria Bauab.

6.3.1. Preparo do inóculo

6.3.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

Foi realizada de acordo com o documento do NCCLS (2003) em que cultura de colônias isoladas de cada bactéria foi obtida em caldo BHI por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foi transferida uma alíquota deste inóculo para solução salina estéril e a turvação foi ajustada até 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

6.3.1.2. Padronização da suspensão fúngica

Foi realizada segundo o documento do NCCLS (2002), em que uma subcultura de *Candida albicans* em tubo de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose foi incubada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, foram transferidas 5 colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm para 5 mL de solução salina estéril. Os tubos foram agitados em vórtex e a densidade foi ajustada em espectrofotômetro em 530 nm, até que se obtivesse transmitância equivalente a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL). Logo após, foi feita diluição 1:100 em caldo Sabouraud. Foi feita uma segunda diluição, sendo 1:20, também em caldo Sabouraud, resultando em concentração de 5×10^2 a 25×10^2 células/mL.

6.3.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antimicrobiana dos sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina, através do método da microdiluição

Em placa de 96 poços com fundos chatos, foram pipetados 150 µL de sabonete puro (sem adição de clorexidina) em dois poços (A1, A2); 150 µL de sabonete com 1% de clorexidina em dois poços (B1, B2); 150 µL de sabonete com 2% de clorexidina em dois poços (C1, C2); 150 µL de sabonete com 3% de

clorexidina em dois poços (D1, D2); 150 µL de sabonete com 4% de clorexidina em dois poços (E1, E2); 150 µL de meio de cultura caldo BHI em dois poços (F1, F2); 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina em dois poços (G1, G2); 100 µL de solução de digluconato de clorexidina a 1% e 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina em dois poços (H1, H2); 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de sabonete sem clorexidina em dois poços (A3, B3); 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de sabonete com 1% de clorexidina em dois poços (C3, D3); 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de sabonete com 2% de clorexidina em dois poços (E3, F3); 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de sabonete com 3% de clorexidina no poço G3; 100 µL de meio de cultura caldo BHI e 50 µL de sabonete com 4% de clorexidina no poço H3. Foram pipetados 90 µL de meio de cultura e 10 µL de sabonete com 1% de clorexidina em dois poços (A4 e B4) e a partir desses poços foi realizada diluição seriada 1:10 até os poços (A12 e B12), colocando em seguida 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina. Foram pipetados 90 µL de meio de cultura e 10 µL de sabonete com 2% de clorexidina em dois poços (C4 e D4) e a partir disso foi realizada diluição seriada 1:10 até os poços C12 e D12, colocando em seguida 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina. Nos poços E4 e F4, foram pipetados 90 µL de meio de cultura e 10 µL de sabonete com 3% de clorexidina e a partir disso foi realizada diluição seriada 1:10 até os poços E12 e F12, colocando em seguida 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina. Foram pipetados 90 µL de meio de cultura e 10 µL de sabonete com 4% de clorexidina em dois poços (G4 e H4) e a partir disso foi realizada diluição seriada 1:10 até os poços G12 e H12, colocando em seguida 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina. Foi procedida a incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A esquematização do procedimento para a distribuição das amostras encontra-se apresentada na Figura 19.

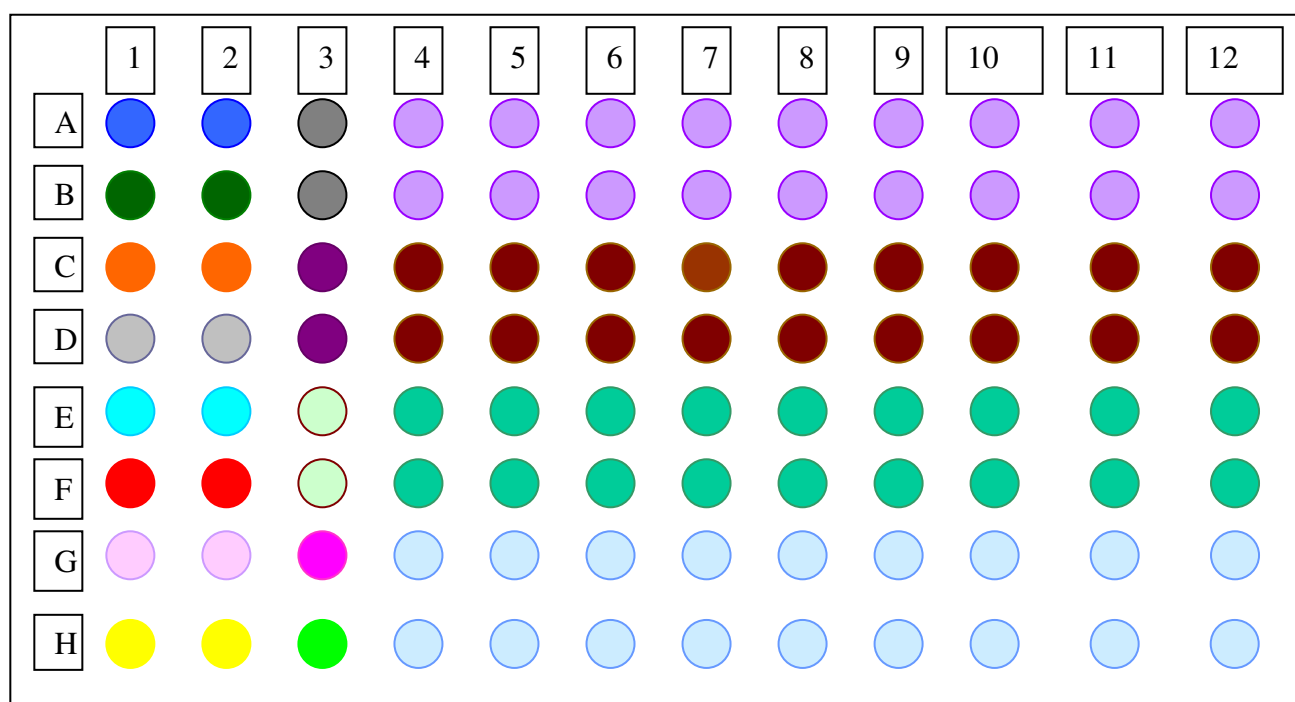


Figura 19. Esquema da realização do ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

- 150 µL de sabonete líquido sem clorexidina (controle negativo)
- 150 µL de sabonete líquido com 1% de clorexidina (controle negativo)
- 150 µL de sabonete líquido com 2% de clorexidina (controle negativo)
- 150 µL de sabonete líquido com 3% de clorexidina (controle negativo)
- 150 µL de sabonete líquido com 4% de clorexidina (controle negativo)
- 150 µL de caldo BHI (controle negativo)
- 100 µL de caldo BHI e 50 µL de microrganismo (controle positivo)
- 100 µL de solução de clorexidina a 1% e 50 µL de microrganismo
- 100 µL de sabonete líquido sem clorexidina e 50 µL de caldo BHI
- 100 µL de sabonete líquido com 1% de clorexidina e 50 µL de caldo BHI
- 100 µL de sabonete líquido com 2% de clorexidina e 50 µL de caldo BHI
- 100 µL de sabonete líquido com 3% de clorexidina e 50 µL de caldo BHI
- 100 µL de sabonete líquido com 4% de clorexidina e 50 µL de caldo BHI
- 90 µL de caldo BHI + 10 µL de sabonete com 1% de clorexidina e diluições + 50 µL de microrganismo
- 90 µL de caldo BHI + 10 µL de sabonete com 2% de clorexidina e diluições + 50 µL de microrganismo
- 90 µL de caldo BHI + 10 µL de sabonete com 3% de clorexidina e diluições + 50 µL de microrganismo
- 90 µL de caldo BHI + 10 µL de sabonete com 4% de clorexidina e diluições + 50 µL de microrganismo

Para a levedura *C. albicans*, foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, o meio de cultura empregado foi caldo Sabouraud.

A Tabela 20 apresenta a diluição feita para os sabonetes líquidos no ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – microdiluição.

Tabela 20. Diluições utilizadas para os sabonetes líquidos no ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido pelo método da microdiluição

AMOSTRAS	DILUIÇÕES DECRESCENTE DAS FORMULAÇÕES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sab. 1 *	1	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-7}	1×10^{-8}
Sab. 2 **	2	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-6}	2×10^{-7}	2×10^{-8}
Sab. 3 ***	3	3×10^{-1}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
Sab. 4 ****	4	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-8}

(*) Sabonete com 1% de digluconato de clorexidina; (**) sabonete com 2% de digluconato de clorexidina; (***) sabonete com 3% de digluconato de clorexidina; (****) sabonete com 4% de digluconato de clorexidina

6.3.1.4. Leituras

Depois de 24 horas de incubação, foram realizadas leituras visuais, antes e após a adição de corante resazurina.

Após a leitura visual, foi realizada subcultura de cada poço da microplaca em placas de Petri contendo ágar BHI, por meio de hastes estéreis. As placas foram incubadas por 24 horas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a fim de determinar se a concentração inibitória mínima (CIM) apresentou efeito bactericida ou bacteriostático.

A resazurina, um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, tem sido empregada para avaliar a viabilidade bacteriana, (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005).

A solução de resazurina foi preparada na concentração de $0,1 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de água destilada estéril. Em todos os orifícios da microplaca, foram adicionados $30 \text{ } \mu\text{L}$ de corante. Após leitura visual, a microplaca foi reincubada a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, mantendo-as até 24 h para confirmação dos resultados. Em seguida, foi realizada leitura visual final.

A manutenção de cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência do crescimento microbiano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de células viáveis em crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração do sabonete líquido capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração do sabonete capaz de impedir a mudança de cor azul para rosa (ALVES et al., 2008)

6.3.2. Resultados

Os resultados encontrados para o ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido pela técnica de microdiluição em caldo, após a realização de subcultura em placas de Petri contendo ágar BHI podem ser vistos nas Tabelas 21 a 36.

Tabela 21. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 1% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Salmonella spp</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 22. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 1% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 23. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 1% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
<i>P. aeruginosa</i>	+	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 24. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 1% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 25. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 2% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	2	2x10 ⁻¹	2x10 ⁻²	2x10 ⁻³	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁸
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i>	-	-	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 26. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 2% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	2	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-6}	2×10^{-7}	2×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 27. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 2% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	2	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-6}	2×10^{-7}	2×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	++
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 28. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 2% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	2	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-6}	2×10^{-7}	2×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	++	++
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	++	++	++	++	++	++	++

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 29. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 3% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	3	3×10^{-1}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	++
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 30. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 3% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	3	3×10^{-1}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 31. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 3% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	3	3×10^{-1}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 32. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 3% de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	3	3×10^{-1}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 33. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 1 contendo 4 % de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	4	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	++	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	++
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 34. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 2 contendo 4 % de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	4	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Salmonella</i> spp	-	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	++	++
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 35. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 3 contendo 4 % de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	4	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp	-	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

Tabela 36. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido do sabonete líquido da formulação 4 contendo 4 % de digluconato de clorexidina

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (%)								
	4	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++) crescimento uniforme microbiano em toda a estria do repique; (+) crescimento com algumas colônias de microrganismo na estria do repique; (-) ausência de crescimento microbiano na estria do repique.

As Figuras 20 a 33 ilustram os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição, para os sabonetes líquidos contendo digluconato de clorexidina. A permanência de cor azul nos orifícios indica ausência de crescimento microbiano e o desenvolvimento de cor rosa, presença de crescimento.

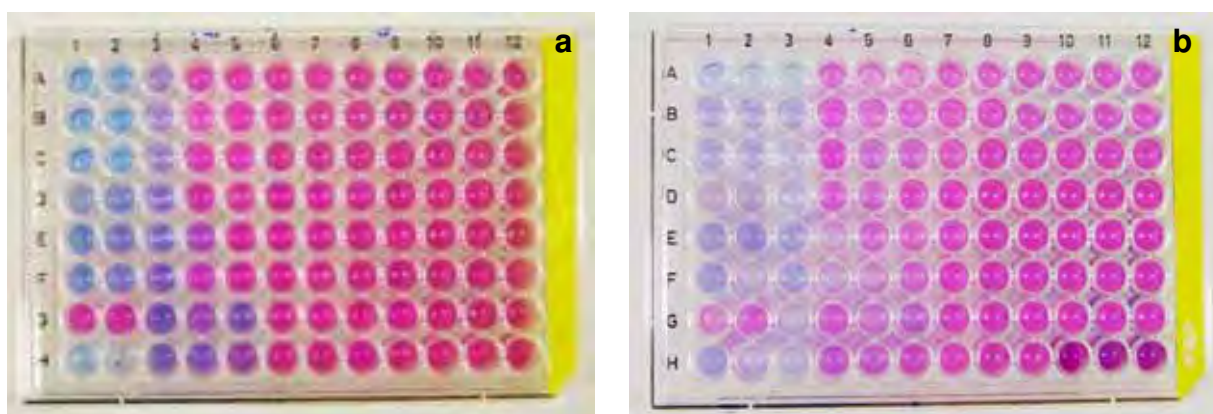


Figura 20. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *P. aeruginosa*. A1, A2, contêm sabonete sem clorexidina; B1, B2, sabonete com 1% de clorexidina; C1, C2, sabonete com 2% de clorexidina; D1, D2, sabonete com 3% de clorexidina; E1, E2, sabonete com 4% de clorexidina; F1, F2, meio de cultura; G1, G2, controle positivo; H1 e H2, solução de clorexidina a 1% e microrganismo; A3, B3, sabonete sem clorexidina e meio de cultura; C3, D3, sabonete com 1% de clorexidina e meio de cultura; E3, F3, sabonete com 2% de clorexidina; G3, sabonete com 3% de clorexidina e meio de cultura; H3, sabonete com 4% de clorexidina e meio de cultura. A4, B4, sabonete com 1% de clorexidina, meio de cultura e microrganismo e nos demais poços destas fileiras, as diluições seriadas 1:10 do sabonete, meio de cultura e microrganismo; C4, D4, sabonete com 2% de clorexidina, meio de cultura e microrganismo e nos demais poços dessa fileira, as diluições seriadas 1:10 do sabonete, meio de cultura e microrganismo; E4, F4, sabonete com 3% de clorexidina, meio de cultura e microrganismo e nos demais poços dessa fileira, as diluições seriadas 1:10 do sabonete, meio de cultura e microrganismo; G4, H4, sabonete com 4% de clorexidina, meio de cultura e microrganismo e nos demais poços dessa fileira, as diluições seriadas 1:10 do sabonete, meio de cultura e microrganismo.

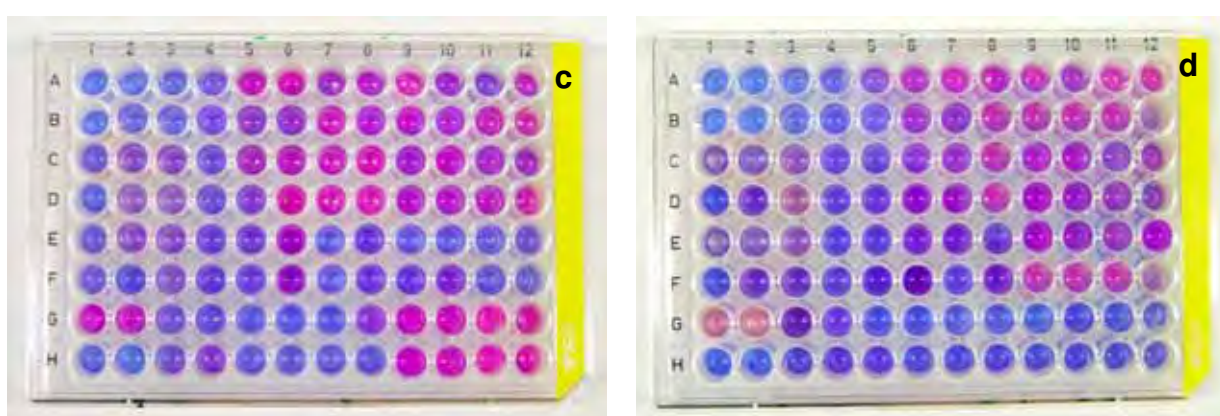


Figura 21. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *P. aeruginosa*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 20.

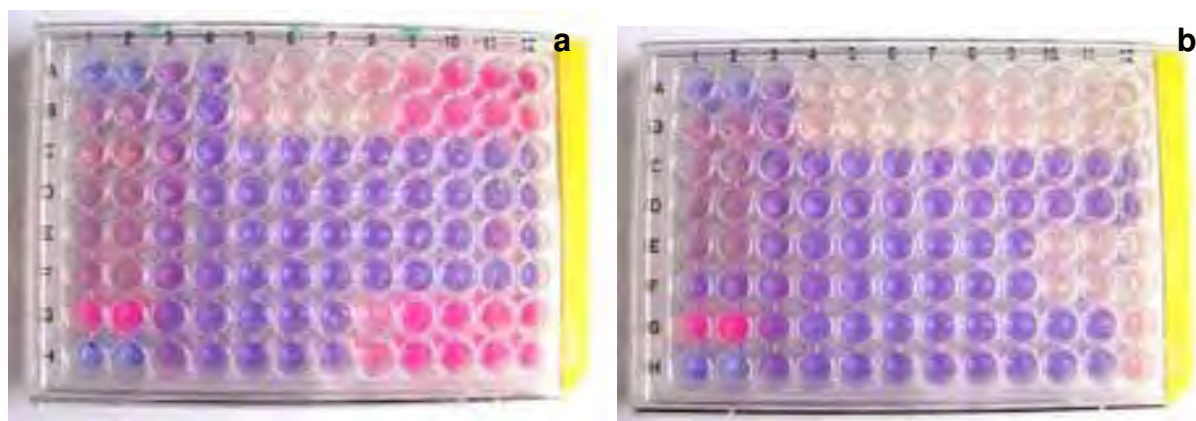


Figura 22. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *S. aureus*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 20.

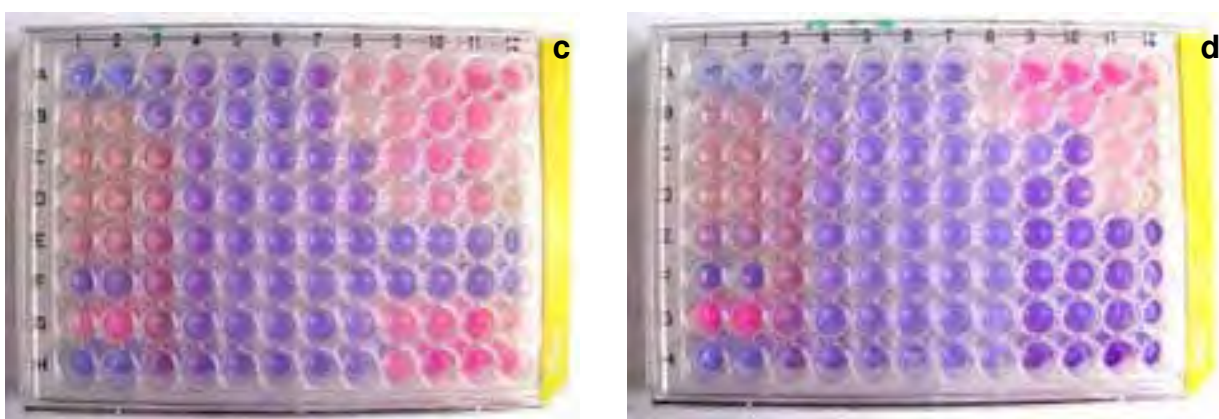


Figura 23. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *S. aureus*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 20.

