

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAMILA THOMAZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE DOIS GÉIS PARA A MUCOSA BUCAL DE  
PACIENTES INTERNADOS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA: ANÁLISE *IN*  
*VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, HIDRATANTE E DA  
CITOTOXICIDADE

PONTA GROSSA  
2018

CAMILA THOMAZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE DOIS GÉIS PARA A MUCOSA BUCAL DE  
PACIENTES INTERNADOS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA: ANÁLISE *IN*  
*VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, HIDRATANTE E DA  
CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de mestre na Universidade Estadual de  
Ponta Grossa, Área Interdisciplinar em  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml  
Campagnoli.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA  
2018

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S237 Santos, Camila Thomaz dos  
Desenvolvimento de dois géis mucoadesivos para a mucosa bucal de pacientes internados sob ventilação mecânica: análise in vitro das atividades antimicrobiana, hidratante e da citotoxicidade/ Camila Thomaz dos Santos. Ponta Grossa, 2018.  
97f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Infecção hospitalar. 2. Clorexidina. 3. Triclosan. 4. Higiene bucal. 5. Tecnologia farmacêutica. I. Campagnoli, Eduardo Bauml. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

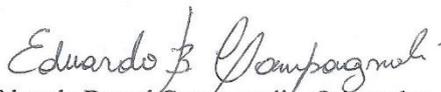
CDD: 616.02

CAMILA THOMAZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE DOIS GÉIS MUCOADESIVOS PARA A  
MUCOSA BUCAL DE PACIENTES INTERNADOS SOB  
VENTILAÇÃO MECÂNICA: ANÁLISE IN VITRO DAS ATIVIDADES  
ANTIMICROBIANA, HIDRATANTE E DA CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 05 de julho de 2018.



Prof. Dr. Eduardo Baum Campagnoli – Orientador  
Doutor em Estomatopatologia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Fernanda Maria Marins Ocampos  
Doutora em Ciências Farmacêuticas  
Instituto Federal do Paraná



Profa. Dra. Clóris Regina Blanski Grden  
Doutora em Enfermagem  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



A minha família e  
a minha sempre Ladyinha,

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que me oportunizou o início do Mestrado e que me proporcionou energia, persistência e coragem para as viagens semanais. A Ele também agradeço a minha vontade, tranquilidade, confiança e dedicação à pesquisa científica.

A conclusão do Mestrado e desta pesquisa seria impossível também sem a colaboração de algumas pessoas importantes e instituições. Destas, manifesto um agradecimento especial:

A minha família, de forma especial, aos meus amados pais: Antonio e Carmensita; e ao meu irmão (futuro médico), Guilherme, por me apoiarem na escolha de realizar o mestrado, pela compreensão e por toda preocupação (que não foi pouca) ao longo deste percurso (durante as viagens pra lá e pra cá, inclusive). Ao meu pai, novamente, que me ajudou em diversos momentos na pesquisa, com estatística, ideias, conceitos e práticas de laboratório. Sou grata a minha linda e amada Lady, que me tranquilizou e alegrou nos momentos que mais precisei (Saudades imensas... Te amo pra sempre!). Também agradeço a minha querida avó Geny, a qual sempre será meu exemplo e incentivo. Neste momento do Mestrado, ela foi inspiração novamente para a temática da dissertação. Amo muito todos vocês!

Ao Will, meu namorado lindo pela paciência gigantesca, pelo apoio, compreensão (e bota compreensão nisso) e pelo carinho de sempre. Te amo muito, meu amor!

Agradeço a minha tia e maedrinha Lú e aos meus tios André, Kátia e Carlos, pela acolhida de sempre, paciência e cuidado que tiveram comigo durante esses dois anos intensos.

Aos professores que de forma geral compartilharam seus conhecimentos em sala de aula e em minha pesquisa. Sou extremamente grata ao meu orientador Professor Eduardo (que já me acompanha desde a graduação) pela compreensão, atenção, tranquilidade e oportunidades repassadas ao longo do curso. Também agradeço ao meu co-orientador Professor Paulo Vitor pela compreensão e paciência na pesquisa. À Professora Marcinha, pelas contribuições na banca de qualificação, pelo carinho de sempre e por seus sábios conselhos. Ao Professor Esmerino, por ser sempre prestativo e por suas contribuições na banca da qualificação. Ao Professor Rogério Araújo pela ajuda com testes laboratoriais no laboratório de química da Unisociesc. E às Professoras Fernanda e Clóris pelos excelentes apontamentos e contribuições durante a defesa do Mestrado.

À Mari e à Dani, amigas e pós-graduandas de Odontologia da UEPG, pela paciência e pela ajuda (e muita ajuda!!!) na pesquisa. Obrigada de coração! Aproveito para agradecer também aos outros amigos da pós-graduação de Odontologia: Ana Cláudia, Gustavo, Fernanda, Evelyn e Leomar; e a todos os colegas de curso da pós-graduação de Ciências da Saúde, em especial: Fer (amiga querida que está me seguindo!), Carol, Gabi e Vera pelo compartilhamento de ideias, alegrias, frustrações, desesperos e vitórias.

Não poderia deixar de agradecer aos técnicos queridos dos laboratórios que me deram todo o suporte para a prática e também ouviram minhas dúvidas, frustrações, medos e também alegrias: Jana (Microbiologia UEPG), Bete e Júlia (Farmácia UEPG), e Johny (Farmácia Anhanguera).

Às Instituições: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Faculdade Anhanguera Regional Joinville, e Centro Universitário Unisociesc Joinville; pelas oportunidades e aprendizagens.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## RESUMO

**DOS SANTOS CT. Desenvolvimento de dois géis para a mucosa bucal de pacientes internados sob ventilação mecânica: análise *in vitro* das atividades antimicrobiana, hidratante e da citotoxicidade.** [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde com ênfase na área Interdisciplinar]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

As Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde são consideradas as principais causas de morbidade e de mortalidade no âmbito hospitalar, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva. Uma das infecções mais comuns que acometem pacientes em uso de ventilação mecânica por intubação orotraqueal é a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica. Esta infecção apresenta grande relação com a microbiota bucal alterada. Além disso, tais pacientes geralmente apresentam hipossalivação, com ressecamento intenso da mucosa, fissuras e lesões traumáticas bucais. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver dois géis com atividade antimicrobiana (um gel com digluconato de clorexidina 0,12% e um gel de Triclosan 0,03%) associado a um hidratante (D-pantenol), para serem aplicados na mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. O estudo apresenta caráter interdisciplinar, pois os géis foram formulados e submetidos a testes *in vitro*, integrando conhecimentos na área da odontologia, farmácia, microbiologia e citologia. A caracterização de cada gel foi realizada por propriedades organolépticas e físico-químicas. Também foram verificadas as propriedades antimicrobiana, de hidratação e citotoxicidade. Os resultados dos testes de caracterização demonstraram que os géis apresentaram características organolépticas, pH, densidade e viscosidade ideais para serem utilizados na mucosa bucal de pacientes internados. Na atividade antimicrobiana, todas as cepas testadas foram sensíveis ao uso do gel contendo digluconato de clorexidina 0,12% com valores melhores quando comparado ao colutório de clorexidina comercial disponível. Em relação ao gel de triclosan 0,03%, a ação antimicrobiana foi superior quando comparado com o enxaguante bucal contendo triclosan 0,03%. Além disso, o gel de triclosan foi considerado um produto não citotóxico e hidratante para mucosa bucal. Já o gel de digluconato de clorexidina 0,12% demonstrou-se citotóxico e não apresentou propriedade hidratante. De forma geral, os dois géis demonstraram que podem ser utilizados para o controle da microbiota bucal dos pacientes internados, bem como o gel de triclosan pode hidratar a mucosa bucal, oferecendo maior conforto ao paciente hospitalizado.

Palavras-chave: Infecção Hospitalar. Clorexidina. Triclosan. Higiene Bucal. Tecnologia Farmacêutica.

## ABSTRACT

DOS SANTOS CT. **Development of two gels for the oral mucosa of patients hospitalized under mechanical ventilation: *in vitro* analysis of antimicrobial, moisturizing and cytotoxicity activities.** [Master's Dissertation in Health Sciences with emphasis in the Interdisciplinary area]. Ponta Grossa: State University of Ponta Grossa, 2018.

Infections Related to Healthcare Assistance are considered the main causes of morbidity and mortality in the hospital setting, especially in Intensive Care Units. One of the most common infections affecting patients undergoing mechanical ventilation per orotracheal intubation is ventilator-associated pneumonia. This infection presents a great relation with the altered oral microbiota. In addition, such patients usually present hyposalivation, with intense mucosa dryness, fissures and traumatic mouth lesions. Thus, the objective of this research was to develop two gels with antimicrobial activity (a 0.12% chlorhexidine digluconate gel and a 0.03% triclosan gel) associated with a moisturizing agent (d-panthenol) to be applied in the mucosa of patients admitted to the Intensive Care Unit. The study presents an interdisciplinary character, on this account the gels were formulated and submitted to *in vitro* tests, integrating knowledge in the areas of dentistry, pharmacy, microbiology and cytology. The characterization of each gel was carried out by the organoleptic properties (color, odor, appearance and consistency), as well as physicochemical properties (pH, density and viscosity). The antimicrobial, hydration and cytotoxicity properties were also verified. The results of the characterization tests showed that the gels had organoleptic characteristics, pH, density and viscosity ideal for use in the oral mucosa of hospitalized patients. In the antimicrobial activity, all the strains tested were sensitive to the use of the gel containing 0.12% chlorhexidine digluconate with better values when compared to the available commercial chlorhexidine mouthwash. Regarding the gel of 0.03% triclosan, the antimicrobial action was also superior when compared to the oral rinse containing 0.03% triclosan. In addition, triclosan gel was considered a non-cytotoxic and moisturizing product for oral mucosa. On the other hand, the gel of 0.11% chlorhexidine digluconate was cytotoxic and showed no moisturizing properties. In general, the two gels demonstrated that they can be used to control the oral microbiota of inpatients, as well as the triclosan gel can hydrate the oral mucosa, offering greater comfort to the hospitalized patient.

Keywords: Cross Infection. Chlorhexidine. Triclosan. Oral Hygiene. Technology, Pharmaceutical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fluxograma com o delineamento da parte laboratorial do estudo..... 38
- Figura 2 - A) Sólidos presentes no gel de Triclosan, ainda não triturados. B) Manipulação e trituração dos sólidos da formulação de Triclosan com gral e pistilo. C) Pré-dissolução dos componentes sólidos triturados com propilenoglicol em um gral..... 40
- Figura 3 - Géis armazenados em frascos plásticos estéreis, identificados e com data de fabricação..... 42
- Figura 4 - Equipamentos utilizados para determinação de valores de pH dos produtos. A) Peagâmetro digital de bolso PH-009. B) Fitas indicadoras de pH REF 92110 Macherey-Nagel®..... 43
- Figura 5 - Viscosímetro de Brookfield. A) *Spindles* disponíveis para uso no equipamento. B) *Spindle* RV nº 05 utilizado nos dois géis com o viscosímetro. C) Escala do equipamento utilizada para analisar a viscosidade dos géis, de acordo com o *spindle* nº 05..... 44
- Figura 6 - Viscosímetro de Brookfield. A) Verificação das rotações por minuto do equipamento pelo *spindle* nº 05 no gel 2. B) Verificação das rotações por minuto do equipamento pelo *spindle* nº 05 no gel 1..... 45
- Figura 7 - Picnometria. A) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo água destilada em seu interior. B) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo o gel 2 em seu interior. C) Pesagem

	realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo o gel 1 em seu interior.....	46
Figura 8 -	Cultura das cepas frescas dos microrganismos comerciais: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® 25955 KP), <i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC® 19606), <i>Escherichia coli</i> ESBL+ (ATCC® 35218).....	47
Figura 9 -	Placa de Petri já semeada com os cinco poços compostos por produtos diferentes: colutório de Triclosan, colutório de Digluconato de Clorexidina, Gel 1, Gel 2 e base do gel.....	49
Figura 10 -	Contagem de células na câmara hemocitométrica de Neubauer.....	51
Figura 11 -	Teste de esterilidade: tubos de Falcon compostos por extrato dos géis após sete dias em estufa, com ausência de turvação.....	52
Figura 12 -	Teste de esterilidade. Placas de Petri contendo cada produto, após 48h em estufa. Ausência de crescimento microbiano.....	52
Figura 13 -	Extratos de um dos produtos nas quatro concentrações pré-determinadas (100%, 50%, 25% e 12,5%).....	53
Figura 14 -	Caracterização organoléptica. Produto caracterizado como forma farmacêutica semi-sólida, com consistência de gel fluido.....	60
Figura 15 -	Caracterização organoléptica. A) Gel 1 – cor branco, de aspecto uniforme. B) Gel 2 – cor bege claro, de aspecto uniforme.....	60
Figura 16 -	Controle negativo. Placa de Petri com ausência de microrganismos e halos de inibição ao redor dos poços de cada produto.....	63

- Figura 17 - Morfologia celular do grupo controle (sem tratamento). Fibroblastos 3T3 com seus formatos alongados e seus prolongamentos considerados normais..... 66
- Figura 18 - Morfologia celular após 24h de tratamento com a base do gel. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 66
- Figura 19 - Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 2. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 67
- Figura 20 - Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 1. Ausência de prolongamentos celulares indicando alterações severas e apoptose celular de fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 67
- Figura 21 - Morfologia celular após 48h de tratamento com a base do gel. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 68
- Figura 22 - Morfologia celular após 48h de tratamento com o gel 2. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 68
- Figura 23 - Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 1. Ausência de prolongamentos celulares indicando alterações severas e apoptose celular de fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto..... 69
- Figura 24 - Localização de cada produto utilizado em uma placa de 96 poços para os ensaios de MTT e VN. Testes realizados em quadruplicata de cada produto (gel 1, gel 2 e CN - controle negativo) nas

concentrações pré-estabelecidas (100%, 50%, 25% e 12,5%). A) Placa de 96 poços após incubação por 3h com os tratamentos de MTT e VN. B) Placa de 96 poços após aplicação dos eluentes e imediatamente antes da leitura em leitor de microplaca por espectrofotometria.....70

Figura 25 - Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 pelos métodos MTT e VN no período de 24 horas de incubação com os géis de clorexidina (gel 1), Triclosan (gel 2) e base do gel nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%. ..... 71

Figura 26 - Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 pelos métodos MTT e VN no período de 48 horas de incubação com os géis de clorexidina (gel 1), Triclosan (gel 2) e base do gel nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%. ..... 72

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores de pH dos géis 1 e 2 em quatro períodos diferentes (1º dia, 8º dia, 15º dia e 22º dia). ..... 61
- Gráfico 2 - Viscosímetro de Brookfield. Gráfico da viscosidade (cP) dos géis pela velocidade (rpm) pré-determinada do *spindle* da série RV nº 05..... 62

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Formulações desenvolvidas a partir do estudo de pré-formulação (cada uma com seus componentes e concentrações respectivas).....39
- Quadro 2 - Formulação da base dos géis desenvolvida isoladamente como controle negativo para a Etapa C (testes de microbiologia, citotoxicidade e hidratação), com seus componentes e concentrações respectivas.....41
- Quadro 3 - Identificação dos componentes de cada gel desenvolvido com suas concentrações e suas funções dentro das formulações.....58
- Quadro 4 - Características organolépticas do gel 1 (gel de clorexidina 0,12%) e do gel 2 (gel de Triclosan 0,03%) identificadas após preparo das formulações.....59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características físico-químicas dos gel 1 (gel de clorexidina 0,12%) e gel 2 (gel de Triclosan 0,03%) com seus determinados valores, de acordo com o padrão estabelecido no quadro (viscosidade na velocidade de 20rpm, pH e densidade iniciais dos géis)..... 61
- Tabela 2 - Faixa de valores dos halos de inibição presentes nas placas de Petri, de acordo com cada microrganismo semeado e a substância utilizada. .... 64
- Tabela 3 - Valores de viabilidade celular média em porcentagem (%) encontrados com a aplicação de cada produto sob as células em função da desidratação prévia (tratamento para ressecamento) e da desidratação induzida posteriormente (prevenção ao ressecamento)..... 73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMIB	Associação de Medicina Intensiva Brasileira
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPI	Equipamento de Proteção Individual
HPMC	Hidroxipropilmetil celulose
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide</i>
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG 4000	Propilietilenoglicol 4000
POP	Procedimento Operacional Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TOT	Tubo orotraqueal
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VN	Vermelho Neutro

## LISTA DE SÍMBOLOS

G	Grama
g/mL	grama por mililitro
H	Hora
µL	Microlitro
mg/mL	miligrama por mililitro
Min	Minutos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mPa.s	milipascal segundo
Nm	Nanômetro
nº	Número
Rpm	rotações por minuto
UFC/mL	unidade formadora de colônia por mililitro
°C	grau Celsius
±	para mais ou para menos
%	Porcentagem
Qsp	quantidade suficiente para
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CO <sub>2</sub>	gás carbônico ou dióxido de carbono
X	Vezes
pH	potencial hidrogeniônico
cmH <sub>2</sub> O	centímetro de água
<	Menor
X	<i>versus</i> (comparação)
=	igual a

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Infecções nosocomiais e Odontologia Hospitalar Intensiva.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Higiene bucal de pacientes entubados em UTI .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 Digluconato de Clorexidina .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.2 Triclosan (Irgasan).....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3 Xilitol .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Hidratação da mucosa bucal .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.1 Polímeros mucoadesivos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 D-pantenol .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3 Xilitol .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.4 Álcool.....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 ETAPA A – Preparo das formulações .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 ETAPA B - Caracterização dos géis .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 ETAPA C.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.1 Propriedade antimicrobiana .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.2 Citotoxicidade.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.3 Propriedade hidratante.....</b>	<b>55</b>
<b>4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>56</b>

<b>5. RESULTADOS</b>	<b>58</b>
5.1 Formulações	58
5.2 Caracterização dos géis	59
5.3 Teste microbiológico	63
5.4 Citotoxicidade	65
5.5 Hidratação	72
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>74</b>
6.1 Formulações e caracterização dos géis	74
6.2 Propriedade antimicrobiana	78
6.3 Citotoxicidade	79
6.4 Hidratação	80
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas as principais causas de morbidade e de mortalidade no âmbito hospitalar, além de aumentarem o tempo de internamento do paciente, elevando o custo do tratamento. As infecções hospitalares são adquiridas durante a hospitalização, por isso são diagnosticadas a partir de 48 horas após o internamento (ANVISA, 2013; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; DHAR et al, 2014).

No cuidado ao paciente frente às infecções, deve haver a participação da equipe interdisciplinar que inclui diferentes profissionais da saúde como enfermeiro, médico, fisioterapeuta, farmacêutico, psicólogo, nutricionista e assistente social. Foram aprovados os Projetos de Lei nº2776/08 e nº363/11, que estabelecem a obrigatoriedade também do cirurgião-dentista nas unidades hospitalares públicas e privadas, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (FRANÇA, 2011), pois se compreendeu a necessidade do profissional da odontologia no cuidado aos pacientes internados comprometidos sistemicamente, apresentando ou não infecções hospitalares. Desta forma, o cuidado odontológico junto do trabalho interdisciplinar da equipe possibilita a melhora da saúde bucal e geral, além de proporcionar diminuição no tempo de internamento e evitar o óbito (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012; AMARAL et al, 2013).

Dentre as IRAS mais comuns estão as infecções do trato respiratório, que podem ter origem por microrganismos hospitalares geralmente resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (ANVISA, 2013; GOMES; ESTEVES, 2012). Estes patógenos e outros como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, que não são geralmente encontrados na boca, podem estar presentes na microbiota bucal do paciente internado, disseminando-se pelo organismo (AMARAL et al, 2013; GAETTI-JARDIM JÚNIOR et al, 2014).

Pacientes que fazem uso de ventilação mecânica por intubação orotraqueal, além de necessitarem de ajuda no controle do biofilme bucal, apresentam hipossalivação, o que gera ressecamento intenso da mucosa com o aparecimento de fissuras e lesões traumáticas (MATOS et al, 2015; SALDANHA et al, 2015).

Esta situação pode se intensificar quando usam-se produtos na mucosa bucal em que na composição apresenta o álcool, pois o mesmo contribui para o ressecamento e para a descamação da mucosa (BERTI-COUTO et al, 2012; GOMES; ESTEVES, 2012; ENNIBI et al, 2013). Um agente umectante muito utilizado para hidratação e regeneração labial é o D-pantenol, porém raramente é citado na literatura em formulações para mucosa bucal (MORAIS et al, 2013; BARBOSA et al, 2015). Na tentativa de proporcionar conforto ao paciente, alguns produtos incluem emolientes na formulação como glicerina, sorbitol e/ou xilitol (GALES; NGUYEN, 2000; NAYAK et al, 2014; BARBOSA et al, 2015). Contudo, a maioria dos auxiliares químicos existentes não apresentam propriedade hidratante suficiente para a mucosa bucal dos pacientes intubados. Existem ainda produtos para a cavidade bucal como o XeroLacer® e o Kin Hidrat® que possuem em sua composição o pantenol e o triclosan (CABRAL, 2012). No entanto, esses produtos apresentam valores de compra inviáveis aos hospitais, que precisam destes produtos para todos os pacientes internados, principalmente em UTI.

Frente aos microrganismos multirresistentes responsáveis pelas IRAS e pela busca de conforto aos pacientes intubados, optou-se por agregar propriedades antimicrobiana e hidratante numa mesma formulação. Assim, o objetivo geral da pesquisa foi desenvolver dois géis com atividade antimicrobiana (um gel com digluconato de clorexidina 0,12% e um gel de Triclosan 0,03%) associado a um hidratante (D-pantenol), para serem aplicados na mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. Além disso, analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana, a ação hidratante e a citotoxicidade do produto. Desta forma, este estudo apresenta caráter interdisciplinar por integrar conhecimentos na área da odontologia, farmácia, microbiologia e citologia.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Infecções nosocomiais e Odontologia Hospitalar Intensiva**

A Odontologia hospitalar e Intensiva é a área da Odontologia que agrega ações de saúde bucal preventivas, diagnósticas, terapêuticas, além de paliativas em nível terciário de saúde (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012). O cirurgião-dentista pode atuar em conjunto com uma equipe interdisciplinar, em diferentes setores hospitalares, principalmente no local onde os pacientes apresentam maior suscetibilidade a adquirirem infecções nosocomiais como em Unidades de Terapia Intensiva (GOMES; ESTEVES, 2012; AMARAL et al, 2013).

A UTI é o setor hospitalar destinado aos pacientes críticos, que apresentam parâmetros fisiológicos instáveis e, desta forma, podem necessitar de suporte ventilatório e monitorização constante por uma equipe multidisciplinar. Ela foi instituída como setor aos pacientes críticos graves e intermediários pela Portaria nº 895, de 31 de março de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estes pacientes são expostos diariamente ao uso de diferentes medicamentos e procedimentos invasivos, o que favorece a colonização local e sistêmica por microrganismos patogênicos. Dentre os procedimentos invasivos realizados em UTI, pode-se citar a intubação orotraqueal para ventilação mecânica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SOUSA et al, 2017).

O uso do tubo orotraqueal (TOT) garante um aporte de oxigênio adequado para a manutenção da vida do paciente crítico. Assim como o cateter vesical de demora, a sonda nasogástrica e o acesso venoso central, a intubação endotraqueal é um procedimento invasivo que favorece a instalação e colonização de microrganismos que podem gerar graves infecções (SOUSA et al, 2017). Pela localização do TOT, torna-se comum infecções do trato respiratório e a colonização da microbiota bucal por estes microrganismos hospitalares (GAETTI-JARDIM JÚNIOR et al, 2014; DOS SANTOS et al, 2017).

Na cavidade bucal existem mais de 700 espécies de microrganismos, os quais formam a microbiota bucal residente. Ela é essencial na saúde bucal de um indivíduo, pois promove uma barreira imunológica e favorece a homeostase (ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012; GLURICH et al, 2014). Em indivíduos saudáveis, os microrganismos mais encontrados na microbiota bucal são

*Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Neisseria* spp., *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp. (HASAN et al, 2014; WASHIO et al, 2014). Porém, em paciente internados, a microbiota bucal sofre desequilíbrio, associando-se a etiologia de alterações bucais como doença cárie e doença periodontal, e de alterações sistêmicas, principalmente infecções do trato respiratório (AGUIAR; OLIVEIRA, 2008; GLURICH et al, 2014).

As infecções do trato respiratório são uma das IRAS mais causadoras de morbidade e mortalidade no âmbito hospitalar. Também são responsáveis por aumentar o tempo de internamento e o custo do tratamento (DIAZ; SILVEIRA, 2011; ANVISA, 2013; SOUSA et al, 2017). Normalmente estão associadas aos microrganismos Gram negativos, os quais promovem uma maior agressividade de infecção (SCHETTINO, 2012). Dentre as infecções do trato respiratório mais comuns e que apresentam grande relação com a área odontológica hospitalar, pode-se citar a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) (DIAZ; SILVEIRA, 2011; ANVISA, 2013).

