

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE

CLOREXIDINA 3,52%

PELO TESTE “ IN VITRO ”

MARCOS DA VEIGA KALIL

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor em Endodontia.**

**Rio de Janeiro
2002**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE
CLOREXIDINA 3,52%
PELO TESTE “ IN VITRO ”

MARCOS DA VEIGA KALIL

Professor Orientador: Dr Rivail Antonio Sérgio Fidel

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor em Endodontia.

RJ
2000

FICHA CATALOGRÁFICA

KALIL, Marcos da Veiga

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE
CLOREXIDINA 3,52% PELO TESTE “ IN VITRO ”**

Rio de Janeiro, UERJ, Faculdade de Odontologia, 2002. v.I, p

***Tese (Doutorado em Endodontia – Curso de Pós-Graduação em Endodontia.
Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.***

1. Teste de Citotoxicidade “in vitro”

2. Célula Hep-2

3. Clorexidina

4. Cultura Celular

DEDICO,

A minha Esposa Maria Theresa, que sempre me apoiou e incentivou, em todos os momentos da nossa vida.

Aos meus filhos Marcos Kalil Filho e Mariana Kalil, desejando que meu curso sirva de exemplo para futura vida profissional deles.

Aos meus pais, Lúcia e Constantino (†), por hoje eu estar aqui ...

Agradecimentos,

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr Rivail Antonio Sergio Fidel, que para mim é um exemplo de vida profissional, o meu muito obrigado, pela paciência, boa vontade, competência e atenção durante todo o trabalho.

Ao Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- INCQS da Fundação Oswaldo Cruz /RJ, órgão do Ministério da Saúde.

Principalmente na pessoa do Dr. Humberto Pinheiro de Araújo, e a Dra Maria Aparecida Affonso Boller do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela Coorientação, Ajuda, Atenção, incentivo e acolhimento, durante toda a parte prática laboratorial deste trabalho.

A todos os meus colegas de turma, que foram um presente de Deus para mim; palavras são Insuficientes para lhes dizer o quanto foi importante e bom conviver com vocês.

Ao professor Licinio Esmeraldo da Silva, Chefe do Departamento de Estatística (GET) do Instituto de Matemática da UFF. Pelo seu empenho e eficiência durante o trabalho de tratamento estatísticos dos dados, sem o qual não obteríamos o sucesso conseguido neste trabalho.

A todos aqueles, que mesmo não sendo citados neste trabalho foram importantes durante este período da minha vida, o meu cordial e sincero agradecimento.

Finalmente quero agradecer e louvar a Deus, por ter me mostrado o caminho, dando-me sabedoria para aceitar o inevitável, que na maioria das vezes é passageiro, e aprender com o definitivo, que na realidade são as lições do inevitável !!!

EPIGRAFE

Se falar as línguas de homens e anjos, mas não tiver a caridade, sou como bronze que soa ou tímpano que retine.

E se possuir o dom da profecia e conhecer todos os mistérios e toda a ciência e alcançar tanta fé que chegue a transportar montanhas, mas não tiver a caridade, nada sou.

A caridade nunca acabará; as profecias? terão fim; as línguas? cessarão; a ciência terminará.

Pois nosso conhecimento é imperfeito e assim também a profecia.

No presente permanecem estas três: fé, esperança e caridade; delas, porém, a mais excelente é a caridade.

1Cor 13
Bíblia Sagrada

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura	03
3. Proposição	21
4. Material e Método	22
4.1. Material	
4.2. Método	
5. Resultados	43
6. Discussão	48
7. Conclusões	54
8. Resumo	55
9. Summary	57
10. Referências Bibliográficas	59

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO AQUOSA DE

CLOREXIDINA 3,52%

PELO TESTE “ IN VITRO ”

MARCOS DA VEIGA KALIL

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor em Endodontia.**

Aprovado em: de de

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Niterói
2000**

1 INTRODUÇÃO

Pesquisadores de diversas especialidades da odontologia têm cada vez mais se interessado em relação à citotoxicidade de diferentes materiais. Vários materiais utilizados com diversas finalidades têm sido alvo de avaliação, permitindo sua segura utilização terapêutica.