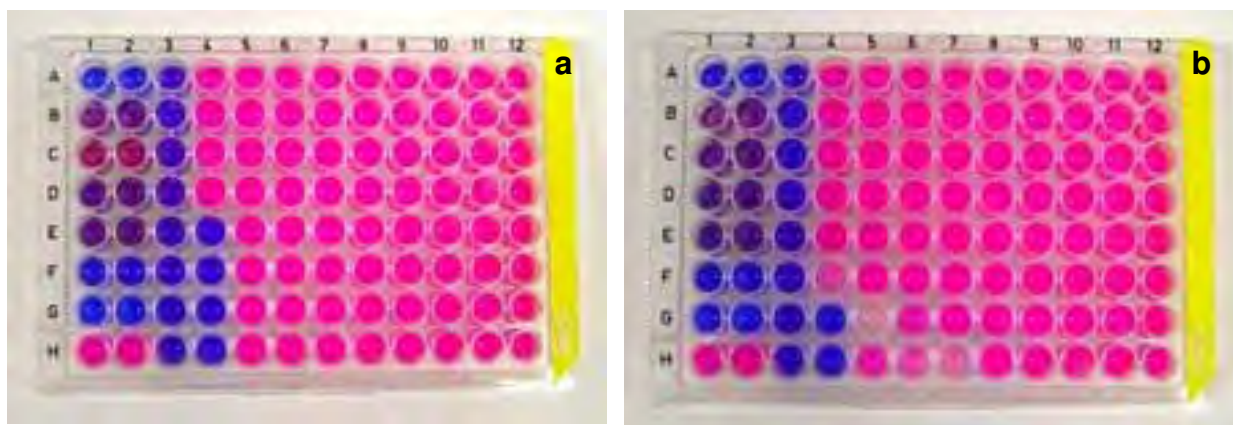


Figura 24. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *Salmonella* spp. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 19, entretanto, houve uma modificação em G1 e G2, que contêm solução de clorexidina a 1%, meio de cultura e microrganismo e em H1 e H2, que contêm meio de cultura e microrganismo.

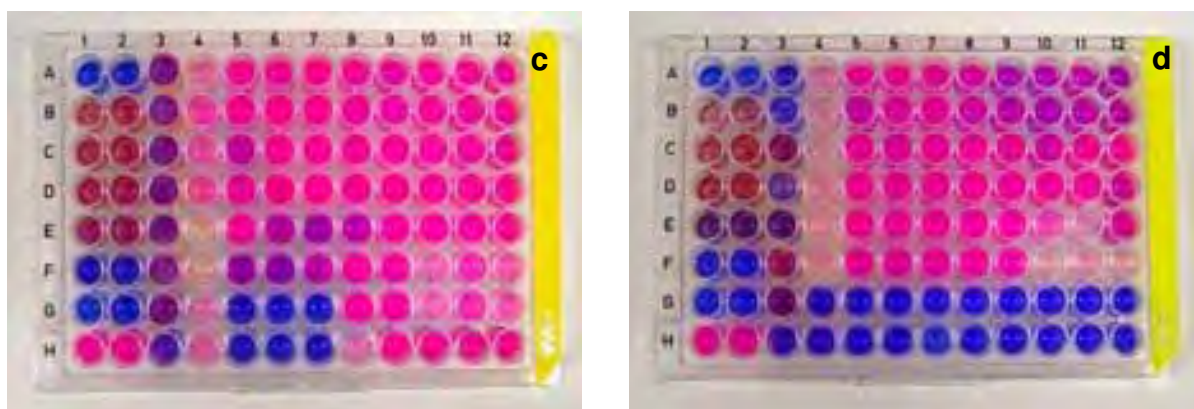


Figura 25. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *Salmonella* spp. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

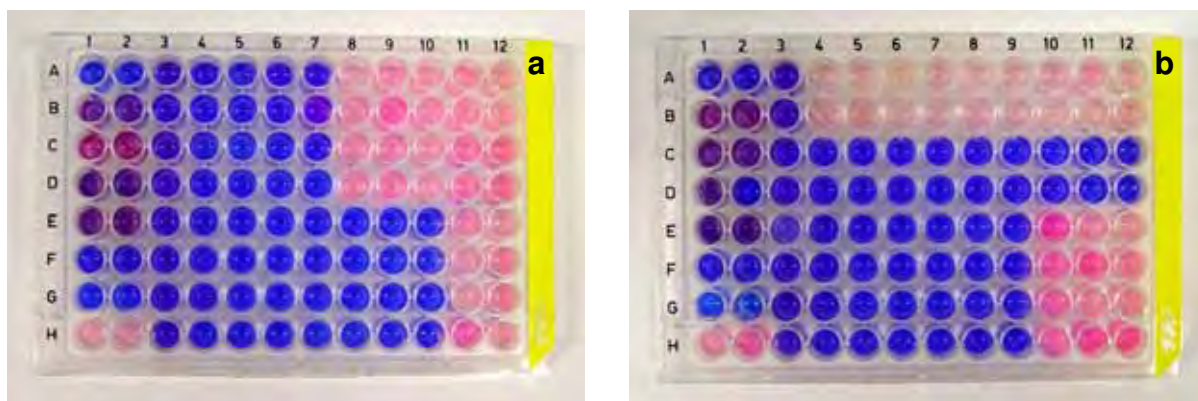


Figura 26. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *S. epidermidis*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

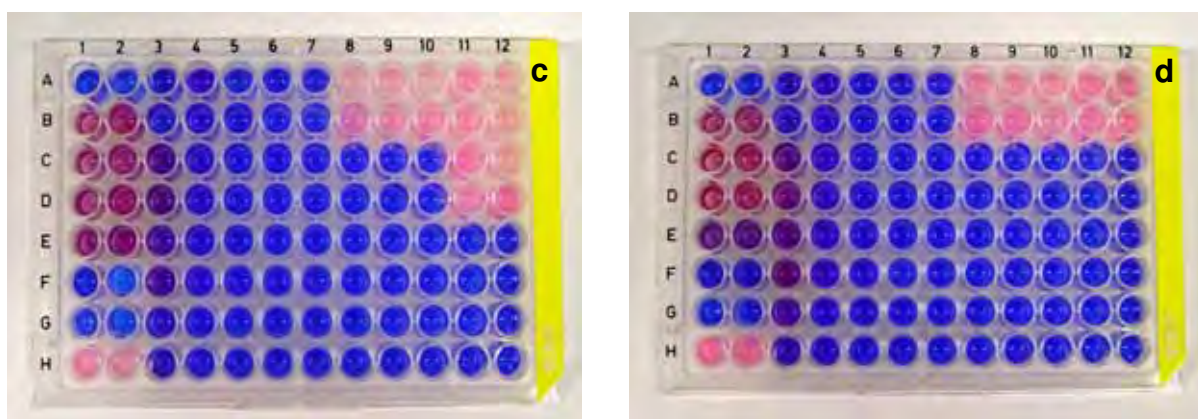


Figura 27. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *S. epidermidis*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

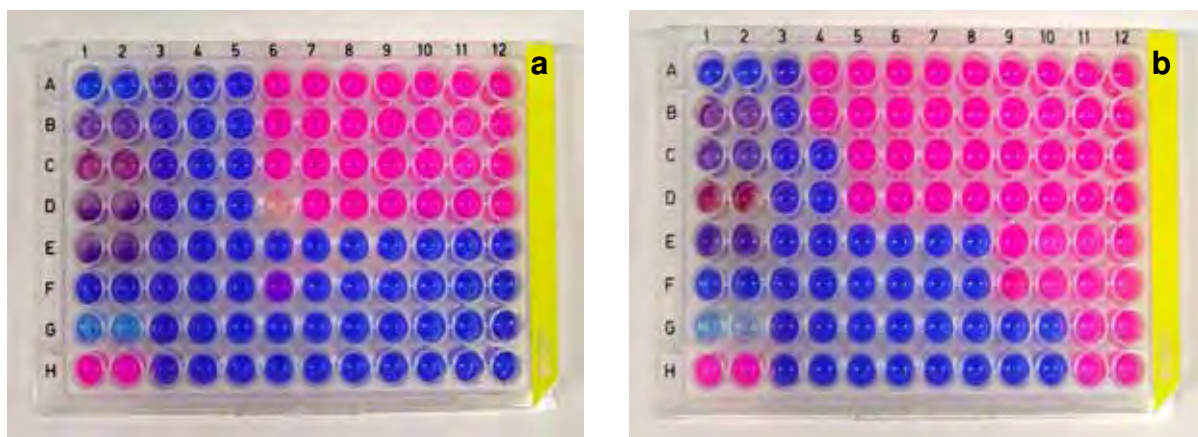


Figura 28. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *E. faecalis*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

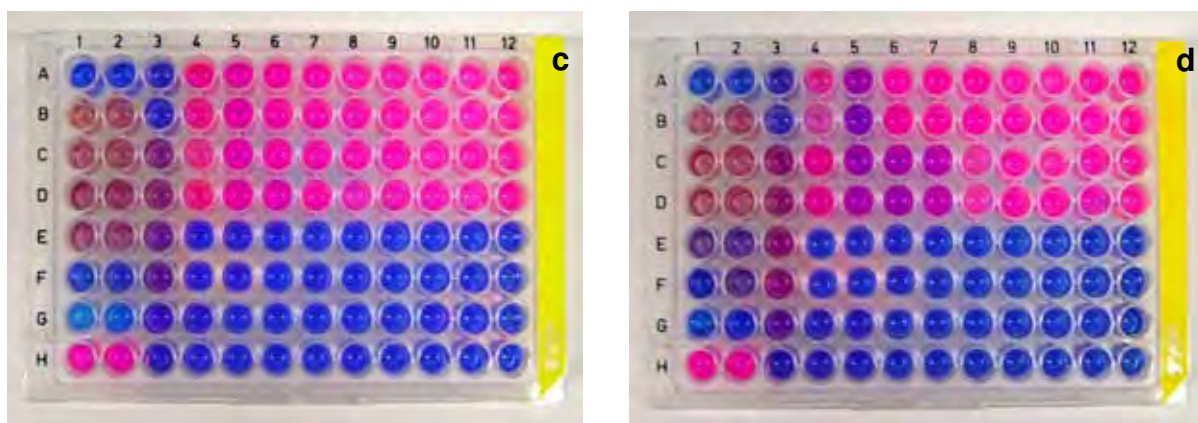


Figura 29. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *E. faecalis*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

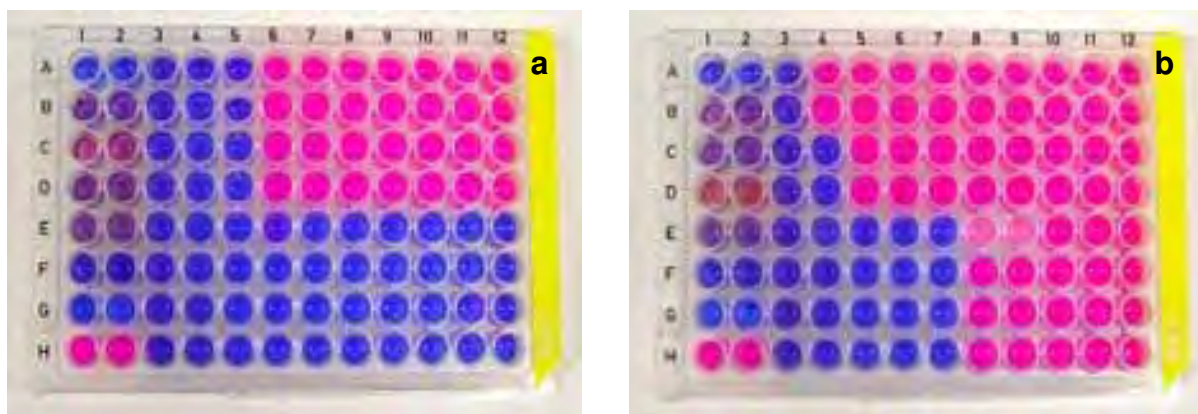


Figura 30. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *E. coli*. A distribuição dos sabonetes e das diluições dos sabonetes é igual à apresentada na Figura 24.

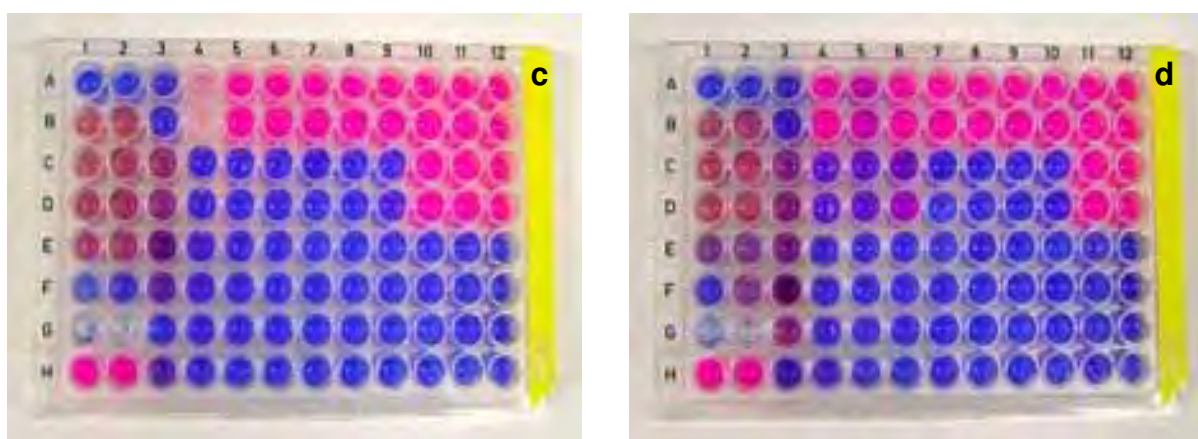


Figura 31. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *E. coli*. A distribuição dos sabonetes e das diluições dos sabonetes é igual à apresentada na Figura 24.

Para o ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido frente a *C. albicans*, a coloração amarela indica crescimento microbiano, enquanto que coloração marrom, indica ausência de crescimento microbiano.

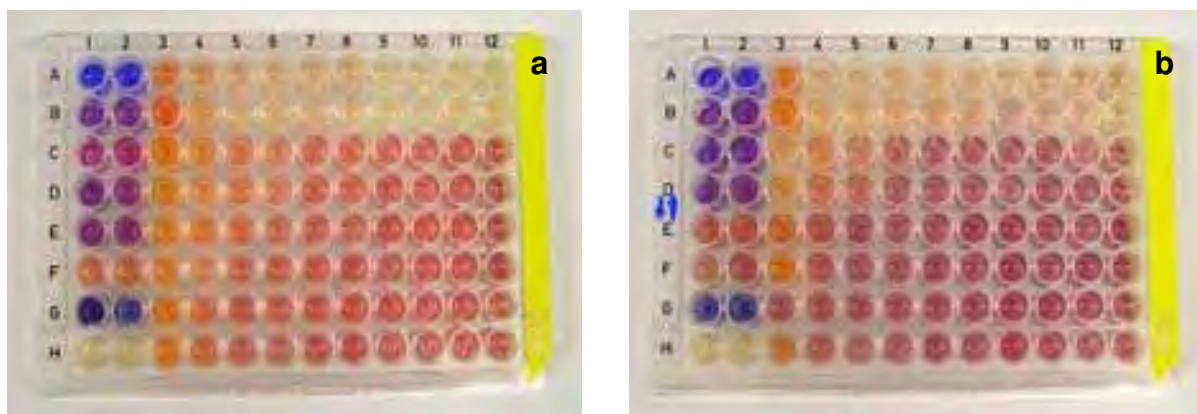


Figura 32. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 1 (a) e formulação 2 (b), empregando *C. albicans*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

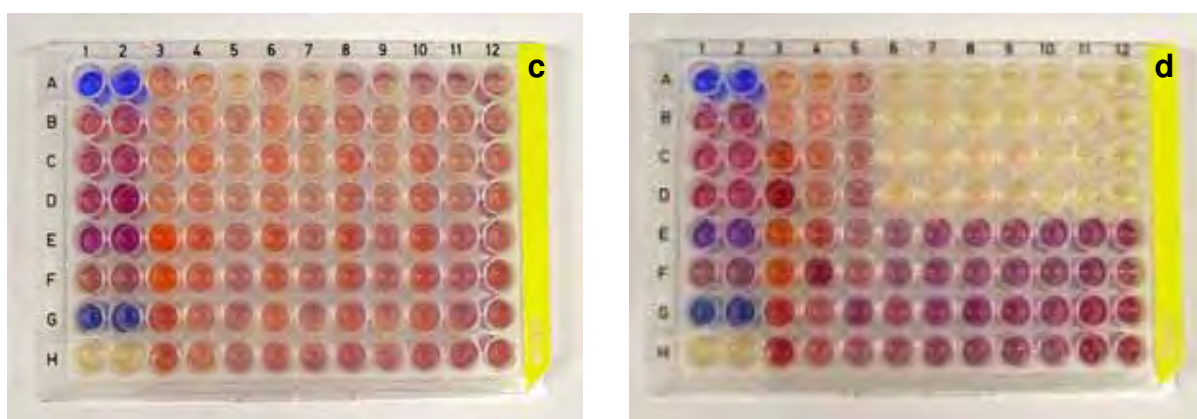


Figura 33. Ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido – técnica de microdiluição dos sabonetes da formulação 3 (c) e formulação 4 (d), empregando *C. albicans*. A distribuição dos sabonetes e das diluições é igual à apresentada na Figura 24.

6.3.3. Discussão

A determinação da CIM é um método quantitativo que analisa a menor concentração do composto testado capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo em estudo. A concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM), também são métodos quantitativos em que se analisa a menor concentração do composto testado capaz de matar 99,9% da população bacteriana e fúngica, respectivamente (COLLINS, LYNE, 2004).