A PAV é uma infecção nosocomial responsável por cerca de 25% de todas as infecções adquiridas no internamento em UTI e se desenvolve após 48 horas de intubação (DIAZ; SILVEIRA, 2011; ANVISA, 2013). Ela apresenta incidência de 9% a 27%, taxa de mortalidade de 20 a 60% e pode aumentar em média 12 dias o tempo de internamento (ANVISA, 2013; RICHARDS, 2013; YUSUF, 2013; BELLISSIMO-RODRIGUES et al, 2014).

O principal mecanismo para o desenvolvimento da PAV é a broncoaspiração de secreção contaminada da orofaringe. Esta secreção pode ser composta por patógenos respiratórios presentes na orofaringe ou na microbiota bucal, que se deslocam pelo tubo endotraqueal (GRAP, 2009; RICHARDS, 2013; YUSUF, 2013; BELLISSIMO-RODRIGUES et al, 2014). Os microrganismos mais envolvidos neste processo são *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* (SCANNAPIECO, 1999; GUIMARÃES; ROCCO, 2006; DIAZ; SILVEIRA, 2011; DOS SANTOS et al, 2017).

Estes patógenos, que não são geralmente encontrados na boca, podem estar presentes na microbiota bucal do paciente internado, disseminando-se pelo organismo (GUIMARÃES; ROCCO, 2006; FIDEL JÚNIOR; LOURENÇO; FISCHER, 2013; DOS SANTOS et al, 2017). Também podem haver infecções de

origem odontológica que ocasionarão ou potencializarão doenças sistêmicas (SALDANHA et al, 2015). Scannapieco (1999) identifica que a *Porphyromonas gingivalis*, bactéria presente na microbiota bucal e na doença periodontal, pode estar fortemente relacionada com infecções respiratórias como a PAV (SCANNAPIECO, 1999). Da mesma forma, um indivíduo que apresenta um quadro de periodontite crônica, por exemplo, possui maior risco de desenvolver, descompensar ou intensificar doenças como hipertensão (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012), diabetes (DESVARIEUX et al, 2010), doença renal (ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012; GALHARDO et al, 2015), doença arterial coronariana (KSHIRSAGAR et al, 2005; ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012), acidente vascular cerebral (GUIMARÃES; ROCCO, 2006; ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012) e a própria pneumonia aspirativa (GUIMARÃES; ROCCO, 2006; WASHIO et al, 2014). Com as intervenções odontológicas, junto da equipe interdisciplinar, o cirurgião-dentista previne e melhora essas condições locais e sistêmicas, até mesmo de pacientes críticos (MUNRO, 2014; VILELA et al, 2015; LEITE et al, 2016).

## **2.2 Higiene bucal de pacientes intubados em UTI**

Para o controle desta microbiota bucal torna-se essencial a higienização dos tecidos bucais. De acordo com a Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) (AMIB, 2014), realizar a higiene bucal do paciente internado em UTI reduz a colonização da orofaringe, evita a contaminação da traqueia, controla o biofilme da cavidade bucal, diminuindo riscos de infecção respiratória, além de proporcionar conforto ao paciente (AMIB, 2014; STONECYPHER, 2014). Algumas evidências demonstram que a colonização da boca por patógenos respiratórios acontece antes mesmo da colonização pulmonar (CUTLER; DAVIS, 2005; DOS SANTOS et al, 2017).

Além da higiene bucal incorreta, a condição bucal do paciente intubado e a dependência total deste para realizar a higiene bucal são fatores que podem favorecer a ocorrência da broncoaspiração. Nas instituições geralmente a equipe responsável pela realização da higiene bucal dos pacientes é a equipe técnica de enfermagem sob supervisão e capacitação do enfermeiro responsável (EL-SOLH

et al, 2004; FRANCO et al, 2014). Porém, pela preocupação maior em estabilizar a condição sistêmica e manutenção da vida do internado, os cuidados bucais não se tornam prioridade (GRAP, 2009).

A equipe odontológica (quando presente em uma UTI) acompanha, supervisiona, capacita a equipe de enfermagem e realiza em casos específicos esta higiene bucal, com avaliação, registro e tratamento de alterações presentes na cavidade bucal que podem interferir no cuidado e controle das condições sistêmicas deste paciente (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012). Desta forma, as equipes podem confeccionar um Protocolo Operacional Padrão de higiene bucal, para que todos possam realiza-la igualmente da forma mais correta possível (CUTLER; DAVIS, 2005). Este protocolo padronizado pode apresentar, além da técnica de higiene bucal, outros cuidados necessários para a saúde bucal e conforto do paciente internado (FRANCO et al, 2014). Os protocolos para cuidados de saúde bucal de pacientes intubados já existentes são geralmente baseados no *bundles* utilizados para prevenção de PAV (DIAZ; SILVEIRA, 2011; ANVISA, 2013). Além disso, antes e após a higiene bucal, a higienização das mãos e o uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequados (óculos, máscara e luva) são procedimentos comuns utilizados, afim de evitar infecção cruzada entre paciente-paciente e profissional-paciente (CUTLER; DAVIS, 2005; ANVISA, 2013).

De acordo com o Manual de Odontologia Hospitalar dos Hospitais do Estado de São Paulo (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012), para pacientes intubados em UTI os cuidados com a higiene bucal devem ser: 1) regular a angulação da cabeceira para 30°; 2) realizar aspiração prévia da orofaringe; 3) embeber o *swab* ou a gaze em um colutório formado por uma solução não-álcoolica de digluconato de clorexidina 0,12%, removendo o excesso do produto, e friccionar em todas as superfícies bucais (dentes, gengiva, mucosa, língua, palato) e no tubo orotraqueal; 4) aspirar a orofaringe após o procedimento ou sempre que necessário. Todos esses cuidados são realizados para evitar, principalmente a broncoaspiração e, por consequência o surgimento da PAV (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012).

Os Departamentos de Odontologia e de Enfermagem da AMIB padronizaram esses mesmos cuidados e incluíram outros tais como assegurar-se que o TOT

está bem fixado e a verificação da pressão do balonete (*cuff*) entre 25 e 30cmH<sub>2</sub>O antes da realização da higiene bucal (AMIB, 2014). O *Guideline* descrito pelo CDC orienta todos esses cuidados, incluindo também a aspiração subglótica antes de manusear o *cuff* (CASON, 2007). O colutório de digluconato de clorexidina 0,12% também é utilizado, porém foi padronizado de 12 em 12 horas (tempo de ação e substantividade da clorexidina nos tecidos bucais), tendo nos intervalos da aplicação da clorexidina o uso da água destilada ou de um aromatizante bucal sem álcool para higienização (AMIB, 2014).

A desorganização do biofilme bucal de pacientes intubados é realizada de forma mecânica normalmente com auxílio de um swab (BLUM et al, 2017). A escova dental associada a um dentifrício não é muito recomendada pois o risco de broncoaspiração com o sabão liberado pela escovação é maior, mesmo com o uso da sonda de aspiração durante o processo. Além disso, proporciona pouca redução do casos de PAV, quando comparado ao uso exclusivo do digluconato de clorexidina (MUNRO et al, 2009). Um estudo prospectivo e randomizado demonstrou que o uso da escovação com a clorexidina diminuiu o tempo de uso da ventilação mecânica, porém a incidência de PAV e o tempo de internamento em UTI não tiveram redução significativa (VIDAL et al, 2017). Outra desvantagem de se utilizar escovas dentais na higiene bucal de pacientes intubados é a contaminação das mesmas. Quando utilizadas precisam de desinfecção para não haver contaminação da cavidade bucal novamente. Alguns estudos comprovaram a eliminação de microrganismos das cerdas das escovas com o uso de antissépticos como o hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 0,12% e cloreto de cetilpiridínio. Todas essas substâncias se mostraram efetivas na desinfecção (SATO et al, 2004; CHAVES et al, 2007). Porém, os estudos não foram realizados em pacientes internados em UTI, onde podem haver microrganismos diferenciados e resistentes.

Apesar de existir ainda bastante controvérsias sobre a escovação dental na técnica de higiene bucal em pacientes intubados, os materiais mais utilizados de forma geral são gazes ou *swab* descartável embebidos no digluconato de clorexidina ou em outro antisséptico bucal (PEARSON; HUTTON, 2002).

Agentes químicos na higiene bucal são frequentemente utilizados para auxiliar no controle da microbiota bucal. Na literatura podem-se encontrar como

antissépticos bucais o uso de óleos essenciais, solução enzimática à base de lactoperoxidase, cloridrato de cetilpiridínio, xilitol, Triclosan (irgasan) e digluconato de clorexidina, sendo o Triclosan e a clorexidina os mais utilizados (SANTOS et al, 2008; NEUMANN, 2011; CASARIN et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015).

Dentre as formas farmacêuticas mais usadas destes antissépticos estão as líquidas (colutórios) e as semi-sólidas (géis) (PAN et al, 2010; MEINBERG et al, 2012). Estes produtos são amplamente usados pela sua facilidade na administração em mucosa bucal de pacientes intubados. Além disso, são considerados antimicrobianos de baixo custo, com fácil acesso em compras e tem um bom rendimento (CUTLER; DAVIS, 2005; ARAÚJO et al, 2015). Mesmo estando presentes na maioria dos protocolos de higiene bucal hospitalares, os colutórios oferecem risco de broncoaspiração caso o mesmo seja administrado em excesso ou sem os devidos cuidados prévios com o paciente (CASON, 2007; SECRETARIA DE SAÚDE, 2013).

### **2.2.1 Digluconato de clorexidina**

A clorexidina é um forte antimicrobiano de amplo espectro, utilizada como princípio ativo em diversos produtos antissépticos e desinfetantes, em diferentes concentrações (CASARIN et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015). É um fármaco fortemente catiônico, o qual liga-se a parede celular bacteriana (pela interação de cargas positivas da clorexidina com as cargas negativas das bactérias). Este processo permite que as moléculas de clorexidina adentrem ao citoplasma bacteriano, a qual rompe a membrana celular e provoca extravasamento das estruturas celulares (ARAÚJO et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015). Ela tem maior poder de ação em bactérias Gram positivas, inclusive em microrganismos resistentes como o MRSA. A sua ação também acontece sobre bactérias Gram negativas, fungos filamentosos e leveduras, mas é considerada menos eficaz (CASARIN et al, 2012). Apesar disso, ela ainda é o “padrão-ouro” entre os antissépticos bucais, pois apresenta capacidade de inibir a formação do biofilme dental (SEMENOFF; SEMENOFF-SEGUNDO; BIASOLI, 2008; CASARIN et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015) e possui a propriedade individual de substantividade, na qual a clorexidina tem sua ação prolongada (ARAÚJO et al, 2015; LEITE et al, 2016; RAMAMURTHY; VENKATESH, 2017). O estudo de Leite et al. (2016) analisou a

aplicação do colutório de digluconato de clorexidina 0,12% na higiene bucal de pacientes intubados e não intubados. Pode-se observar que nos pacientes que faziam uso do TOT, a clorexidina apresentou substantividade de 12 horas, enquanto que nos pacientes não intubados houve controle dos microrganismos durante apenas 3 horas (LEITE et al, 2016).

Em relação ao seu uso na higiene bucal em UTI na prevenção de PAV, um estudo do tipo revisão da literatura abrangeu 35 ensaios clínico randomizados. De forma geral, encontraram-se evidências de que o colutório de clorexidina ou o gel de clorexidina utilizados na higiene bucal reduzem cerca de 40% as chances de PAV em pacientes adultos (SHI et al, 2017). Essas evidências também foram encontradas no estudo de Cutler e Davis (2005) (CUTLER; DAVIS, 2005). Frente a isso, os protocolos de higiene bucal hospitalares e os *bundles* de prevenção de PAV padronizam o uso de colutório de digluconato de clorexidina 0,12% (CASON, 2007; SECRETARIA DE SAÚDE, 2012; AMIB, 2014).

Apesar de ser muito utilizado na Odontologia, o digluconato de clorexidina apresenta gosto amargo e provoca efeitos adversos, que ocorrem normalmente pelo seu uso prolongado, pela concentração elevada ou pelo volume utilizado (PEGORARO et al, 2014). A alteração de cor dos elementos dentários e da língua é o efeito mais comum. Este manchamento pode ocorrer pela interação da clorexidina com os corantes presentes na dieta (ZANATTA; RÖSING, 2007). A clorexidina também pode gerar descamação em mucosa, lesões de ulceração, hálito residual amargo e aumento na deposição de cálculo dental (PEGORARO et al, 2014; BRITO et al, 2012; LOPES et al, 2016). Ainda que utilizada por algumas instituições para prevenção e controle de mucosite (MACEDO et al, 2015), a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* e a *International Society of Oral Oncology* não recomendam seu uso em pacientes oncológicos (MASCC/ISOO, 2013). Ela pode provocar ardência bucal, disgeusia, xerostomia e lesões de ulceração por queimadura química, principalmente quando se utiliza solução alcoólica de digluconato de clorexidina por tempo prolongado (PEGORARO et al, 2014; ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015). Em alguns modelos experimentais, foram induzidas mutações com o uso da clorexidina. No entanto, a relevância destes estudos em humanos ainda é discutida (KOLLEF et al, 2006).

Produtos com digluconato de clorexidina para uso em cavidade bucal podem apresentar-se nas concentrações 0,12%, 0,2% e 2% (KRAMER et al, 2016), sendo a concentração de 0,12% a mais encontrada entre os colutórios e géis bucais comercializados (VIDAL et al, 2017). Nestes produtos, a concentração de clorexidina é baixa, o que demonstra seu poder bacteriostático. Ela paralisa os microrganismos pela mudança do equilíbrio osmótico e da diminuição de substâncias intracelulares. Produtos para antissepsia da pele ou, ainda, para desinfecção de superfícies fixas possuem concentrações mais altas de clorexidina, caracterizando-a como bactericida. Desta forma, provoca morte celular (FRANCO et al, 2014; PEGORARO et al, 2014; MCCOY et al, 2008; GONDIM; GOMES; FIRMINO, 2010).

### **2.2.2 Triclosan (Irgasan)**

O Irgasan, mais conhecido como Triclosan, é um antimicrobiano de baixo custo, utilizado como princípio ativo em produtos odontológicos antissépticos. Ele possui amplo espectro, agindo sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e fungos filamentosos (ARAÚJO et al, 2015; VAZ, 2014). Também tem ação sobre microrganismos anaeróbicos que normalmente estão envolvidos com a PAV (DOS SANTOS et al, 2017; DIAZ; SILVEIRA, 2011; GUIMARÃES; ROCCO, 2006; SCANNAPIECO, 1999).

Apesar do seu amplo espectro frente aos microrganismos, faltam estudos que discutam seu uso na higiene bucal de pacientes intubados. Na literatura, não há evidências científicas suficientes para afirmar a eficácia do Triclosan na higiene bucal em UTI na prevenção de PAV (SHI et al, 2017).

O Triclosan é um fármaco de caráter aniônico, o que lhe confere baixa substantividade dentro de um colutório odontológico. Desta maneira, ele pode ser associado a um copolímero para melhorar esta propriedade. Polímeros utilizados em produtos odontológicos possuem a função de aumentar a sua retenção na mucosa bucal (mucoadesão) e, por consequência, o seu tempo de ação. Neste sentido, é comum o Triclosan apresentar-se associado a um copolímero como o polivinilmetil metacrilato e ácido maléico (Gantrez) nas formulações odontológicas (CASARIN et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015; VAZ, 2014; AQUINO et al, 2004).

A concentração mais utilizada do Triclosan como princípio ativo em colutórios é a de 0,03%, podendo aparecer em dentifrícios entre a faixa de 0,2% a 0,5% (MARTINS

et al, 2012). Nestas concentrações, o Triclosan já apresenta capacidade de agir sobre microrganismos da mucosa, língua, saliva e dentes, o que evita a recolonização rápida do biofilme (FINE et al, 2012; ANDRADE, 2013). Além disso, inibe processos da inflamação como a síntese de prostaglandinas específicas e a formação de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (MUSTAFA et al, 2005; RELVAS, 2015).

A desvantagem principal do uso do Triclosan é o seu efeito antimicrobiano inferior a ação da clorexidina. No entanto, ele não apresenta efeitos adversos e seu sabor não é desagradável (VAZ, 2014; ANDRADE, 2013; RELVAS, 2015; TELES; TELES, 2009; AYAD et al, 2010). O Triclosan apresenta baixa toxicidade e não provoca desequilíbrio da microbiota bucal, por isso é muito utilizado em dentifrícios (MARTINS et al, 2012; RELVAS, 2015; AYOOLA SAHEED et al, 2012), apesar de ser utilizado em colutórios também.

### 2.2.3 Xilitol

O xilitol é um composto adoçante natural, extraído de plantas fibrosas. Apresenta-se em forma de pó cristalino branco, de sabor doce semelhante ao da sacarose. Seu poder adoçante é maior do que o do manitol e do sorbitol (MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Desta forma, o xilitol pode substituir a sacarose e outros edulcorantes, possibilitando o uso de diferentes produtos por pacientes diabéticos (ARAÚJO et al, 2015).

Edulcorante e conservante numa formulação, o xilitol tem como propriedade principal a anticariogenicidade (MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Este é muito utilizado em diferentes produtos de higiene bucal tais como colutórios, géis dentais e dentifrícios. Ele promove a remineralização do esmalte dental (NAYAK et al, 2014; ARAÚJO et al, 2015), inibe a proliferação de *Streptococcus mutans* e, assim, reduz a porcentagem de lesões cariosas (NAYAK et al, 2014; MUSSATTO; ROBERTO, 2002; RAI et al, 2011). Os *S. mutans* são considerados colonizadores primários do biofilme dental, apesar de não apresentarem adesinas de grande afinidade pela película adquirida quando comparados com outros estreptococos (NAYAK et al, 2014; BARBIERI, 2005). Da mesma forma, com a menor porcentagem destes microrganismos, a remoção do biofilme torna-se mais facilitada na higiene bucal (GALES; NGUYEN, 2000).

Estudos demonstram que o xilitol, além de agir sobre os *S. mutans*, também tem ação de inibição do crescimento de bactérias nasofaríngeas como os *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mitis* (NAYAK et al, 2014; TAPIAINEN et al, 2001). Desta maneira, o xilitol (em produtos de higiene bucal) se mostrou eficiente auxiliar na prevenção e no tratamento de infecções respiratórias, inclusive em pneumonias (NAYAK et al, 2014; TAPIAINEN et al, 2001; ZABNER et al, 2000).

### **2.3 Hidratação da mucosa bucal**

Nas UTI, o uso do TOT garante estabilidade hemodinâmica, entretanto facilita a adesão de microrganismos patogênicos nos tecidos bucais. Ademais, pacientes intubados permanecem muitos dias com a boca aberta, o que gera ressecamento intenso da mucosa. Além disso, a fixação do TOT pode gerar ulcerações se não for trocada de posição. Durante o internamento, os pacientes também fazem uso de diversos medicamentos que podem provocar hipossalivação como os opióides e os anticolinérgicos (GARCIA et al, 2016). Esta desidratação da mucosa bucal coopera para o aparecimento de fissuras e lesões traumáticas (MATOS et al, 2015; SALDANHA et al, 2015), as quais aumentarão o risco de infecções secundárias e causarão desconforto e irritabilidade ao paciente (LANDSTROM et al, 2009; PUNTILLO et al, 2014).

É comum pacientes intubados terem grande acúmulo de biofilme, principalmente em palato e entre as papilas na língua, dificultando a remoção em uma única higiene bucal. As tentativas de remoção deste biofilme podem ocasionar lesões e sangramento, o que acredita-se facilitar a translocação de microrganismos patogênicos. Desta forma, a hidratação prévia da mucosa, língua, palato e lábios pode auxiliar na higiene bucal e, inclusive prevenir a PAV (UEDA, 2011).

Na literatura existem diferentes substâncias e produtos utilizados para realizar a hidratação dos tecidos moles antes e após higiene bucal dos pacientes intubados. As formas farmacêuticas mais encontradas são as líquidas (soluções, colutórios, óleos medicinais e sprays) e as semi-sólidas (géis, cremes e pomadas). Os agentes líquidos, de uma forma geral, se espalham mais facilmente na boca. Os semi-sólidos em creme ou pomada normalmente possuem componentes importantes na cicatrização de lesões. Já os agentes semi-sólidos

em forma de géis concentram umidade na mucosa bucal, o que torna interessante a administração destes produtos em pacientes que fazem uso da ventilação mecânica, pois promovem conforto aos mesmos (UEDA, 2011).

Água gelada, soro fisiológico 0,9%, saliva artificial, glicerina, óleo de girassol, dexpanthenol, ácidos graxos essenciais e xilitol são algumas das substâncias hidratantes e umectantes utilizadas em protocolos e pesquisas (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012; AMIB, 2014; GARCIA et al, 2016; UEDA, 2011; MENDONÇA; GONDIM, 2017). Estudos demonstram o uso da vaselina como uma opção para hidratação labial (ABIDIA, 2007; FREITAS, 2012; AMARAL, 2013). No entanto, de acordo com o Manual de Odontologia Hospitalar de São Paulo (2012), a vaselina (e outros hidratantes a base de petróleo) deixou de ser indicada em ambiente hospitalar pois há risco de combustão quando em contato com o oxigênio da oxigenioterapia (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012).

Apesar da hidratação prévia aparecer em alguns protocolos de higiene bucal de pacientes críticos (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012; CASON, 2007; UEDA, 2011), existem algumas limitações na sua aplicação. Por se utilizar produtos antissépticos na higiene bucal, o hidratante pode reagir com o princípio ativo e modificar seu efeito terapêutico ou, ainda intensifica-lo, favorecendo a toxicidade por estes agentes (WISE; WILLIAMS, 2013).

Ressalta-se que os agentes químicos utilizados na higiene bucal dos pacientes intubados podem apresentar o álcool de cereais (álcool etílico) como um dos componentes adjuvantes da formulação. Porém, o álcool contribui para o ressecamento da mucosa e gera incômodo aos pacientes (GOMES; ESTEVES, 2012; ENNIBI et al, 2013; BERTI-COUTO et al, 2012).

### **2.3.1 Polímeros mucoadesivos**

Polímeros são substâncias obtidas por reações de polimerização. Estas reações formam estruturas pequenas de repetição, conhecidas como “*meros*”. Desta forma, existem polímeros de diferentes tamanhos e estruturas que caracterizarão a sua função em um produto (VILLANOVA et al, 2010).

Em formulações odontológicas, os polímeros são utilizados como adjuvantes farmacotécnicos, normalmente com funções de auxiliar na manipulação do produto, aumentar a retenção do fármaco na boca e, por consequência, prolongar o seu tempo

de ação. Também podem ser usados numa formulação para proporcionar estabilidade físico-química e microbiológica, bem como garantir maior conforto e aceitabilidade do produto pelo paciente (VILLANOVA et al, 2010).

Mucoadesividade e bioadesividade são propriedades comuns aos polímeros utilizados na odontologia, os quais em formulações semi-sólidas proporcionam maior espalhabilidade, umedecimento e retenção na cavidade bucal (COOK; KHUTORYANAKIY, 2015). Estes polímeros tem a capacidade de hidratar a mucosa bucal e proporcionar a ação do fármaco em uma maior área de contato. Acredita-se que isto acontece pela transferência de moléculas de água da saliva (muco) para o polímero, bem como pela interação deste com as glicoproteínas salivares (FINI et al, 2011; BAGAN et al, 2012).

O Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero sintético e hidrofílico, que interage com a mucina (proteína salivar) por ligações de hidrogênio (FINI et al, 2011). Desta forma, apresenta rápida interação com a mucosa bucal. O HPMC é considerado um polímero gelificante e celulósico, que proporciona viscosidade ao produto final. Por este motivo, ele tem grande uso em formulações semi-sólidas como géis dentais. Essas formulações são preparadas pela dispersão do polímero em meio aquoso, o qual servirá de base para a consistência e aparência de gel. Além disso, o HPMC é um polímero capaz de controlar a liberação de fármacos de uma formulação (VILLANOVA et al, 2010; ALLEN et al, 2005).

Assim como o HPMC, o Propilenoglicol (PEG) é um polímero hidrofílico sintético não-iônico, muito utilizado em formulações odontológicas semi-sólidas e sólidas. Ele é empregado como solubilizante e fornece estabilidade ao produto (VILLANOVA et al, 2010). O PEG possui como importante propriedade a higroscopicidade, a qual proporciona retenção e absorção de umidade, tornando-o um excipiente lubrificante e hidratante, principalmente em preparações semi-sólidas como géis, cremes e pomadas (SEVERINO et al, 2011).