Em geral, o potencial de citotoxicidade pode ser analisado através de experimentos *in vitro* e *in vivo* e constitui um dos recursos para a avaliação dos aspectos de segurança e eficácia de quaisquer substâncias ou materiais. Nos testes *in vitro*, pode-se utilizar três metodologias diferentes: avaliação da liberação de cromo, filtração em membrana Millipore e teste de difusão em ágar. Este método considerado rápido e sensível na determinação da citotoxicidade relativa para investigar os efeitos de materiais sobre a monocamada de células, vem ganhando terreno. Portanto, sendo escolhido para desenvolver esta pesquisa quantitativa colorimétrica para sobrevivência e proliferação de células.

A substância escolhida, a solução aquosa de Clorexidina 3,52% (Arte Química Farmácia de Manipulação LTDA, RJ, Brasil), vêm ganhando uma elevada importância por suas indicações em diferentes especialidades. Daí a sua avaliação quanto seu potencial de citotoxicidade através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, constituir um dos recursos para a avaliação dos aspectos de segurança e eficácia.

Por outro lado, numerosos produtos vêm sendo utilizados para o preparo químico-mecânico dos canais radiculares em endodontia, sendo o hipoclorito de sódio 5% (Biodinâmica Química e Farmaceutica LTDA), o mais comum e suas propriedades bem

conhecidas. Por este motivo, escolhido como um controle positivo, possibilitando, assim, uma avaliação de forma comparativa, estabelecendo um parâmetro adequado ao estudo do grau de citotoxicidade.

REVISÃO DE LITERATURA

A clorexidina foi introduzida como um desinfetante geral devido a sua baixa toxicidade e a sua eficácia contra um amplo espectro de microorganismos patogênicos de acordo com GJERMO (1989).

Segundo THYLSTRUP (1995), inúmeros agentes antimicrobianos e antiplaca foram e estão sendo comercializados na forma de soluções para higiene oral e dentifrícios, a fim de modificarem a composição bacteriana da placa dentária e reduzirem a microbiota salivar.

A clorexidina, lançada como desinfetante oral em 1954, é o agente quimioprofilático mais cuidadosamente estudado e o mais potente. É uma bisbiguanida, consistindo de dois anéis de 4-clorofenol e dois grupos bisbiguanidas que estão simetricamente ligados a uma cadeia hexametilena, formando uma base forte na forma de sal. FARDAL e URNBULL (1986). Os agentes catiônicos podem interagir tanto com as bactérias *Gram*-positivas quanto com as *Gram*-negativas e, devido às suas propriedades antimicrobianas, os agentes catiônicos podem reduzir o número de bactérias viáveis nas superfícies do dente ou podem reduzir a patogenicidade da placa dentária estabelecida. O espectro antimicrobiano da clorexidina inclui a maioria das bactérias e fungos e, geralmente, as bactérias *Gram*-positivas são mais sensíveis que as *Gram*-negativas. Também há variação na sensibilidade das bactérias orais *Gram*-positivas, sendo o

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus* mais sensíveis que os *Streptococcus sanguis*, THYLSTRUP (1995).

Em uma revisão bibliográfica, GJJERMO (1989) postulou que a clorexidina em concentração relativamente altas é bactericida, mas em concentrações mais baixas ela é bacteriostática, sendo, em geral, mais eficaz contra as bactérias (*Gram*-positivas do que contra as *Gram*-negativas. As moléculas positivamente carregadas da clorexidina rapidamente se unem às moléculas negativamente carregadas da parede celular dos microorganismos, principalmente aos grupos fosfatos nos lipossacarídeos e as grupos carboxílicos nas proteínas, interferindo nas trocas da membrana e permitindo uma extravasamento de substâncias de baixo peso molecular. Em altas concentrações, a clorexidina penetra na célula e ocasiona a precipitação do citoplasma. Devido a esta natureza eletrostática de retenção da clorexidina à parede celular bacteriana, a molécula vai sendo liberada destes sítios de retenção, à medida que a concentração no meio decresce (provavelmente é trocada com íons cálcio da saliva). A quantidade de clorexidina que fica retida nas estruturas orais após a lavagem com o anti-séptico depende da concentração, da dose e do tempo em que o agente permanece na cavidade oral. Segundo o autor, as estruturas orais podem agir como um reservatório, liberando as moléculas do agente por um prolongado período de tempo, em quantidades suficientes para manter um meio ambiente bacteriostático na cavidade oral, privando os microorganismos de suas atividades metabólicas usuais, necessárias e sua multiplicação e aderência. De acordo com o autor, tem sido sugerido que a clorexidina estaria envolvida na inibição da aderência bacteriana às superfícies orais e a outras bactérias, através da competição por íons cálcio do sítios de retenção, impedindo a formação de pontes de cálcio entre as bactérias e as superfícies orais

e entre as bactérias (sendo a clorexidina dicatônica, ela substituiria o íon Ca^{++} das pontes de cálcio que se forma entre as bactérias e a superfície dental).