Os valores de CIM para os sabonetes líquidos estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37. Valores de CIM encontrados para os sabonetes líquidos desenvolvidos com as diferentes concentrações de digluconato de clorexidina

Formulações*	Microrganismo / concentração da formulação (%)						
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
1a	-	1	-	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}	-
1b	-	2×10^{-8}	-	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-2}	2×10^{-8}
1c	-	3×10^{-8}	3	3×10^{-6}	3×10^{-8}	3×10^{-8}	3×10^{-8}
1d	4×10^{-1}	4×10^{-4}	4	4×10^{-6}	4×10^{-8}	4×10^{-8}	4×10^{-8}
2a	-	-	-	10^{-8}	-	-	-
2b	-	2×10^{-8}	-	2×10^{-8}	2	2	2×10^{-8}
2c	-	3×10^{-5}	-	3×10^{-5}	3×10^{-4}	3×10^{-4}	-
2d	-	4×10^{-7}	4	4×10^{-5}	4×10^{-3}	4×10^{-6}	4×10^{-8}
3a	1	10^{-3}	-	10^{-3}	-	-	10^{-8}
3b	2	2×10^{-4}	-	2×10^{-6}	2×10^{-5}		2×10^{-8}
3c	3×10^{-8}	3×10^{-8}	-	3×10^{-8}	3×10^{-8}	3×10^{-8}	3×10^{-8}
3d	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-3}	4×10^{-8}	4×10^{-8}	4×10^{-8}	4×10^{-8}
4a	-	10^{-3}	-	10^{-3}	-	-	10^{-1}
4b	2×10^{-2}	2×10^{-6}	-	2×10^{-8}	2×10^{-6}	-	2×10^{-1}
4c	3×10^{-4}	3×10^{-8}	-	3×10^{-8}	3×10^{-8}	3×10^{-8}	3×10^{-8}
4d	4×10^{-8}	4×10^{-8}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}

* Os números indicam a formulação e as letras indicam a concentração da solução de digluconato de clorexidina presente em cada sabonete líquido, assim, 1 é formulação 1; 2 é formulação 2; 3 é formulação 3 e 4 é formulação 4; a indica 1% de digluconato de clorexidina; b, 2% de digluconato de clorexidina; c, 3% de digluconato de clorexidina e d, 4% de digluconato de clorexidina; (-) ausência de atividade antimicrobiana

A CIM, com efeito bactericida da formulação 1 com 1% de clorexidina para *S. aureus* foi 1%; para *S. epidermidis* a CIM da formulação 1 com 1% de clorexidina foi $1 \times 10^{-3}\%$, com efeito bacteriostático; contra *E. faecalis*, a CIM foi $1 \times 10^{-1}\%$ com efeito bacteriostático; contra *E. coli*, a CIM foi $1 \times 10^{-1}\%$ com ação bacteriostática; diante da *Salmonella* spp, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, esta formulação não apresentou nenhuma atividade.

Para o sabonete 1 com 2% de clorexidina, diante de *S. aureus*, a CIM com efeito bacteriostático, foi $2 \times 10^{-8}\%$; contra *S. epidermidis* a CIM foi $2 \times 10^{-3}\%$ com efeito bactericida; contra *E. faecalis* a CIM foi 2×10^{-1} com ação bacteriostática e contra *E. coli*, a CIM foi $2 \times 10^{-2}\%$, com ação bactericida; diante da *C. albicans*, a CIM foi $2 \times 10^{-8}\%$, com efeito bacteriostático; frente à *Salmonella* spp e *P. aeruginosa*, não houve atividade alguma.

Quando o sabonete líquido continha 3% de clorexidina, a CIM com ação bactericida foi $3 \times 10^{-8}\%$ contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*; contra *S. epidermidis*, a CIM com efeito bactericida foi $3 \times 10^{-6}\%$; contra *E. faecalis*, a CIM foi $3 \times 10^{-8}\%$, com efeito bacteriostático; contra *Salmonella* spp, a CIM foi 3% com efeito bactericida e para *P. aeruginosa*, não houve atividade.

Para o sabonete desta formulação com 4% de ativo, a CIM com efeito bactericida, foi $4 \times 10^{-3}\%$ contra *S. aureus*; contra *S. epidermidis* foi $4 \times 10^{-6}\%$, com efeito bactericida, contra *P. aeruginosa* a CIM foi $4 \times 10^{-1}\%$, ação bactericida; contra *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* a CIM foi $4 \times 10^{-8}\%$, com efeito bactericida, contra *Salmonella* spp, a CIM foi 4%, com ação bactericida.

Em relação à formulação 2 contendo 1% de digluconato de clorexidina a CIM para *S. epidermidis* foi $1 \times 10^{-8}\%$, com efeito bacteriostático, entretanto, para os demais microrganismos não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana.

O sabonete desta formulação contendo 2% de clorexidina mostrou-se novamente bacteriostático para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. albicans* com CIM de $2 \times 10^{-8}\%$; contra *E. faecalis* e *E. coli*, a CIM foi 2%, com ação bactericida; para os demais microrganismos não apresentou atividade.

Com 3% de ativo, a CIM contra *S. aureus* e *S. epidermidis* foi $3 \times 10^{-5}\%$, com ação bactericida; contra *E. faecalis*, a CIM foi $3 \times 10^{-4}\%$ com ação bacteriostática; contra *E. coli*, a CIM foi $3 \times 10^{-3}\%$, com ação bacteriostática; diante dos demais microrganismos não houve atividade.

Com 4% de digluconato de clorexidina, a CIM contra *S. aureus* foi $4 \times 10^{-7}\%$, com ação bactericida; contra *S. epidermidis* a CIM foi $4 \times 10^{-5}\%$, com ação bacteriostática; contra *Salmonella* spp, a CIM foi 4%, com ação bactericida; contra *E. faecalis*, a CIM foi $4 \times 10^{-6}\%$, com efeito bacteriostático; contra *E. coli*, a CIM com ação bactericida, foi $4 \times 10^{-3}\%$; contra *C. albicans*, a CIM foi $4 \times 10^{-8}\%$, com ação bacteriostática e para *P. aeruginosa* não houve atividade.

Esses dados ressaltam que no ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar não houve formação de halo de inibição de crescimento para as formulações 1 e 2 contra nenhum microrganismo analisado devido à viscosidade dos sabonetes destas formulações, às possíveis interações ocorridas entre o tensoativo lauriléter e o meio de cultura sólido, entre o excesso de clorexidina e o pH do meio de cultura sólido e entre o tensoativo lauriléter e a clorexidina com a formação do complexo aniônico-catiônico que dificultou a difusão da clorexidina no ágar. Entretanto, este complexo não impediu que a clorexidina apresentasse ação antimicrobiana frente aos microrganismos testados pela técnica da microdiluição em caldo.

A presença do tensoativo anfótero cocoamidopropil betaína na formulação 2 não contribuiu para diminuição das interações entre a clorexidina e o tensoativo lauriléter, fato observado por não haver melhora significativa da atividade antimicrobiana desta formulação em relação à formulação 1, quando comparadas na mesma concentração pelo método da microdiluição em caldo e também não houve mudança dos aspectos físicos destas formulações.

Foi observado também que, ao elevar a concentração da clorexidina nestas formulações houve melhora da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo, ao contrário do que aconteceu no teste de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar.

Para a formulação 3 com 1% de digluconato de clorexidina a CIM para *S. aureus* foi $1 \times 10^{-3}\%$, com ação bactericida; para *S. epidermidis*, a CIM foi $1 \times 10^{-3}\%$ com efeito bacteriostático; contra *P. aeruginosa*, a CIM foi 1%, com ação bacteriostática; contra *C. albicans*, a CIM foi $1 \times 10^{-8}\%$ com ação bacteriostática e para os demais microrganismos não foi observada nenhuma atividade.

Com 2% de ativo, o sabonete líquido teve CIM de 2% com ação bactericida contra *P. aeruginosa*; contra *S. aureus*, a CIM foi $2 \times 10^{-4}\%$ com ação bactericida; contra *S. epidermidis*, a CIM foi $2 \times 10^{-6}\%$, com ação bactericida; contra *E. coli* a CIM foi $2 \times 10^{-5}\%$, com ação bacteriostática, contra *C. albicans* a CIM foi $2 \times 10^{-8}\%$ com ação bactericida e para os demais microrganismos testados não houve atividade.

Com 3% de clorexidina, o sabonete líquido desta formulação apresentou CIM de $3 \times 10^{-8}\%$ com ação bactericida contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *C. albicans* e *E. faecalis*; contra *P. aeruginosa*, a CIM foi $3 \times 10^{-8}\%$, com ação bacteriostática e para *Salmonella* spp não houve atividade.

O sabonete líquido com 4% de clorexidina mostrou CIM de $4 \times 10^{-4}\%$ com ação bacteriostática contra *P. aeruginosa*; CIM de $4 \times 10^{-4}\%$, com ação bactericida contra *S. aureus*; contra *Salmonella*, a CIM foi $4 \times 10^{-3}\%$ com ação bactericida; contra *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, a CIM foi $4 \times 10^{-8}\%$, com ação bactericida.

Em relação à formulação 4, o sabonete líquido com 1% de clorexidina contra *S. aureus* mostrou CIM de $1 \times 10^{-3}\%$, com ação bactericida; contra *S. epidermidis* a CIM foi $1 \times 10^{-3}\%$, com ação bacteriostática; contra *C. albicans*, a CIM foi $1 \times 10^{-2}\%$, com ação bacteriostática e para os demais microrganismos, não houve ação. O sabonete líquido com 2% de digluconato de clorexidina, apresentou CIM de $2 \times 10^{-1}\%$ com ação bacteriostática contra *P. aeruginosa*; CIM de $2 \times 10^{-6}\%$ com ação bactericida contra *S. aureus*; contra *S. epidermidis*, a CIM foi $2 \times 10^{-8}\%$ com ação bactericida; contra *E. coli*, a CIM foi $2 \times 10^{-6}\%$ com efeito bacteriostático, contra *C. albicans*, a CIM com ação bacteriostática, foi $2 \times 10^{-1}\%$ e para os demais microrganismos testados não houve atividade.

Com 3% de ativo, o sabonete líquido apresentou CIM de $3 \times 10^{-4}\%$ com ação bacteriostática contra *P. aeruginosa*; contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans*, a CIM com ação bactericida, foi $3 \times 10^{-8}\%$ e diante da *Salmonella* spp, não houve atividade.

Com 4% de clorexidina, o sabonete desta formulação mostrou CIM com ação bacteriostática de $4 \times 10^{-8}\%$ contra *P. aeruginosa*; contra *S. aureus*, *Salmonella* spp, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, a CIM foi $4 \times 10^{-8}\%$ com ação bactericida.

Diante dos resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana em meio líquido e por difusão em ágar, as formulações 3 e 4 apresentaram melhores resultados.

Foi possível notar pelo ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido, que com aumento da concentração da clorexidina, obtêm-se melhores resultados de atividade antimicrobiana, diferentemente do ensaio de difusão em ágar, que, com aumento da concentração da clorexidina no sabonete, houve diminuição do tamanho do halo de inibição de crescimento. Portanto, ao elevar a concentração de clorexidina, não há aumento de interação com o meio de cultura líquido, ao contrário do que ocorreu com o meio de cultura sólido e que os resultados encontrados podem ser realmente falso-negativos. Além disso, o tensoativo sarcosinato pode ter interagido

menos com o meio de cultura líquido, resultando em melhora de atividade antimicrobiana.

A presença do tensoativo anfótero cocoamidopropil betaína na formulação 4 não contribuiu para diminuição das interações entre a clorexidina e o tensoativo sarcosinato, fato observado por não haver melhora significativa da atividade antimicrobiana desta formulação em relação à formulação 3, quando comparadas na mesma concentração pelo método da microdiluição em caldo e também não houve mudança dos aspectos físicos destas formulações.

Confirmando os resultados encontrados no ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar, os microrganismos Gram-positivos foram mais sensíveis à clorexidina, enquanto que os Gram-negativos foram mais resistentes. Neste ensaio, a *C. albicans* também se mostrou sensível. Entretanto, em trabalho realizado por Bambace e colaboradores (2003), utilizando solução aquosa de clorexidina a 0,5%; 1%; 2%; 3% e 4% comparando sua eficácia com a do álcool 70% gel e líquido para limpeza de superfícies em consultório odontológico, constatou que *P. aeruginosa* foi sensível à solução de clorexidina em todas as concentrações testadas.

O método de microdiluição apresentou vantagem em relação ao método de difusão em ágar, uma vez que empregou menor quantidade de meio de cultura, houve facilidade de manuseio, permitiu análise qualitativa e quantitativa e também permitiu avaliar melhor as formulações em estudo, pois a viscosidade das amostras e as interações com o meio de cultura líquido não interferiram nos resultados de atividade antimicrobiana. Entretanto, apresentou-se inconveniente para leitura visual, pois em algumas vezes a turvação encontrada era causada pela própria formulação em contato com o meio de cultura e, não pela presença de crescimento microbiano, no entanto, esta dificuldade foi sanada ao realizar a subcultura em placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e ágar Sabouraud e com a adição do corante resazurina.

6.3.4. Conclusão

Diante dos resultados obtidos, é necessário o emprego de mais de uma técnica para avaliar o potencial antimicrobiano de determinado produto ou formulação. Para os produtos viscosos e que podem interagir com o meio de cultura sólido, deve-se dar preferência ao método de diluição em caldo.

Em relação às formulações, os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de diluição em caldo, demonstraram que as formulações 1 e 2 (com lauriléter sulfato de sódio) possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos Gram-positivos testados e houve melhora da atividade antimicrobiana com o aumento da concentração de clorexidina nas formulações, demonstrando que a incompatibilidade entre o tensoativo aniônico e a clorexidina é apenas do ponto de vista técnico, uma vez que há turvação e precipitação destas formulações.

Foi realizado o mesmo ensaio com o sabonete sem adição de clorexidina, que demonstrou atividade antimicrobiana apenas quando não foi diluído, portanto, a atividade apresentada pelos sabonetes contendo o ativo, refere-se mesmo à clorexidina.

Diante dos microrganismos Gram-negativos, estas formulações apresentaram melhores resultados frente à *E. coli*. Esta atividade deveu-se à presença de clorexidina, pois o sabonete sem o ativo apresentou atividade apenas quando não estava diluído. Em relação aos outros microrganismos Gram-negativos, não houve atividade antimicrobiana.

Quanto às formulações 3 e 4 (com lauroilmiristilsarcosinato de sódio), os microrganismos Gram-positivos novamente demonstraram maior susceptibilidade. A atividade é devido à presença de clorexidina, comprovada uma vez que no teste realizado apenas com os sabonetes, houve atividade na amostra não diluída e na primeira diluição. Quando obteve-se a diluição 10^{-3} , o efeito foi bacteriostático, entretanto estes resultados corroboram com a literatura, que diz que o lauroilmiristilsarcosinato de sódio possui atividade antimicrobiana superior ao lauriléter sulfato de sódio. Diante dos microrganismos Gram-negativos, apenas a *E. coli* apresentou atividade satisfatória.

Assim como nas formulações 1 e 2, o aumento da concentração da clorexidina nas formulações 3 e 4 melhorou a atividade antimicrobiana pelo método de diluição em caldo.

Foi observado que houve maior interação das quatro formulações com o meio de cultura sólido e quando utilizou maior concentração de clorexidina nas formulações. A presença do tensoativo anfótero cocoamidopropil betaína nas formulações 2 e 4 não melhorou a atividade antimicrobiana e os aspectos físicos em relação às formulações 1 e 2 respectivamente.

Foi observado que a formulação 3 com 3% de clorexidina apresentou resultado semelhante em relação à mesma formulação com 4% de ativo, diferindo apenas quanto à *Salmonella* spp que apresentou efeito bactericida na diluição de $4 \times 10^{-3}\%$, enquanto que com o sabonete com 3% não houve atividade; quanto à *P. aeruginosa*, que, com 3% de clorexidina houve efeito bacteriostático em todas as diluições e com 4% de clorexidina houve efeito bacteriostático até a diluição de $4 \times 10^{-3}\%$ e ao *S. aureus* que com 3% de clorexidina houve ação bactericida em todas as diluições e com 4%, foi bactericida até a diluição de $4 \times 10^{-4}\%$.

Quanto à formulação 4, com 4% de clorexidina, o sabonete mostrou melhor atividade em relação à *P. aeruginosa*, pois foi bacteriostático em todas as concentrações analisadas e com 3% de clorexidina foi bacteriostático até a diluição $3 \times 10^{-4}\%$. Quanto à *Salmonella* spp, a formulação 4, com 4% de ativo, foi bactericida em todas as diluições analisadas e com 3% de ativo, não mostrou atividade antimicrobiana.

A formulação 3 com 3% de clorexidina foi considerada, do ponto de vista microbiológico, mais ativa, uma vez que contém menor quantidade de anti-séptico em relação às formulações 3 e 4 com 4% de clorexidina e foi observado resultado semelhante a estas preparações, porém, com atividade superior àquela apresentada pelas formulações 1, 2, 3 e 4 com 1% e 2% de clorexidina. Ao levar em conta os fatores econômicos, ambientais e risco de efeitos indesejáveis pelo consumidor como irritação, alergia e desenvolvimento de resistência, esta formulação foi escolhida para dar continuidade às análises realizadas neste trabalho.

7. TESTE DE EFICÁCIA DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O objetivo deste estudo foi realizar o teste desafio do sabonete líquido contendo 3% de digluconato de clorexidina, frente a culturas puras de microrganismos, a fim de verificar com que velocidade o sabonete é capaz de matar os microrganismos empregados e se esta velocidade é suficiente para que o produto seja aceito pelos critérios farmacopéicos do teste.

7.1. Microrganismos utilizados

Foram utilizados isolados de bactérias, fungo e levedura de coleções padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 IAL 1606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 IAL 1028), *Escherichia coli* (ATCC 25922 IAL 2393), *Candida albicans* (ATCC 64548) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

7.2. Conservação dos microrganismos-teste

Cada uma das bactérias foi repicada por semeadura em estrias, em 12 tubos de ensaio contendo meio ágar tripticaseína-soja esterilizado e inclinado. A levedura foi repicada em meio ágar Sabouraud dextrose, seguindo a mesma técnica. Em seguida, os microrganismos foram levados à estufa, onde as bactérias permaneceram por 24 horas à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e a levedura por 48-72 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o crescimento, em cada tubo, foi vertida uma quantidade suficiente de óleo mineral esterilizado para conservação em congelador à temperatura de $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Desta maneira, para cada mês, foi preparado 1 tubo de cada microrganismo.

O fungo *A. niger*, inoculado em meio ágar Sabouraud dextrose inclinado, foi repicado com auxílio de alça de platina a outros 6 tubos, contendo o mesmo meio. Após, os tubos foram incubados por 5 dias à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o desenvolvimento das culturas, os tubos foram mantidos em temperatura de 4°C , obtendo-se assim, o estoque semestral.

7.3. Reativação dos microrganismos

Ao início de cada mês, um tubo de cada microrganismo (bactérias e levedura) foi retirado do congelador e submetido ao descongelamento à temperatura ambiente. Em seguida, um tubo de cada bactéria foi transferido para Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo tripticaseína-soja e no caso da levedura em caldo Sabouraud-dextrose e

incubados em estufa à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 horas para as bactérias e 72 horas para a levedura. Após este período, cada microrganismo foi repicado, em meio adequado, por semeadura em estrias em 6 tubos e novamente incubados nas mesmas condições.

O fungo foi repicado em 2 tubos com ágar Sabouraud a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para obtenção do estoque mensal, a partir do tubo do estoque semestral.

7.4. Repiques dos microrganismos para utilização nos testes

Um tubo de cada microrganismo foi retirado do estoque mensal e repicado por semeadura em estrias, em meio ágar inclinado adequado e incubado à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para bactérias, para a levedura a temperatura de incubação foi $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 3 dias e para o fungo foi $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 7 dias.

7.5. Obtenção de suspensões-mãe de microrganismos testes e contagem do número de microrganismos viáveis

Às culturas de microrganismos-teste, adicionaram-se 9 mL de solução salina esterilizada para a obtenção da suspensão de cada microrganismo (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*). A “suspensão-mãe” foi então ajustada quanto à escala 0,5 McFarland e submetida à diluição decimal seriada em solução salina estéril, até obter a diluição 10^1 .