### **2.3.2 D-pantenol**

O D-pantenol (ou Dexpantenol) é um álcool biologicamente ativo, com alto poder de absorção e hidratação, que é indicado como uso tópico em pele e mucosa (OGUZ et al, 2015; ULGER et al, 2016). É um líquido incolor e viscoso, que apresenta riscos mínimos de sensibilidade e alergias. Ele proporciona conforto ao paciente internado,

principalmente àqueles que fazem uso de ventilação mecânica e que apresentam fissuras, lesões traumáticas, ressecamento bucal ou ulcerações em mucosa (EBNER et al, 2002; PUNTILLO et al, 2014). Em relação a mucosite oral, sua ação ainda é restrita e pouco estudada (DÖRR et al, 2005).

O Dexpanthenol é um umectante, solúvel em água e em óleo, podendo ser utilizado em diferentes produtos cosméticos. Quando inserido em géis aquosos, auxilia na viscosidade do produto e facilita a espalhabilidade do mesmo sobre a pele e a mucosa. É indicado para uso tópico, na concentração de 0,5% a 5%, tendo como pH de estabilidade ideal 6,0 (com variação entre 4,0 e 7,0) (OGUZ et al, 2015; ULGER et al, 2016; EBNER et al, 2002).

Quando em contato com a pele e a mucosa, o D-pantenol se transforma em ácido pantotênico. Este ácido contribui para a regeneração e a cicatrização destes tecidos, pelo estímulo celular realizado. Por este motivo, o Dexpanthenol começou a aparecer em padronizações hospitalares como opção de produto para hidratação labial e de mucosa bucal (AMIB, 2014; MENDONÇA; GONDIM, 2017). No entanto, ele ainda não é padrão de uso na maioria dos hospitais, sendo substituído por óleos essenciais graxos, água ou soro fisiológico (UEDA, 2011). Pelo seu alto poder de hidratação, o dexpanthenol diferencia-se da vaselina e da lanolina (PADOVANI, 2012), as quais não devem ser mais utilizadas em ambiente hospitalar (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012).

Por ser anti-inflamatório e antioxidante, o D-pantenol foi inserido em diferentes formulações antimicrobianas e antissépticas, na busca de um tratamento mais efetivo em feridas, inclusive com a sua associação ao digluconato de clorexidina (KOLLEF et al, 2006). Kramer et al (2016) identificaram que a eficácia antimicrobiana da clorexidina é aumentada *in vitro* quando se adiciona D-pantenol a 5% na formulação. Há um aumento também, não tão considerado, da eficácia do Triclosan sobre feridas em pele. Ainda neste estudo, verificou-se que em presença de mucina, a ação antisséptica da associação dos dois produtos teve eficácia máxima em 24h, diferente da ação em epiderme (sem presença de mucina) que obteve sua eficácia em 10 minutos (KRAMER et al, 2016).

Apesar do Dexpanthenol aparecer em várias formulações cosméticas voltadas para a pele com seu uso cicatrizante comprovado, na literatura são escassos os estudos específicos para mucosa bucal.

### 2.3.3 Xilitol

O xilitol é um edulcorante natural, de baixo teor calórico, que tem substituído a sacarose e outros açúcares maléficos ao organismo em diversos produtos terapêuticos. Ele pode ser utilizado inclusive por pacientes portadores de Diabetes Mellitus, por sua metabolização ocorrer independente da insulina (HANSON; CAMPBELL, 2011). Além de ser edulcorante, adoçante natural e conservante, o xilitol também é considerado um excelente umectante e hidratante (DIRIX et al, 2007).

Na cavidade bucal, o xilitol retém umidade e tem o poder de estimular a produção salivar, favorecendo a hidratação da mucosa bucal. Ele é utilizado em formulações odontológicas no tratamento de xerostomia e da Síndrome da Ardência Bucal, por proporcionar suavidade a mucosa e conforto ao paciente (HANSON; CAMPBELL, 2011). Um estudo demonstrou a eficácia do uso de produtos comerciais contendo xilitol como componente ativo para alívio da xerostomia pós tratamento radioterápico (DIRIX et al, 2007). Além disso, o xilitol se mostrou importante na prevenção de lesões ulcerosas (MÄKINEN, 2015).

### 2.3.4 Álcool

O álcool de cereais (álcool etílico) é um solubilizante límpido, incolor, com odor característico e de sabor ardente. Está presente em diferentes composições farmacêuticas, com a finalidade principal de solubilizar flavorizantes ou de conservar o produto (ARAÚJO et al, 2015). Na Odontologia, pode estar presente ou não em colutórios, por exemplo.

Sua concentração considerada antisséptica está entre 50% e 70%. Porém, os colutórios comercializados possuem de 0% a 27% de álcool em suas formulações, concentrações maiores até mesmo do que bebidas alcoólicas (DE ARAÚJO et al, 2015). Desta forma, a função do álcool numa formulação resume-se a solubilizar essências e fármacos lipofílicos, prevenir a contaminação do produto por microrganismos e aumentar, assim, seu prazo de validade (QUIRYNEN et al, 2005). A *Food and Drug Administration* recomenda que formulações antissépticas bucais devam apresentar no máximo 10% de álcool em sua composição (ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015), pois acima desta concentração o álcool provoca morte celular na mucosa bucal. Isso causando descamação,

fissuras, halitose, lesões por queimadura química e ardência bucal (MATOS et al, 2015; SALDANHA et al, 2015; ARAÚJO et al, 2015; ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015). Além disso, o álcool contribui para o ressecamento da mucosa e gera ardência e incômodo aos pacientes (GOMES; ESTEVES, 2012; ENNIBI et al, 2013; BERTI-COUTO et al, 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Desenvolver dois géis com atividade antimicrobiana (um gel com digluconato de clorexidina 0,12% e um gel de Triclosan 0,03%) associado a um hidratante (D-pantenol), para serem aplicados na mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva.

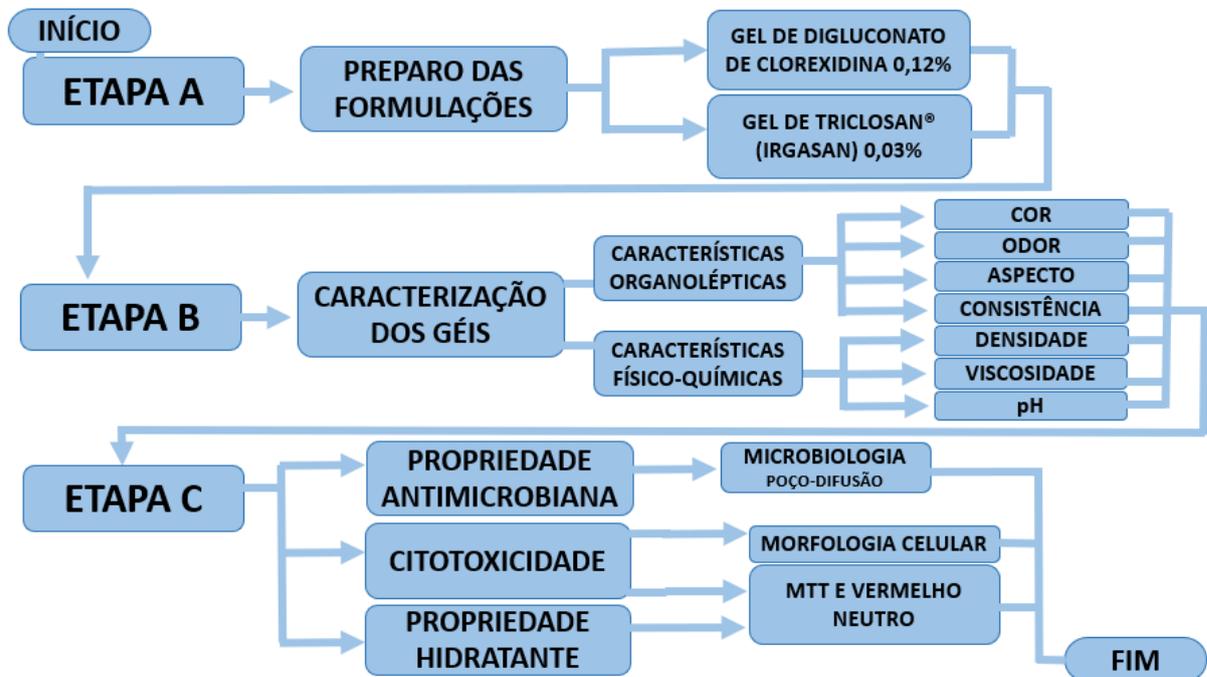
#### Objetivos específicos

- I. Estabelecer o perfil de sensibilidade dos géis frente as cepas sensíveis de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 25955 KP), de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) e de *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606), bem como a cepa resistente de *Escherichia coli* (ATCC® 35218);
- II. Comparar os perfis de sensibilidade identificados entre cada um dos géis desenvolvidos e com dois colutórios comerciais com princípios ativos equivalentes aos dos géis;
- III. Caracterizar os géis de forma organoléptica e físico-química pelos itens: aspecto, consistência, odor, cor, pH, viscosidade e densidade;
- IV. Avaliar o efeito citotóxico dos géis na viabilidade celular de fibroblastos (3T3) pelos ensaios de *Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide* (MTT) e de Vermelho Neutro (VN);
- V. Identificar o efeito hidratante dos géis sobre fibroblastos (3T3) pelo ensaio de *Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide* (MTT).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é de natureza experimental, o qual foi realizado entre agosto de 2016 a dezembro de 2017. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura Celular do Programa de Pós-graduação em Odontologia e nos Laboratórios de Microbiologia, Farmacotécnica e Controle de Qualidade Farmacêutica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Também foram realizados testes no Laboratório de Farmácia da Faculdade Anhanguera Regional Joinville e no Laboratório de Química do Centro Universitário Unisociesc Joinville. O estudo foi realizado em etapas, como segue o fluxograma (Figura 1).

**Figura 1.** Fluxograma com o delineamento da parte laboratorial da pesquisa.



Fonte: Própria autora.

### 4.1 ETAPA A – Preparo das formulações

O preparo das formulações ocorreu no Laboratório de Farmacotécnica da UEPG, onde foram desenvolvidas as formulações dos géis. Realizou-se, primeiramente, um estudo de pré-formulação dos géis, baseando-se nas incompatibilidades do digluconato de clorexidina com componentes iônicos. Desta forma, optou-se pelas formulações indicadas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Formulações desenvolvidas a partir do estudo de pré-formulação (cada uma com seus componentes e concentrações respectivas).

<b>Formulações</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
<b>Gel de clorexidina 0,12% (Gel 1)</b>	Digluconato de clorexidina	0,12%
	HPMC	2,00%
	PEG 4000	2,00%
	Xilitol	5,00%
	Propileonglicol	7,00%
	Esteviosídeo	0,50%
	D-pantenol	5,00%
	Acessulfame sódico	0,20%
	Flavorizante de menta	4,00%
	Água purificada q.s.p.	100g
<b>Gel de Triclosan 0,03% (Gel 2)</b>	Triclosan	0,03%
	HPMC	2,00%
	PEG 4000	2,00%
	Xilitol	5,00%
	Propileonglicol	7,00%
	Esteviosídeo	0,50%
	D-pantenol	5,00%
	Acessulfame sódico	0,20%
	Flavorizante de menta	4,00%
	Água purificada q.s.p.	100g

**Fonte:** Própria autora.

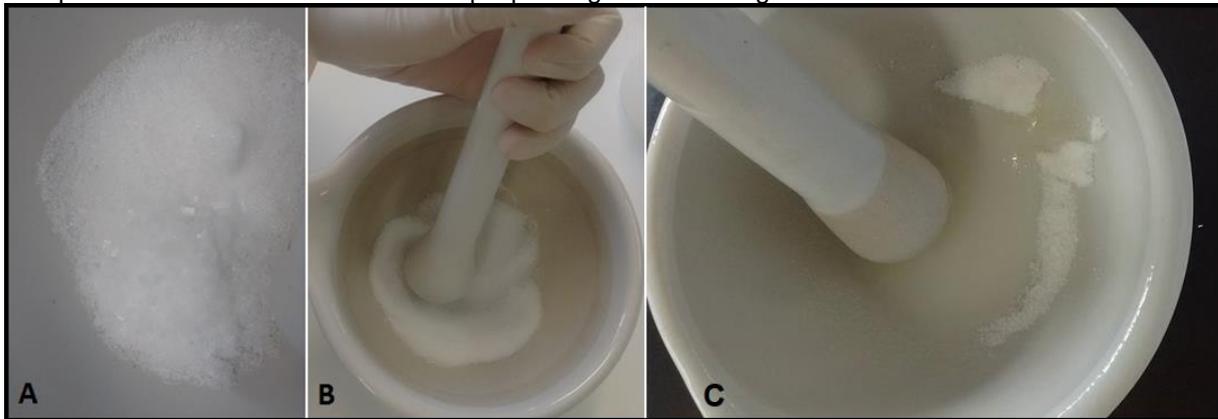
As formulações foram manipuladas de acordo com as práticas corretas de fabricação e controle preconizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 67/2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2016). Para o preparo das formulações, primeiramente foram separados os componentes utilizados e foram calculadas e pesadas as quantidades necessárias de cada componente em uma balança semi-analítica.

Para o preparo do gel de clorexidina 0,12%, foi necessário ajustar a quantidade de digluconato de clorexidina, o qual estava em solução a 20%. Na manipulação, em um béquer aqueceu-se a água purificada numa temperatura de

70°C e nela foi solubilizado o HPMC. O béquer com a solução foi agitado lentamente até a sua consistência ficar igual a um gel fluido. Este béquer foi reservado e iniciou-se a etapa da trituração dos sólidos. Em um gral de porcelana foram inseridos o esteviosídeo, o PEG 4000, o acessulfame sódico e o xilitol. Eles foram triturados com um pistilo, sendo pré dissolvidos em propilenoglicol. Após este processo, a solução foi repassada ao béquer (com a solução de água e HPMC) e foi misturada. Incluíram-se, então, os componentes semi-sólidos e líquidos (digluconato de clorexidina, flavorizante de menta e D-pantenol) e misturados novamente.

O gel de Triclosan 0,03% foi preparado com pequenas diferenças quando comparado ao gel de clorexidina: os componentes foram pesados na mesma balança semi-analítica e em um béquer a água foi aquecida numa temperatura de 70°C. Na água foi solubilizado o HPMC da mesma forma. O béquer com a solução foi agitado lentamente até a sua consistência ficar igual a um gel fluido. Este béquer foi reservado e iniciou-se a etapa da trituração. Em um gral de porcelana, trituraram-se os componentes sólidos (esteviosídeo, PEG 4000, acessulfame sódico, xilitol e Triclosan) com um pistilo (Figura 2A e 2B), e foram pré dissolvidos em propilenoglicol (Figura 2C). Após este processo, a solução foi repassada ao béquer (com a solução de água e HPMC) e misturada. Os componentes semi-sólidos e líquidos foram incluídos (flavorizante de menta e D-pantenol) e misturados novamente.

**Figura 2.** A) Sólidos presentes no gel de Triclosan, ainda não triturados. B) Manipulação e trituração dos sólidos da formulação de Triclosan com gral e pistilo. C) Pré-dissolução dos componentes sólidos triturados com propilenoglicol em um gral.



Fonte: Própria autora.

Além dos dois géis, foi manipulada a base do gel, a qual foi utilizada na Etapa C, como controle negativo. A técnica preconizada foi a mesma do preparo dos géis, porém sem a adição de princípio ativo antisséptico (Quadro 2).

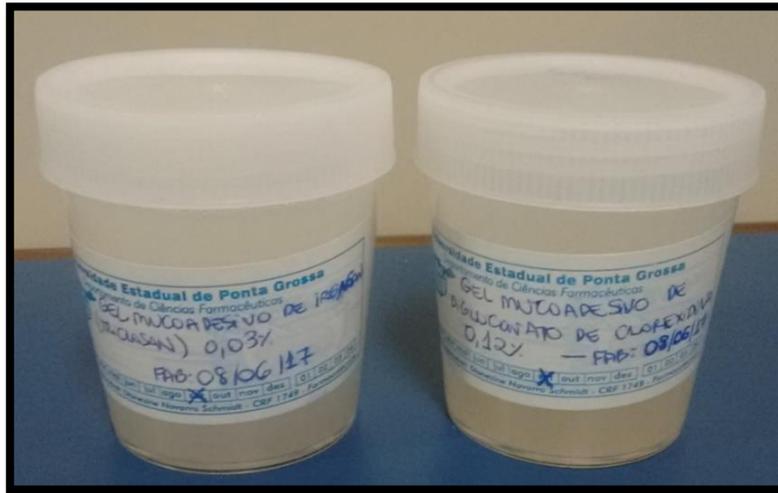
**Quadro 2.** Formulação da base dos géis desenvolvida isoladamente como controle negativo para a Etapa C (testes de microbiologia, citotoxicidade e hidratação), com seus componentes e concentrações respectivas.

<b>Base dos géis (Controle negativo)</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
	HPMC	2,00%
	PEG 4000	2,00%
	Xilitol	5,00%
	Propileonglicol	7,00%
	Esteviosídeo	0,50%
	D-pantenol	5,00%
	Acessulfame sódico	0,20%
	Flavorizante de menta	4,00%
	Água purificada q.s.p.	100g

Fonte: Própria autora.

Para finalização do preparo das formulações, foi feita a determinação do pH de cada um dos géis (gel 1 e gel 2) com auxílio de um peagâmetro digital de bancada Q402M QUIMIS® calibrado. Nenhuma das formulações necessitou de ajustes com outros excipientes pois já estavam com pH próximo da neutralidade (gel 1 = pH 6,7; gel 2 = pH 7,2) e longe do pH crítico bucal (pH 5,5). As três formulações (gel 1, gel 2 e base gel), após manipuladas, foram armazenadas em recipientes individuais plásticos estéreis, identificados com nome e data de fabricação (Figura 3).

**Figura 3.** Géis armazenados em frascos plásticos estéreis, identificados e com data de fabricação.



Fonte: Própria autora.

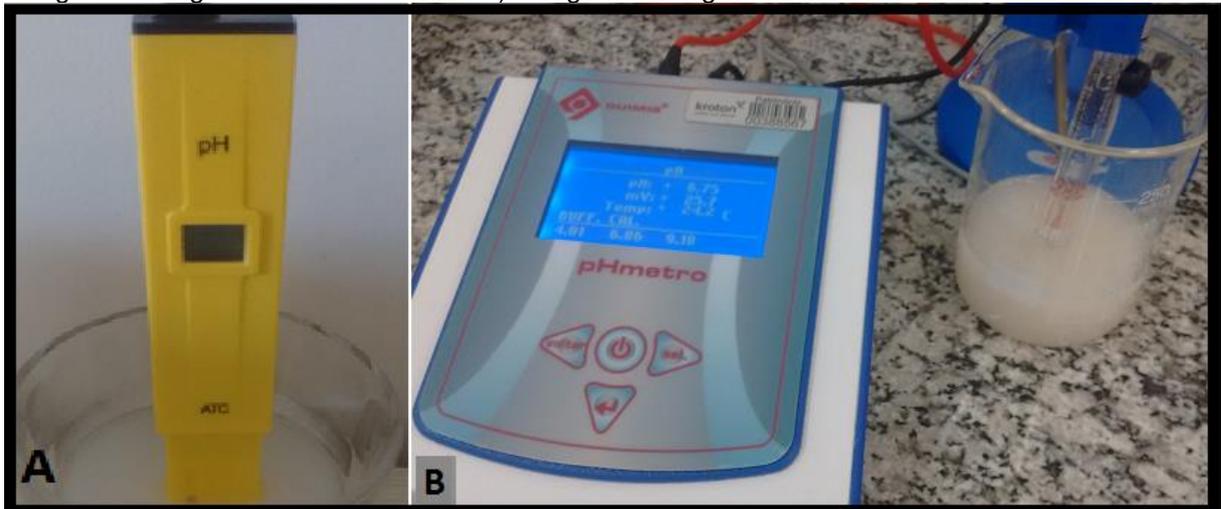
#### 4.2 ETAPA B - Caracterização dos géis

Com as formulações finalizadas, realizou-se a caracterização dos géis. Para tanto, foram verificadas as características organolépticas das amostras: cor, consistência, aspecto e odor. Também foram analisados como parâmetros físico-químicos os valores de pH, viscosidade e densidade dos géis.

No Laboratório de Farmácia da Faculdade Anhanguera Regional Joinville foram realizados os testes para determinar os valores de pH. Foram realizados três métodos diferentes para determinar o pH de cada gel (Figura 4). O primeiro método consistiu na medição dos valores de pH através de um peagâmetro digital de bancada Q402M QUIMIS® calibrado. O segundo método foi realizado com um peagâmetro digital de bolso PH-009 também calibrado. Para calibração dos dois aparelhos, utilizaram-se as soluções padrão de pH 6,86 e pH 4,00, conferindo sensibilidade ao equipamento. Após calibração, nos dois métodos com peagâmetro foram inseridos o eletrodo do aparelho lentamente na solução (evitando bolhas de ar) até o valor indicado se estabilizar. Para limpar o eletrodo utilizou-se água destilada e papel absorvente. E o terceiro método utilizaram-se fitas indicadoras de pH REF 92110 Macherey-Nagel®. Cada fita foi submergida por um minuto na solução e depois compararam-se as cores das fitas de pH com uma escala de cores (presente na embalagem das fitas) e seus valores correspondentes. Os três métodos foram aplicados com as soluções em

temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As medições de pH foram realizadas em quatro tempos diferentes: no dia em que os géis foram preparados (logo após os preparos) e uma vez a cada semana, totalizando quatro medições (1<sup>o</sup> dia, 8<sup>o</sup> dia, 15<sup>o</sup> dia e 22<sup>o</sup> dia).

**Figura 4.** Equipamentos utilizados para determinação de valores de pH dos produtos. A) Peagâmetro digital de bolso PH-009. B) Peagâmetro digital de bancada Q402M QUIMIS®.



Fonte: Própria autora.

O teste de viscosidade foi realizado apenas para caracterização dos produtos, sendo feito uma única vez. Ele foi realizado no Laboratório de Química do Centro Universitário Unisociesc Joinville, no sexto dia após preparo das formulações. Foi utilizado o Viscosímetro de Brookfield BrasEq® Modelo RVT, o qual verifica a viscosidade dinâmica de um fluido, em diferentes valores de rotação, caracterizando-o de forma reológica (fluidos newtonianos, fluidos não newtonianos pseudoplásticos ou fluidos não newtonianos reopáticos) (GABAS; MENEZES; TELIS-ROMERO, 2012). O equipamento possui vários discos (*spindles*) de diferentes tamanhos para realizar a leitura em diversos fluidos (Figura 5).

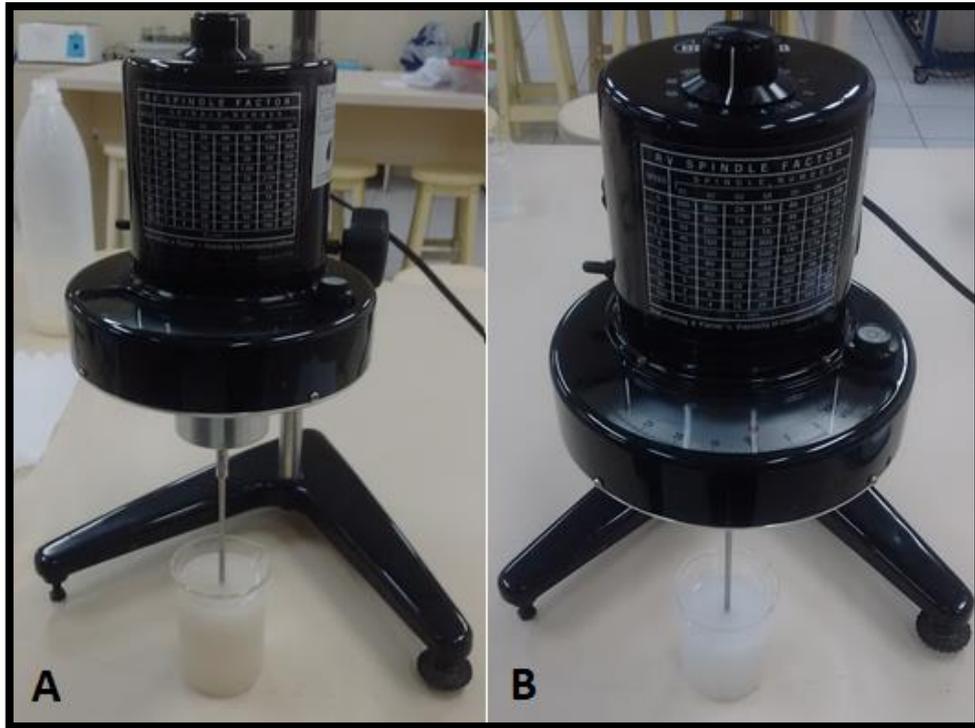
**Figura 5.** Viscosímetro de Brookfield. A) *Spindles* disponíveis para uso no equipamento. B) *Spindle* RV nº 05 utilizado nos dois géis com o viscosímetro. C) Escala do equipamento utilizada para analisar a viscosidade dos géis, de acordo com o *spindle* nº 05.