Modo de Ação

Estudos realizados por ROLLA, LÖE e SCHOTT (1970) nos indicam que o digluconato de clorexidina adsorve à hidroxiapatita, às superfícies dos dentes e às mucinas salivares e, depois de adsorvido, é liberado, quando a concentração no meio diminui. Segundo os autores, a possível formação de reservatórios de digluconato de clorexidina na superfície do dente, *in vivo*, e do qual o anti-séptico é lentamente liberado, poderia prevenir a colonização bacteriana e a formação da placa dentária. Os resultados demonstraram que a clorexidina é adsorvida por aquelas substâncias e que o agente antimicrobiano é subsequentemente liberado quando a concentração da droga no meio ambiente bucal decresce, sugerindo a existência de uma reserva do agente antimicrobiano.

DAVIES (1973) relata que a clorexidina é uma base forte com dois prótons distribuídos sobre dez átomos de nitrogênio, contém grupos lipofílicos pequenos e, normalmente, é utilizada como sal digluconato de clorexidina. A clorexidina, sendo uma molécula catiônica, interage com as bactérias que possuem carga negativa em sua superfície, em pH fisiológico. Em meio ácido, a ionização bacteriana é menor, assim como o efeito da clorexidina. A afinidade da bactéria pela clorexidina confere seu potencial antibacteriano. A absorção de pequenas quantidades de clorexidina danifica as camadas mais externas da parede celular da *Escherichie colo*, revela em micrografias de cortes finos. Além disso, a clorexidina deixa a bactéria permeável a outras substâncias. Estas

propriedade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática está relacionada a seu potencial bactericida. Ao atingir a membrana, ocorre um vazamento dos componentes intracelulares, pelo aumento da permeabilidade, ocorrendo inicialmente a saída dos íons potássio da célula bacteriana, seguido da saída dos componentes que contêm fósforo. A quantidade de absorção dependerá da concentração da solução, contudo, se a concentração de clorexidina for baixa, este efeito será reversível e a membrana com o tempo recupera a sua normalidade. Após a entrada da substância no citoplasma, ela reage com soluções celulares livres do citoplasma bacteriano e precipita as pentoses e os fósforos, conforme afirmam HUGO e LONGWORTH (1966), apud DAVIES (1973). A precipitação impedirá o reparo da membrana citoplasmática. Através do experimento realizado, DAVIES (1973) concluiu que a ação da clorexidina está ligada à absorção da substância e à lenta liberação, o que aumenta o efeito bactericida. Quando *Streptococcus mutans* crescem onde a sacarose está presente, a ação da clorexidina é mais lenta, indicando a presença de alguma barreira, não encontrada em bactérias que crescem em meio livre de sacarose, diminuindo a absorção com a presença da sacarose. Explica-se que os microorganismos crescidos em meio com sacarose são cobertos por uma membrana extracelular polissacarídea.

HENNESSEY (1973) realizou estudos com *Streptococcus mutans*, revelando que a presença de sacarose 5% influencia profundamente a atividade bactericida. Presume-se que esta alteração seja o resultado da adsorção da clorexidina aos polissacarídeos extracelulares. O *Streptococcus mutans* mostrou-se sensível à clorexidina e os microorganismos Gram-negativos possuem menor suscetibilidade (*Pseudomonas aeruginosa*). O autor relacionou, também, a necessidade de aumento da concentração da clorexidina quanto maior o número de microorganismos.

EMILSON (1977) realizou um estudo *in vitro*, a fim de determinar a suscetibilidade de vários microorganismos à ação da clorexidina, utilizando organismos aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos, sob o método de disco de difusão referenciado pelo *International Collaborative Study Group*. Os resultados demonstraram o largo espectro de organismos suscetíveis de ambos os grupos (*Gram*-positivos e negativos), sendo que as bactérias *Gram*-positivas mostraram-se mais suscetíveis à clorexidina. Baixos valores de MIC (concentração inibitória mínima, correspondente à menor concentração do fármaco capaz de inibir a multiplicação de determinada cepa bacteriana) foram observados para *Staphylococcus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Escherichie coli*, enquanto que as culturas de *Proteus*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* foram menos suscetíveis à clorexidina. O microorganismo *Streptococcus sanguis* mostrou uma suscetibilidade intermediária à droga. Entre os microorganismos anaeróbios testados, as culturas mais suscetíveis ao agente foram *Propionibacterium* e *Selenomonas*, enquanto que as amostras menos suscetíveis foram os *coccus Gram*-negativos, ressaltando a *Veillonella*.