Alíquotas de 1,0 mL das diluições seriadas foram semeadas à superfície do meio com auxílio de alça de Drigalsky esterilizada. As placas foram incubadas em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em meio tripticaseína-soja, enquanto que a levedura foi incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas em meio Sabouraud-dextrose. Após este período, as placas que apresentavam um número de colônias entre 30 a 300, foram selecionadas para contagem do número de microrganismos viáveis.

Para o fungo, a um tubo com ágar Sabouraud dextrose inclinado, contendo *A. niger*, foram adicionados 9,0 mL de solução salina estéril e, por agitação, os esporos foram suspensos. Desta suspensão, 1,0 mL foi transferido para outro tubo de solução salina estéril e diluída 8 vezes, também em solução salina estéril. Destas diluições foram retirados pequenos volumes para contagem de número de esporos/mL em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico. A diluição que apresentou 10^8 UFC de esporos foi selecionada para contagem do número de microrganismos viáveis.

Alíquotas de 1,0 mL da diluição que apresentou número de 10^8 esporos foram diluídas em 9,0 mL solução salina estéril até obter a diluição 10^1 . Alíquotas de 1,0 mL das diluições seriadas foram semeadas à superfície do meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose com auxílio de alça de Drigalsky esterilizada. As placas foram incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após este período, as placas que apresentavam um número de colônias entre 30 a 300, foram selecionadas para contagem do número de microrganismos viáveis. (BP, 2003; USP, 2006).

7.6. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana do sistema

O estudo de neutralização foi feito verificando-se a inibição do crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. niger* e *C. albicans* em concentrações diferentes da formulação, obtidas a partir de diluições seriadas.

Primeiramente, a 1,0 g da formulação foram adicionados 9 mL de solução salina estéril, obtendo-se, então, a primeira diluição (10^{-1}), a partir desta foram feitas diluições decimais até 10^{-9} para as bactérias Gram-negativas, *A. niger* e para *C. albicans* e até 10^{-12} para as Gram-positivas. A cada uma das diluições, foi adicionado 1 mL da suspensão de microrganismos contendo aproximadamente 10^4 bactérias, 10^5 células de bolores para a *C. albicans* ou 10^5 esporos para *A. niger*. A seguir, os tubos foram agitados mecanicamente e alíquotas de 1 mL foram semeadas, em duplicatas, nas placas de Petri contendo meios adequados (BP, 2003; USP, 2006).

O mesmo procedimento foi realizado com o sabonete líquido sem adição de clorexidina para comparação dos resultados entre as duas formulações, a fim de garantir que os resultados encontrados sejam devido à ação da clorexidina, evitando erros na interpretação dos resultados, pois apenas o sabonete também possui atividade antimicrobiana como já foi discutido na revisão de literatura deste trabalho e nos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Para comprovação da eficiência da neutralização dos conservantes, o teste foi acompanhado por um controle, no qual 1,0 mL da suspensão de microrganismo foi adicionado em 9,0 mL de solução salina estéril, seguindo o mesmo procedimento da formulação.

As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a contagem de bactérias, enquanto que para a levedura foi $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas e

para o fungo foi 7 dias. Após o crescimento, o número de UFC foi determinado (Figura 34).

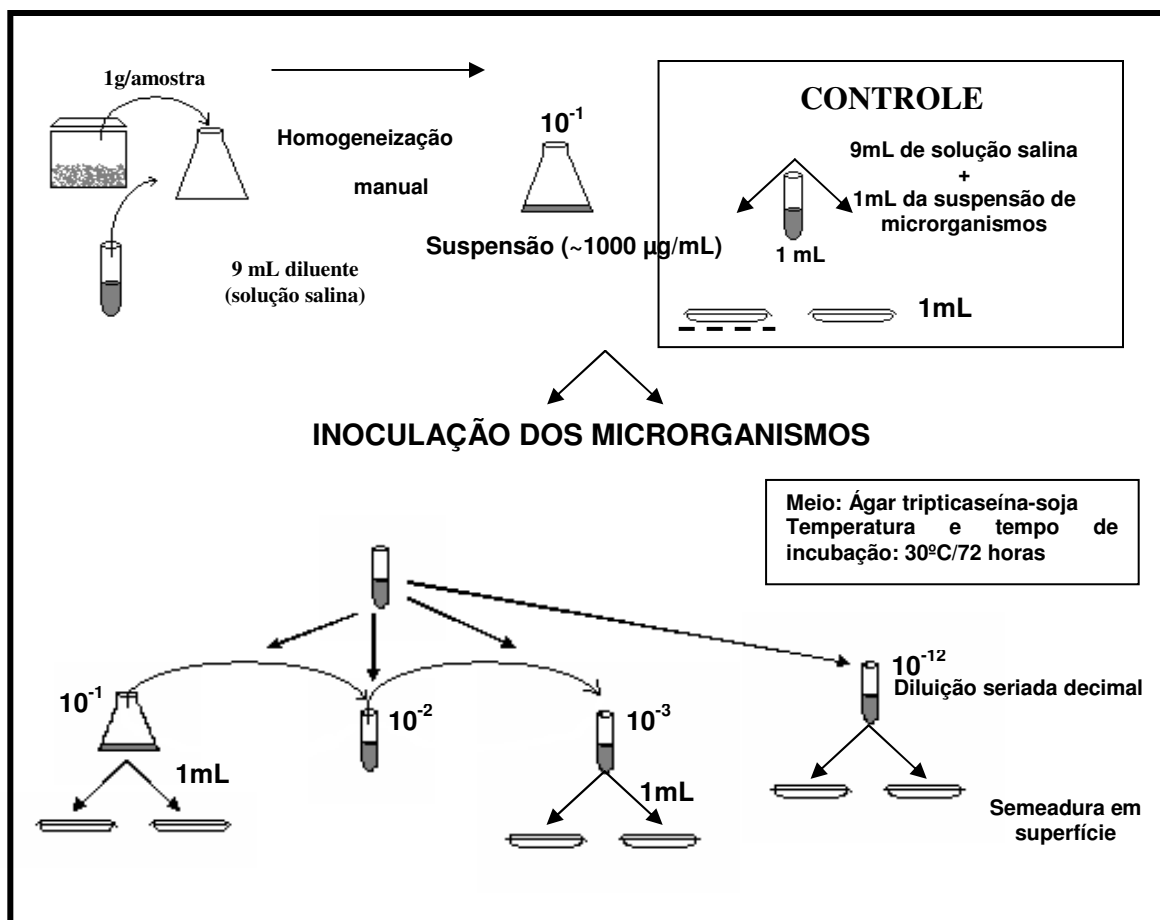


Figura 34. Esquema da realização do teste de neutralizante.

7.7. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito

Em embalagem adequada e esterilizada, foram colocados 20 g de formulação. Em seguida, foi inoculado um volume de suspensão de microrganismo, para a obtenção final de uma carga teórica de microrganismos equivalente a 10^6 bactérias ou 10^6 esporos ou células de fungo por grama de formulação. Em seguida, 1 g de formulação foi pesado, em recipiente estéril, e adicionados de 9 mL de solução salina estéril, sob agitação manual constante. Após a dissolução de todo conteúdo, obteve-se a diluição 10^{-1} , que foi subsequentemente diluída até 10^{-5} (BP, 2003; USP, 2006). Este procedimento foi realizado para todos os microrganismos em análise.

O mesmo procedimento foi realizado com o sabonete líquido sem adição de clorexidina, para todos os microrganismos em análise a fim de comparar os resultados entre as duas formulações, para garantir que os resultados encontrados

sejam devido à ação da clorexidina, evitando erros na interpretação dos resultados, pois apenas o sabonete também possui atividade antimicrobiana.

Paralelamente, controles foram realizados, em que, nos tubos de ensaio, com 20 mL de solução salina estéril, inoculou-se a mesma carga microbiana, e foi agitado para homogeneização das células. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi pipetado e adicionado a 9,0 mL de solução salina 1 estéril, dando seqüência às diluições até 10^{-5} .

Da diluição 10^{-5} , alíquotas de 1,0 mL, foram retiradas com auxílio de pipeta automática e inoculadas em placas de Petri, em duplicata, contendo os meios de cultura adequados para bactérias, levedura e fungo. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para contagem de bactérias e a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas para a levedura e 7 dias para o fungo. Após o crescimento, o número UFC foi determinado (Figura 35).

O período do teste ocorreu nos intervalos de tempo de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas; 7, 14, 21 e 28 dias. A análise dos microrganismos viáveis dos controles foi executada somente no tempo zero, ou seja, logo após a inoculação.

Durante a execução do teste, as formulações foram mantidas à temperatura ambiente em local livre de umidade e excesso de luz.

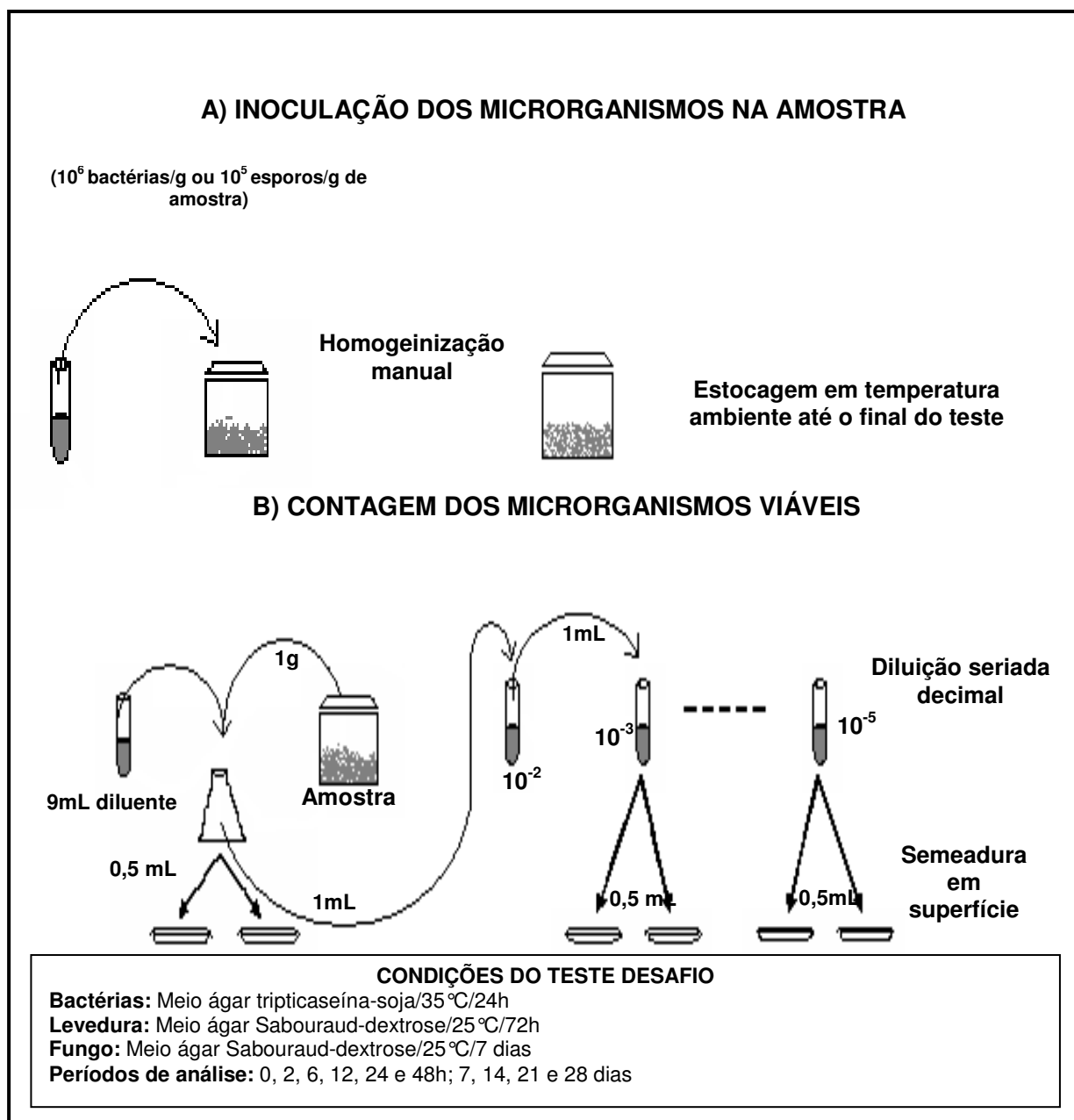


Figura 35: Esquema da execução das análises microbiológicas do sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina durante o teste desafio.

7.8. Resultados

7.8.1. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana

Os resultados da avaliação da neutralização do sabonete líquido contendo 3% de digluconato de clorexidina e do sabonete isento do anti-séptico estão apresentados nas Tabelas 38 a 42, frente aos microrganismos em análise.

Tabela 38. Contagem do número de microrganismos viáveis de *P. aeruginosa* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Controle
SL	56	91	165	203	296	388	502	598	686	142
SL CHX	41	86	101	137	248	302	412	587	625	142

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

A contagem do número total de microrganismos viáveis para *P. aeruginosa* demonstrou que o sabonete líquido contendo clorexidina foi mais eficaz para inibir o crescimento microbiano quando comparado com o resultado obtido para o sabonete líquido em que o ativo não está presente.

Tabela 39. Contagem do número de microrganismos viáveis de *E. coli* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Controle
SL	46	103	185	241	313	388	410	473	566	240
SL CHX	0	82	164	223	297	362	368	418	528	240

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

Tabela 40. Contagem do número de microrganismos viáveis de *S. aureus* após neutralização do sistema conservante

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	Cont
SL	0	21	54	87	125	169	199	222	269	294	311	323	256
SL	0	0	0	0	0	0	0	0	98	127	156	256	256
CHX													

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina; cont., controle

A contagem do número total de microrganismos viáveis para *S. aureus*, demonstrou que o sabonete líquido contendo clorexidina foi mais eficaz para inibir o crescimento microbiano quando comparado com o resultado obtido para o sabonete líquido em que o ativo não está presente.

Tabela 41. Contagem do número de microrganismos viáveis de *C. albicans* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸	10⁻⁹	Controle
SL	218	234	256	283	294	319	349	362	399	272
SL CHX	78	92	128	232	264	301	330	342	365	272

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

A contagem do número total de microrganismos viáveis para *C. albicans* demonstrou que o sabonete líquido contendo clorexidina foi mais eficaz para inibir o crescimento microbiano quando comparado com o resultado obtido para o sabonete líquido em que o ativo não está presente.

Tabela 42. Contagem do número de microrganismos viáveis de *A. niger* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸	10⁻⁹	Controle
SL	84	103	164	206	288	359	496	562	603	278
SL CHX	63	96	122	189	247	301	397	476	562	278

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

7.8.2. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito

As Tabelas 43 a 52 e as Figuras 36 a 45 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de teste desafio realizado tanto pelo método convencional (BP, 2003; USP, 2006) quanto pelo método do valor D (ORTH, 1989).

Tabela 43. Log de UFC/g de *P. aeruginosa*, nas formulações de sabonete líquido com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo

Sistema Conservante	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	21d	28d
SL	6,0	5,74	5,32	4,95	4	0	0	0	0	0
SL CHX	6,0	5,32	4,90	4,00	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado; SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O resultado do teste evidenciou que o sabonete líquido de clorexidina apresenta atividade superior à mesma formulação isenta de clorexidina frente à *P. aeruginosa*.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D) obtidos para as formulações isenta e com digluconato de clorexidina, utilizando *P. aeruginosa*, estão apresentados nas Figuras 36 e Tabela 44.

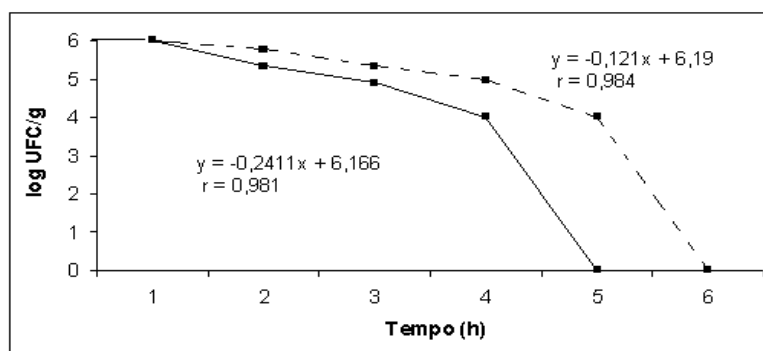


Figura 36. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *P. aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento de digluconato de clorexidina (pontilhado) e contendo digluconato de clorexidina (cheio).

Tabela 44. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações sem e com digluconato de clorexidina, utilizando *P. aeruginosa*

Sistema conservante	Equação da reta	Valor D (h)	Coeficiente de correlação (R)
SL	$y = -0,121x + 6,19$	8,1	0,984
SL CHX	$y = -0,2411x + 6,166$	4,06	0,981

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O valor D confirma a redução do microrganismo *P. aeruginosa* quando comparado à mesma formulação sem a presença da clorexidina.

Tabela 45. Log de UFC/g de *E. coli*, nas formulações de sabonete líquido com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo

Sistema Conservante	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	21d	28d
SL	6,0	5,5	4,47	4,3	0	0	0	0	0	0
SL CHX	6,0	5,41	4,30	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado; SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O resultado do teste evidenciou que o sabonete líquido de clorexidina apresenta atividade superior à mesma formulação isenta de clorexidina frente à bactéria *E. coli*.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D) obtidos para as formulações isenta e com digluconato de clorexidina, utilizando *E. coli* para o teste desafio, estão apresentados na Figura 37 e Tabela 46.

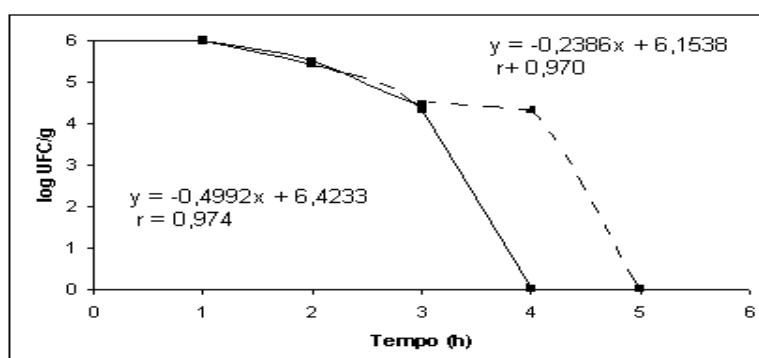


Figura 37. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *E. coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento de digluconato de clorexidina (pontilhado) e contendo digluconato de clorexidina (cheio).

Tabela 46. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações sem e com digluconato de clorexidina, utilizando *E. coli*

Sistema conservante	Equação da reta	Valor D (h)	Coeficiente de correlação (R)
SL	$y = -0,2386x + 6,1538$	4,06	0,970
SL CHX	$y = -0,4992x + 6,4233$	1,95	0,974

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O valor D confirma a redução do microrganismo *E. coli* quando comparado à mesma formulação sem a presença da clorexidina.

Tabela 47. Log de UFC/g de *S. aureus*, nas formulações de sabonete líquido com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo

Sistema Conservante	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	21d	28d
SL	4,90	4,30	0	0	0	0	0	0	0	0
SL CHX	4,47	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado; SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina.