Fonte: Própria autora.

Para a seleção do *spindle* mais adequado aos géis, consideraram-se valores entre 80% a 20% da leitura que o equipamento determina, o qual relaciona o modelo com a velocidade de rotação e o rotor escolhido. Nos dois géis utilizou-se o *spindle* da série RV nº05. Após calibração do equipamento, foi usado um béquer com quantidade de gel suficiente para submergir o *spindle* até a marca indicada no seu eixo, evitando a formação de bolhas que pudessem interferir no teste (Figura 6). Quando acionado, o equipamento gira o *spindle* em velocidade constante e uniforme. Foram realizadas análises da viscosidade com os valores de rotação de 10rpm, 20rpm, 50rpm e 100rpm; tendo como temperatura dos géis 25°C. As leituras no aparelho foram feitas sempre após estabilização do valor indicado. Após anotação de todos os valores determinados pelo equipamento em todas as rotações, utilizou-se uma escala própria do equipamento do *spindle* RV nº05 para verificar a viscosidade dinâmica de cada gel.

**Figura 6.** Viscosímetro de Brookfield. A) Verificação das rotações por minuto do equipamento pelo *spindle* nº 05 no gel 2. B) Verificação das rotações por minuto do equipamento pelo *spindle* nº 05 no gel 1.



Fonte: Própria autora.

No Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutica da UEPG a densidade relativa dos produtos foi determinada para caracterização dos produtos, pelo método da Picnometria (Figura 7). O teste foi realizado no mesmo dia em que foram preparadas as formulações. Para determinar a massa do picnômetro utilizou-se uma balança analítica AY220 Shimadzu®. O picnômetro vazio foi pesado e depois colocou-se água destilada no seu interior até seu total preenchimento. Pesou-se o picnômetro novamente para determinar a massa da água destilada. Para pesar os géis, inseriu-se o Gel 1 com uma pipeta Pasteur até completar o picnômetro e o pesou. Fez-se o mesmo processo com o Gel 2, após limpeza do picnômetro, identificando a massa do gel de Triclosan. Para cada produto utilizado (água destilada, Gel 1 e Gel 2) foi obtido a massa pela equação:

$$\text{Massa do produto (g)} = \text{Massa do picnômetro com o produto (g)} - \text{Massa do picnômetro vazio (g)}$$

A água destilada e os dois géis estavam na temperatura de 25°C e todos os valores foram anotados para o cálculo final das densidades, a qual utiliza a seguinte equação:

$$\text{Densidade do gel (g/mL)} = \text{Massa do gel (g)} / \text{Massa da água destilada (mL)}$$

**Figura 7.** Picnometria. A) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo água destilada em seu interior. B) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo o gel 2 em seu interior. C) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo o gel 1 em seu interior.



**Fonte:** Própria autora.

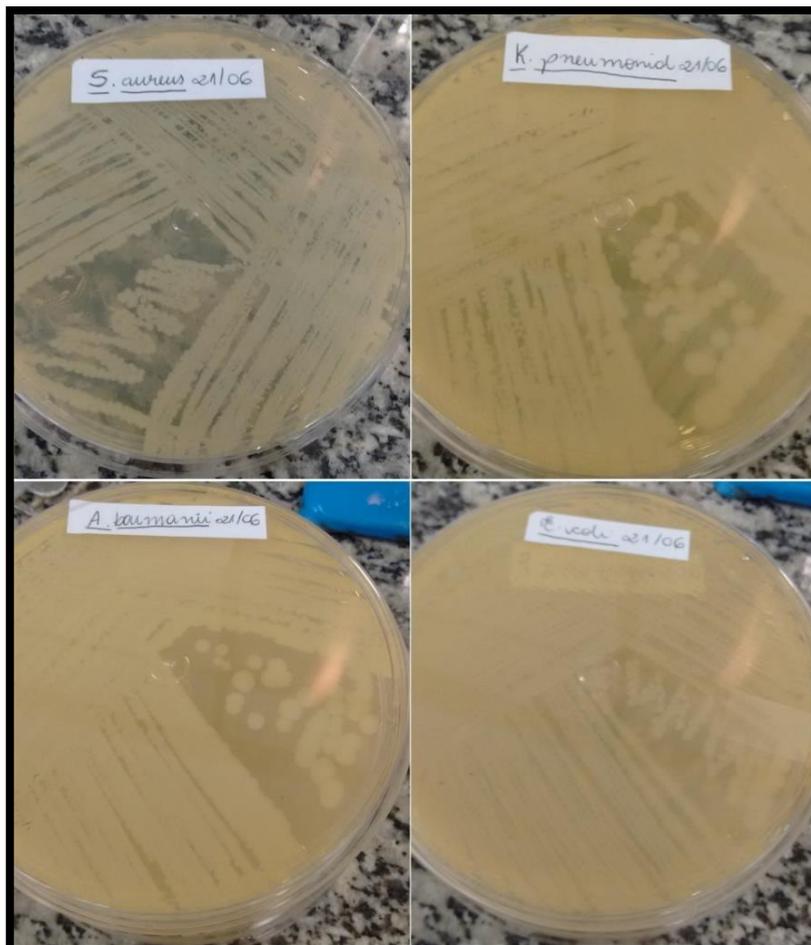
## 4.3 ETAPA C

### 4.3.1 Propriedade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana, no Laboratório de Microbiologia da UEPG, foi realizada a técnica do poço-difusão investigando o perfil de sensibilidade *in vitro* aos géis e aos colutórios de digluconato de clorexidina 0,12% (Periotrat®) e de Triclosan 0,03% (Dental Clean®) de quatro cepas: *Escherichia coli* ESBL+ (ATCC® 35218), *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 25955 KP) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923); as quais são comuns em infecções do trato respiratório em pacientes internados.

Antes da aplicação da técnica de poço-difusão, foi necessário a realização de culturas frescas das cepas adquiridas (Figura 8).

**Figura 8.** Cultura das cepas frescas dos microrganismos comerciais: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 25955 KP), *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606), *Escherichia coli* ESBL+ (ATCC® 35218).



Fonte: Própria autora.

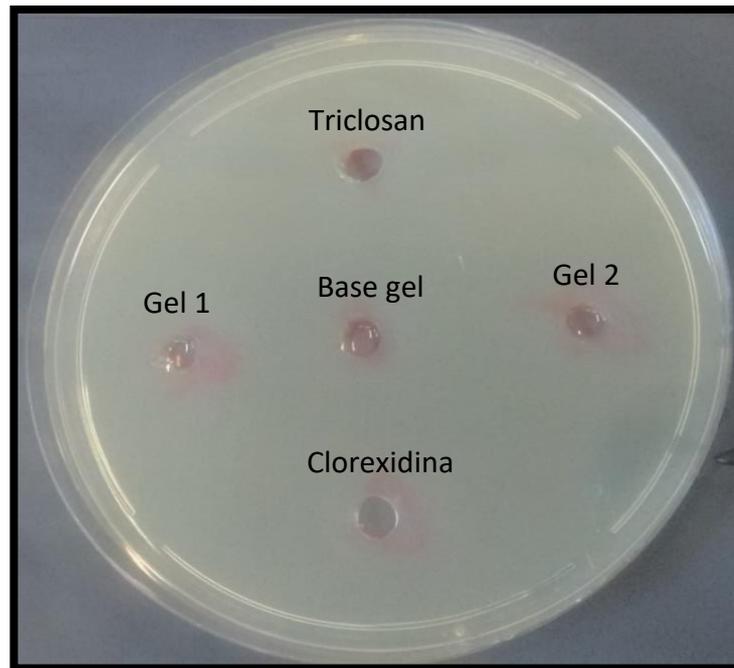
Os discos das cepas comerciais foram introduzidos em tubos de ensaio estéril com tampa de rosca (13x100mm) contendo caldo Mueller Hinton estéril e foram mantidos em estufa a 37°C por 48h. Após 48h, foi preparado meio de cultura ágar Mueller Hinton (de acordo com as recomendações do fabricante) e esterilizado em autoclave adequada. Foram distribuídos, então, 45mL de meio de cultura em placas de Petri de vidro estéreis (60x15mm) com auxílio de tubo tipo Falcon graduado estéril. Após a solidificação do meio, foram coletados 100µL da solução das cepas comerciais com uma micropipeta e dispensados nas placas de Petri, realizando a semeadura com alça de platina flambada ao rubro. Colocaram-se as placas de Petri em estufa a 37°C por 24h. As placas de Petri foram removidas da estufa, após o período de incubação, e as colônias crescidas foram confirmadas por meio da técnica de coloração de Gram.

Para iniciar a técnica do poço-difusão propriamente dito, foi utilizado o meio de cultura ágar Mueller Hinton (com seu preparo de acordo com as recomendações do fabricante), esterilizando em autoclave adequada o meio de cultura em placas de Petri descartáveis de Poliestireno estéreis sem divisórias (150x15mm). Após esterilização, com o auxílio de um tubo tipo Falcon graduado estéril, verteram-se 60mL de meio em cada placa.

Na semeadura das placas, foi necessário preparar inóculos para padronizar a quantidade de microrganismos utilizados em cada placa de Petri. Desta forma, optou-se por utilizar a escala de McFarland, a qual padroniza a amostra pela comparação visual da turvação de uma suspensão bacteriana. A escala de McFarland foi confeccionada de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA e pela CLSI (CLSI, 2003), obtendo turbidez correspondente a 0,5 que indica aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. No preparo dos inóculos foram utilizados tubos de ensaio de vidro estéril (com tampa de rosca) contendo 10mL de solução salina estéril. Adicionou-se uma alçada de uma das cepas frescas em um dos tubos e agitou-o em vortex para homogeneização da solução. Quando a turvação da solução bacteriana estava semelhante a turvação da escala de McFarland, foram coletados 100µL da solução com auxílio de uma micropipeta e dispensados no centro da placa de Petri com o meio de cultura já solidificado. Foram feitas, então, as semeaduras com auxílio de *swab* estéril pela técnica da placa cheia com cada uma das cepas determinadas na quantidade padronizada.

Após semeadura, foram realizadas cinco cavidades (espalhadas pela placa) com cerca de 9mm de diâmetro com ponteiros azuis de micropipeta esterilizadas. Em cada poço foi inserido um produto diferente: colutório de Triclosan, colutório de digluconato de clorexidina, Gel 1, Gel 2 e base do gel (Figura 9).

**Figura 9.** Placa de Petri já semeada com os cinco poços compostos por produtos diferentes: colutório de Triclosan, colutório de Digluconato de Clorexidina, Gel 1, Gel 2 e base do gel.



**Fonte:** Própria autora.

Foram gotejadas três gotas (equivalente a 150 $\mu$ L) de cada produto com auxílio de pipetas Pasteur descartáveis estéreis. Para cada cepa, foram utilizadas 10 placas de Petri. Além das quatro cepas, foram realizados controles negativos e de esterilidade, para confirmar ausência de crescimento de microrganismos. O controle negativo foi feito com mais 10 placas, sem realizar a semeadura, apenas com as cavidades e os produtos. As placas de Petri foram colocadas em estufa a 37°C por 24h, para serem analisadas a partir do halo de inibição formado em volta de cada poço. Os halos serão mensurados quando bem definidos (sem microrganismos em seu interior) com auxílio de régua milimetrada.

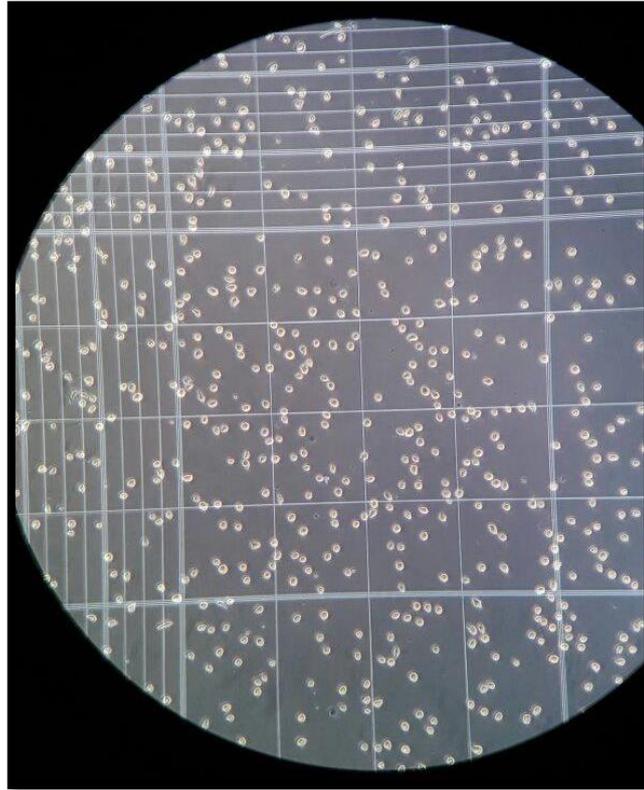
### 4.3.2 Citotoxicidade

Os testes de cultura de célula e viabilidade celular para verificar presença ou não de citotoxicidade foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura Celular do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPG. Inicialmente, foi realizada a cultura de células com o cultivo de Fibroblastos 3T3 (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil) em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (DMEM/F-12, Sigma Chemical Company, St Louis MO, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em frascos de cultura armazenados em ambiente umidificado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 48h, sendo que as células apresentaram tempo de dobramento de dois dias. Após a confluência da monocamada celular, as células foram lavadas com solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril (preparado de acordo com as normas da ANVISA) (ANVISA, 2004). Para que houvesse o desprendimento dos fibroblastos, a garrafa foi incubada por cinco minutos com 3mL de tripsina 0,25%. Quando as células se soltaram do fundo do frasco (o que foi determinado pela observação em microscopia de contraste de fase), adicionou-se volume igual de DMEM a 10% de SFB. Realizou-se, então, a homogeneização das células e a suspensão celular gerada foi transferida para outros frascos.

Antes da realização de cada experimento, as células foram contadas para determinação da proporção de células por poço a ser utilizada. Para a contagem das células, a suspensão celular foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular foi ressuspensionado em 1mL de DMEM a 1% de SFB e foram acrescentados 10µL da suspensão celular em 10µL de solução de azul de Tripán. Realizou-se, então, a contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer (Figura 10), verificando o número de células presentes na suspensão de 1mL pela multiplicação entre o número de células contadas, o fator de diluição (2) e por 10<sup>4</sup>, conforme a equação:

$$N^{\circ} \text{ DE CÉLULAS (em 1mL)} = N^{\circ} \text{ DE CÉLULAS CONTADAS} \times 2 \times 10^4$$

**Figura 10.** Contagem de células na câmara hemocitométrica de Neubauer.



**Fonte:** Própria autora.

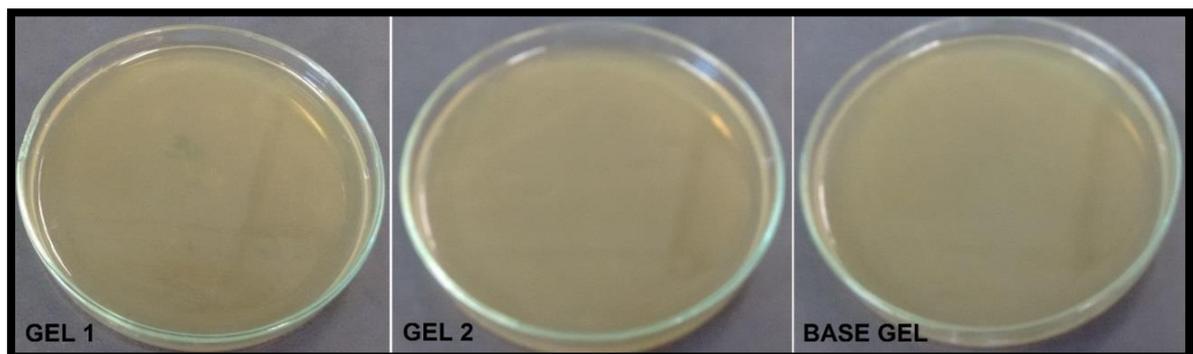
Foi realizado teste de esterilidade com as amostras do Gel 1, Gel 2 e base dos géis como controle negativo (CN), antes de iniciar o teste de viabilidade celular. Utilizaram-se tubos de Falcon de 4mL contendo extratos de cada gel. Os extratos foram preparados com DMEM a 1% SFB e uma porção de cada gel. Este teste foi realizado apenas para verificar se o material estava sem contaminação, por isso sem necessidade de padronização da quantidade da amostra. Os tubos preparados foram mantidos em estufa a 35°C por sete dias, onde verificou-se a ausência de turvação durante este período, caracterizando a esterilidade do material (Figura 11). Para confirmação da esterilidade, realizou-se ainda teste microbiológico, onde foram preparadas placas de Petri de vidro estéreis (60x15mm) com meio de cultura ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (uso de acordo com as recomendações do fabricante). Após a solidificação do meio, foi mergulhado um *swab* estéril em um dos extratos preparados e realizada a técnica da placa cheia. Utilizou-se uma placa de Petri para cada produto, colocando-as em estufa a 37°C por 48h. Da mesma forma, não houve crescimento de microrganismos, demonstrando que os materiais poderiam ser utilizados no teste de viabilidade celular (Figura 12).

**Figura 11.** Teste de esterilidade: tubos de Falcon compostos por extrato dos géis após sete dias em estufa, com ausência de turvação.



**Fonte:** Própria autora.

**Figura 12.** Teste de esterilidade. Placas de Petri contendo cada produto, após 48h em estufa. Ausência de crescimento microbiano.

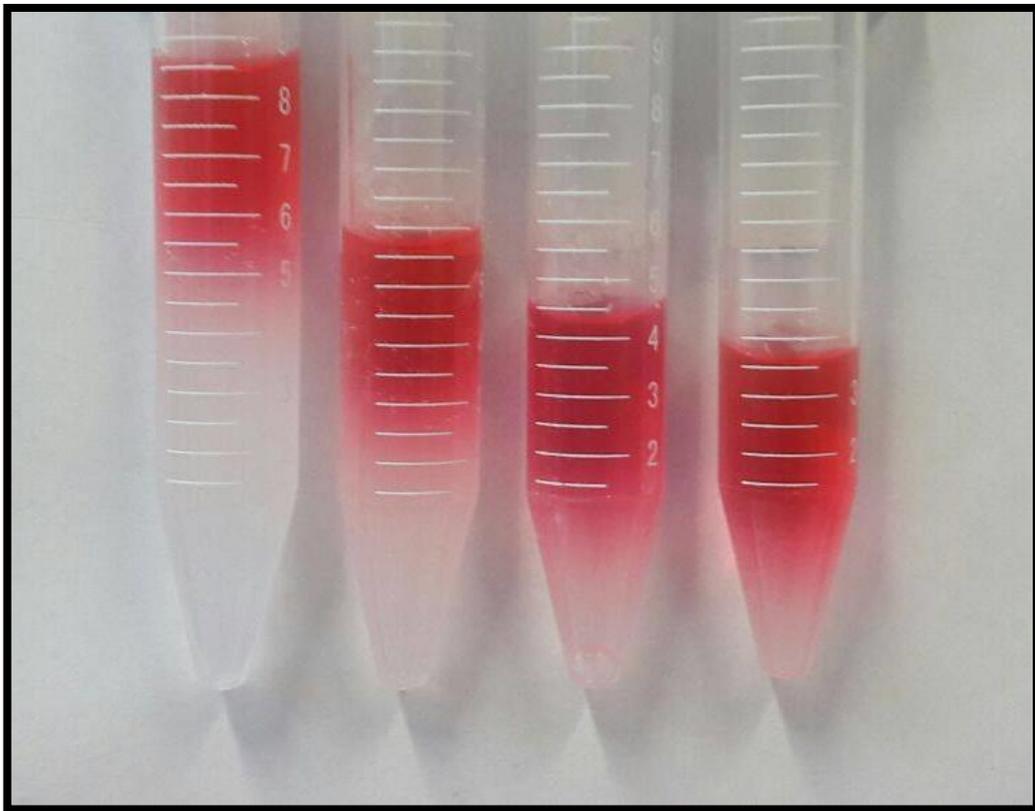


**Fonte:** Própria autora.

Para avaliar o tratamento com os géis e sua base na viabilidade celular de fibroblastos 3T3, foram realizados os ensaios de *Dimetiltiazol difenil tetrazolium* (MTT) e de Vermelho Neutro (VN). Para tanto, foram preparados extratos dos géis, agora

padronizados. Para cada produto foram realizados quatro extratos de concentrações diferentes (100%, 50%, 25% e 12,5%) (Figura 13). Na concentração de 100% foram pesados 1g de gel para 1mL de DMEM a 1% SFB. Para a concentração de 50%, pesaram-se 0,5g do produto desenvolvido para 1mL do meio de cultura. Em 25% de concentração foram pesados 0,25g de gel por mL de meio, bem como na concentração de 12,5% pesaram-se 0,125g de gel para 1mL de meio de cultura. Cada extrato foi realizado em um tubo de Falcon estéril de 4mL. Os géis permaneceram em contato com o meio de cultura por 24h, em incubadora e CO<sub>2</sub> a 35°C.

**Figura 13.** Extratos de um dos produtos nas quatro concentrações pré-determinadas (100%, 50%, 25% e 12,5%).



**Fonte:** Própria autora.

O teste de MTT é uma técnica baseada na capacidade que a enzima succinato desidrogenase têm de converter o sal de tetrazolium (amarelado) em cristais de formazan (de cor azul escura ou púrpura). Esta enzima está presente nas mitocôndrias de células viáveis, portanto o teste de MTT indica atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (GALDINO et al, 2014). Para o teste de MTT, os fibroblastos 3T3 foram plaqueados na proporção de  $10^4$  células/poço em placas de 96

poços com DMEM a 1% de SFB. Após 24h de incubação das placas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, o meio foi removido e adicionado DMEM a 1% SFB com os géis e sua base nas concentrações pré-determinadas, sendo cada concentração adicionada em quadruplicata. Poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB sem tratamento foram utilizados como controle. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado (24h e 48h), o sobrenadante dos poços foi removido e foi aplicado 200µL de solução de MTT a 0,5mg/mL. As placas foram mantidas por 3h em incubadora de CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi descartado e o corante foi removido com a inserção de 200µL de etanol em cada poço. A placa foi colocada em um agitador de placas por 10min, sendo seu conteúdo lentamente homogeneizado dissolvendo os cristais.

A leitura da absorbância dos poços da placa foi realizada em um leitor de microplaca por espectrofotometria (BioTek®, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570nm. Após a obtenção dos valores de absorbância, foi calculada a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 que receberam os diferentes tratamentos, quando comparados ao grupo controle. Foram considerados com viabilidade celular de 100% aqueles poços que receberam apenas DMEM a 1% de SFB.

Para o ensaio VN, foi utilizado o corante vermelho neutro que apresenta a capacidade de penetração em membrana celular de células vivas. Ele se difunde e se concentra nos lisossomos. Quando células pré-expostas ao corante entram em contato com substâncias citotóxicas do produto, há a diminuição da capacidade de reter o corante vermelho neutro. Este ensaio pode fazer a distinção entre células viáveis, danificadas e mortas, baseado na capacidade que os lisossomos celulares têm de absorver o corante (REPETTO et al, 2008). Para isso, os fibroblastos 3T3 foram plaqueados na proporção de 10<sup>4</sup> células/poço em placas de 96 poços com DMEM a 1% de SFB. Após 24h de incubação das placas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, o meio foi removido e adicionado DMEM a 1% SFB com os géis e sua base nas concentrações pré-determinadas, sendo cada concentração adicionada em quadruplicata. Poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB sem tratamento foram utilizados como controle em uma outra microplaca. Os testes foram realizados em 24h e 48h.

Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado (24h e 48h), o sobrenadante dos poços foi removido e foram aplicados 200µL de solução

de VN a 0,5% em DMEM a 1% de SFB sobre as células. A incubação das placas foi realizada por 3h em incubadora de CO<sub>2</sub>.

Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com solução de formaldeído e CaCl<sub>2</sub>, e foram pipetados 200µL de solução de ácido acético e etanol. A placa foi colocada em um agitador de placas por 10min, sendo seu conteúdo lentamente homogeneizado dissolvendo o corante.

A leitura da absorbância dos poços da placa foi realizada em um leitor de microplaca por espectrofotometria (BioTek®, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 540nm.

Após a obtenção dos valores de absorbância, foi calculada a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 que receberam os diferentes tratamentos, quando comparados ao grupo controle. Foram considerados com viabilidade celular de 100% aqueles poços que receberam apenas DMEM a 1% de SFB.