Estudos prévios realizados por CERVONE, TRONSTAD e HAMMOND (1990), *in vitro*, indicaram que a clorexidina mantinha um processo de liberação constante, por volta de 0,25 microgramas por cm² a cada hora, durante uma semana, sendo um veículo efetivo contra bactérias nas áreas de superfícies de dentes, bolsa periodontal ou canal radicular. Os mesmos autores testaram seu efeito antimicrobiano da clorexidina em um sistema de liberação controlada (matriz polimérica contendo o medicamento com uma membrana de vinil controlando a liberação da droga). Utilizaram para esta análise, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Wolibella recta*,

Bacteroides gingivalis, *Bacteroides intermedius*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*, tendo sido estes microorganismos coletados de bolsas periodontais, tecido pulpar necrótico e de lesões de cárie radicular. Os resultados obtidos demonstraram a inibição do crescimento de todas as bactérias testadas ao redor de todas as peças de vinil, havendo um claro efeito de inibição sobre as bactérias testadas.

Testando a eficácia da clorexidina, HELING et al (1992-a) comparou-a com o hidróxido de cálcio na esterilização e prevenção de infecção secundária dos túbulos dentinários, através do artifício de liberação lenta. Espécimes de dentina radicular bovina previamente incubada com *Streptococcus faecalis* foram usadas neste experimento. O grau de infecção bacteriana nos canais radiculares, com esses medicamentos, foi testado depois de um período de incubação de 24h, 72h e 7 dias. A eficácia na prevenção de infecção secundária após recontaminação foi testada após 72h e 7 dias. Os resultados demonstraram que após 72 horas e 7 dias, o digluconato de clorexidina reduziu o número de bactérias nos túbulos dentinários e previniu a infecção secundária em todos os testes realizados, superando o hidróxido de cálcio, que acabou falhando, não mostrando qualquer atividade antibacteriana nos períodos testados.

HELING et al. (1992-b) afirmam que a clorexidina é um agente antibacteriano de largo espectro, ativo contra microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios e aeróbios. As propriedades catiônicas da clorexidina permitem que esta seja absorvida pela hidroxiapatita. Além dessa afinidade entre o bactericida e as bactérias, propiciada pela natureza catiônica da clorexidina, há também a ligação do

bactericida com a superfície dentária, ou seja, a hidroxiapatita. Esta união com a dentina faz com que a solução seja liberada lentamente, prolongando a sua atividade antimicrobiana.

VAHDATY, PETT-FORD e WILSON (1993) testaram a eficácia das soluções de clorexidina a 0,2 e 2%, como também as soluções de hipoclorito de sódio (nas mesmas concentrações) e a solução salina, na desinfecção de túbulos dentinários *in vitro*. Anteriormente à irrigação dos canais radiculares com as referidas soluções, o cimento foi removido, a *smear layer* eliminada com o uso de EDTA e NaOCl e os canais foram infectados com *Enterococcus faecalis*. Foi demonstrado que tanto a clorexidina como o hipoclorito de sódio foram eficazes como agentes antibacterianos em concentrações similares, reduzindo o número de bactérias, especialmente nas camadas superficiais dos túbulos dentinários (100µm).

Segundo RÖSING (1995), anti-sepsia é a eliminação das formas vegetativas das bactérias de tecidos vivos, ou seja, de seres animados. O anti-séptico deve apresentar substantividade (tempo em que permanece ativo na cavidade bucal), eficácia, estabilidade em solução, segurança e baixo custo. A clorexidina é o anti-séptico que apresenta os melhores resultados. Devido à sua alta substantividade (natureza dicatiônica), torna-se a primeira escolha para o seu intrabucal. É um anti-séptico eficaz em relação a bactérias *Gram*-positivas e negativas e leveduras, atuando por alteração da aderência bacteriana e modificação da parede celular, promovendo lise.