O resultado do teste evidenciou que o sabonete líquido de clorexidina apresenta atividade superior à mesma formulação de sabonete líquido isento de clorexidina frente à bactéria *S. aureus*.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D) obtidos para as formulações isenta e com digluconato de clorexidina, utilizando *S. aureus* para o teste desafio, estão apresentados na Figura 38 e Tabela 48.

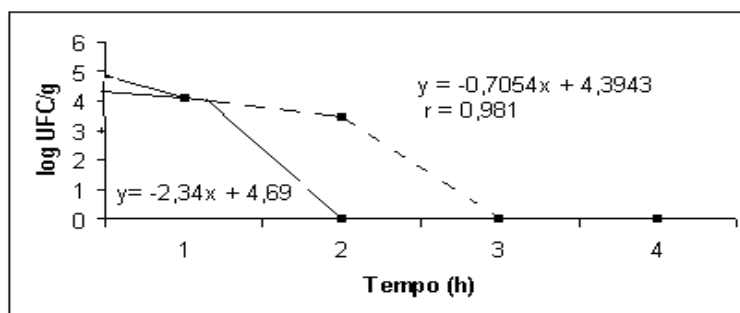


Figura 38. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *S. aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento de digluconato de clorexidina (pontilhado) e contendo digluconato de clorexidina (cheio).

Tabela 48. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações sem e com digluconato de clorexidina, utilizando *S. aureus*

Sistema conservante	Equação da reta	Valor D (h)	Coeficiente de correlação (R)
SL	$y = -0,7054x + 4,3943$	1,40	0,981
SL CHX	$y = -2,345x + 4,69$	0,43	1

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O valor D confirma a redução do microrganismo *S. aureus* na formulação com clorexidina quando comparado à mesma formulação isenta de clorexidina.

Tabela 49. Log de UFC/g de *C. albicans*, nas formulações de sabonete líquido com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo

Sistema Conservante	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	21d	28d
SL	4,90	4,47	0	0	0	0	0	0	0	0
SL CHX	4,60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado; SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina.

O resultado do teste evidenciou que o sabonete líquido de clorexidina apresenta atividade superior à mesma formulação de sabonete líquido isento de clorexidina frente à levedura *C. albicans*.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D) obtidos para as formulações isenta e com digluconato de clorexidina, utilizando *C. albicans* para o teste desafio, estão apresentados na Figura 39 e Tabela 50.

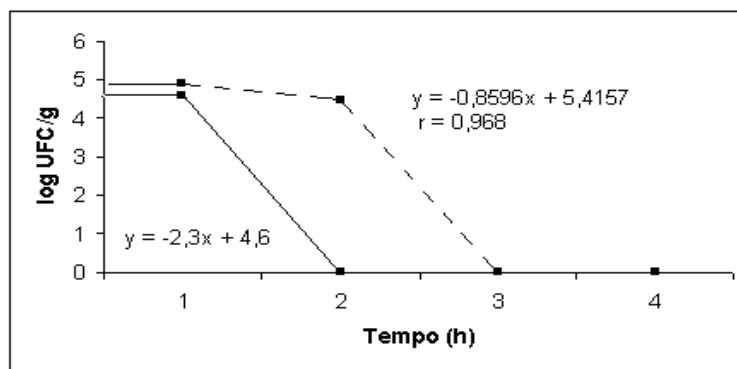


Figura 39. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *C. albicans* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento de digluconato de clorexidina (pontilhado) e com digluconato de clorexidina (cheio).

Tabela 50. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para as formulações sem e com digluconato de clorexidina, utilizando *C. albicans*

Sistema conservante	Equação da reta	Valor D (h)	Coeficiente de correlação (R)
SL	$y = - 0,8596x + 5,4157$	1,12	0,968
SL CHX	$y = - 2,3x + 4,6$	0,43	1

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O valor D confirma a redução de *C. albicans* na formulação com clorexidina quando comparado à mesma formulação isenta do ativo.

Tabela 51. Log de UFC/g de *A. niger*, nas formulações de sabonete líquido com e sem a presença da clorexidina, em função do tempo

Sistema Conservante	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	21d	28d
SL	6,0	5,53	5,25	4,84	4,47	0	0	0	0	0
SL CHX	6,0	5,23	5,04	4,47	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado; SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina.

O resultado do teste evidenciou que o sabonete líquido de clorexidina apresenta atividade superior à mesma formulação de sabonete líquido isento de clorexidina frente ao fungo *A. niger*.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D) obtidos para as formulações controle e com digluconato de clorexidina, utilizando *A. niger* para o teste desafio, estão apresentados na Figura 40 e Tabela 52.

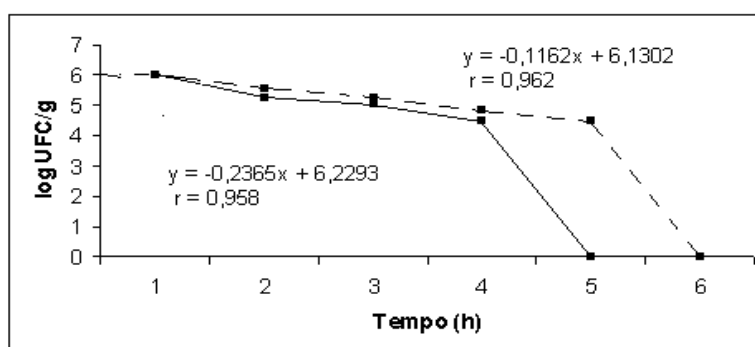


Figura 40. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *A. niger* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido isento de digluconato de clorexidina (azul) e contendo digluconato de clorexidina (vermelho).

Tabela 52. Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e valores (D), obtidos para a formulação sem digluconato de clorexidina e para a formulação com digluconato de clorexidina, utilizando *A. niger*

Sistema conservante	Equação da reta	Valor D (h)	Coeficiente de correlação (R)
SL	$y = -0,1162x + 6,1302$	8,3	0,962
SL CHX	$y = -0,2365x + 6,2293$	4,1	0,958

SL = sabonete líquido; SL CHX = sabonete líquido com digluconato de clorexidina

O valor D confirma a redução do microrganismo *A. niger* quando comparado à mesma formulação sem a presença da clorexidina.

7.9. Discussão

Nos anos de 1980 surgiram os testes de eficácia conservante ou teste desafio ou ainda *challenge test*, que possibilitam a análise da eficácia do sistema conservante em formulações específicas (BP, 2003).

Nestes testes, o produto é contaminado propositalmente com uma carga microbiana específica do microrganismo-teste. O monitoramento é realizado quanto à presença de sobreviventes em intervalos de tempo, pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri de acordo com metodologias internacionalmente recomendadas, para garantir um produto microbiologicamente seguro e estável (ORTH, MILSTERIN, 1989; NICOLETTI et al., 1997; BP, 2003).

Os métodos convencionais baseiam-se na porcentagem de redução da carga microbiana analisada em diferentes tempos. A carga microbiana é expressa em logaritmo decimal (log) de UFC, a qual é obtida em intervalos de tempos variáveis, dependendo do método oficial aplicado (CRÉMIEUX et al., 2005).

Os métodos rápidos se baseiam na inoculação proposital de microrganismos e avaliação da morte celular em intervalos de tempo subsequentes, diferenciando do método convencional quanto à frequência da avaliação das cargas microbianas. No método convencional o período de avaliação é de 28 dias, enquanto que no método rápido é de 48 horas (CRÉMIEUX et al., 2005).

Para a realização deste teste, culturas puras ou misturas de cultura de microrganismos podem ser empregadas, no entanto, as culturas puras são mais apropriadas, pois permitem conhecer as taxas de morte de cada microrganismo e determinar o perfil de resistência para determinada formulação (ORTH, 1993), enquanto que a mistura de culturas pode refletir mais corretamente o perfil de contaminação normal de um produto (BRANNAN, 1997). Ainda de acordo com estes autores, os microrganismos utilizados para o teste devem representar as espécies de bactérias Gram-positivas como, por exemplo, *S. aureus*; Gram-negativas com diversas capacidades metabólicas como *P. aeruginosa*; bactéria do grupo coliforme como *E. coli*; *C. albicans* como levedura e fungos como *Aspergillus niger*.

Os testes de eficácia de conservante são executados a fim de determinar o tipo e a concentração mínima do conservante necessária para que produtos não estéreis acondicionados em recipientes de múltiplo uso e com base aquosa permaneçam conservados e mantenham a estabilidade (ORTH, STEINBERG, 2003), além de fazerem parte dos testes de segurança do produto por avaliar a qualidade

microbiológica durante sua vida útil, inclusive nas condições de uso (RODRIGUES, SAITO, 1991).

Conservantes antimicrobianos não devem ser empregados para substituir as boas práticas de fabricação (BP, 2003; USP, 2006), entretanto, não devem permitir a proliferação microbiana, para que não haja comprometimento do produto, de sua ação e da segurança do paciente (RODRIGUES, SAITO, 1991). A eficácia do conservante deve ser demonstrada em produtos tópicos de múltiplas doses, de uso oral, oftálmico, nasal e fluidos de diálise (USP, 2006). De acordo com Siqueira (2004), o teste de eficácia de conservante deve também ser realizado para a embalagem do produto, uma vez que o material de acondicionamento pode dificultar ou facilitar a entrada de microrganismos no produto.

Para que o produto seja aceito pelo método convencional descrito na farmacopéia britânica (2003), é necessário que haja queda de 2 log da carga bacteriana inicialmente inoculada em 48 horas, redução de 3 log da carga inicial de bactéria em 7 dias e não deve haver proliferação microbiana até o período final de realização do teste. Em relação aos fungos, deve haver redução de 2 log da carga inicialmente inoculada em 14 dias e não deve haver aumento da população fúngica até o período final do teste. De acordo com a farmacopéia americana (2006), deve haver redução de pelo menos 2 log em 14 dias da carga bacteriana inicialmente inoculada e não deve haver aumento de microrganismos até o final do teste. Quanto aos fungos, não deve haver aumento de microrganismos contatos no início do teste, no 14º dia e no período final do teste. O método de regressão linear é outra metodologia descrita para avaliação da eficácia do sistema conservante. Neste método, a taxa de inativação dos microrganismos é obtida através da redução decimal (valor D), que corresponde ao tempo necessário para que 90% (1 log) da população microbiana do teste morra, quando submetidos ao agente letal (ORTH, 1993; MAZZOLA et al., 2003).

De acordo com Orth e Steinberg (2003), o valor D é calculado tomando-se a recíproca negativa da inclinação da curva de sobrevivência traçada, utilizando o número log de microrganismos sobreviventes em função do tempo em que as amostras foram coletadas para cada espécie microbiana teste. Menores valores D indicam uma taxa de morte rápida, e, valores maiores, indicam que a taxa de morte é mais lenta.

As vantagens que podem ser conferidas ao método do valor D são resultados rápidos, possibilidade de estimar o tempo necessário para eliminação total de

qualquer microrganismo em um produto, pode ser utilizado em estudo de efeitos aditivos e sinérgicos de combinação de conservantes (PINTO et al., 2003).

O teste de neutralizante foi executado para permitir a contagem de microrganismos viáveis presentes no sabonete líquido com 3% de digluconato de clorexidina. Neste estudo, o método escolhido para neutralização da formulação foi a diluição, pois se tivesse sido empregado algum inativante para clorexidina, o tensoativo permaneceria exercendo sua atividade antimicrobiana, e com a diluição este produto também foi neutralizado.

Neste trabalho foi seguida a metodologia recomendada pelas farmacopéias britânica (2003) e americana (2006), com algumas modificações, para o método convencional. De acordo com os compêndios, o teste é realizado em intervalos de tempo de 0, 6 e 24 horas, 7, 14 e 28 dias (BP, 2003) e de 0 hora, 7, 14 e 28 dias (USP, 2006). Os intervalos de tempo analisados neste trabalho foram 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, a fim de obter um maior número de pontos.

Os resultados obtidos demonstram que foi necessário uma diluição do sabonete líquido contendo clorexidina maior do que aquela recomendada pela literatura para que fosse possível a contagem do número de microrganismos viáveis comparáveis ao controle, tendo em vista que nas diluições sugeridas pela metodologia seguida neste trabalho, não houve crescimento microbiano. Os resultados obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido foi verificado que o sabonete na concentração de $3 \times 10^{-8}\%$ inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Para que o valor D seja critério de aceitação no teste desafio, este número deve ser menor ou igual a 4 horas para bactérias patogênicas e menor ou igual a 28 horas para bactérias não patogênicas e bolores (BP, 2003).

De acordo com os requisitos exigidos pelas farmacopéias britânica (2003) e americana (2006), ambos os produtos analisados (sabonete líquido contendo ou não digluconato de clorexidina) apresentaram eficácia para o *S. aureus* e foram aceitos quanto ao teste desafio pela metodologia convencional e pelo método rápido. Houve redução de 100% da carga microbiana inoculada antes de 48 horas e durante o período de realização do teste não houve desenvolvimento de microrganismos e o valor D foi inferior a 4 horas.

Os resultados encontrados para *C. albicans* demonstraram que as duas formulações analisadas foram eficazes e aceitas no teste desafio pelo método

convencional e pelo método rápido. Houve morte em 100% da carga microbiana inicialmente inoculada antes de 48 horas e durante o período de realização do teste não houve desenvolvimento da levedura e o valor D encontrado foi menor que 28 horas. Portanto, as formulações estavam de acordo com os requisitos exigidos pelos compêndios oficiais seguidos neste trabalho.

Para *E. coli*, as formulações analisadas foram eficazes e aceitas para o teste desafio quando adotada a metodologia convencional e do teste rápido. Houve redução de 100% dos microrganismos inicialmente inoculados em menos de 48 horas e durante a realização do teste os mesmos não se desenvolveram. O valor D encontrado para as formulações analisadas foi inferior a 4 horas. Portanto, as formulações estavam de acordo com os requisitos exigidos pelos compêndios oficiais.

Para *P. aeruginosa* as duas formulações analisadas atenderam aos requisitos farmacopéicos exigidos para o teste desafio pela metodologia convencional, pois houve redução de 100% da carga microbiana inicialmente inoculada antes de 48 horas e durante o período de realização do teste não houve desenvolvimento de microrganismos, mas apenas a formulação com clorexidina atendeu aos requisitos farmacopéicos exigidos pelo teste rápido, pois o valor D para a formulação isenta de clorexidina foi superior a 4 horas.

Para o fungo *A. niger* as duas formulações analisadas cumpriram com os requisitos farmacopéicos exigidos para o teste desafio pela metodologia convencional e do teste rápido. Houve redução de 100% da carga microbiana inicialmente inoculada em menos de 48 horas e durante o período de realização do teste não houve proliferação deste microrganismo e o valor D encontrado foi inferior a 4 horas.

Diante dos resultados encontrados, foi verificado que as duas formulações foram eficazes na eliminação dos microrganismos analisados, confirmando dados da literatura que o tensoativo lauroilmiristilsarcosinato de sódio possui atividade antimicrobiana (BALSAM et al., 1972). Esse fato justifica não ter havido grande diferença nos valores D encontrados para a formulação com e sem a presença de clorexidina diante dos microrganismos desafiados, e também em relação ao tempo necessário para que ocorresse morte de 100% da população microbiana.

Porém, este fato favoreceu a realização de diluições altas da formulação, e isso acarretou em diminuição da sensibilidade da técnica.

Diante dos resultados obtidos no teste desafio, foi possível concluir que não houve formação de halo de inibição para as formulações 1 e 2 analisadas nos

ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em ágar, devido às interações ocorridas entre o tensoativo e o meio de cultura sólido, ao excesso de clorexidina e o meio de cultura, devido à viscosidade das formulações e ao complexo formado entre a clorexidina e o tensoativo lauriléter.

Estes dados também confirmam que os resultados obtidos com o teste de atividade antimicrobiana por difusão em ágar para as formulações 3 e 4 são devido ao tensoativo sarcosinato.

Também confirmam os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana por diluição em caldo, em que grandes diluições das formulações mostraram-se eficazes para inibir o crescimento microbiano.

7.10. Conclusão

Foi possível concluir que tanto a clorexidina quanto o tensoativo sarcosinato utilizado nas formulações possuem atividade conservante, mas esta ação não foi muito potencializada quando se adicionou clorexidina à formulação de sabonete líquido em estudo, com exceção diante da bactéria *P. aeruginosa*.

A metodologia do valor D estava em concordância com os resultados encontrados pela metodologia convencional para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. Níger* para a formulação com clorexidina e para a formulação sem clorexidina houve discordância apenas em relação à *P. aeruginosa*, com valor D superior a 4 horas.

Estas informações confirmam os resultados obtidos com os ensaios de atividade antimicrobiana, que demonstraram que grandes diluições das formulações foram eficazes para impedir o desenvolvimento microbiano e que os resultados obtidos pelo teste de difusão em ágar foram falso-negativos, por não haver formação de halo de inibição devido à viscosidade, às interações ocorridas entre as formulações e o meio de cultura sólido e entre a clorexidina e os tensoativos utilizados.

A metodologia do valor D foi importante porque considerou a resistência do microrganismo em análise quando estava em contato direto com agente químico possuidor de atividade antimicrobiana.

Finalmente, foi observado que entre os microrganismos testados, a *P. aeruginosa* foi o mais resistente à clorexidina, conforme observado nos testes de atividade antimicrobiana pelo método de diluição em caldo e corroborando os dados da literatura.

**8. ANÁLISE QUANTITATIVA DE SABONETE LÍQUIDO
DESENVOLVIDO CONTENDO 3% DE DIGLUCONATO DE
CLOREXIDINA**

Este estudo teve por objetivo avaliar o teor de digluconato de clorexidina presente no sabonete líquido contendo 3% de digluconato de clorexidina.

8.1. Material

Foram utilizadas solução padrão secundário de digluconato de clorexidina e solução amostra de digluconato de clorexidina, descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.3 respectivamente.

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro especificado na Lista de Equipamentos, (p.xxvii, item 13), utilizando etanol como solvente.

8.1.1. Preparo da substância química padrão secundário

A partir da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20,98% (p/v), foi preparada uma solução a 0,1%. Uma alíquota de 500,0 μ L da solução padrão foi diluída em balão volumétrico de 100 mL, utilizando-se água deionizada para obtenção de solução a 0,1% (solução A).

8.1. 2. Método

A partir da solução A, uma alíquota de 200,0 μ L foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se etanol para obtenção de uma solução a 0,002%.

O espectro de absorção na região de ultravioleta foi obtido utilizando-se o equipamento especificado na Lista de Equipamentos (p. xxvii, item 13) e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi realizada entre 200 e 400 nm. O espectro de absorção de solução de digluconato de clorexidina padrão secundário, em etanol, na região de ultravioleta pode ser visto na Figura 41.