#### **4.3.3 Propriedade hidratante**

Para verificar a propriedade hidratante do Gel 1, do Gel 2 e da base gel foram utilizadas células da mesma linhagem (fibroblastos 3T3). O teste foi realizado com base nos estudos de OTA et al. (2012). As células foram cultivadas em seis placas de 96 poços com soro fetal bovino a 10% em Meio Mínimo Essencial de Eagle (E-MEM, ATCC 30-2003) a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Para realizar o tratamento das células, aplicou-se o ensaio de MTT em dois grupos: grupo 1 (aplicação dos géis como prevenção, antes do ressecamento) e grupo 2 (aplicação dos géis como tratamento, após o ressecamento induzido). A intenção de se realizar o grupo 1 foi verificar se os géis apresentaram propriedade preventiva hidratante, diferente do grupo 2 que teve o objetivo de identificar propriedade hidratante terapêutica. O tratamento foi mantido num período de 15min para todos os grupos. Para o ressecamento, cada placa teve um tempo diferente: 7min, 14min e 28min (OTA et al, 2012).

No grupo 1 (aplicação dos géis como prevenção, antes do ressecamento), foram pipetados com auxílio de um pipetador automático em quadruplicata os produtos: Gel 1, Gel 2 e base gel, com quantidade suficiente para completar o poço. Para este grupo utilizaram-se três placas de 96 poços. O tempo de tratamento foi de 15 minutos e após este período, aspiraram-se os produtos, deixando o conteúdo secar nos tempos diferentes (7min, 14min e 28min) em cada placa. Depois aplicou-se o

ensaio de MTT em todos os poços (da mesma forma em que foi descrito no teste de citotoxicidade) para análise do resultado de tratamento.

No grupo 2 (aplicação dos géis como tratamento, após o ressecamento induzido), mantiveram-se primeiramente as células secas em cada placa nos diferentes tempos (7min, 14min e 28min). Após esses períodos, com auxílio de um pipetador automático em quadruplicata os produtos foram aplicados como tratamento: Gel 1, Gel 2 e base gel, com quantidade suficiente para completar o poço, da mesma forma. O tempo de tratamento também foi de 15 minutos e após este período, aspiraram-se os produtos, aplicando-se o ensaio de MTT em todos os poços (da mesma forma em que foi realizado no teste de citotoxicidade) para análise do resultado de tratamento.

As taxas de sobrevivência de células foram medidas em uma microplaca de espectrômetro (Gemini XPS; Devices Molecular, San Jose, CA, EUA) com absorção de 560nm e comprimento de onda de 590nm. Os resultados foram obtidos em valores de absorvância, convertidos para porcentagem de viabilidade celular.

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e dos testes estatísticos específicos, considerando-se o nível de significância de 5%. Todos os cálculos foram realizados com o programa estatístico BioEstat versão 5.3 (Belém - Pará, Brasil).

Nos testes de citotoxicidade foi usada a análise de variância, a qual comparou a viabilidade celular em 24h e 48h de cada um dos produtos (base do gel, Gel 1 e Gel 2 em diferentes concentrações) com o grupo controle; seguido do teste de Tukey quando houve significância estatística.

Para o teste microbiológico, verificaram-se os valores encontrados dos halos de inibição, realizando cruzamento entre os valores do Gel 1 e do colutório de clorexidina, seguido do cruzamento do Gel 2 e do colutório de Triclosan. Essas análises foram feitas pelo teste de Mann-Whitney (teste não paramétrico para amostras independentes).

Em relação ao teste de hidratação pelo ensaio de MTT, os resultados foram analisados por dois testes estatísticos. O teste estatístico Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a porcentagem de viabilidade celular gerada entre os

produtos (Gel 1, Gel 2 e controle negativo) em cada tempo estipulado (7min, 14min e 28min) nos dois grupos. Com as porcentagens de viabilidade de cada produto, realizaram-se os cruzamentos do Gel 1 com Gel 2, da base com o Gel 1 e da base com Gel 2 pelo teste estatístico Student-Nesman-Keuls, para verificar diferenças entre cada produto.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Formulações

Com os estudos de pré-formulação criaram-se as formulações de dois géis de princípios ativos antissépticos diferentes: digluconato de clorexidina 0,12% e Triclosan 0,03%. Incluiu-se também como princípio ativo nos dois produtos o D-pantenol 5% como hidratante. Além dos princípios ativos, as formulações apresentam diferentes excipientes que proporcionam a cada produto vantagens e características importantes. É possível identificar a concentração e a função de cada componente das formulações desenvolvidas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Identificação dos componentes de cada gel desenvolvido com suas concentrações e suas funções dentro das formulações.

COMPONENTE	GEL 1	GEL 2	FUNÇÃO NA FORMULAÇÃO
Digluconato de clorexidina	0,12%	-	Antimicrobiano
Triclosan	-	0,03%	Antimicrobiano
D-Pantenol	5%	5%	Hidratante
HPMC	2%	2%	Polímero que promove viscosidade a formulação e liberação controlada do fármaco
PEG 4000	2%	2%	Polímero mucoadesivo solubilizante, umectante, hidratante, estabilizante
Propilenoglicol	7%	7%	Polímero solubilizante e hidratante
Xilitol	5%	5%	Edulcorante natural, umectante, hidratante e conservante
Acessulfame sódico	0,2%	0,2%	Edulcorante
Esteviosídeo	0,5%	0,5%	Edulcorante natural
Flavorizante de menta	4%	4%	Flavorizante/Saborizante
Água purificada	qsp. 100g	qsp. 100g	Veículo, solvente

**Fonte:** Própria autora.

Os excipientes foram utilizados na mesma proporção para os dois géis, mantendo suas bases semelhantes. Para proporcionar a viscosidade e aspecto de gel, utilizou-se o HPMC. Ele também fará a liberação controlada dos fármacos sobre a superfície aplicada. Assim como o HPMC, foram utilizados mais dois polímeros: o PEG 4000 e o propilenoglicol. O PEG 4000 foi incluso para proporcionar mucoadesividade, auxiliar na umidade e hidratação bucal, bem como estabilizar o produto. O propilenoglicol também auxilia na hidratação, mas sua função principal na formulação é solubilização. Ainda em relação a hidratação e umidade bucal, incluiu-se o xilitol. Este terá função também de conservar e de proporcionar sabor adocicado ao produto. O acessulfame sódico e o esteviosídeo também fazem parte dos componentes que proporcionam sabor doce a formulação. O flavorizante de menta está presente para melhorar o sabor das formulações. Como veículo e solvente foi utilizada a água purificada. As formulações não apresentam álcool e nem corantes.

## 5.2 Caracterização dos géis

Os dois géis preparados foram primeiramente identificados pelas suas características organolépticas, as quais foram descritas no Quadro 4.

**Quadro 4.** Características organolépticas do Gel 1 (gel de clorexidina 0,12%) e do Gel 2 (gel de Triclosan 0,03%) identificadas após preparo das formulações.

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	GEL 1	GEL 2
COR	Branco	Bege claro
ODOR	Essência de menta	Essência de menta
ASPECTO	Uniforme	Uniforme
CONSISTÊNCIA	Gel fluido	Gel fluido

Fonte: Própria autora.

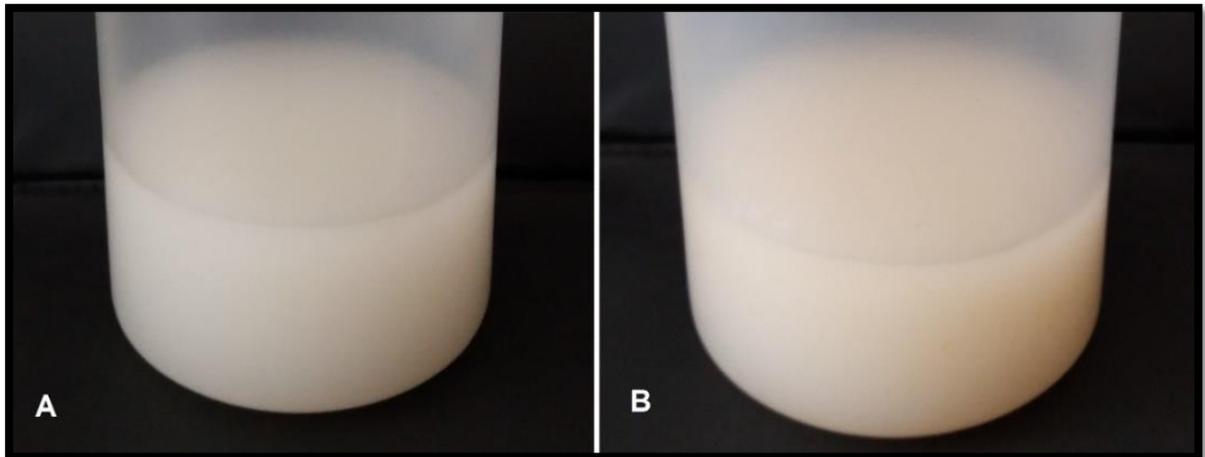
Os dois produtos se apresentaram como formulações de forma farmacêutica semi-sólida (gel). O Gel 1 apresentou coloração branca, de odor específico de essência de menta (a qual foi utilizada na formulação), aspecto uniforme (homogêneo) e com consistência de gel fluido (Figura 14). O Gel 2 se diferenciou do Gel 1 durante a observação visual apenas na característica organoléptica relacionada a cor (bege claro) (Figura 15). As outras características permaneceram semelhantes às do Gel 1.

**Figura 14.** Caracterização organoléptica. Produto caracterizado como forma farmacêutica semi-sólida, com consistência de gel fluido.



**Fonte:** Própria autora.

**Figura 15.** Caracterização organoléptica. A) Gel 1 – cor branco, de aspecto uniforme. B) Gel 2 – cor bege claro, de aspecto uniforme.



**Fonte:** Própria autora.

Para caracterização também foram realizados testes físico-químicos com cada gel, sendo apresentados seus resultados na Tabela 1.

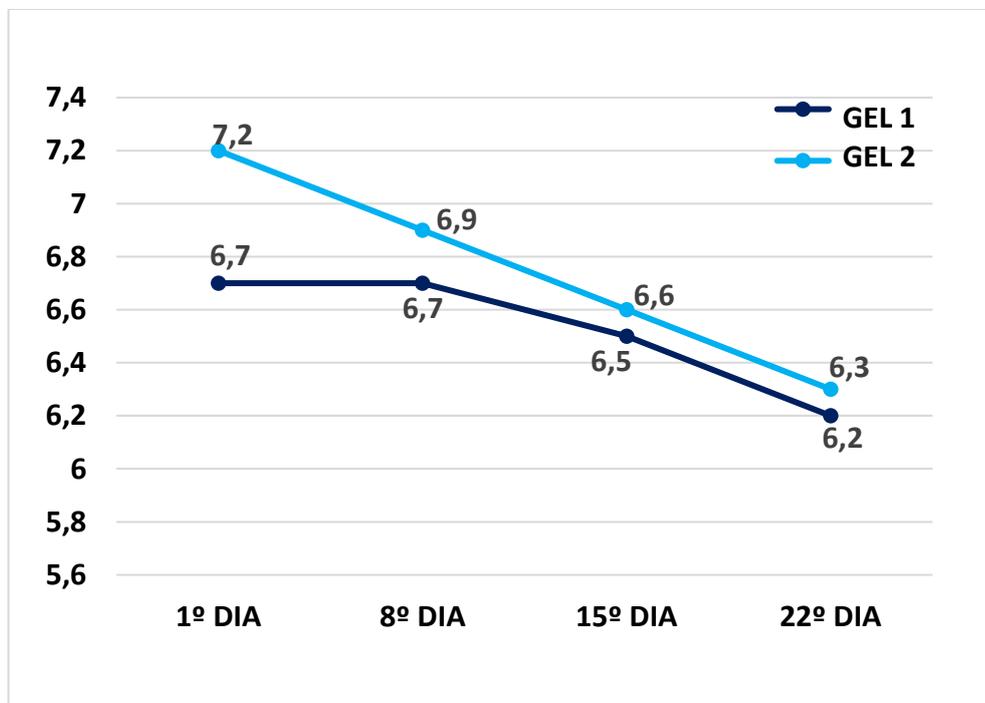
**Tabela 1.** Características físico-químicas dos Gel 1 (gel de clorexidina 0,12%) e Gel 2 (gel de Triclosan 0,03%) com seus determinados valores, de acordo com o padrão estabelecido no quadro (variação de viscosidade pelas rpm empregadas, pH e densidade iniciais dos géis).

<b>CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS</b>	<b>GEL 1</b>	<b>GEL 2</b>
<b>pH INICIAL</b>	6,7	7,2
<b>DENSIDADE</b>	1,0379 g/mL	1,0331 g/mL
<b>VISCOSIDADE</b>	6800-3660 cP	6200-3360 cP

Fonte: Própria autora.

Para caracterização físico-química dos dois géis fluidos, analisaram-se primeiramente os valores de pH, pelos dois métodos diferentes, para confirmação dos valores (peagâmetro digital de bancada e peagâmetro digital de bolso). Os valores de pH entre os dois métodos utilizados para verificar o pH exato dos produtos não demonstraram alterações com a empregabilidade dos métodos em um mesmo gel. Desta forma, foram comparados os valores de pH de cada gel entre o período estabelecido (1º dia, 8º dia, 15º dia e 22º dia) (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Valores de pH dos géis 1 e 2 em quatro períodos diferentes (1º dia, 8º dia, 15º dia e 22º dia).



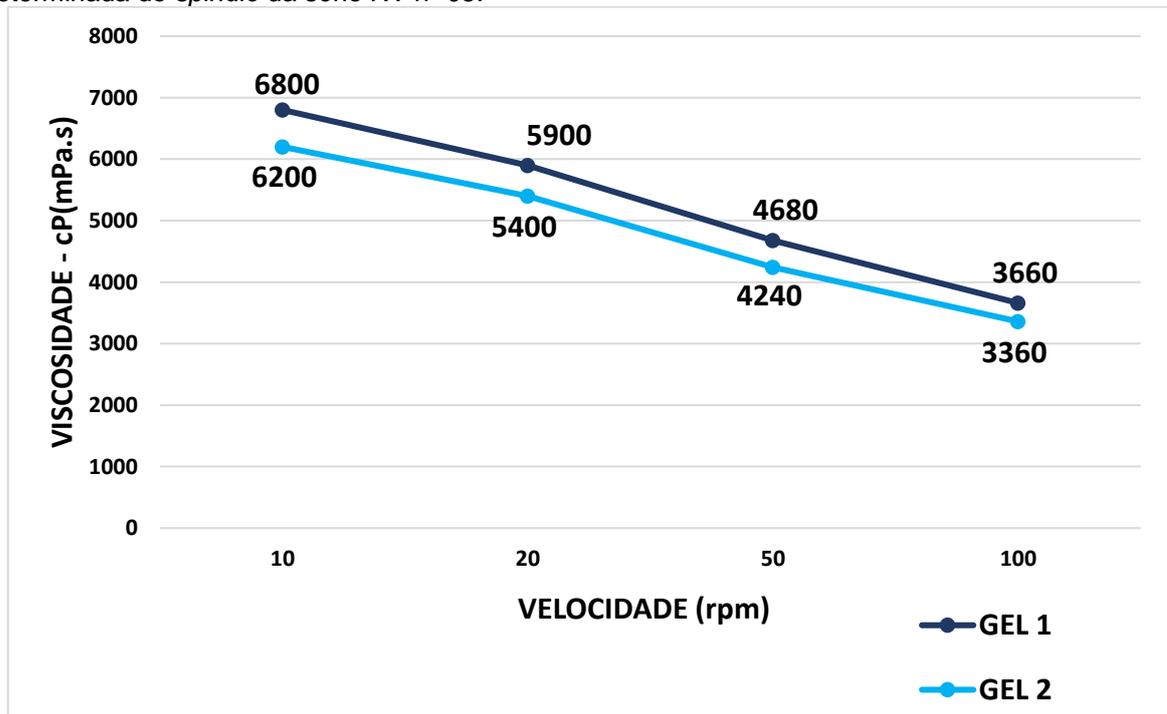
Fonte: Própria autora.

Observam-se que os dois géis tiveram decréscimo dos valores de pH durante os

dias corridos. O Gel 1 variou entre os valores de pH 6,7 (1º dia), pH 6,7 (8º dia), pH 6,5 (15º dia) e pH 6,2 (22º dia). Os valores encontrados para o Gel 2 foram pH 7,2 (1º dia), pH 6,9 (8º dia), pH 6,6 (15º dia) e pH 6,3 (22º dia).

No viscosímetro de Brookfield, com o *spindle* da série RV nº 05, obtiveram-se as viscosidades em velocidades fixas (rotações por minuto realizadas pelo *spindle*). Na velocidade de 10rpm o Gel 1 apresentou viscosidade de 6800cP e o Gel 2 o valor de 6200cP (Gráfico 2), por exemplo.

**Gráfico 2.** Viscosímetro de Brookfield. Gráfico da viscosidade (cP) dos géis pela velocidade (rpm) pré-determinada do *spindle* da série RV nº 05.



Fonte: Própria autora.

Essas viscosidades não se alteraram numa mesma velocidade com o passar do tempo. Porém, conforme aumentavam-se as rotações por minuto, a viscosidade dos géis diminuía. Desta forma, os dois géis formulados foram caracterizados como fluidos não newtonianos pseudoplásticos.

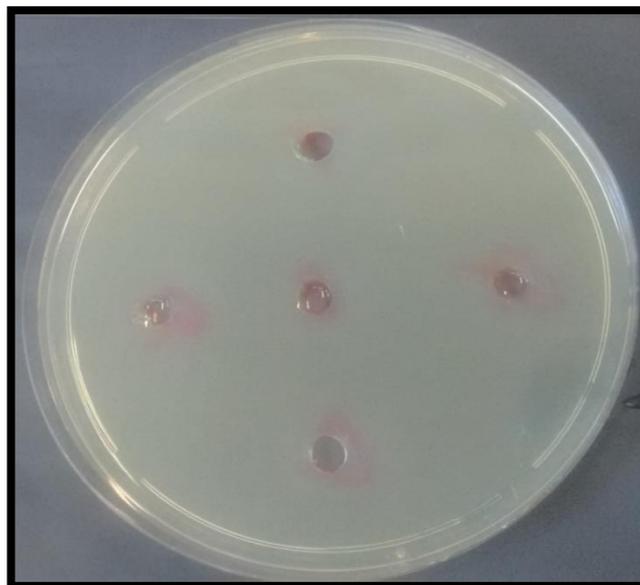
A última característica físico-química utilizada para caracterizar os géis foi a densidade, realizada pela técnica da Picnometria. Utilizou-se um picnômetro vazio de massa 23,0673g, no qual apresentou massa correspondente a 56,8872g quando cheio de água destilada, obtendo a massa da água destilada de 33,8199g. Com o uso das equações, verificou-se que o Gel 1 pesava 35,104g (picnômetro com Gel 1 = 58,1713g) e o Gel 2 correspondia a massa de 34,9404g (picnômetro com Gel 2 =

58,0077g). Desta forma, a densidade do gel 1 é de 1,0379g/mL e a densidade do gel 2 é de 1,0331g/mL.

### 5.3 Teste microbiológico

No teste microbiológico, primeiramente verificou-se a presença ou não de halos de inibição. As placas de Petri correspondentes ao controle negativo não apresentaram crescimento de microrganismos e nem halos de inibição (Figura 16). Nas placas semeadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923), os poços contendo o colutório de Triclosan e o gel de Triclosan não apresentaram halos definidos. Houve uma diminuição da quantidade de microrganismos próximo a esses poços, mas não foi possível mensurar cada halo, pois em seu interior ainda permaneceram colônias. Em relação aos poços que apresentavam a base do gel, os halos de inibição não estavam bem definidos nas placas semeadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC<sup>®</sup> 25955 KP) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC<sup>®</sup> 19606), pois ainda existiam microrganismos em seu interior. Apenas nas placas semeadas com *Escherichia coli* ESB<sup>+</sup> (ATCC<sup>®</sup> 35218) formaram-se halos de inibição com a base do gel. Nas demais placas semeadas, todos os poços que continham Gel 1, Gel 2 e os colutórios apresentaram halos de inibição. Todos os halos não definidos foram considerados inexistentes.

**Figura 16.** Controle negativo. Placa de Petri com ausência de microrganismos e halos de inibição ao redor dos poços de cada produto.



Fonte: Própria autora.

O diâmetro de cada halo de inibição encontrado foi mensurado, obtendo-se a média (em milímetros) entre as placas, de acordo com cada grupo e cada substância utilizada. Também foram verificados os valores do desvio padrão entre as placas utilizadas de cada microrganismo. Os valores de cada grupo estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Faixa de valores dos halos de inibição presentes nas placas de Petri, de acordo com cada microrganismo semeado e os diferentes antimicrobianos utilizados.

<b>GRUPOS</b> – faixa de valores em milímetros (média / desvio padrão)					
<b>PRODUTOS</b>	<b>CONTROLE NEGATIVO</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® 25955 KP)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC® 19606)	<i>Escherichia coli</i> ESBL+ (ATCC® 35218)
Base do gel	Ausência de crescimento de microrganismos.	Ausência de halos de inibição.	Ausência de halos de inibição.	Ausência de halos de inibição.	13-15 (13,7 / 0,67)
Colutório de clorexidina 0,12%	Ausência de crescimento de microrganismos.	19-21 (19,8 / 0,63)	15-17 (16,0 / 0,81)	15-16 (15,5 / 0,53)	17-22 (18,5 / 1,35)
<b>GEL 1</b> (clorexidina 0,12%)	Ausência de crescimento de microrganismos.	24-26* (25,1 / 0,74)	18-20* (18,9 / 0,74)	18-19* (18,1 / 0,32)	19-21* (20,4 / 0,84)
Colutório de Triclosan 0,03%	Ausência de crescimento de microrganismos.	- Ausência de halos de inibição.	20-25 (21,8 / 1,62)	15-22 (16,9 / 2,33)	20-26 (22,0 / 2,54)
<b>GEL 2</b> (Triclosan 0,03%)	Ausência de crescimento de microrganismos.	- Ausência de halos de inibição.	26-28** (27,2 / 0,63)	19-25** (21,2 / 2,25)	23-28** (25,2 / 1,62)

**Nota:** \* $p < 0,05$  – Gel 1 X Colutório de Clorexidina (Teste Estatístico Mann-Whitney).

\*\* $p < 0,05$  – Gel 2 X Colutório de Triclosan (Teste Estatístico Mann-Whitney).

**Fonte:** Própria autora.

Na tabela 2, observam-se os produtos utilizados em cada poço e seus halos de inibição de acordo com cada microrganismo semeado. No grupo *Staphylococcus aureus* (ATCC®25923), houveram halos de inibição nos poços de clorexidina (colutório e Gel 1), onde o poço do gel apresentou valores de halos entre 24-26mm, diferente dos valores encontrados com o colutório. Nas placas semeadas com *Klebsiella pneumoniae* (ATCC®25955KP), os maiores halos encontrados foram com os produtos que continham Triclosan (Gel 2: 26-28mm; colutório de Triclosan: 20-25mm), seguidos do Gel 1 e do colutório de clorexidina. Pelo grupo *Acinetobacter baumannii* (ATCC®19606), o Gel 2 se mostrou com halos maiores quando comparado com o

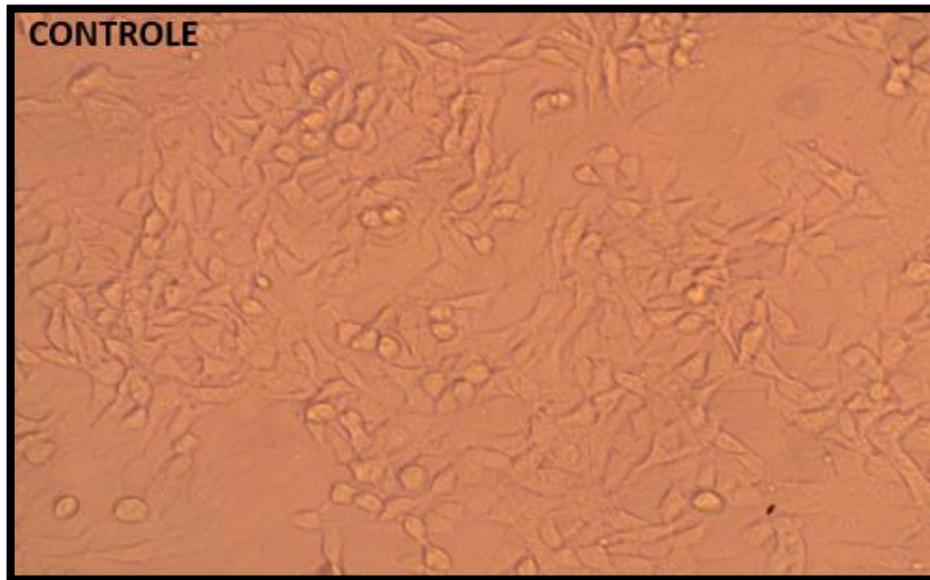
colutório de Triclosan, assim como o Gel 1 apresentou valores acima dos encontrados com o colutório de clorexidina. Em relação a *Escherichia coli* ESBL+ (ATCC®35218), com exceção da base, os géis apresentaram faixa de valores coincidentes com alguns valores diferentes comparando cada produto: Gel 2 (23-28mm) e colutório de triclosan (20-26mm); Gel 1 (19-21mm) e colutório de clorexidina (17-22mm).