Efeitos Adversos

FOULKES (1973) avaliou a toxicidade da clorexidina através de testes crônicos em ratos durante 3 meses, 1 ano e 2 anos. A única mudança constatada nestes testes foi o aparecimento de células gigantes nos nódulos linfáticos abdominais. Nenhum tumor ou alguma outra manifestação de uma possível toxicidade foram encontrados nos tecidos examinados. Em outros estudos mais sofisticados, o autor avaliou o possível aparecimento de efeitos reprodutivos, teratológicos e de sensibilidade da pele de ratos, como também a irritação dos olhos em coelhos. Os resultados foram satisfatórios, não sendo encontradas mudanças teratológicas ou reprodutivas. O uso desta substância em humanos estabeleceu que concentrações maiores do que 2% podem causar desconforto na pele, e que concentrações menores do que 0,2% são toleradas pelos olhos. Em quase 20 anos de experiência com a clorexidina, o autor não relata nenhuma complicação maior com ingestão acidental do agente antimicrobiano. Em raras ocasiões em que soluções de cloraxidina foram acidentalmente administradas intrevenosamente, a consequência desse procedimento foi uma hemólise, resultando de uma imediata hipotonicidade, antes de um efeito direto da clorexidina. Foram realizadas transfusões de sangue, conduzindo ao completo restabelecimento do paciente.

Em suma, estabelecidos testes prévios de toxicidade animal, juntamente com a longa experiência clínica que se tem com o uso da clorexidina, verificaram-se baixos níveis de toxicidade em animais e no homem.

O efeito adverso mais comum, que ocorre após o uso tópico da clorexidina, é o manchamento dos dentes, das restaurações, das mucosas e da língua, sendo dependente da concentração e frequência de uso do agente desinfetante. Outros efeitos como alteração do paladar, gosto ruim e formação de cálculo salivar também são observados. Descamação e ardência das mucosas têm sido ocasionalmente relatadas (como consequência da precipitação de camadas protetoras de células), enquanto que efeitos adversos sistêmicos são bastante raros, segundo GJERMO (1989).

A possibilidade de que compósitos ou sistemas adesivos resinosos possam ter um efeito antibacteriano é atrativo. EMILSON e BERGENHOLTZ (1993), com o objetivo de examinar o efeito antibacteriano de alguns agentes dentinários comuns em relação a cinco espécies de bactérias orais (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrimus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*), selecionaram sete sistemas adesivos dentários para a realização do estudo *in vitro*. Foram eles: *Denthesive*, *Gluma Bonding System*. Uma solução de 2 *Super Lux Universal Bond 2*, *Tripton* e *XR Bonding System*. Uma solução de clorexidina a 0,2% (ICI Dental) foi incluída no estudo como um controle positivo. Foram realizados testes de difusão em ágar, através de discos de filtro de papel contendo 10ml cada de condicionador, primer ou resina composta, sendo colocadas em agar sangue e ágar mitis salivarius bacitricina. Após a incubação, zonas de crescimento bacteriano inibidas foram medidas. De todos os testes, os efeitos antibacterianos mais pronunciados foram encontrados no sistema adesivo Gluma, seguido pelo *Denthesive* e *Scotchbond 2*. Os primers do *Gluma*, *Denthesive* e *Scotchbond 2* apresentaram uma atividade antimicrobiana que, em alguns casos, foi comparável à da clorexidina a 0,2%. A natureza antimicrobiana do limpador Gluma deve estar relacionada com a grande quantidade de EDTA na sua

composição, ao passo que em relação às zonas de inibição bacterianas observadas no *primer* do *Gluma* deve-se isto ao componente glutaraldeído e a seu baixo pH. Também foram observadas zonas de inibição para os materiais resinosos do *Scotchbond 2* e *Tripton*, em discos contendo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*. Nenhum efeito antibacteriano foi notado nos sistemas adesivos *Prisma Universal Bond 2* e *Superlux Universal Bond 2*. Não foi observada inibição bacteriana depois que estas resinas foram fotopolimerizadas, enquanto que o efeito do *XR-Bond* em relação ao *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus* não foi afetado pela fotopolimerização. Os autores salientam que esses achados experimentais apenas conseguiram dados úteis para a avaliação do efeito antibacteriano inicial destes sistemas adesivos, e que os mesmos variam muito na sua habilidade de agir no desenvolvimento de várias bactérias orais *in vitro*.

A clorexidina pode apresentar como efeitos adversos a pigmentação extrínseca dos dentes e mucosas e alterações das sensações gustativas. Esses efeitos adversos locais são aliados com a redução da concentração da clorexidina segundo RÖSING (1995).