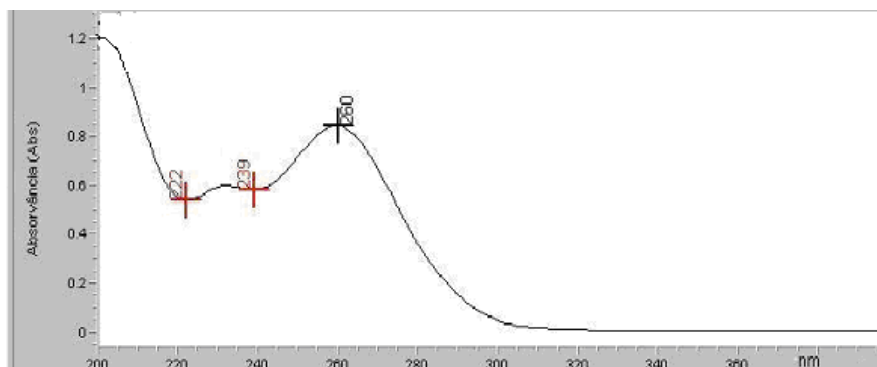


Figura 41. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário em etanol, em concentração de 0,002%, de 200 a 400 nm.

8.1.2.1. Obtenção da curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região de ultravioleta obedece à linearidade.

A partir da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20,98%, foi preparada uma solução a 0,1%. Uma alíquota de 500,0 μL da solução padrão foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de micropipeta, e foi diluída utilizando-se água deionizada para obtenção de uma solução a 0,1% (solução A). A partir da solução A, foram preparadas soluções de digluconato de clorexidina em concentrações crescentes, para obtenção da curva de Ringbom de 18 pontos. Soluções com concentrações de 0,0002 a 0,0036% de digluconato de clorexidina foram obtidas transferindo-se alíquotas da solução A para balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com etanol (Tabela 53). As leituras foram efetuadas no comprimento de onda de 260,0 nm.

A Figura 42 apresenta as leituras espectrofotométricas que permitiram a construção da curva de Ringbom.

Tabela 53. Preparo da curva de Ringbom de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm

Pontos	Volume (µL) solução estoque de digluconato de clorexidina 0,1%	Concentração final (%)	Absorvância (ABS)	100-T%
1	20	0,0002	0,082	17,205
2	40	0,0004	0,173	32,857
3	60	0,0006	0,261	45,172
4	80	0,0008	0,347	55,022
5	100	0,0010	0,428	62,674
6	120	0,0012	0,501	68,449
7	140	0,0014	0,588	74,177
8	160	0,0016	0,662	78,222
9	180	0,0018	0,762	82,701
10	200	0,0020	0,839	85,512
11	220	0,0022	0,905	87,554
12	240	0,0024	0,985	89,648
13	260	0,0026	1,096	91,983
14	280	0,0028	1,185	93,468
15	300	0,0030	1,279	94,739
16	320	0,0032	1,368	95,714
17	340	0,0034	1,439	96,360
18	360	0,0036	1,526	97,021

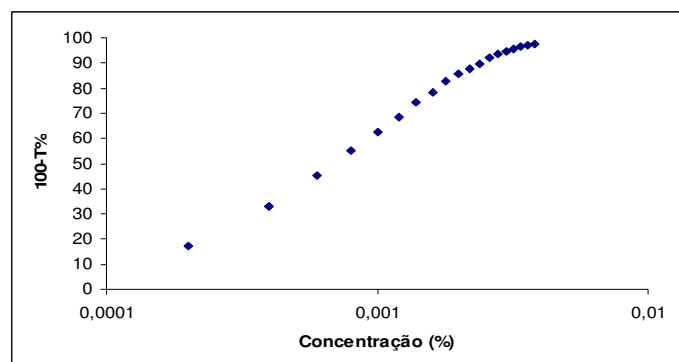


Figura 42. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de digluconato de clorexidina padrão secundário, utilizando etanol como solvente, no comprimento de onda de 260 nm.

8.1.2.2. Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica de solução de digluconato de clorexidina padrão secundário, foram transferidas alíquotas de 500,0 μL da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina para balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com água deionizada (solução A). A partir da solução A, foram preparadas soluções de digluconato de clorexidina em concentrações crescentes, de 0,001% a 0,002% para obtenção da curva analítica de 6 pontos. As soluções foram obtidas transferindo-se alíquotas da solução A para balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com etanol (Tabela 54). Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras das soluções foram efetuadas a 260 nm, utilizando etanol como branco.

Tabela 54. Preparo da curva analítica de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm

Pontos	Volume (μL) solução estoque de digluconato de clorexidina 0,1%	Concentração final (%)
1	100	0,0010
2	120	0,0012
3	140	0,0014
4	160	0,0016
5	180	0,0018
6	200	0,0020

Os resultados das leituras de absorvância obtidos para construção da curva analítica estão apresentados na Tabela 55.

Tabela 55. Valores de absorvâncias determinados para a curva analítica de digluconato de clorexidina padrão secundário por espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

Pontos	Concentração de digluconato de clorexidina (%)	Absorvância a 260 nm	Absorvância média $\pm$ e.p.m. *	DPR%**
1	0,0010	0,427		
		0,422	0,425 $\pm$	0,59
		0,425	0,0015	
2	0,0012	0,523		
		0,522	0,524 $\pm$	0,50
		0,527	0,0015	
3	0,0014	0,613		
		0,617	0,617 $\pm$	0,57
		0,620	0,0020	
4	0,0016	0,714		
		0,707	0,708 $\pm$	0,72
		0,704	0,0030	
5	0,0018	0,790		
		0,791	0,790 $\pm$	0,13
		0,789	0,0006	
6	0,0020	0,889		
		0,884	0,887 $\pm$	0,30
		0,888	0,0015	

* e.p.m. erro padrão da média; ** DPR desvio padrão relativo

A curva analítica de digluconato de clorexidina (Figura 48) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas nos ensaios de linearidade. A equação da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados é $y = 457,33 x - 0,0276$, com coeficiente de correlação (R) igual a 0,9997.

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de digluconato de clorexidina em concentrações de 0,001 à 0,002% pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm estão representados na Figura 43.

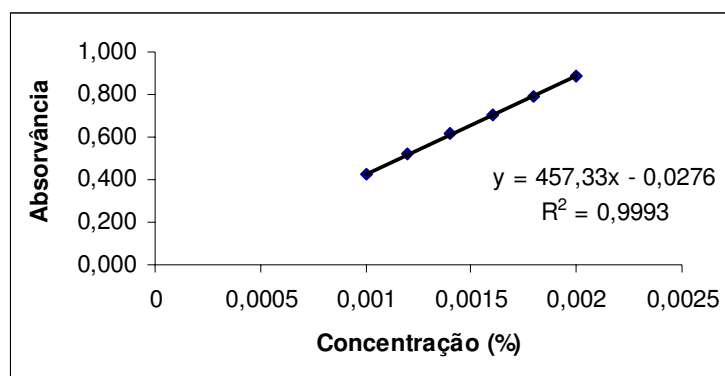


Figura 43. Representação gráfica da curva analítica da solução de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente.

8.2. Análise estatística

A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores de absorvâncias utilizados na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliados pela análise da variância (ANOVA), apresentada na Tabela 56.

Tabela 56. Análise da variância das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

Fontes de variação	GL	soma dos quadrados	variância	F _{calc}	F _{tab}
ENTRE doses	5	0,43952	0,08790	732,53*	3,11
regressão linear	1	0,43893	0,43893	3657,73*	4,75
desvio de linearidade	4	0,00059	0,00015	1,23	3,26
RESÍDUO	12	0,00012	0,00001	-	-
TOTAL	17	0,43964	-	-	-

*significativo para $p < 0,5$.

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 57.

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela equação:

$$\epsilon = A/(c.b)$$

Equação 3

Em que: A = absorvância

c = concentração molar

b = caminho óptico da cubeta (cm)

Tabela 57. Parâmetros analíticos utilizados na determinação de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	260
ϵ (L/M.cm)	276202540783,52
Faixa de concentração utilizada (%)	0,001 – 0,002
Equação: $y = ax + b$	
a	457,33
b	0,0276
r (coeficiente de correlação)	0,9997
n	6

8.3. Determinação de digluconato de clorexidina no sabonete líquido

8.3.1. Preparo do padrão

A solução padrão secundário de digluconato de clorexidina foi preparada conforme descrita no item 8.1.2.

8.3.2. Preparo da amostra

Foram pesados 400,0 mg de sabonete líquido contendo 3% de digluconato de clorexidina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com água deionizada, obtendo-se solução com concentração de 0,012%. Desta solução, 1,667 mL foram transferidos para balão volumétrico de 10

mL, com auxílio de micropipeta, e seu volume foi completado com etanol, obtendo-se concentração final de 0,002%. As soluções foram preparadas em seis réplicas.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 260 nm, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico e sabonete líquido isento de clorexidina e etanol como branco.

O cálculo do teor de digluconato de clorexidina no sabonete líquido foi feito utilizando-se a Equação 4.

$$C_A = A_A \cdot C_{SP} / A_{SP}$$

Equação 4

Em que: C_A = concentração da amostra (%)

C_{SP} = concentração da solução padrão secundário (%)

A_A = absorvância da amostra

A_{SP} = absorvância da solução padrão secundário

O teor percentual de digluconato de clorexidina nas amostras foi calculado segundo a Equação 5.

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 5

Em que: C_A = concentração de digluconato de clorexidina encontrada na amostra (%)

C_t = concentração teórica de digluconato de clorexidina na amostra

8.3.3. Resultados

Os valores de teor de digluconato de clorexidina no sabonete líquido, determinados pelo método proposto, encontram-se na Tabela 58.

Tabela 58. Valores determinados para o doseamento de sabonete líquido com digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

Ensaio	Teor de digluconato de CHX ¹ sabonete líquido* (%)	Teor médio ± e.p.m.	DPR%
I	2,91		
II	2,87	2,89 ± 0,0921	0,7877
III	2,90		

*cada valor é média de três determinações

¹CHX, digluconato de clorexidina em sabonete líquido

e.p.m. – erro padrão da média; DPR% - desvio padrão relativo

8.4. Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método desenvolvido (AOAC, 1990; USP, 2004). Para a realização deste teste, quantidades exatamente definidas de solução padrão secundário de digluconato de clorexidina foram adicionadas às soluções amostras de sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina para a quantificação da substância.

8.4.1. Preparo das soluções

A partir da solução padrão secundário com concentração de 0,1%, foi preparada solução de digluconato de clorexidina em concentração de 0,002%.

As soluções amostras foram preparadas com concentração de 0,012%, a partir da solução de sabonete líquido com digluconato de clorexidina.

Para o ensaio de recuperação, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL, denominadas A, R1, R2 e R3. Foram adicionadas quantidades de 20,0; 40,0; 60,0 e 120,0 µL de solução de digluconato de clorexidina padrão secundário em concentração de 0,1% nos balões R1, R2, R3 e P, respectivamente. Os volumes dos balões foram completados com etanol, obtendo-se concentrações de 0,0012; 0,0014; 0,0016; 0,0018; 0,0012% para os balões A, R1, R2, R3 e P, respectivamente (Tabela 59). Cada concentração foi preparada em triplicata.

Tabela 59. Preparo das soluções para o teste de recuperação de sabonete líquido de digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

	Vol. Sol. da amostra	Vol. Sol padrão sec. CHX	Concentração final
	0,012% (µL)	0,1%	(%)
A	1000,0	-	0,0012
R1	1000,0	20,0	0,0014
R2	1000,0	40,0	0,0016
R3	1000,0	60,0	0,0018
P	-	120,0	0,0012

8.4.2. Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de digluconato de clorexidina recuperada (R%) foi calculada utilizando-se a Equação 6.

$$\%R = [(C_f - C_a) / C_r] \times 100$$

Equação 6

Em que: C_f = concentração da solução amostra adicionada de padrão (%)

C_a = concentração da amostra (%)

C_r = concentração teórica da substância padrão secundário adicionada (%)

8.4.3. Resultados

Os valores encontrados no teste de recuperação para sabonete líquido com digluconato de clorexidina estão na Tabela 60.

Tabela 60. Valores obtidos no teste de recuperação do sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente

	Digluconato CHX SPS* adicionado (%)	Concentração final (%)	Digluconato CHX encontrado (%)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	0,0002	0,0012	0,00139	101,41		
R2	0,0004	0,0014	0,00158	99,01	100,12	1,21
R3	0,0006	0,0016	0,00178	99,93		

DPR, desvio padrão relativo, * digluconato de clorexidina solução padrão secundário

8.5. Validação

A validação do método espectrofotométrico de ultravioleta para sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina foi realizada de acordo com o guia publicado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

8.5.1. Linearidade

Os resultados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 8.1.2, foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a linearidade foi verificada pela ANOVA.

8.5.2. Precisão

A precisão foi avaliada pelos ensaios para determinação de digluconato de clorexidina em sabonete líquido, durante três dias consecutivos e o desvio padrão relativo (DPR%) dos dados foi calculado estatisticamente. Os resultados desta análise estão descritos no item 8.3.3, na Tabela 58.

A precisão foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e interdia) e reprodutibilidade, realizados em três dias diferentes, nos quais foram analisadas seis amostras preparadas em cada dia. O teor de digluconato de clorexidina encontrado no sabonete líquido foi em média 2,89%. O desvio padrão relativo das absorvâncias nas leituras foi de 1,07 e 1,05% no ensaio intradia e interdia (intermediária), respectivamente.

Ensaios preliminares de reprodutibilidade foram realizados variando o espectrofotômetro (Tabela 61). Foram utilizados equipamentos de marcas diferentes em diferentes laboratórios como descrito na Lista de Equipamentos (p. xxviii, item 13).

Tabela 61. Valores obtidos para a reprodutibilidade do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm do sabonete líquido com digluconato de clorexidina, utilizando etanol como solvente

	Absorvâncias	Absorvância média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)	DPR (%) total
	0,893; 0,877			
1	0,879; 0,891	0,886 $\pm$ 0,0028	0,76	
	0,886; 0,890			
	0,874; 0,863			0,67
2	0,874; 0,869	0,872 $\pm$ 0,0021	0,58	
	0,876; 0,876			
DPR, desvio padrão relativo; e.p.m., erro padrão da média				

Para o teste de reprodutibilidade, o desvio padrão relativo foi de 0,67%. Assim, os desvios estão dentro do permitido, que é de, no máximo, 5% para produtos farmacêuticos, comprovando a precisão do método.

8.5.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, conforme descrito no item 8.4. O método proposto é exato, uma vez que a média das recuperações foi 100,12%, estando de acordo com o especificado na legislação vigente (BRASIL, 2003), que recomenda recuperação entre 98% e 102%.

8.5.4. Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta observada para o digluconato de clorexidina na ausência dos excipientes (padrão secundário) e a resposta verificada na presença dos excipientes do sabonete líquido (Figura 44).

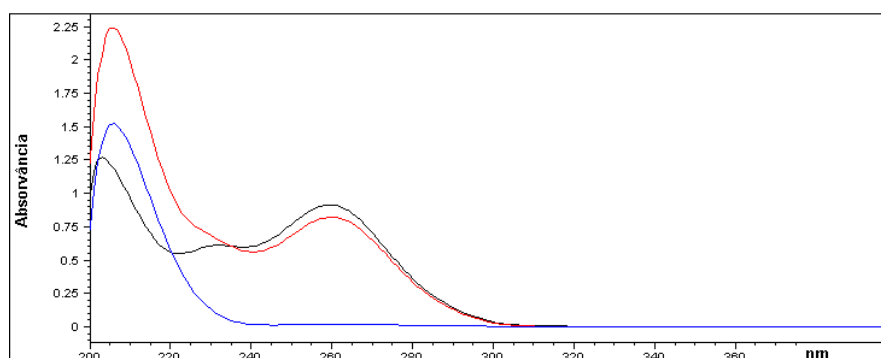


Figura 44. Espectro na região ultravioleta da solução de digluconato de clorexidina padrão secundário (em preto), solução de sabonete com clorexidina (em vermelho) e solução de sabonete sem clorexidina (em azul), utilizando etanol como solvente.

8.5.5. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de parâmetros operacionais como a modificação no comprimento de onda para leitura dos valores de absorvâncias. Desse modo, utilizaram-se comprimentos de 260 nm e 255 nm (Tabela 62).

Tabela 62. Valores obtidos para a robustez do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 260 nm para o sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina, utilizando etanol como solvente

	Absorvância	Absorvância média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)	DPR (%) total
$\lambda = 260 \text{ nm}$	0,875; 0,876			
	0,872; 0,881	0,876 $\pm$ 0,0012	0,37	
	0,875; 0,880			
$\lambda = 255 \text{ nm}$	0,875; 0,869			0,38
	0,865; 0,872	0,870 $\pm$ 0,0014	0,38	
	0,869; 0,869			

λ , comprimento de onda; e.p.m., erro padrão da média; DPR, desvio padrão relativo

8.6. Discussão

A espectrofotometria é uma das técnicas mais utilizadas em análise quantitativa, por ter facilidade de manuseio, custo relativamente baixo, boa sensibilidade, exatidão, robustez, seletividade moderada e ampla aplicabilidade.

Nesta região do espectro, ocorre absorção de moléculas com capacidade de sofrer transições eletrônicas nos orbitais de baixa energia (GIL, 2007).

Métodos quantitativos utilizando espectrofotometria de absorção são baseados na suposição de que a capacidade de absorvidade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto (Lei de Lambert-Beer) (ROCHA, TEIXEIRA, 2004).

O método proposto para a quantificação de digluconato de clorexidina em sabonete líquido foi desenvolvido utilizando etanol como solvente, uma vez que apresentou boa intensidade de absorção da substância ativa neste meio como foi verificado nos ensaios de identificação de digluconato de clorexidina, bem como sua facilidade de aquisição. Embora a água também tenha demonstrado ser bom solvente, houve interferência dos excipientes da formulação quando a utilizou como solvente do sabonete líquido para análise quantitativa.

A linearidade refere-se à capacidade de um método analítico em produzir respostas diretamente proporcional à concentração do analito nas amostras, em determinada faixa de concentração (INMETRO, 2007). Desse modo, a linearidade do método foi obtida na faixa de concentração de 0,001% a 0,002%, com coeficiente de correlação de 0,9997, com desvio padrão relativo entre as determinações menor que 5%, demonstrando a existência de correlação linear entre os valores analisados.

A precisão intradia (repetitividade) e intermediária também foi comprovada com os dados do item 8.5.2, no qual se observa que os valores experimentais obtidos estão próximos, com desvio padrão relativo inferior a 2%.

Embora a reprodutibilidade não seja necessária para validação de um método efetuado por um só laboratório (LEITE, 2002; INMETRO, 2007), foram realizados testes preliminares de reprodutibilidade em que se variou o equipamento e o laboratório, obtendo desvio padrão relativo de 0,67%, estando de acordo com a legislação, que recomenda desvio padrão relativo inferior a 5%.

A robustez tem por finalidade avaliar a sensibilidade que o método apresenta diante de pequenas variações (INMETRO, 2007); sendo assim, a robustez do método proposto pode ser comprovada de acordo com o item 8.5.5., no qual se modificou o comprimento de onda de análise de absorvâncias.

A exatidão também foi comprovada demonstrando concordância entre os valores experimentais e verdadeiros (LEITE, 2002; INMETRO, 2007), como apresentado no item 8.5.3, com valor de recuperação de 100,12%.

O parâmetro especificidade refere-se à resposta de apenas um analito, enquanto que seletividade, refere-se às respostas para vários analitos, mas é possível distinguir a resposta de um analito entre os outros (INMETRO, 2007).