Primeiramente comparou-se a efetividade microbiana entre os produtos com clorexidina, onde o Gel 1 se mostrou mais efetivo do que o colutório, com diferenças estatisticamente significativas em todos os microrganismos utilizados. Quando se compararam os produtos contendo Triclosan, pode-se observar que o Gel 2 teve maior efetividade microbiana estatisticamente significativa do que o colutório, sobre *Klebsiella pneumoniae* (ATCC®25955KP), *Acinetobacter baumannii* (ATCC®19606) e *Escherichia coli* ESBL+ (ATCC®35218).

#### 5.4 Citotoxicidade

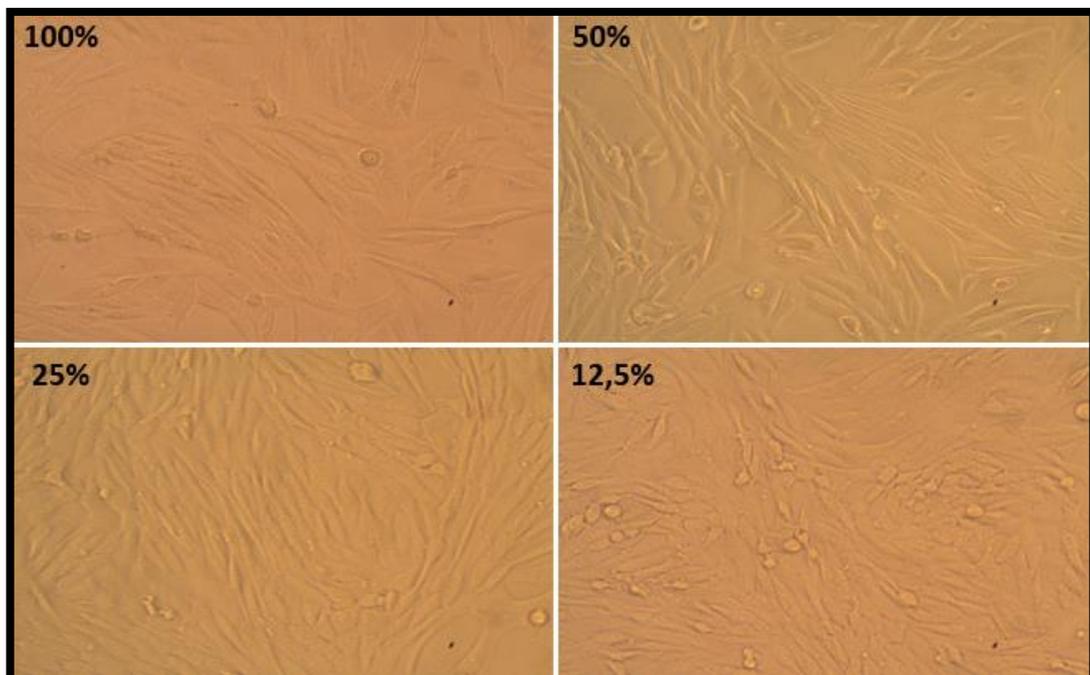
Primeiramente realizou-se a análise da morfologia celular. Os tratamentos de 24h e 48h foram semelhantes. O controle realizado apresentou-se com morfologia celular padrão (fibroblastos com seu formato alongado e seus prolongamentos considerados normais) (Figura 17). Com o uso da base do gel como controle negativo, observaram-se alterações morfológicas leves em todas as concentrações, com acentuação do aspecto alongado dos prolongamentos citoplasmáticos celulares (Figura 18 e Figura 21). Da mesma forma comportou-se o gel de Triclosan (Gel 2), com alterações leves da morfologia celular em todas as concentrações (Figura 19 e Figura 22). Diferente dos demais, o gel de clorexidina (Gel 1) demonstrou alterações celulares severas, indicativas de apoptose celular, também em todas as concentrações preparadas. Os fibroblastos perderam seu formato alongado, apresentaram prolongamentos menos pronunciados e tiveram alteração de contraste dos seus limites. O aspecto de células arredondadas que se soltaram do frasco indica a perda de prolongamentos celulares e o processo de apoptose celular (Figura 20 e Figura 23).

**Figura 17.** Morfologia celular do grupo controle (sem tratamento). Fibroblastos 3T3 com seus formatos alongados e seus prolongamentos considerados normais.



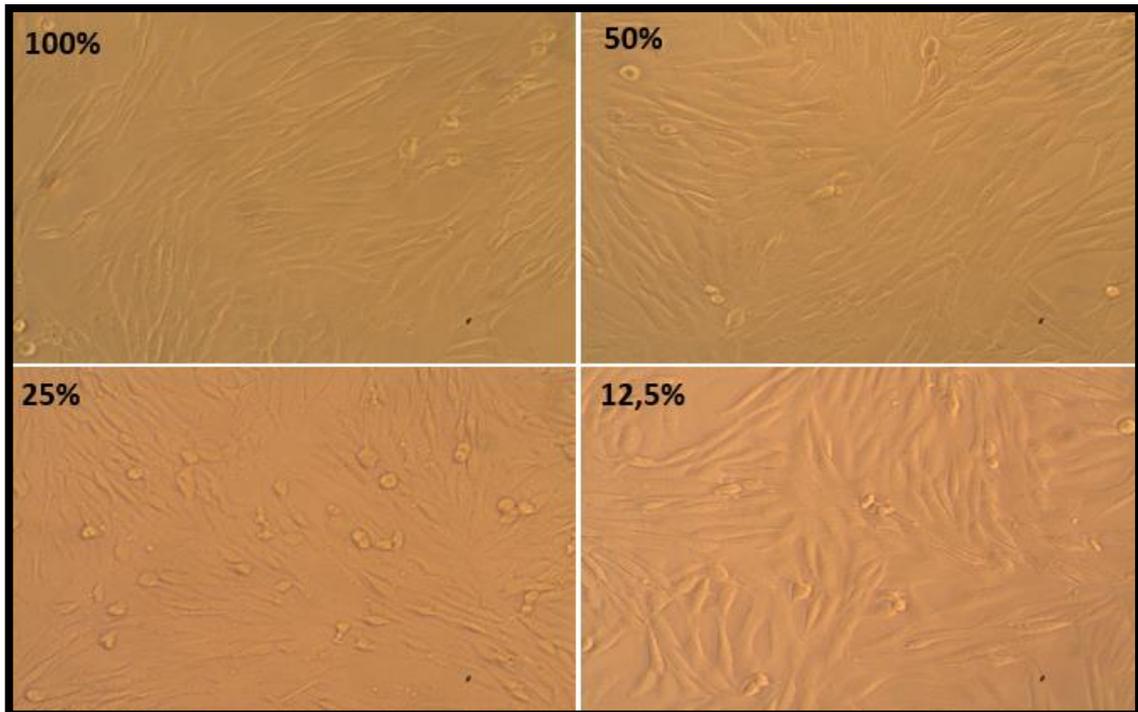
Fonte: Própria autora.

**Figura 18.** Morfologia celular após 24h de tratamento com o controle negativo. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



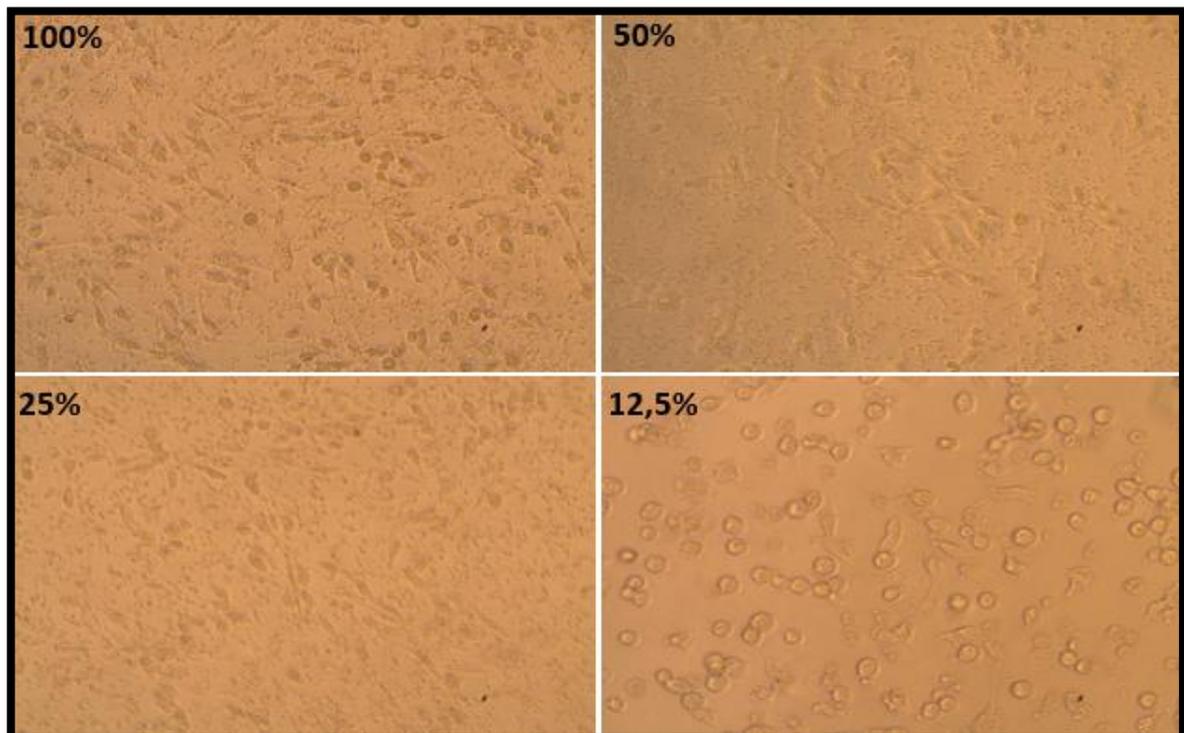
Fonte: Própria autora.

**Figura 19.** Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 2. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



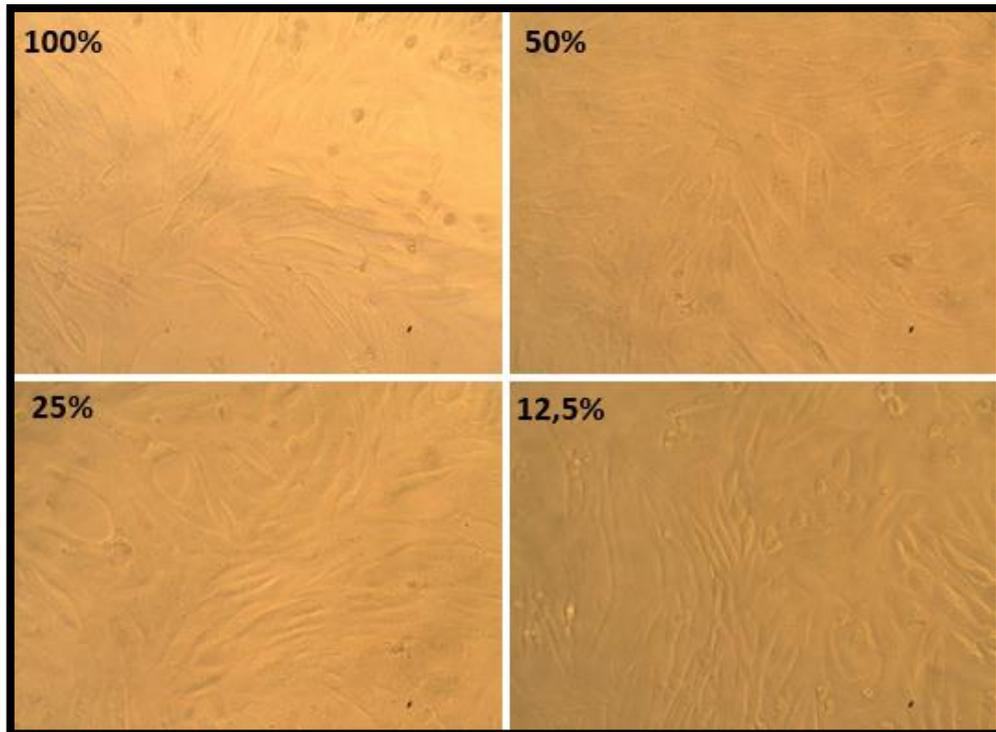
**Fonte:** Própria autora.

**Figura 20.** Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 1. Ausência de prolongamentos celulares indicando alterações severas e apoptose celular de fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



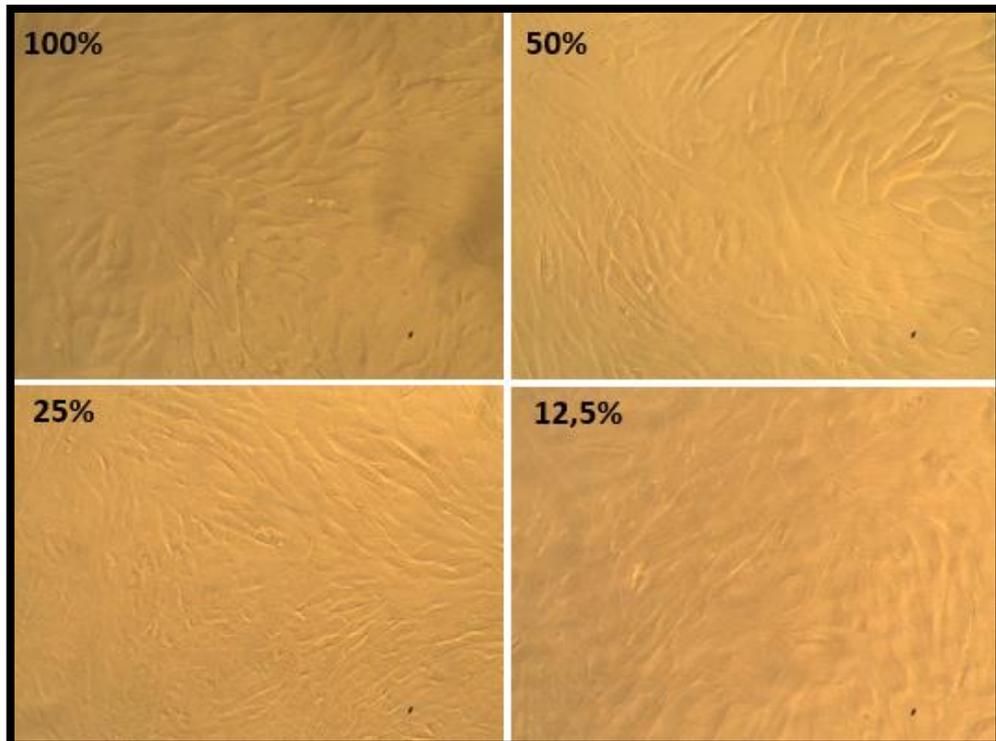
**Fonte:** Própria autora.

**Figura 21.** Morfologia celular após 48h de tratamento com o controle negativo. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



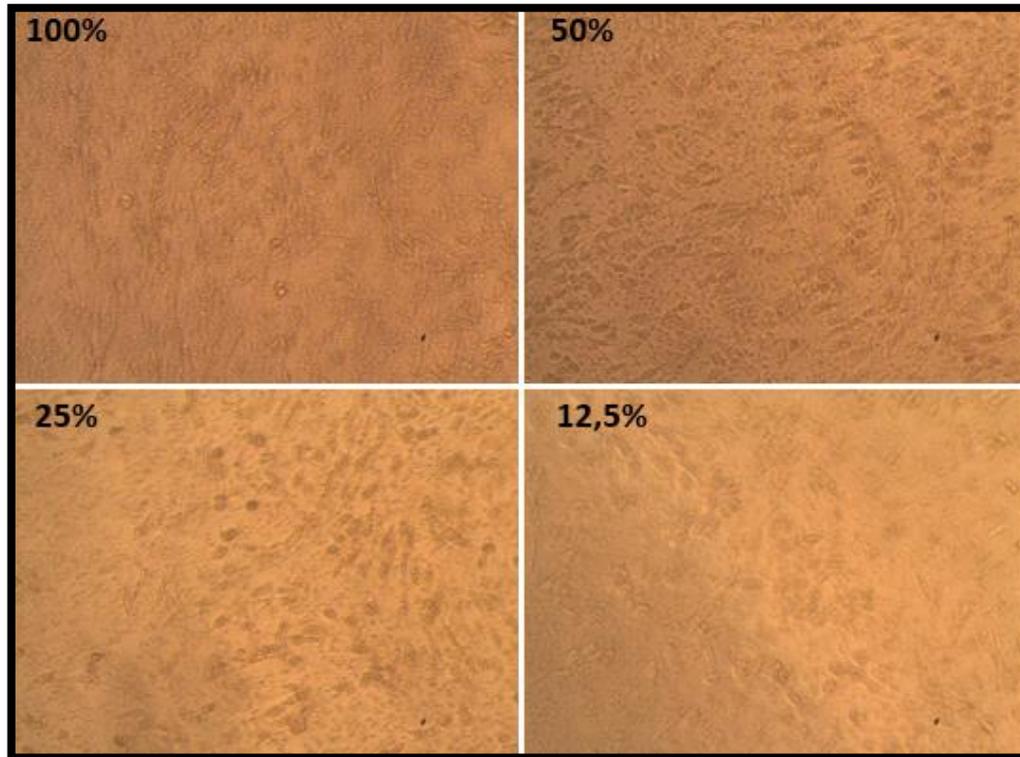
**Fonte:** Própria autora.

**Figura 22.** Morfologia celular após 48h de tratamento com o gel 2. Presença de leve alongamento citoplasmático dos fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



**Fonte:** Própria autora.

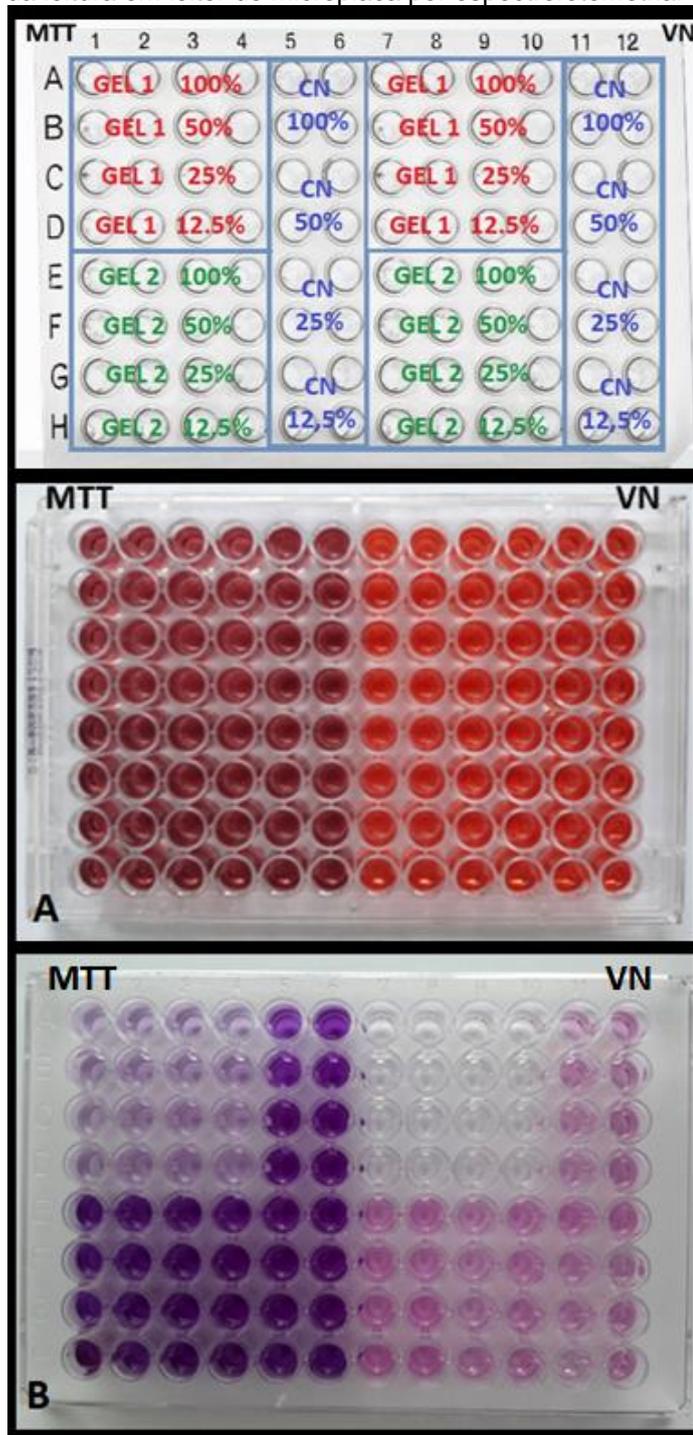
**Figura 23.** Morfologia celular após 24h de tratamento com o gel 1. Ausência de prolongamentos celulares indicando alterações severas e apoptose celular de fibroblastos 3T3, nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% do produto.



**Fonte:** Própria autora.

Na análise do potencial de citotoxicidade, verificou-se a viabilidade celular com o tratamento das células com os produtos Gel 1, Gel 2 e base do gel nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%, em 24h e 48h em fibroblastos 3T3 pelos ensaios de MTT e VN (Figura 24). Além dos produtos, analisou-se o grupo controle (apenas o DMEM a 1% SFB sem tratamento).

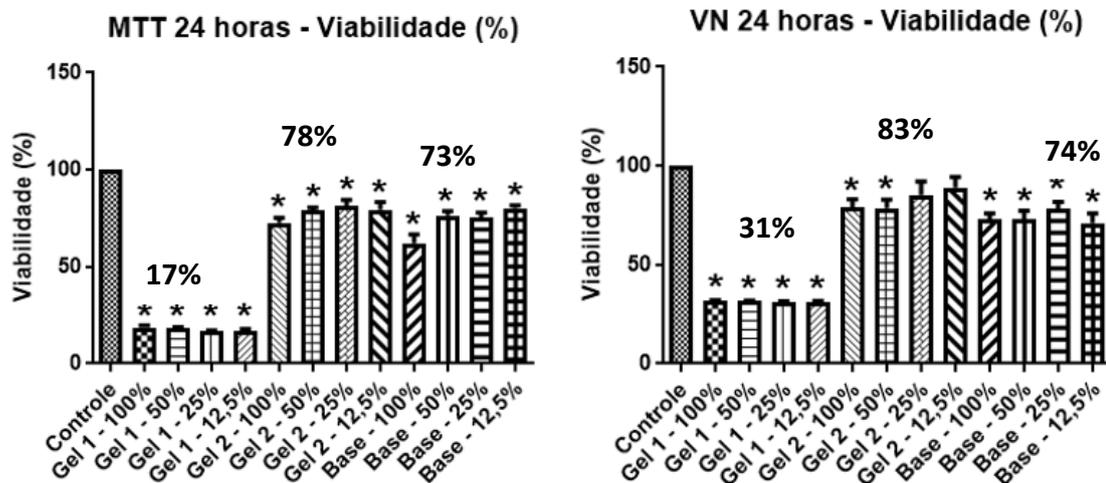
**Figura 24.** Localização de cada produto utilizado em uma placa de 96 poços para os ensaios de MTT e VN. Testes realizados em quadruplicata de cada produto (gel 1, gel 2 e CN - controle negativo) nas concentrações pré-estabelecidas (100%, 50%, 25% e 12,5%). A) Placa de 96 poços após incubação por 3h com os tratamentos de MTT e VN. B) Placa de 96 poços após aplicação dos eluentes e imediatamente antes da leitura em leitor de microplaca por espectrofotometria.



Fonte: Própria autora.

Os testes de viabilidade celular pelo MTT e VN em 24h de tratamento com os extratos dos géis indicaram resultados parcialmente semelhantes (Figura 25).

**Figura 25.** Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 pelos métodos MTT e VN no período de 24 horas de incubação com os géis de clorexidina (Gel 1), Triclosan (Gel 2) e base do gel nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.



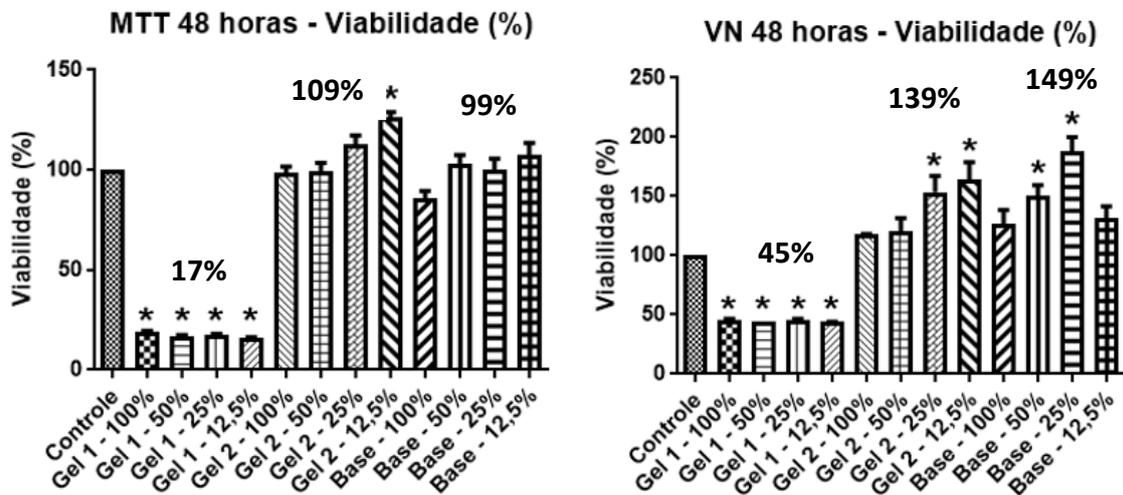
**Nota:** Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). \*quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

**Fonte:** Própria autora.

O Gel 1 (clorexidina) se mostrou mais tóxico aos fibroblastos 3T3, pela diminuição acentuada da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. O extrato do Gel 2 (Triclosan) foi o produto que apresentou o menor impacto na viabilidade dos fibroblastos, inclusive tendo resultados melhores do que a base do gel.

Os testes de viabilidade celular pelo MTT e VN em 48h de tratamento com o extrato do Gel 1 indicaram que a viabilidade permaneceu acentuada, demonstrando o poder citotóxico da clorexidina em todas as concentrações utilizadas (Figura 26).

**Figura 26.** Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 pelos métodos MTT e VN no período de 48 horas de incubação com os géis de clorexidina (Gel 1), Triclosan (Gel 2) e base do gel nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.



**Nota:** Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). \*quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

**Fonte:** Própria autora.

O Gel 2 e a base do gel não indicaram efeitos negativos da viabilidade celular. Diferente dos resultados apresentados em 24h, o extrato do Gel 2 nas concentrações de 25% e 12,5%, bem como a base do gel nas concentrações de 50% e 25% demonstraram até mesmo um aumento na viabilidade dos fibroblastos. Este resultado pode indicar uma maior proliferação celular em resposta a um agente tóxico de baixa intensidade.

## 5.5 Hidratação

Na análise da propriedade hidratante dos géis, verificaram-se os valores de viabilidade celular como prevenção e tratamento para desidratação celular induzida, os quais estão identificados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de viabilidade celular média em porcentagem (%) encontrados com a aplicação de cada produto sob as células em função da desidratação prévia (tratamento para ressecamento) e da desidratação induzida posteriormente (prevenção ao ressecamento).

Produtos	Desidratação posterior – Prevenção (tempos estabelecidos em minutos)			Desidratação prévia - Tratamento (tempos estabelecidos em minutos)		
	7min	14min	28min	7min	14min	28min
	Gel 1	28,5 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>	18,6 <sup>a</sup>	29,5 <sup>a</sup>	28,0 <sup>a</sup>
Gel 2	57,1 <sup>a</sup>	55,3 <sup>b</sup>	47,7 <sup>b</sup>	73,4 <sup>b</sup>	80,7 <sup>b</sup>	56,6 <sup>b</sup>
Controle negativo	19,9 <sup>a</sup>	18,6 <sup>a</sup>	16,9 <sup>a</sup>	28,4 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	28,5 <sup>a</sup>

**Nota:** Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$  – Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado com o teste de Student-Nesman-Keuls).

**Fonte:** Própria autora.

No Grupo 1, observou-se melhor capacidade preventiva quanto a desidratação do Gel 2 principalmente nos tempos de 14min e 28min. Além disso, pode-se perceber uma tendência maior de preservação celular quanto ao efeito da desidratação no período de 7min, apesar de não haver diferença estatisticamente significante.

No Grupo 2, identificou-se diferença estatisticamente significante entre os valores do Gel 2 e do controle negativo nos três tempos verificados, demonstrando um efeito hidratante. Entretanto, o Gel 1 e o controle negativo apresentaram valores considerados estatisticamente iguais, a um nível de significância de 5%.

De forma geral, o Gel 2 apresentou valores maiores de viabilidade celular, enquanto que os valores encontrados do Gel 1 e do controle negativo se mostraram bem semelhantes e menores que as porcentagens do Gel 2.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Formulação e Caracterização dos géis

Os géis foram estudados e formulados aos pacientes internados, principalmente intubados, oferecendo-lhes desde controle do biofilme até conforto durante o internamento, sempre na busca de minimizar riscos de infecções, reações adversas e complicações. Cada gel foi formulado com os seguintes componentes, buscando suas respectivas funções: D-pantenol (hidratação), HPMC (viscosidade), PEG 4000 (mucoadesividade, hidratação e estabilidade), propilenoglicol (solubilização), xilitol (edulcorante, conservação do produto e hidratação), acessulfame sódico (edulcorante), esteviosídeo (edulcorante), essência de menta (flavorizante) e água purificada (solvente).

A formulação do Gel 1 apresenta como antimicrobiano o digluconato de clorexidina que, apesar de apresentar algumas reações adversas se utilizado em um longo período ou em altas concentrações (PEGORARO et al, 2014; BRITO et al, 2012; LOPES et al, 2016), é considerado por diversos estudos como padrão ouro entre os antissépticos (CASARIN et al, 2012; ARAÚJO et al, 2015; SEMENOFF; SEMENOFF-SEGUNDO; BIASOLI, 2008). Keijser et al (2003) comprovaram que tanto a concentração de 0,12% quanto a de 0,2% (as mais utilizadas entre os antissépticos bucais) geraram diminuição da formação do biofilme e melhoraram a condição gengival em pacientes sistemicamente saudáveis, sem apresentar diferenças estatisticamente significantes entre elas (KEIJSER et al, 2003). Entre as duas concentrações, a de 0,12% é a mais indicada quando se associa esse efeito antimicrobiano à diminuição dos efeitos adversos (MOREIRA et al, 2008). Desta forma, o Gel 1 foi formulado com digluconato de clorexidina na concentração de 0,12%, possibilitando maior segurança em seu uso.

Em pacientes intubados, uma meta-análise realizada por Shi et al (2013) demonstrou que a clorexidina é um importante produto para higiene bucal (na forma de colutório ou de gel), reduzindo em 40% o desenvolvimento de PAV (SHI et al, 2013). Os mesmos autores realizaram estudo de revisão mais atual demonstrando que tanto a solução oral quanto o gel reduzem o risco de PAV de 24% para cerca de 18% e evita o desenvolvimento da pneumonia em um paciente a cada 17 intubados (SHI et al, 2017).

A formulação do Gel 2 apresenta como princípio ativo o Triclosan, o qual não

promove efeitos adversos e nem desconforto ao paciente devido ao seu sabor (VAZ, 2014; ANDRADE, 2013; RELVAS, 2015; TELES; TELES, 2009; AYAD et al, 2010). Porém, a literatura se mostra escassa em relação aos estudos sobre o uso do Triclosan na higiene bucal de pacientes internados na UTI (SHI et al, 2013), sendo este um dos diferenciais da presente pesquisa.

Como princípio ativo secundário do Gel 1 e do Gel 2, incluiu-se o D-pantenol. Ele é considerado um excelente hidratante de pele e mucosas, o qual oferece regeneração e cicatrização a estes tecidos (AMIB, 2014; MENDONÇA; GONDIM, 2017). O Dexpanthenol, ao contrário da vaselina, pode ser utilizado em pacientes hospitalizados pois não gera risco de combustão quando em contato com o oxigênio durante a oxigenioterapia (SECRETARIA DE SAÚDE, 2012). Por estes motivos, ele é indicado para hidratação labial e de mucosa bucal de pacientes internados em UTI (AMIB, 2014; MENDONÇA; GONDIM, 2017). Estudos indicam, ainda, que o D-pantenol em uso tópico tem ação sobre mucosa e pele quando apresenta-se de 0,5% a 5% (OGUZ et al, 2015; ULGER et al, 2016; EBNER et al, 2002), estando os géis dentro da concentração terapêutica recomendada na literatura.

Tanto o Gel 1 quanto o Gel 2 apresentam os mesmos excipientes. Um dos diferenciais destes componentes é o uso do esteviosídeo e do xilitol como edulcorantes naturais. Além de mascararem o sabor amargo da clorexidina (principalmente), os dois edulcorantes são anticariogênicos, oferecendo até melhor controle de pH bucal e da capacidade tamponante da saliva (MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Estes componentes também são bem tolerados por pacientes diabéticos (NEGRI, 2005). Mussatto e Roberto (2002) relatam que o xilitol independe de insulina para ser metabolizado, pois as duas principais vias de absorção do xilitol (fígado e intestino) não são mediadas pela insulina (MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Shivanna et al (2013) isolaram um esteviosídeo de extratos das folhas de *Stevia rebaudiana* (bertoni) Hemsl (Asteraceae) e verificaram inclusive efeitos antihiperlipidêmicos, insulinoatrópicos e glucagonostáticos em ratos diabéticos (SHIVANNA et al, 2013). Desta maneira, os dois géis podem ser utilizados para higiene bucal e para pacientes diabéticos. Além disso, o xilitol é considerado também um bom umectante. Mäkinen (2011) demonstrou que o xilitol apresenta importante função na prevenção de lesões ulcerosas em pele e mucosas (MÄKINEN, 2011).

Com o intuito de proporcionar maior espalhabilidade, umedecimento e retenção dos princípios ativos na cavidade bucal, foram inseridos polímeros mucoadesivos nas

formulações: HPMC e PEG 4000. Em relação as características organolépticas dos géis, a consistência de gel foi gerada principalmente pela inclusão do HPMC. Além disso, alguns estudos demonstram que este polímero pode umedecer e aumentar a área de contato do fármaco com a mucosa (VILLANOVA et al, 2010; ALLEN et al, 2005), o que também acontece com a inclusão do PEG 4000 (SEVERINO et al, 2011). Outra função do HPMC é controlar a liberação do princípio ativo de uma formulação (VILLANOVA et al, 2010; ALLEN et al, 2005). Grap (2009) evidencia que dentro de uma UTI, onde o paciente está sob ventilação mecânica, as práticas de higiene bucal não são priorizadas pela equipe de cuidado ou são realizadas apenas uma vez ao dia, não seguindo protocolos já implantados (GRAP, 2009). Neste sentido, o HPMC é interessante pois ao liberar o antimicrobiano lentamente, propõe uma redução na quantidade de vezes diárias de realização da higiene bucal. Testes futuros específicos serão necessários com os géis formulados para confirmação desta função.

Dentre as características organolépticas, ainda, pode-se observar que a cor do Gel 1 foi diferente da cor do Gel 2. Nas formulações não foram utilizados corantes, apenas a junção de todos os componentes da formulação a qual gerou as cores finais relatadas. Corantes tem a função de tornar um produto mais atrativo, melhorando a sua adesão pelos pacientes (FIOCRUZ, 2005), o que não se aplica aos intubados. Além disso, existem reações adversas relatadas na literatura sobre o uso desses aditivos, como alterações de comportamento, carcinogenicidade a longo prazo e, principalmente, reações tóxicas e alérgicas (mesmo em uso tópico). As reações poderiam provocar complicações a estes pacientes que já apresentam comprometimento sistêmico (POLÔNIO; PERES, 2009).

Outro componente que também não foi incluso nas formulações foi o álcool de cereais. O álcool é um agente utilizado para solubilizar essências e fármacos lipofílicos, além de prevenir a contaminação do produto por microrganismos e aumentar, assim, seu prazo de validade (QUIRYNEN et al, 2005). Almerich et al (2005) induziram um modelo de gengivite, realizando testes para verificar a influência do álcool em enxagatários de Triclosan e cloreto de zinco. Como resultado descobriram que o álcool não influencia na ação do antisséptico bucal contra a gengivite e nem contra a formação de cálculo supragengival (ALMERICH et al, 2005). São vários os efeitos adversos do álcool sob a cavidade bucal, incluindo halitose, queimadura química, descamação e disgeusia (GOMES; ESTEVES, 2012; MATOS et al, 2015; SALDANHA et al, 2015; ENNIBI et al, 2013; BERTI-COUTO et al, 2012;

ARAÚJO et al, 2015; ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015). Deste modo, optou-se por não utilizar o álcool nas formulações, já que a ausência dele diminui, significativamente, a incidência de eventos adversos aos pacientes intubados (ALMERICH et al, 2005).

Na caracterização dos géis também foram identificados o pH, a viscosidade e a densidade de cada produto. Em relação ao pH, Baliga et al (2013) relata que a saliva apresenta uma faixa de pH normal de 6,2 a 7,6 (pH médio de 6,7), mantendo a cavidade bucal dentro da neutralidade (pH 6,7-7,3) (BALIGA; MUGLIKAR; KALE, 2013). Um estudo com antissépticos bucais apontou que 63,6% deles possuíam valor de pH inferior a 5,5 (CORSO et al, 2004), o que potencializa a erosão dentária e outras doenças bucais, já que este valor é considerado crítico a cavidade bucal (JARDIM, 2003; SILVA et al, 2016).

Os dois géis formulados se apresentaram no padrão relatado ideal, com pH inicial próximo ao pH neutro (pH Gel 1 – 6,7; pH Gel 2 – 7,2), sem necessidade de modificações em suas formulações. Mesmo no 22º dia, com a redução dos valores de pH (Gel 1 – pH 6,2; Gel 2 – pH 6,3), os géis ainda permaneceram dentro da faixa de pH normal salivar e distante do pH 5,5. Isto significa que estes produtos não favorecem o aparecimento de doenças bucais, mantendo a condição bucal saudável. A queda brusca dos valores de pH aconteceu provavelmente pelos géis não apresentarem grandes quantidades de conservantes como álcool, corantes e outros componentes. Estes poderiam manter um prazo maior de validade dos géis, entretanto, poderiam também trazer prejuízos maiores aos pacientes (QUIRYNEN et al, 2005; POLÔNIO; PERES, 2009). Nos géis formulados, o xilitol entrou como conservante natural (DIRIX et al, 2007) e o PEG 4000 como estabilizante (VILLANOVA et al, 2010), reduzindo o risco de eventos adversos aos pacientes intubados e internados em UTI. Testes futuros serão realizados para verificar a estabilidade dos produtos de forma física, química e terapêutica.

Quanto a viscosidade, os géis foram classificados de forma reológica como fluidos não newtonianos e pseudoplásticos. Correa et al (2005) e Menegon (2009) relatam que essas características classificam a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, principalmente formulações dermocosméticas (CORREA et al, 2005; MENEGON, 2009). Menegon (2009) ainda demonstra que produtos com enxágue pós uso necessitam que o fluido seja suficientemente viscoso para que as partículas suspensas não decantem durante o armazenamento, e que com o passar do tempo

essa viscosidade diminua para que o enxágue bucal seja possível (MENEGON, 2009). No caso dos géis, a viscosidade não precisa desta diminuição ao longo do tempo, pois não haverá enxague bucal destes produtos. Os géis foram formulados justamente para se manter na cavidade bucal por mais tempo.

Sobre os valores de densidade relativa encontrados, o Gel 1 e o Gel 2 apresentaram resultados bem semelhantes (Gel 1 – 1,0379g/mL; Gel 2 – 1,0331g/mL). A variação desses valores se deve pela utilização de antimicrobianos diferentes em cada formulação. No caso do Gel 1, o antimicrobiano utilizado é o digluconato de clorexidina, o qual apresenta densidade relativa de 1,06 a 1,07g/mL<sup>136,137</sup>. O Gel 2 é composto pelo antimicrobiano Triclosan que, diferente da densidade da clorexidina, possui valores que variam de 0,6 a 0,9g/mL<sup>138</sup>.

## 6.2 Propriedade antimicrobiana

O uso dos auxiliares químicos na higiene bucal tornou-se essencial na odontologia hospitalar, principalmente pelo comprometimento sistêmico dos pacientes em relação aos microrganismos associados as alterações bucais e sistêmicas. Os microrganismos investigados nesta pesquisa foram determinados correlacionando-os com as infecções do trato respiratório que mais acometem o paciente intubado.

Em relação ao *Staphylococcus aureus*, o colutório com digluconato de clorexidina demonstrou efeito antimicrobiano semelhante aos estudos de Moreira et al (2009) e Festuccia et al (2013) (MOREIRA et al, 2009; FESTUCCIA et al, 2013), tendo o Gel 1 valores acima da média encontrada. Diferente da clorexidina, os produtos com Triclosan não apresentaram halos de inibição bem definidos. Este resultado difere da literatura, em que encontraram-se diferentes estudos que apresentaram bons resultados do Triclosan frente ao *S. aureus* (MOREIRA et al, 2009; GONÇALVES; PINTO, 2013). De acordo com o Manual EUCAST (2016), isso pode acontecer por dois motivos. Primeiramente, podem haver pequenas colônias de *S. aureus* no interior dos halos, demonstrando maior resistência dessas colônias frente ao Triclosan. E o segundo motivo seria o crescimento de pequenas colônias de microrganismos não correspondentes ao *S. aureus* dentro dos halos. Para comprovação dos resultados, recomenda-se o subcultivo e identificação destes microrganismos presentes dentro de cada halo de inibição (EUCAST, 2016), o que no

momento foi inviável para a pesquisa.

Sobre a *Klebsiella pneumoniae*, os dois produtos com clorexidina 0,12% (colutório e Gel 1) apresentaram semelhanças nos resultados do estudo de Zuniga (2008), o qual demonstrou eficácia na inibição do crescimento bacteriano (ZUNIGA, 2008). Isto também foi observado com os produtos compostos por Triclosan 0,03% contra o mesmo microrganismo.

Quanto ao resultado do uso dos produtos de clorexidina e Triclosan (tanto colutórios como géis) sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* e de *Escherichia coli* ESBL+, os valores da pesquisa demonstraram inibição bacteriana. O estudo de López-Jornet et al (2011) comparou diferentes colutórios, demonstrando que o colutório de Triclosan associado ao Dexpantenol teve bons resultados sob diferentes cepas, inclusive sobre *E. coli* (LÓPEZ-JORNET et al, 2011). A eficácia antimicrobiana da associação da clorexidina com o D-pantenol foi observada no estudo de Kramer et al (2016), o qual demonstrou que a clorexidina aumenta seu poder antimicrobiano com a associação de 5% de Dexpantenol. Apesar destes estudos, a literatura se mostra ainda escassa em relação ao uso destes princípios ativos sobre esses microrganismos pré-determinados, sendo este um dos diferenciais da presente pesquisa (KRAMER et al, 2016).

De forma geral, as diferenças entre os halos de inibição, formados pelos colutórios e pelos géis contendo o mesmo princípio ativo, provavelmente aconteceram em função da associação e interação de componentes ativos diferenciados das formulações desenvolvidas que apresentam efeito direto ou indireto sobre microrganismos (TANOMARU et al, 2008), como o xilitol e o D-pantenol. Isso também explica o motivo pelo qual a base dos géis teve efeito antimicrobiano sobre uma das cepas utilizadas. Além disso, a diferença de halos dos géis e dos colutórios pode ocorrer também devido ao uso de polímeros mucoadesivos como o PEG 4000, aumentando o contato do produto sobre uma superfície.

### **6.3 Citotoxicidade**

Para cultura de células utilizou-se a linhagem de fibroblastos 3T3, recomendada pela ISO 10993-5:2009(E) para testes de citotoxicidade (ISO 10993-5:2009(E), 2009). Fibroblastos são as células mais abundantes em tecido conjuntivo, o que torna a sua manipulação mais viável e favorece estabilidade adequada (TODARO; GREEN,

1963), proporcionando resultados mais confiáveis em testes com produtos de aplicação tópica.

De acordo com a mesma ISO, o valor mínimo para considerar um produto não citotóxico corresponde a 70% de viabilidade celular (ISO 10993-5:2009(E), 2009). Desta forma, os testes de viabilidade celular em 24h (pelos dois métodos empregados – MTT e VN) apresentaram valores do gel de Triclosan e da base dos géis considerados não citotóxicos, com a média acima de 70%. Diferente do gel de Triclosan, o gel de clorexidina diminuiu consideravelmente a viabilidade dos fibroblastos, o que confirma seu poder citotóxico já constatado na literatura, mesmo em menores concentrações e com outras linhagens celulares (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; DE SOUZA, et al, 2007; YI-CHING et al, 2014). Em 48h do teste de viabilidade celular, o gel de clorexidina se manteve tóxico aos fibroblastos 3T3, enquanto que a base e o gel de Triclosan apresentaram valores acima de 100%. Mesmo com essa pequena proliferação celular, os valores são considerados adequados por estarem acima de 70% de viabilidade celular (ISO 10993-5:2009(E), 2009). Isto pode ser ainda comparado e comprovado com os resultados encontrados de morfologia celular, onde o gel de Triclosan e a base não geraram grandes alterações morfológicas dos fibroblastos 3T3, enquanto que o gel de clorexidina induziu alterações severas e, inclusive, apoptose celular.

#### **6.4 Hidratação**

Para verificar a propriedade hidratante dos géis, optou-se por realizar teste com cultura de células por MTT, tendo como base o estudo de OTA et al. (2012) (OTA et al, 2012). Desta forma, encontraram-se resultados diferentes entre os géis formulados.

Os baixos valores do Gel 1 (os quais foram semelhantes aos valores da base), demonstram que a clorexidina não teve efeito preventivo e de tratamento contra o ressecamento, mesmo em associação ao D-pantenol. A literatura demonstra que a clorexidina proporciona prevenção e auxilia no tratamento contra alterações relacionadas a microrganismos como a *Candida albicans* (AFLAKI et al, 2014). Porém,

é escassa quando se trata da sua ação preventiva ou terapêutica no ressecamento bucal, mesmo em associação com outros componentes.

O Gel 2 apresentou valores maiores de viabilidade celular, demonstrando que foi possível prevenir e tratar o ressecamento. Isto pode ter acontecido provavelmente em função da associação do Triclosan com o D-pantenol, a qual pode ter aumentado a aderência nas células e melhorado o efeito protetor e hidratante.

Um estudo randomizado e duplo-cego, realizado em pacientes com hipossalivação, comparou o efeito hidratante e antisséptico de dois colutórios: o primeiro contendo Triclosan e D-pantenol, e o segundo colutório a base de substitutos enzimáticos salivares. Verificou-se que o colutório de Triclosan com D-pantenol foi melhor empregado a esses pacientes, pois apresentou bons resultados em relação as duas propriedades (hidratante e antimicrobiana), sem interferências entre as funções de seus componentes. Além disso, este colutório obteve baixa toxicidade e demonstrou melhorias na xerostomia relatada pelos pacientes, sendo bem tolerado pelos mesmos. O colutório a base de substitutos enzimáticos salivares apresentou apenas a propriedade hidratante, sendo seu efeito antimicrobiano insuficiente ao controle da microbiota bucal (LÓPEZ-JORNET et al, 2011).

Poucos estudos na literatura avaliam e demonstram a capacidade de hidratação celular, principalmente no uso da clorexidina, do Triclosan e do Dexpantenol, o que dificulta a comparação dos resultados encontrados na pesquisa. São necessários estudos futuros *in vitro* e *in vivo* que comprovem a propriedade hidratante destes géis.

## 7. CONCLUSÃO

Após o estudo de pré-formulação obtiveram-se dois géis: um deles contendo digluconato de clorexidina 0,12% e outro Triclosan 0,03%. O pH de ambos os géis tenderam a neutralidade (ficaram próximos ao pH 7,0) e foram caracterizados como fluídos não newtonianos pseudoplásticos.

A associação do D-pantenol e os antimicrobianos (digluconato de clorexidina 0,12% ou Triclosan 0,03%), não interferiu nas propriedades antimicrobianas desses agentes. Inclusive, a associação melhorou as propriedades antimicrobianas *in vitro*, quando comparado com os colutórios contendo somente digluconato de clorexidina 0,12% ou Triclosan 0,03%.

O gel contendo Triclosan 0,03% não apresentou citotoxicidade, mantendo a viabilidade celular maior que 70% nos tempos de 24 e 48 horas. Já o gel contendo digluconato de clorexidina 0,12% apresentou-se citotóxico.

Em relação a propriedade hidratante, o gel contendo clorexidina 0,12% não foi considerado um produto que previne e/ou trata células submetidas à desidratação *in vitro*. Diferentemente, o gel contendo Triclosan 0,03% apresentou bons resultados quanto as propriedades hidratantes *in vitro*, tanto na prevenção quanto no tratamento de desidratação.