A especificidade do método foi comprovada pelo percentual de resposta observando-se as concentrações obtidas para a solução padrão secundário e amostra. A seletividade foi demonstrada pela ausência de interferência dos excipientes da formulação, como apresentado na Figura 49.

Como não há limite de variação de teor especificado na literatura para sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina, adotou-se a faixa de variação de 10% em relação ao valor inicial de substância ativa. Neste caso, como a formulação é sabonete líquido com 3% de digluconato de clorexidina, a faixa do teor adotado varia de 2,7 a 3,3%. Este limite de variação foi adotado baseado na farmacopéia americana (2008), que especifica como limite de variação 10% de digluconato de clorexidina em creme oral. Como sabonete líquido também é um produto não estéril e de uso externo, tomou-se este valor como limite.

8.7. Conclusão

O método espectrofotométrico na região ultravioleta a 260 nm proposto para análise de teor de digluconato de clorexidina em sabonete líquido foi adequado, uma vez que cumpriu com as exigências da legislação brasileira vigente em relação à validação de métodos analíticos.

Além disso, é uma técnica de fácil e rápida execução, com pouco uso de solvente e de baixo custo.

9. DISCUSSÃO GERAL

A clorexidina é um importante anti-séptico com usos diversos em diferentes áreas. No entanto, são necessárias as BPF e os devidos cuidados durante sua manipulação e armazenamento para evitar que a solução contendo clorexidina seja contaminada e comprometa sua eficácia.

Para a análise da clorexidina e seus produtos de degradação bem como suas impurezas, há diversos métodos descritos na literatura, porém a CLAE se destaca. O método proposto pelas farmacopéias europeia e britânica (reação colorimétrica) para análise de cloroanilina nos sais de clorexidina é menos sensível e exato. Os métodos propostos por Revelle e colaboradores (1993) e por Doub (1996), apenas separa e identifica as impurezas da clorexidina, mas não as quantifica.

Entre os métodos de análise para clorexidina em fluidos biológicos encontrados na literatura, o método espectrofotométrico apresentado por Jensen e Christensen (1971) não é específico para clorexidina, pois recupera constituintes da saliva, embora seja um método de simples e fácil execução. Entretanto, o método de fluorescência descrito por Vries e colaboradores (1991) é simples e exato para determinação de clorexidina em solução aquosa e em saliva. O método proposto por Bosnevoll e colaboradores (1974) verifica a quantidade de clorexidina que fica retida na boca após 24 horas do enxágue com solução de digluconato de clorexidina 0,2%.

Os métodos cromatográficos de análise para clorexidina em saliva são mais trabalhosos exigindo processos de extração mais demorados e complicados, porém possuem maior sensibilidade e especificidade; o método de micro-extração em fase sólida permite avaliar diversos aspectos como ligação e estabilidade da clorexidina à saliva, farmacocinética da clorexidina após enxágue com a solução de clorexidina, porém, exige diversas passagens para a extração da clorexidina, tornando-se trabalhoso e necessitando de maior tempo de análise.

O método de análise apresentado por Usui e colaboradores (2006), é mais sensível e seletivo que o método CLAE-UV e também fornece mais informações para a identificação da clorexidina e suas impurezas.

Para determinação de clorexidina em urina, a CLAE é o método de escolha. O método proposto por Wainwright e Cooke (1986) permite detectar *p*-cloroanilina na urina, porém apenas a clorexidina foi quantificada. A técnica de CLAE associada à extração em fase sólida, apresentada por Below e colaboradores (2004), permite determinar o limite de quantificação de clorexidina em fluidos biológicos e em

preparações farmacêuticas e também possibilita observação de *p*-cloroanilina e 1-cloro-4-nitrobenzeno, mas suas quantificações não são exatas.

Em preparações farmacêuticas, a CLAE é o método mais utilizado, porém necessita de extração da clorexidina dos produtos que em alguns casos é demorada. O método proposto por Miribel e colaboradores (1983) necessitou de diversos passos, e, espectrometria de massas e ressonância magnética foram realizadas para verificar se a estrutura química era realmente da clorexidina. Os métodos propostos por Gavlick (1992) e Bauer e colaboradores (1984) permitem quantificação de clorexidina e cloroanilina.

Não foi encontrado na literatura método de análise para sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina e análise quantitativa pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar para solução de digluconato de clorexidina. Em virtude destes motivos, estes métodos foram desenvolvidos e validados.

A solução de digluconato de clorexidina utilizada neste trabalho cumpriu com os testes de identificação, uma vez que estava de acordo com os parâmetros farmacopéicos exigidos e de acordo com a solução padrão secundário.

O método analítico de doseamento microbiológico da solução de digluconato de clorexidina por difusão em ágar mostrou-se uma técnica eficiente, com pouco custo e facilidade de execução. Foi possível validar este método, utilizando-se análises de variância, no qual a solução apresentou potência de 92,58% frente ao microrganismo *S. aureus*.

As formulações de sabonetes líquidos desenvolvidas demonstraram diferentes características físicas, quando observadas visualmente, confirmando o fato de haver precipitação e turvação das preparações contendo tensoativo aniônico lauril.

Em relação à viscosidade, também foi observado que, com aumento da concentração de clorexidina nos produtos, houve aumento da viscosidade, até o ponto em que o sistema micelar do tensoativo suportou a quantidade de clorexidina presente e conseguiu manter o sistema, como observado nas formulações I e II contendo 1% e 2% de clorexidina. No entanto, ao adicionar quantidade maior de clorexidina, o sistema micelar não mais conseguiu estabilizar o sistema, acarretando perda da viscosidade, como observado nas formulações I e II contendo 3% e 4% de clorexidina.

Em relação ao tensoativo aniônico sarcosinato, houve uma melhor estabilidade do sistema sem a presença de turvação e precipitação, demonstrando que este

detergente embora seja também aniônico, foi estruturalmente mais compatível com a clorexidina.

De acordo com resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar foi verificado que as formulações 1 e 2 contendo tensoativo aniônico lauril não apresentaram atividade antimicrobiana. Entretanto, quando analisadas pelo método da microdiluição em caldo, houve atividade para alguns dos microrganismos analisados, demonstrando que a incompatibilidade deste produto com a clorexidina é técnica.

O fato de não ter havido resposta antimicrobiana pelo método de difusão em ágar para as formulações 1 e 2, pode ser devido à interação entre o tensoativo aniônico lauril e o meio de cultura sólido, entre o excesso de clorexidina e o meio de cultura sólido, dificuldade de difusão por causa do excesso de viscosidade nas formulações com maiores quantidades de clorexidina e pela formação do complexo aniônico-catiônico formado entre a clorexidina e tensoativo lauril, que pode ter dificultado a difusão da clorexidina no ágar.

O fato de ter havido halo de inibição de crescimento microbiano menor para as formulações 3 e 4 com maiores concentrações de clorexidina, quando analisadas pelo método de difusão em ágar, possivelmente ocorreu porque houve maior interação do excesso de clorexidina com o meio de cultura sólido, devido à viscosidade das formulações com maiores concentrações de clorexidina e pode ter havido formação de complexo aniônico-catiônico entre o tensoativo sarcosinato e o excesso de clorexidina, que dificultou a difusão no ágar.

O tensoativo sarcosinato pode ter interagido menos com o meio de cultura sólido e isto possibilitou a difusão do mesmo no ágar e houve formação do halo de inibição de crescimento, pois como já foi visto anteriormente neste trabalho, este tensoativo possui atividade antimicrobiana superior a do tensoativo lauril. Entre os microrganismos testados, os Gram-positivos foram mais sensíveis.

Quando as formulações 3 e 4 foram analisadas pelo método de diluição em caldo foi verificado que com o aumento da concentração da clorexidina nas formulações houve melhora da resposta antimicrobiana, demonstrando que não houve interações entre as formulações e o meio de cultura líquido.

O método de microdiluição em caldo foi melhor em relação à técnica de difusão em ágar, pois a viscosidade das formulações, as interações entre o tensoativo e o meio de cultura e a maior quantidade de clorexidina nas formulações não interferiram

nos resultados como aconteceu para o método de difusão. Confirmando os dados obtidos com o teste de atividade antimicrobiana por difusão em ágar, os microrganismos mais sensíveis à clorexidina foram os Gram-positivos.

Houve dificuldade de análise de atividade antimicrobiana dos sabonetes líquidos, pois os tensoativos presentes possuem atividade antimicrobiana, e justamente por isso foram realizados controles apenas com o sabonete líquido isento de clorexidina e também os tensoativos podem ter inferido com o meio de cultura sólido dificultando a difusão do produto e a formação do halo de inibição de crescimento, podendo mascarar os resultados.

O tensoativo anfótero cocoamidopropil betaína não modificou os aspectos físicos das formulações 2 e 4 quando comparadas com as formulações 1 e 3, respectivamente, pois as formulações 1 e 2 apresentaram-se turvas e com precipitação enquanto que as formulações 3 e 4 apresentaram-se límpidas.

O tensoativo cocoamidopropil betaína também não alterou os resultados de atividade antimicrobiana, pois pelo método de difusão em ágar as formulações 1 e 2 não apresentaram resposta e as formulações 3 e 4 apresentaram respostas semelhantes. Quando comparadas pelo método de diluição em caldo, as formulações 1 e 2 apresentaram respostas antimicrobiana semelhantes, quando comparadas na mesma concentração para o mesmo microrganismo, e as formulações 3 e 4 também apresentaram respostas semelhantes, quando comparadas na mesma concentração para o mesmo microrganismo.

No teste desafio foi avaliado o sabonete líquido contendo clorexidina e a mesma formulação isenta de clorexidina, frente a *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *A. niger*. Os resultados demonstraram não haver grande diferença de atividade antimicrobiana entre as formulações analisadas, pois não houve grande diferença de valor D encontrado para ambas as formulações.

As duas formulações analisadas cumpriram com o teste desafio diante de todos os microrganismos analisados pelo método convencional. Quanto à metodologia do teste rápido, apenas a formulação isenta de clorexidina não atendeu aos requisitos exigidos pelas farmacopéias diante de *P. aeruginosa*, pois o valor D obtido foi superior a 4 horas.

Como se trata de produto contendo tensoativo com atividade antimicrobiana, foi necessário realizar diluições maiores que as diluições apresentadas pela literatura para o teste de neutralizante, mas este fato acarretou em perda de sensibilidade da

técnica. Portanto, produtos que naturalmente possuem atividade antimicrobiana, mesmo sem a adição de ativos, dificultam a sua análise. Talvez seja este o motivo de não ter sido encontrado na literatura trabalhos de atividade antimicrobiana de sabonetes líquidos pelo método de difusão em ágar, diluição em caldo e teste desafio.

Há neutralizantes para a clorexidina como solução de azolectina a 0,75% e tween 80 a 0,5%, mas se estes produtos tivessem sido utilizados não teria sido feito a neutralização do tensoativo presente nas formulações, por isso foi escolhido o método da diluição para neutralizar os produtos em análise.

O método analítico na região de ultravioleta utilizando etanol como solvente demonstrou-se sensível, de fácil aplicação, rápida execução, com baixo custo e sem geração de resíduos tóxicos. Foi validado de acordo com análise de variância e cumpriu com os parâmetros descritos na legislação vigente para validação de métodos analíticos.

10. CONCLUSÕES

A solução de digluconato de clorexidina foi identificada e caracterizada utilizando-se técnicas como faixa de fusão, densidade relativa, pH, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região de ultravioleta e infravermelho.

Foi possível propor ensaio microbiológico, pela técnica de difusão em ágar, utilizando *S. aureus* como microrganismo indicador, para solução de digluconato de clorexidina como método de análise quantitativa.

No estudo de atividade antimicrobiana das formulações desenvolvidas foi constatado que a incompatibilidade entre o tensoativo aniônico lauriléter sulfato de sódio e a clorexidina é técnica, mas ainda assim possui atividade antimicrobiana.

O estudo de atividade antimicrobiana em meio líquido foi mais favorável para verificar a atividade das formulações sem interferentes, pois no ensaio por difusão em ágar, a viscosidade das formulações, as interações entre o tensoativo e meio de cultura e o excesso de clorexidina e o meio de cultura prejudicaram os resultados.

Diante dos resultados apresentados pelo ensaio de atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo, foi observado que há aumento de atividade antimicrobiana quando se eleva a concentração de clorexidina de 1%, 2% e 3% em todas as formulações. No entanto, ao elevar para 4%, não há melhora significativa de atividade, principalmente ao se levar em conta fatores econômicos, de toxicidade e risco de resistência bacteriana.

O tensoativo sarcosinato foi estruturalmente mais compatível com a clorexidina uma vez que não houve precipitação e turvação das formulações com este detergente e também interagiu menos com os meios de cultura utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

O tensoativo cocoamidopropil betaína não melhorou os aspectos físicos e a atividade antimicrobiana das formulações 2 e 4 em relação às formulações 1 e 3, respectivamente.

No estudo do teste desafio, as duas formulações estudadas (com e sem a presença de clorexidina), cumpriram com os requisitos farmacopéicos para a metodologia convencional. Para a metodologia do teste rápido, apenas a formulação sem a presença de clorexidina não cumpriu com o teste para a *P. aeruginosa*.

Para *E. coli*, o valor D encontrado para o sabonete sem a clorexidina foi 4,06 horas e para o sabonete com a clorexidina foi, 1,9 horas. Para *P. aeruginosa* o valor D encontrado para o sabonete sem a clorexidina foi 8,1 horas e para o sabonete com a clorexidina foi 4,0 horas. Para *A. niger*, o valor D para o sabonete sem a clorexidina

foi 8,3 horas e para o sabonete com a clorexidina foi 4,1 horas. Para *S. aureus* o valor D encontrado para o sabonete sem a clorexidina foi 1,4 horas e para o sabonete com a clorexidina foi 0,43 horas e para *C. albicans*, o valor D encontrado para o sabonete sem a clorexidina foi 1,1 horas e para o sabonete com a clorexidina foi 0,43 horas.

Foi possível desenvolver e validar o método de análise quantitativa de sabonete líquido contendo digluconato de clorexidina, pela técnica de espectrofotometria na região de ultravioleta a 260 nm, utilizando etanol como solvente e faixa de concentração de 0,001% a 0,002%.

Este trabalho foi satisfatório, por conseguir desenvolver formulações distintas com diferentes concentrações de digluconato de clorexidina e avaliar suas atividades antimicrobianas, apesar das interferências ocorridas entre as formulações e as técnicas utilizadas.

Diante dos resultados obtidos com estes ensaios, foi possível obter uma formulação satisfatória em relação à atividade antimicrobiana, custo, facilidade de utilização e também foi possível o desenvolvimento e validação de metodologia analítica quantitativa para esta formulação. A formulação que satisfaz aos objetivos deste trabalho foi a formulação 3 contendo 3% de digluconato de clorexidina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-VILLAR, E. M.; ETTER, S.F.; THIEL, M.A.; HAUSER, P.C. Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Anal. Chem. Acta**, v. 561, p. 133-137, 2006.

ALCAMO, I.E. **Fundamentals of microbiology**. 6th ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publ., 2001. p. 534;567-571,698-708, 743-744.

AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSELL, A.D. Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 65, p. 329-337, 1988.

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ALVES, E.G.; VINHOLI, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnica de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMORIN, C.V.G.; AUN, C.E.; MAYER, M.P. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. **Braz. Oral Res.**, v. 18, n. 3, p. 242-246, 2004.

ANDRADE, D.; BERALDO, C.C.; WATANABE, E.; OLIVEIRA, B.A.; ITO, I. Y. Atividade antimicrobiana *in vitro* do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 2, p. 250-254, 2007.

ANDRADE, F.R.O.; SOUZA, A.A.; ARANTES, M.C.B.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Rev. Eletron. Farm.**, v. 2, n. 2, p. 38-44, 2005.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.4, n. 16, p. 517-524, 2006.

ARAÚJO, M.T.B.; ARAÚJO, R.P.C.; CAMPOS, E.J. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da atividade bactericida da clorexidina 0,12% e a 0,2% e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplak. **Rev. Odonto Ciência**, v.16, n. 33, p. 187-200, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v 1, p. xvii.

BAILEY, F.; BRITTAIN, P.N.; WILLIAMSON, B.F. Automated chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical preparations. **J. Chromatogr.**, v. 109, p. 305-312, 1975.

BAKER, H.; FRANK, O.; DeANGELIS, B.; BAKER, E.R. Biocidal action of chlorhexidine is annulled by nicotinic acid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 10, p. 2458-2459, 1994.

BALSAM, M.S.; RIEGER, M.M.; STRIANSE, S.J. **Cosmetics: science and technology**. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1972. v.1, p. 448.

BAMBACE, A.M.J.; BARROS, E. J.A.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfetantes de superfícies. **Rev. Biociênc. Taubaté**, v. 9, n. 2, p. 73-81, 2003.

BAUER, M.; DEGUDE, C.; MAILHE, L. Simultaneous determination of chlorhexidine, tetracaine and their degradation products by ion-pair liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 315, p. 457-464, 1984.

BAUER, M.; MAILHE, L.; MENARD, D.; ROUANET, J. Dosage de la chlorhexidine et de la tétracaine dans des préparations pharmaceutiques par chromatographie liquide de paires d'ions sur phase greffée type nitrile. **J. Chromatogr.**, 259, p. 360-366, 1983.

BELOW, H.; LEHAN, N.; KRAMER, A. HPLC determination of the antiseptic agent chlorhexidine and its degradation products 4-chloroaniline and 1-chloro-4-nitrobenzene in serum and urine. **Microchim. Acta**, v. 146, p. 129-135, 2004.

BONACORSI, C.; DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G. Citotoxicidade *in vitro* de soluções de digluconato de clorexidina preparadas em farmácias de manipulação. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 21, n. 1, p. 125-132, 2000.

BONADEO, I. **Tratado de cosmética moderna**. Barcelona: Ed. Científico – Medica, 1963. p.1–4, 53, 84-85, 102-106.

BONAZZI, D.; ANDRISANO, V.; GATTI, R.; CAVRINI, V. Analysis of pharmaceutical creams: a useful approach base on solid-phase extraction (SPE) and UV spectrophotometry. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 13, p. 1321-1329, 1995.

BOSNEVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G.; PAUS, P.N. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Archs. Oral Biol.**, v. 19, p. 209-212, 1974.

BRANNAN, D.K. (ed.). **Cosmetic microbiology**: a practical Handbook. Washington: CRC Press, 1997, 323 p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Ministério da Saúde. **Higienização das mãos em serviços de saúde**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15/04/2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Caderno básico de controle de infecção hospitalar**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12/03/2008.

BRASIL b. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Segurança do paciente – higienização das mãos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/03/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 set. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas e Manuais técnicos. **Lavar as Mãos: Informações para Profissionais de Saúde**. Brasília, 1989. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14/04/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 211, 17 de 29 de novembro de 2006. Aprova instruções gerais e específicas para a utilização da lista das Denominações Comuns Brasileiras, conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 nov. 2006

BRITISH pharmaceutical codex 1973. London: Pharmaceutical Press, 1973. p.98.

BRITISH pharmacopoeia 2003. London: Her Majesty Stationery Office, 2003. v.4, p. 334-336.

BRITISH pharmacopoeia 2005. London: Her Majesty Stationery Office, 2005. v.1, p. 441-445.