Estudos futuros *in vitro* e *in vivo* deverão ser realizados para verificar a estabilidade dos produtos de forma física, química e terapêutica, comprovar a propriedade hidratante dos produtos, bem como identificar o poder mucoadesivo dos géis. Desta forma, a pesquisa poderá contribuir com a equipe interdisciplinar hospitalar e, principalmente com a melhora do quadro clínico do paciente internado.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABIDIA, R. F. Oral Care in the Intensive Care Unit: A Review. **J Comt Dent Pract**, v. 8, n. 1, p. 76-82, 2007.
- AFLAKI, E. et al. Na approach to the patient with a dry mouth. **Medicine Today**, v. 15, n. 4, p. 30-37, 2014.
- AGUIAR, M. C. A.; OLIVEIRA, E. R. A. **Eficácia de medidas de higiene bucal sobre a microbotal oral potencialmente patogênica para pneumonia aspirativa em idosos residentes em instituições de longa permanência.** [Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2008.
- ALLEN, L. V. et al. Ansel's pharmaceutical dosage forms. **Lippincot Williams & Wilkins**, Philadelphia, 2005.
- ALMERICH, J. M. et al. Influence of alcohol in mouthwashes containing triclosan and zinc: an experimental gingivitis study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 539-544, 2005.
- AMARAL, C. O. F. et al. Importância do cirurgião-dentista em Unidade de Terapia Intensiva: avaliação multidisciplinar. **Rev. Assoc Paul Cir Dent**, v. 67, n. 2, p. 107-111, 2013.
- AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 11, p. 1116-1124, 2009.
- AMIB – ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA. **POP Procedimento Operacional Padrão: Higiene bucal do paciente internado em UTI (Adulto).** AMIB – Depto. Odontologia e Depto. Enfermagem, p. 1-4, 2014.
- ANDRADE, E. **Efeito do Triclosan sobre a formação inicial dos biofilmes supragengival e subgengival.** [Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação e Criação de um Programa de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar (Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – IRAS)**. Módulo 1, p.1-52, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Série: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, v. 4, p. 01-87, 2013.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 67, DE 8 de outubro de 2007, p.1-90, 2007. Disponível em:<[http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao67\\_08\\_10\\_07.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao67_08_10_07.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2016

AQUINO, D. R. et al. Ação antimicrobiana de triclosan sobre microbiota cariogênica. **Rev. Biociên.**, v. 10, n. 1-2, p. 79-86, 2004.

ARAÚJO, D. B. et al. Mouthrinses: active ingredients, pharmacological properties and indications. **RGO**, v. 60, n. 3, p. 349-357, 2012.

ARAÚJO, D. B. et al. Saúde bucal: a importância dos enxagatatórios com antissépticos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 14, n. 1, p. 88-93, 2015.

ARAÚJO, R. F. S. B.; SOUSA, M. M.; LIMA, K. C. Concentração alcoólica de antissépticos bucais comercializados no Brasil no início da segunda década do séc. XXI. **Rev. Ciência Plural**, v. 1, n. 3, p. 26-37, 2015.

AYAD, F. et al. A comparison of the efficacy of a triclosan/copolymer/sodium fluoride dentifrice, a stannous fluoride/ sodium hexametaphosphate/ zinc lactate dentifrice, and a sodium fluoride dentifrice for the control of established supragingival plaque and gingivitis: a six-week clinical study. **J Clin Dent.**, v. 21, n. 4, p. 111-116, 2010.

AYOOLA SAHEED, A. et al. Triclosan resistance in bacteria and antibiotics cross-resistance. **Int J Curr Pharm Res.**, v. 4, n. 4, p. 88-90, 2012.

BAGAN, J. et al. Mucoadhesive polymers for oral transmucosal drug delivery: a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 34, p. 5497-5514, 2012.

BALIGA, S.; MUGLIKAR, S.; KALE, R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 17, n. 4, p. 461-465, 2013.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** [Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia]. Universidade Federal do Paraná; 2005.

BARBOSA, A. I. T. et al. **A xerostomia em portadores de prótese removível.** [Dissertação de Mestrado em Medicina Dentária]. Porto: Faculdade de Medicina Dentária, p. 1-43, 2015.

BASF, S. A. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico: Irgasan® DP 300. Versão 3.1, p. 1-13, 2017. Disponível em: <[https://worldaccount.basf.com/wa/SA-es\\_ES/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30338761/.pdf?asset\\_type=msds/pdf&language=PT&validArea=BR&urn=urn:documentum:ProductBase\\_EU:09007af88043dd1b.pdf](https://worldaccount.basf.com/wa/SA-es_ES/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30338761/.pdf?asset_type=msds/pdf&language=PT&validArea=BR&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af88043dd1b.pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2018.

BELLISSIMO-RODRIGUES, W. T. et al. Effectiveness of a dental care intervention in the prevention of lower respiratory tract nosocomial infections among intensive care patients: a randomized clinical trial. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 35, n. 11, p. 1342-1348, 2014.

BERTI-COUTO, S. A. et al. Clinical diagnosis of hyposalivation in hospitalized patients. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 20, n. 2, p. 157-161, 2012.

BLUM, D. F. C. et al. Influência da presença de profissionais em odontologia e protocolos para assistência à saúde bucal na equipe de enfermagem da unidade de terapia intensiva. Estudo de levantamento. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 391-393, 2017.

BRITO, C. A. et al. Efeito da clorexidina e do laser de baixa potência na prevenção e no tratamento da mucosite oral. **Rev Odontol UNESP**, v. 41, n. 4, p. 236-241, 2012.

CABRAL, S. **Saliva natural vs Saliva artificial: Composição bioquímica.** [Dissertação de Mestrado em Medicina Dentária]. Porto: Faculdade de Medicina Dentária, p. 1-27, 2012.

CASARIN, M. et al. Ação da solução de clorexidina 0,12%, óleos essenciais e triclosan em biofilme bucal formado por diferentes concentrações de oxigênio – um estudo

piloto (2012). **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)**, p. 1-10, 2012.

CASON, C. L. Nurse' implementation of guidelines for ventilator-associated pneumonia from the centers for disease control and prevention. **American Journal of critical care**, v. 16, n. 1, p. 28-36, 2007.

CHAVES, R. A. C. et al. Avaliação de soluções anti-bacterianas na descontaminação de escovas dentais de Pré-escolares. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 36, n. 1, p. 29-33, 2007.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition**. CLSI, 2003.

COOK, M. T.; KHUTORYANAKIY, V. V. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials – A mini-review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 1, p. 991-998, 2015.

CORSO, S. et al. Avaliação do potencial erosivo de colutórios bucais. **Rev Odonto Ciênc**, v. 19, n. 45, p. 233-237, 2004.

CORREA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **RBCF**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

CUTLER, C. J.; DAVIS, N. Improving oral care in patients receiving mechanical ventilation. **Am J Crit Care**, v. 14, n. 1, p. 389-394, 2005.

DE ARAÚJO, D. B. et al. Estudo dos enxaguatórios bucais disponíveis nas drogarias, farmácias e supermercados na cidade do Salvador, BA. **Rev Bahiana Odontol.**, v. 6, n. 1, p. 14-33, 2015.

DE SOUZA, L. B. et al. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. **Am. J. Dent.**, v. 20, n. 6, p. 400-404, 2007.

DESVARIEUX, M. et al. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). **J Hypertens.**, v. 28, n. 1, p. 1413-1421, 2010.

DHAR, S. et al. Contact precautions: more is not necessarily better. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 35, n. 3, p. 213-221, 2014.

DIAZ, M. M. O.; SILVEIRA, C. A. N. **Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica em pacientes adultos internados nas Unidades de Terapia Intensiva de hospital público e privado, janeiro de 2006 a junho de 2010.** [Tese de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical]. Brasília: Universidade de Brasília; 2011.

DIRIX, P. et al. Efficacy of the BioXtra dry mouth care system in the treatment of radiotherapy-induced xerostomia. **Support Care Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1429-1436, 2007.

DÖRR, W. et al. Effects of dexpanthenol with or without Aloe vera extract on radiation-induced oral mucositis: preclinical studies. **Int J. Radiat. Biol.**, v. 81, n. 3, p. 243-250, 2005.

DOS SANTOS, C. T. et al. Avaliação da microbiota bucal de pacientes idosos internados em unidade de terapia intensiva e clínica médica hospitalar. **Revista Espacios (Caracas)**, v. 38, n. 3, p. 25, 2017.

EBNER, F. et al. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. **American J. Clinical Dermatology**, v. 3, n. 6, p. 427-433, 2002.

EL-SOLH, A. A. et al. Colonization of dental plaque. **Chest**, v. 126, n. 1, p. 1575-1582, 2004.

ENNIBI, O. et al. Chlorhexidine alcohol base mouthrinse versus Chlorhexidine formaldehyde base mouthrinse efficacy on plaque control: Double blind, randomized clinical trials. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 1, p. 135-139, 2013.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos: Método de disco-difusão.** Versão BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 5.0, p. 1-23, 2016.

FESTUCCIA, J. M. et al. *Staphylococcus aureus* e a atividade *in vitro* da clorexidina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n. 3, p. 411-415, 2013.

FIDEL JUNIOR, R. A. S.; LOURENÇO, R. A.; FISCHER, R. G. A doença periodontal e o idoso frágil. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto.**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2013.

FINE, D. H. et al. Whole mouth antimicrobial effects after oral hygiene: comparison of three dentifrice formulations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 1, p. 1056-1064, 2012.

FINI, A. et al. Mucoadhesive Gels Designed for the Controlled Release of Chlorhexidine in the Oral Cavity. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 665-679, 2011.

FIOCRUZ. **Relatório Geral: Ensaio de Proficiência em Produtos sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária: determinação de Corantes Artificiais em Bebidas não Alcoólicas.** Rio de Janeiro, p.1-11, 2005.

FIORENTINO, F. A. M. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina.** [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UNESP], p. 1-164, 2009.

FRANÇA, S. Odontologia Hospitalar: Atuação em ambiente hospitalar exige dos Cirurgiões Dentistas conhecimentos específicos e evidencia a importância do trabalho multidisciplinar e interprofissional. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas (APCD)**, v. 65, n. 5, p. 326-331, 2011.

FRANCO, J. B. et al. Higiene bucal para pacientes entubados sob ventilação mecânica assistida na unidade de terapia intensiva: proposta de protocolo. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo**, v. 59, n. 3, p. 126-131, 2014.

FREITAS, C. Introdução da rotina de visitas odontológicas e descontaminação oral aos pacientes sob cuidados intensivos. **Mais Vida**, v. 77, n. 44, p. 2, 2012.

GABAS, A. L.; MENEZES, R. S.; TELIS-ROMERO, J. **Reologia na Indústria de Biocombustíveis.** Lavras, Brasil: Indi Gráfica, Cap. 3, p. 16-149, 2012.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. et al. Família *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas* na microbiota bucal de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva. **Arch Health Invest.**, v. 3, n. 4, p. 40-48, 2014.

GALDINO, A.G.S. et al. Análise de ensaios *in vitro* do compósito de 50% HA-50% TiO<sub>2</sub> fabricados pelo método da esponja polimérica. **Cerâmica**, n.60, p.586-593, 2014.

GALES, M. A.; NGUYEN, T. Sorbitol compared with xylitol in prevention of dental caries. **Ann. Pharmacother.**, v. 34, n. 1, p. 98-100, 2000.

GALHARDO, T. S. C. et al. Associação de periodontite crônica severa generalizada em pacientes com diabetes melito tipo 2 e dislipidemia grave. Relato de caso. **Braz. J. Periodontol.**, v. 25, n. 1, p. 46-51, 2015.

GARCIA, A. K. A. et al. Estratégias para o alívio da sede: revisão integrativa da literatura. **Rev Bras Enferm [Internet]**, v. 69, n. 6, p. 1148-1155, 2016.

GLURICH, I. et al. The Oral-Systemic Personalized Medicine Model at Marshfield Clinic. **Oral Dis.**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2014.

GOMES, S. F.; ESTEVES, M. C. L. Atuação do cirurgião-dentista na UTI: um novo paradigma. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, p. 67-70, 2012.

GONÇALVES, E. A.; PINTO, P. F. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan, cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais. **HU Revista**, v. 39, n. 3-4, p. 45-50, 2013.

GONDIM, F. M.; GOMES, I.P.; FIRMINO, F. Prevenção e tratamento da mucosite oral. **Rev. Enferm. UERJ**, v. 18, n. 1, p. 67-74, 2010.

GRAP, M. J. Not-so-trivial pursuit: mechanical ventilation risk reduction. **Am J Crit Care**, v. 18, n. 1, p. 299-309, 2009.

GUIMARÃES, M. M. Q.; ROCCO, J. R. Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 4, p. 339-346, 2006.

HASAN, N. A. et al. Microbial community profiling of human saliva using shotgun metagenomic sequencing. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

HANSON, J.; CAMPBELL, L. Xylitol and caries prevention. **Journal of the Massachusetts Dental Society**, v. 60, n. 2, p. 18-21, 2011.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, v. 15, n. 1, p. 271-276, 2001.

ISO 10993-5:2009(E). **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. 3<sup>a</sup> ed, 2009.

JARDIM, J. J. **Lesões de cárie em esmalte submetidas a diferentes tratamentos com flúor tópico *in situ***. [Dissertação de Mestrado em Clínica Odontológica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul], p. 1-62, 2003.

KEIJER, J. A.; TIMMERMAN, M. F., VAN DER WEIJDEN, F. A. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. **J Periodontol.**, v. 74, n. 1, p. 214-218, 2003.

KOLLEF, M. *et al.* A randomized Double-blind Trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 1, p. 91-97, 2006.

KRAMER, A.; ASSADIAN, O.; KOBURGER-JANSSEN, T. Antimicrobial efficacy of the combination of chlorhexidine digluconate and dexpanthenol. **GMS Hyg Infect Control.**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2016.

KSHIRSAGAR, A. V. et al. Periodontal disease is associated with renal insufficiency in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. **Am J Kidney Dis.**, v. 45, n. 1, p. 650-657, 2005.

LANDSTROM, M. et al. Perceptions of registered and enrolled nurses on thirst in mechanically ventilated adult patients in intensive care units – a phenomenographic study. **Intensive Crit Care Nurs [Internet]**, v. 25, n. 3, p. 133-139, 2009.

LEITE, E. L. et al. **Efeito do uso da clorexidina na contagem salivar de microrganismos em pacientes internados em unidade de terapia intensiva.** *In:*

33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research. São Paulo: Cabo Verde, v. 30., n. 1, p. 507-507, 2016.

LOPES, L. D. et al. Prevenção e tratamento da mucosite em ambulatório de oncologia: uma construção coletiva. **Texto Contexto Enferm.**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2016.

LÓPEZ-JORNET, M. P. et al. Clinical and antimicrobial evaluation of a mouthwash and toothpaste for xerostomia: A randomized, double-blind, crossover study. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 1, p. 757-763, 2011.

MACEDO, R. A. P. et al. Chlorhexidine to treat oral mucositis in patients with acute leukemia: systematic review. **Rev. Dor**, v. 16, n. 3, p. 221-226, 2015.

MÄKINEN, K. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. **Medical Principles and Practice**, v. 20, n. 1, p. 303-320, 2011.

MARTINS, R. S. et al. Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentífricos: uma revisão da literatura entre 1989 e 2011. **J. Health Sci. Inst.**, v. 30, n. 3, p. 287-291, 2012.

MATOS, L. M. R. et al. Efeito dos antissépticos com e sem álcool sobre a microbiota oral. **R. Interd.**, v. 8, n. 4, p. 173-179, 2015.

MCCOY, L. C. et al. Adverse events associated with chlorhexidine use. **J Am Dent Assoc**, v. 149, n. 2, p. 178-183, 2008.

MEINBERG, M. C. A. et al. Uso de clorexidina 2% gel e escovação mecânica na higiene bucal de pacientes sob ventilação mecânica: efeitos na pneumonia associada a ventilador. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 369-374, 2012.

MENDONÇA, E. M. S.; GONDIM, T. R. M. A importância da higiene bucal em pacientes na UTI e pré-alta hospitalar com trauma na arcada dentária decorrente do uso do laringoscópio. **J. Health Sci. Inst.**, v. 35, n. 2, p. 108-111, 2017. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 895, de 31 de março de 2017**. Ministério da Saúde: Brasil, p. 1-42, 2017.

MENEGON, R. F. **Estudo biológico e desenvolvimento de formulação do sal tetrapalmitato de clorexidina para uso em doenças bucais.** [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – UNESP], p. 1-96, 2009.

MORAIS, D. C. M. et al. Ação cicatrizante de substâncias ativas: d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **FOCO**, v. 4, n. 1, p. 83-98, 2013.

MOREIRA, A. C. A. et al. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **R. Ci. méd. biol.**, v. 7, n. 3, p. 266-272, 2008.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **R. Ci. méd. biol.**, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2009.

MULTINATIONAL ASSOCIATION OF SUPPORTIVE CARE IN CANCER / INTERNATIONAL SOCIETY OF ORAL ONCOLOGY (MASCC/ISOO). Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 21, n. 1, p. 3165-3177, 2013.

MUNRO, C. L. Oral health: something to smile about! **Am J Crit Care**, v. 23, n. 4, p. 282-288, 2014.

MUNRO, C. L. et al. Chlorhexidine toothbrushing, and preventing ventilator-associated pneumonia in critically ill adults. **Am J Crit Care**, v. 18, n. 1, p. 428-437, 2009.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **RBCF**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.

MUSTAFA, M. et al. Triclosan reduces microsomal prostaglandine E synthase-1 expression in human gingival fibroblasts. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 1, p. 6-11, 2005.

NAYAK, P. A. et al. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. **Clin Cosmet Investig Dent.**, v. 6, n. 1, p. 89-94, 2014.

NEGRI, G. Diabetes Melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **RBCF**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NEUMANN, I. **Soluções utilizadas para higiene oral em pacientes de terapia intensiva: uma revisão integrativa de literatura.** [Trabalho de Conclusão de Curso de Enfermagem]. Escola de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

OGUZ, A. et al. Topical N-acetylcysteine improves wound healing comparable to dexpanthenol: an experimental study. **Int Surg.**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2015.

OTA, Y. et al. Evaluation of a moisturising micro-gel spray for prevention of cell dryness in oral mucosal cells: an *in vitro* study and evaluation in a clinical setting. **European Journal of Cancer Care**, v. 21, n. 1, p. 728-734, 2012.

PADOVANI, M. C. R. L. Protocolo de cuidados bucais na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal [Oral care protocol in the Neonatal Intensive Care Unit]. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 14, n. 1, p. 71-80, 2012.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PAN, P. C. et al. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 1, p. 16-20, 2010.

PEARSON, L. S.; HUTTON, J. L. A controlled trial to compare the ability of foam swabs and toothbrushes to remove dental plaque. **J Adv Nurs**, v. 39, n. 1, p. 480-489, 2002.

PEGORARO, J. et al. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. **J. Oral Invest.**, v. 3, n. 1, p. 33-37, 2014.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

PUNTILLO, K. R. N. et al. A randomized clinical trial of an intervention to relieve thirst and dry mouth in Intensive care Unit patients. **Intensive care Med**, v. 40, n. 9, p. 1295-1302, 2014.

QUIRYNEN, M. et al. 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 4, p. 390-400, 2005.

RAI, S. et al. Moral and professional responsibility of oral physician toward geriatric patient with interdisciplinary management - The time to act is now! **Journal of Midlife Health**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2011.

RAMAMURTHY, J.; VENKATESH, A. Applications of various forms of chlorhexidine in dentistry – a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 8, n. 5, p. 16980-16986, 2017.

RELVAS, V. F. S. R. **Efeitos do uso de antissépticos na flora oral**. [Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas]. Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde; 2015.

REPETTO, G. et al. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RICHARDS, D. Oral diseases affect some 3,9 billion people. **Evid. Based Dent.**, v. 14, n. 2, p. 35, 2013.

SALDANHA, K. D. F. et al. A odontologia hospitalar: revisão. **Arch Health Invest**, v. 4, n. 1, p. 58-68, 2015.

SANTOS, P. S. S. et al. Uso de solução bucal com sistema enzimático em pacientes totalmente dependentes de cuidados em unidade de terapia intensiva. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2008.

SATO, S. et al. Bacterial survival rate on toothbrushes and their contamination with antimicrobial solutions. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 1, p. 99-103, 2004.

SCANNAPIECO, F. A. Role of oral bacteria in respiratory infection. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 7, p. 793-802, 1999.

SCHETTINO, J. N. A. **Uso de clorexidina na higiene oral de pacientes internados na terapia intensiva**. [Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Terapia Intensiva]. SOBRATI – Sociedade Brasileira de Terapia Intensiva; 2012.

SECRETARIA DE SAÚDE. **Manual de Odontologia Hospitalar**. São Paulo: Grupo Técnico de Odontologia Hospitalar, ed. 1, p. 1-87, 2012.

SEMENOFF, T. A. D. V; SEMENOFF-SEGUNDO, A; BIASOLI E. R. Efetividade antimicrobiana *in vitro* de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. odonto ciênc.**, v. 23, n. 4, p. 351-354, 2008.

SEVERINO, P. et al. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, p. 1-7, 2011.

SHI, Z. et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database Syst Rev.**, 8:CD008367, 2013.

SHI, Z. et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated Pneumonia (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1-4 2017.

SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 2, p. 103-113, 2013.

SILVA, T. F. A. et al. Modelo experimental de cárie dentária como ferramenta educativa em escolares. **Rev. Salud Pública**, v. 18, n. 2, p. 290-299, 2016.

SOUSA, A. F. L. et al. Óbitos em idosos com infecção adquirida em Unidades de Terapia Intensiva. **Rev. Bras. Enferm. [Internet]**, v. 70, n. 4, p. 766-772, 2017.

STONECYPHER, K. Ventilator-associated pneumonia: the importance of oral care in intubated adults. **Crit Care Nurs Q.**, v. 33, n. 1, p. 339-347, 2014.

TANOMARU, J. M. G. et al. Antibacterial activity of four mouthrinses containing triclosan against salivary *Staphylococcus aureus*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 569-572, 2008.

TAPIAINEN, T. et al. Effect of xylitol on growth of *streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 1, p. 166-169, 2001.

TELES, R. P.; TELES, F. R. F. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? **Braz Oral Res.**, v. 23, n. 1, p. 39-48, 2009.

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, p. 1717-1718, 2008.

TODARO, G.J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of cellular Biology*, v. 17, p. 299-313, 1963.

UEDA, K. Preventing Aspiration Pneumonia by Oral Health Care. **Journal of the Japan Medical Association.**, v. 54, n. 1, p. 39-43. 2011.

ULGER, B. V. et al. Comparing the effects of nebivolol and dexpanthenol on wound healing: an experimental study. **Int Wound J.**, v. 13, n. 3, p. 367-371, 2016.

VAZ, V. T. P. **Comparação do efeito do bochecho de triclosan + copolímero + flúor, com a clorexidina, sobre a taxa de formação de placa dentária, retenção do antimicrobiano na placa dentária e na saliva e redução de estreptococos do grupo mutans na saliva. Estudo clínico randomizado, cruzado, duplo-cego controlado.** [Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas]. Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista; 2014.

VIDAL, C. F. L. et al. Impact of oral hygiene involving toothbrushing versus chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. **BMC Infections Disease**, v. 17, n. 1, p. 112-120, 2017.

VILELA, M. C. et al. Oral care and nosocomial pneumonia: a systematic review. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 290-296, 2015.

VILLANOVA, J. C. O. et al. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WASHIO, J. et al. Effects of pH and lactate on hydrogen sulfide production by oral *Veillonella* spp. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, n. 1, p. 4184-4188, 2014.

WISE, M. P.; WILLIAMS, D. W. Oral Care and Pulmonary Infection. **Biomed Central Critical Care Journal.**, v. 17, n. 1, p. 1-3, 2013.

YI-CHING, L et al. Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an *in vitro* mammalian test system. **Journal of Dental Sciences**, v. 9, n. 1, p. 130-135, 2014.

YUSUF, H. Toothbrushing may reduce ventilator-associated pneumonia. **Evid. Based Dent.**, v. 14, n. 3, p. 89-90, 2013.

ZABNER, J. et al. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 97, n. 1, p. 11614-11619, 2000.

ZANATTA, F. D.; RÖSING, C. K. C. Clorexidina: mecanismos de ação e evidências atuais de sua eficácia do contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZARCO, M. F.; VESS, T. J.; GINSBURG, G.S. The oral microbiome in health and disease and the potential impacto on personalized dental medicine. **Oral Dis.**, v. 18, n. 1, p. 109-120, 2012.

ZUNIGA, A. M. F. Estudo *in vitro* da eficácia antimicrobiana da solução de gluconato de clorexidina em cepas de patógenos de infecções pulmonares. [Dissertação de Mestrado – UFPA Pós-graduação em Odontologia], p.1-41, 2008.