BROUGHAM, L.R.; CHENG, H.; PITTMAN, K.A. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine in human serum and urine. **J. Chromatogr.**, v. 383, p. 365-373, 1986.

BUCALEM, G.; WEI, T.H. Anti-sépticos na lavagem das mãos do cirurgião. Disponível em: <<http://www.inscricaoonline.com.br/docs/sbcj/img/V2A0aa0015.pdf>>. Acesso em: 14/04/2008.

BUXBAUM, A.; KRATZER, C.; GRANINGER, W.; GEORGOPOULOS, A. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 193-197, 2006.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.; ITO, I.Y. Determinação da concentração inibitória mínima de Cepacol, Malvona e Periogard, ante a *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 25, n. 1, p. 79-84, 1996.

COHEN, B.; SAIMAN, L.; CIMIOTTI, J.; LARSON, E. Factors associated with hand hygiene practices in two neonatal intensive care units. **Pediatr. Infec. Dis. J.**, v. 22, n. 6, p. 494-499, 2003.

COLLINS, C.H.; LYNE, P. M. **Microbiological methods**. 8th ed. London: Arnold, 2004. p. 168-186.

CRÉMIEUS, A.; CUPFERMAN, S.; LENS, C. Method for evaluation of the efficacy of antimicrobial preservatives in cosmetic wet wipes. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 27, p. 223-236, 2005

CURY, A.E. Atividade *in vitro* de alguns anti-sépticos sobre *Candida*. **Rev. Microbiol.**, v.17, n. 2, p. 137-142, 1986.

CYRILLO, M.A. Manual sobre o uso de anti-sépticos. Disponível em: <http://www.2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretaria/saude/ass_farmaceutica/0026/anti_septicos.pdf>. Acesso em: 02/06/2008.

DOUB, W.H.; RUHI, D.D.; HART, B.; MEHELIC, P.R.; REVELLE, L.K. Gradient liquid chromatographic method for determination of chlorhexidine and its degradation product in bulk material. **J. A.O.A.C.**, v. 79, n. 3, p.636-639, 1996.

DRAELOS, Z.D. **Cosméticos em dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.219-222.

ESTRELA, C.R.A.; ESTRELA, C.; REIS, C.; BAMMANN, L.L.; PÉCORA, J.D. Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. **Braz. Dent. J.**, v. 3, n. 14, p. 187-192, 2003a.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, R.G.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORA, J.D.; SOUSA-NETO, M.D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 1, p. 58-62, 2003b.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORA, J.D.; AMORIM, L.F.G.; TOLEDO, O.A. Eficácia antimicrobiana de formulações de digluconato de clorexidina de concentrações e procedências diferentes. **Rev. Odontol. Bras. Central (ROBRAC)**, v. 13, n. 34, p. 10-13, 2004.

EUROPEAN pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005. v. 2, p.1258-1259.

FARIAS, N.C.; BUFFON, M.M.; CINI, R. Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2003.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. v. 2.2-2.2.2; 5.1.7; 2.5; 2.17-2.17.1.

FONSECA, A.; PRISTA, L.N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: Roca, 1993. p. 48-53.

GAFFNEY, M.H.; COOKE, M. Improved method for the determination of chlorhexidine in urine. **J. Chromatogr.**, v. 306, p. 303-313, 1984.

GAGLIARDI, L.; AMATO, A.; BRASIL, A.; CAVAZZUTTI, G.; FEDERICI, E. Determination of preservatives in cosmetic products by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 348, p. 321-326, 1985.

GAJADHAR, T.; LARA, A; SEALY, P.; ADESIYUN, A.A. Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.14, n.3, p. 193-200, 2003.

GALICE, D.M.; BONACORSI, C.; SOARES, V.C.G.; RADDI, M.S.G.; FONSECA, L.M. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 28, p. 143-146, 2006.

GAVLICK, W.K. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine and *p*-chloroaniline using a specialty column and a photodiode-array detector. **J. Chromatogr.**, v. 623, p. 375-380, 1992.

GAVLICK, W.K; DAVIS, P. Gas chromatographic determination of *p*-chloroaniline in a chlorhexidine digluconate containing alcohol foam surgical scrub product. **J. AOAC Int.**, v. 77, n. 3, p. 583-586, 1994.

GENARO, A.R. (Ed) **Remington**: the science and practice of pharmacy. 21st. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2005. cap. 90. p.1626-1628.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 165-168; 225-230; 282; 353-364; 407-416; 451-453; 459-460.

GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; VIANNA, M.E.; BERBER, V.B.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 6, p. 424-428, Aug. 2001.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for determination of lomefloxacin in coated tablets. **J. AOAC Int.** v. 89, n. 4, p. 1077-1079, 2006.

GONÇALVES, L.B.; RAMOS, A.L.; GASPARETTO, A. Avaliação do efeito da clorexidina 0,12% na redução de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimentos de profilaxia. **R. Dental Press Ortop. Facial**, Maringá, v. 11, n. 3, p. 88-92, 2006.

GONTIJO-FILHO, P.P.; MORAIS, M.L.N.; LOUREIRO, H.M.S.; ARMOA, G.R.G. Avaliação *in vitro* de alguns sabões medicinais disponíveis no Brasil. **Rev. Bras. Cir.**, v. 74, n. 4, p. 181-183, 1984.

HÁ, Y.; CHEUNG, A.P. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 14, p. 1327-1334, 1996.

HAAS, C.N.; MARIE, J.R.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P. Assessment of benefits from use of antimicrobial hand products: reduction in risk from handling ground beef. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 208, p. 461-466, 2005.

HART, J.R.; LEVY, E.F. Sarcocinate-cationic – crème rinse and shampoos. **Soap, Cosmetics, Chem. Specialities**, 1977.

HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; HAJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 43, p. 1169-1173, 2007.

HEBERT, V.R.; MIDDLETON, J.R.; TOMASZEWSKA, E.; FOS, L.K. Methodology for quantifying residues of chlorhexidine in raw dairy milk. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 3, p. 567-570, 2003.

HENESSEY, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J. Periodont. Res.**, v. 8, suppl. 12, p. 61-67, 1973.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.244.

HEWITT, W. **Microbiological assay**. New York: Academic Press, 1977. p. 41-42.

HIRATA, K.; KUROKAWA, A. Chlorhexidine gluconate ingestion resulting in fatal respiratory distress syndrome. **Vet. Human Toxicol.**, v. 44, n. 2, p. 89-91, 2002.

HU, O.Y.; WANG, S.; FANG, Y.; CHEN, Y.; KING, M. Simultaneous determination of thimerosal and chlorhexidine in solutions for soft contact lenses and its applications in stability studies. **J. Chromatogr.**, v. 523, p. 321-326, 1990.

HUSTON, C.E.; WAINWRIGHT, P.; COOKE, M. High-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine. **J. Chromatogr.**, v. 237, p. 457-464, 1982.

IMBERT, C.; LASSY, E.; DANIAULT, G.; JACQUEMIN, J-L.; RODIER, M-H. Treatment of plastic and extracellular matrix components with chlorhexidine or benzalkonium chloride: effect on *Candida albicans* adherence capacity *in vitro*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 281-287, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE 008, 2007. Rio de Janeiro: **INMETRO**, 2007. 25 p.

JENSEN, J.E.; CHRISTENSEN, F. A study of the elimination of chlorhexidine from the oral cavity using a new spectrophotometric method. **J. Periodont. Res.**, v. 6, p. 306-311, 1971.

KABARA, J.J. **Cosmetic and drug preservation: principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 605-621, 726-728.

KÖLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. **J. Hosp. Infec.**, v. 51, p. 106-1130, 2002.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannin and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Med.**, v. 65, p. 444-446, 1999.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F. de A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001/2002. p. 18.2.

KUDO, K.; IKEDA, N.; KIYOSHIMA, A.; HINO, Y.; NISHIDA, N.; INOUE, N. Toxicological analysis of chlorhexidine in human serum using HPLC on a polymer-coated ODS column. **J. Anal. Toxicol.**, v. 26, p. 119-122, 2002.

LAM, Y.W.; CHAN, D.C.N.; RODRIGUEZ, S.R.; LINTAKOON, J.H.; LAM, T. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of chlorhexidine in saliva. **J. Chromatogr.**, n. 612, p. 166-171, 1993.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. p. 25-26; 35-36; 65-72.

LEONARDO, M.R.; FILHO, T.; SILVA, L.A.B.; BONIFÁCIO FILHO, N.K.C.; ITO, I.Y. *In vitro* antimicrobial activity of 2.0% chlorhexidine used as a root canal irrigation solution. **J. Endod.**, v. 25, n.3, p. 167-171, 1999.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 2, n. 16, p. 197-201, 2006.

LUNDMARK, L. The evolution of liquid soap. **Cosmet. Toilet.**, v.107, p. 49-53, 1992.

MAGRO-FILHO, O.; RANGEL-GARCIA JR.,I.; MORAIS-SOUZA, A.M.; D'ANTÔNIO, G.M.; MOIMAZ, S.A.S. Lavagem das mãos com soluções de PVP-I, clorexidina e sabão líquido: estudo microbiológico. **Rev. APCD**, v. 54, n. 1, p. 25-28, 2000.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en comprimidos de 200 mg. **Información Tecnológica, La Sereña**, v. 9, n. 5, p. 251- 254, 1998.

MARTINDALE: the complete drug reference. 35th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p.1472-1475.

MARTINS, S.C.S.; SOARES, J.B. Avaliação da eficiência de antissépticos na limpeza das mãos. **B. CEPPA**, v. 11, n. 1, p. 65-70, 1993.

MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V.; MARTINS, A.M.S. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospital for disinfection purposes. **BMC Infect. Dis.**, v. 3, n. 24, p. 1-10, 2003.

MEDLICOTT, N.J.; FERRY, D.G.; TUCKER, I.G.; RATHBONE, M.J.; HOLBOROW, D.W.; JONES, D.S. High performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of chlorhexidine in saliva film. **J. Liquid Chromatography**, v. 17, n. 7, p. 1605-1607, 1994.

MELO, A.F.M.; SANTOS, E.J.V.; SOUZA, L.F.C.; CARVALHO, A.A.T.; PEREIRA, M.S.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 202-205, 2006.

MELO, G.B.; GONTIJO-FILHO, P.P.; BONETTI, A.M. Resistance of enterobacteria isolated from the oral cavity relationship among use of antimicrobial agents, chlorhexidine and mercury. **Biosci J.**, v.16, n. 2, p. 87-102, 2000.

MIRIBEL, L; BRAZIER, J.L.; COMET, F.; LECOMTE, D. Gas-liquid chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical formulations. **J. Chromatogr.**, v. 268, p. 321-328, 1983.

MONTEJANO, H.A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S.G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resurin byp-benzoquinones in polar solvents. **Dyes Pigments**, v. 64, p. 117-124, 2005.

MOREIRA, A.C.A.; WANDERLEY-CRUZ, J.F. Efetividade da clorexidina incorporada a hidrocolóide irreversível. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v. 4, n. 2, p. 113-117, 2005.

MUSTEATA, F.M.; PAWLISZYN, J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 37, p. 1015-1024, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Método de Referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras.** (NCCLS document M27-A2). Wayne, 2002. p. 5-48.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos testes de sensibilidade dos agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico:** norma aprovada. 6. ed. (NCCLS document M7-A6). Wayne, 2003. p. 5-76.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão:** norma aprovada. 8. ed. (NCCLS document M2-A8). Wayne, 2003. p. 5-54.

NEIDLE, E.A.; YAGIELA, J.A. **Farmacologia e terapêutica para dentistas.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1991. p. 495-499.

NICOLETTI, M.A.; ORSINE, E.M.A.; BOU CHACRA, N.A. Sistema conservante em formulações cosméticas. **Cosmet. Toilet.**, v.9, n. 3, p. 28-33, 1997.

ORTH, D.S. **Handbook of cosmetic microbiology.** New York, Marcel Dekker, 1993. p.591.

ORTH, D.S.; MILSTEIN, S.R. Rational development of preservative systems for cosmetic products. **Cosmet. Toilet.**, v. 104, n. 10, p. 91-103, 1989.

ORTH, D.S.; STEINBERG, D.C. Fator segurança no teste de eficácia de preservante. **Cosmet. Toilet.**, v.15, p. 76-81, 2003.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 4, p.391-395, 2003.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v.1, p. 210-222.

PEREIRA, C.V.; CYRINO, M.A.A.C.G.; LUIZ, M.R.; CARVALHO, A.C.; ALMEIDA, A.N. Avaliação dos conhecimentos dos cirurgiões-dentistas em relação à biossegurança na prática clínica. **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, v. 2, n. 1, 2005.

PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; SAMPAIO, F.C.; SAMPAIO, M.C.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F.; HIGINO, J.S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.

PERRINS, N.; BOND, R. Synergistic inhibition of the growth *in vitro* of *Microsporum canis* by miconazole and chlorhexidine. **Vet. Dermat.**, v. 14, p. 99-102, 2003.

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

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. **Estética-cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Organização Andrei, 1998. p.88-90.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 81-104; 219-258; 261-286.

QUIRYNEN, M.; AVANTROODT, P.; PEETERS, W.; PAWELS, M.; LOUKE, W.; VAN STEENBERGHE, D. Efeito de diferentes formulas de elixires de clorexidina na placa bacteriana recém-formada. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 1127-1136, 2001.

QUITETE, A.M.; TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Validação de metodologia analítica para determinação de digluconato de clorexidina em solução degermante a 2,0% e 4,0%. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 54., 2007, Araraquara. **Anais...** Araraquara, CACIF/FCF, 2007. p .55.

RADEVA, E.; INDIJOV, B.; VACHEVA, R. Antibacterial activity of intracanal medicaments against bacterial isolates in cases of acute periapical periodontitis (nonexudative form). **J. MAB Annual Proceeding, Scientific Papers**, n. 2. 2005.

REVELLE, L.K.; DOUB, W.H.; WILSON, R.T.; HARRIS, M.H.; RUTTER, A.M. Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. **Pharm. Res.**, v. 10, n. 12, p. 1777-1784, 1993.

RICHARD, A.; ELBAZ, M.; ANDERMANN, G. Determination of 4-chloroaniline and chlorhexidine digluconate by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 298, p. 356-359, 1984.

RIEGER, M.M. Surfactant Encyclopedia. **Cosmet. Toilet.**, p.6, 1993.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, M.T.A.; SAITO, T. Avaliação da eficácia antimicrobiana de tiomersal e fenol em alguns produtos imunobiológicos. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v. 27, n. 2, p. 127-136, 1991.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay of gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 40, p. 443-446, 2006.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.A.; FIDEL, S.R.; DIAS, M.; HIRATA JUNIOR, R. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 2, p. 99-102, 2003.

SEABRA, E.J.G.; LIMA, I.P.C.; BARBOSA, S.V.; KENIO, C.L. Atividade antimicrobiana *in vitro* de compostos a base de hidróxido de cálcio e tergentol em diferentes concentrações sobre bactérias orais. **Acta Cirur. Bras.**, v. 20, supl. 1, p. 13-18, 2005.

SIFERT, K.; CASAGRANDE, D.; SILBERMAN, H. Analysis of chlorhexidine via gas-liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 109, p. 193-198, 1975.

SILVA, C.R.G.; JORGE, A.O.C. Avaliação de desinfetantes de superfícies utilizados em odontologia. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 16, n. 2, p. 107-114, 2002.

SILVA, E.J.S.; GONÇALVES, R.G.; PONTES, F.S.C.; CELESTINO JR., A.F. Avaliação microbiológica da eficácia imediata de 04 agentes anti-sépticos utilizados na degermação das mãos. **Rev. Bras. Cir. Impl.**, v. 7, p. 20-27, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, 1994. p. 85-119.

SIQUEIRA, V.L. Estratégia de proteção microbiológica de cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 16, p. 100-104, 2004.

SOUTHERN, E.N.; McCOMBS, G.B.; TOLLE, S.L.; MARINAK, K. The comparative effects of 0,12% chlorhexidine and herbal oral rinse on dental plaque-induced gingivitis. **J. Dental Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 1-9, 2006.

SOUZA, R.E.; BERNARDINELE, N.; BRAMANTE, C.M. Avaliação dos métodos de instrumentação e de substâncias químicas nas paredes de canais radiculares – MEV. **Rev. Odonto Ciência**, v. 21, n. 52, p. 125-131, 2006.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2007.

STEVENS, L.E.; DURRWACHTER, J.R.; HELTON, D.O. Analysis of chlorhexidine sorption in soft contact lenses by catalytic oxidation of [¹⁴C] chlorhexidine and by liquid chromatography. **J. Pharm. Sci.**, v. 75, n. 1, p. 83-86, 1986.

SULLER, M.T.; RUSSELL, A.D. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. **J. Hosp. Infect.**, v. 43, p. 281-291, 1999.

TAMBE, S.M.; SAMPATH, L.; MODAK, S.M. *In vitro* evaluation of the risk of developing bacterial resistance to antiseptics and antibiotics used in medical devices. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 589-598, 2001.

TANOMARU, J.M.G.; PAPPEN, F.G.; TANOMARU FILHO, M.; SPOLIDORIO, D.M.P.; ITO, I.Y. *In vitro* antimicrobial activity of different gutta-percha points and calcium hydroxide pastes. **Braz. Oral Res.**, v. 21, n. 1, p. 35-39, 2007.

TANOMARU, J.M.G.; RODRIGUES, V.M.T.; TANOMARU FILHO, M.; SPOLIDORIO, D.M.P.; ITO, I.Y. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em endodontia. **Rev. Paulista Odontol.**, v. 1, p. 38-40, 2005.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 29). The National Formulary (NF 24). By authority of the United States Pharmacopoeia Convention. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2005, p. 2499-2503.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 31). The National Formulary (NF 26). By authority of the United States Pharmacopoeia Convention. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2008, p. 1717-1718.

THOMAS, L.; MAILLARD, J.Y.; LAMBERT, R.J.W.; RUSSELL, A.D. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a residual concentration. **J. Hosp. Infect.**, v. 46, p. 297-303, 2000.

THOMAS, L.; RUSSEL, A.D.; MAILLARD, J.-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. **J. Appl. Microbiol.**, n. 98, p. 533-543, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 183-200; 459-460; 590-592.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p. 91-94.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 57-65; 101.

USP DI 23: Drug information for the health care professional. – **United States Pharmacopeia**, 23rd ed. Greenwood Village, CO:MICRODEX Thonson Helthcare, 2003, p.786-788.

USUI, K.; HISHINUMA, T.; YAMAGUCHI, H.; TACHIIRI, N.; GOTO, J. Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenoethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. **J. Chromatogr. B**, v.851, p. 105-9, 2006.

VASCONCELOS, J. O uso da clorexidina na prática odontológica. **J. Ass. Odontol.**, v. 27, p. 26-27, 2001.

VRIES, J.; RUBENS, J.; ARENDS, J. Determination of chlorhexidine in saliva and in aqueous solutions. **Caries Res.**, v. 25, p. 410-414, 1991.

WAINWRIGHT, P; COOKE, M. Direct determination of chlorhexidine in urine by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 111, p. 1343-1344, 1986.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; SICKBERT-BENNETT, E.E. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 12, p. 4217-4224, 2007.

WU, G; LIU, X. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 8, n. 9, p. 666-672, 2007.