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos da solução aquosa de Clorexidina 3,52%, pelo teste de citotoxicidade em cultivo de células Hep-2, através de leitura em espectrofotômetro.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL

MÉTODO

CULTURA DE CÉLULAS

As células utilizadas neste experimento são uma linhagem de células Hep-2 originária de célula epitelioídes, de carcinoma de laringe humana (Departamento de Imunologia - INCQS). Trata-se de uma linhagem que foi aceita e faz parte da Coleção Americana de Tipos de Culturas Celulares (ATCC) desde 1961. ATCC foi o primeiro organismo internacional aprovado e aceito pela International Depository Authority (IDA) seguido do Budapest Treaty no International Recognition of Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. ATCC é também um aprovado depositário de procedimentos de patentes seguido da Organização Européia de Patentes, os Estados Unidos, Japão e muitos outros países (11,12).

TESTE PROPRIAMENTE DITO

Foram dispensados 250 µL por poço da solução aquosa de Clorexidina 3,52% de uso em Endodontia (Arte Química Farmácia de Manipulação LTDA, RJ, Brasil) nos poços contendo a monocamada celular para avaliação.

Com a finalidade de retirar do experimento qualquer possibilidade de erro nas leituras, testamos também os efeitos da solução de Clorexidina 3,52% direto na placa(grupo branco), realizamos também a leitura de poços sem qualquer solução ou célula para

eliminar os possíveis efeitos da placa na leitura por espectrofotômetro e ainda, também com a mesma finalidade, tão somente do meio com a placa. O controle negativo foi realizado nos poços contendo a monocamada celular com o meio de DULBECCO'S para cultura das células. E finalmente o controle positivo a solução de hipoclorito de sódio 5% (Biodinâmica Química e Farmaceutica LTDA). Em três poços para cada concentração.

O tempo de exposição padronizado foi 5 minutos (tempo de exposição) visto que este teste nos permite a exposição direta das soluções em suas concentrações de uso e ainda obedecendo a critérios individuais e pertinentes ao mecanismo de ação da solução utilizada, levando-se em conta o tempo de permanência da substância no organismo (SEMRA Ç. e AHMET S., 2000). E por isso no presente experimento, foi convencionado o tempo de exposição de cinco (5,0) minutos.

Em seguida, procedeu-se à lavagem das células com solução PBS, 500 µL / poço e em seguida fixação com 1mL de solução de PBS + Formol 0,01% por 15` . E só depois da completa secagem das placas, coloca-se Coomassie Brilliant Blue R-250, 250µL por orifício por uma hora. Após este período, lavou-se as placas em água com posterior secagem. E com a finalidade de Eluição, colocou-se 1mL/ poço de SDS 1.0 % por 1,0 (uma) hora. Passou-se aí, a leitura ótica no leitor de microplacas Bio-Tec ELX-800 a um comprimento de onda de 595 nm (fig.FOTO).(6). A leitura foi realizada, diretamente na placa de 24 poços e depois também (fig.FOTO), em placa de 96 poços para comparar com os resultados conseguidos na leitura anterior. A leitura ótica realizada no leitor de microplacas Bio-Tec ELX-800 a um comprimento de onda de 595 nm. O processamento da placa para fins de leitura foi realizado em todos os 24 poços das cinco placas deste experimento(fig.FOTO).

E só depois de alcançarmos os resultados finais, após processamento digital informatizado, é que se chegou a confecção dos gráficos. E aí, foram submetidos aos critérios de classificação da norma número nove da FDI de 1980 (Stanford, 1980).

SOLUÇÃO AQUOSA DE CLOREXIDINA 3,52%

Teste n.º _01/02_ Data: __30/01/02__ Placa n.º ___1 a 5___

	1	2	3	4	5	6
A	Branco (placa vazia)	Branco (placa vazia)	Branco (placa vazia)	Controle (Meio+Cel)	Controle (Meio+Cel)	Controle (Meio+Cel)
B	CHX (placa)	CHX (placa)	CHX (placa)	MEIO (placa)	MEIO (placa)	MEIO (placa)
C	%	%	%	%	%	%
D	%	%	%	%	%	%

Figura A figura acima mostra o esquema da placa de 24 poços da forma como foi realizado o experimento. As leituras foram realizadas em placas de 24 e 96 poços, sendo que, cada poço das placas de 24 foi distribuído para três poços da placa de 96. Da forma demonstrada neste esquema de placas acima.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos Protocolos foi realizada para as soluções aquosas de Ácido Cítrico, EDTA e Hipoclorito de Sódio através da modelagem matemática para um delineamento fatorial com dois fatores (substância e fator de diluição), o primeiro com 3 níveis (as 3 substâncias) e o segundo com 5 níveis (a solução de uso de cada substância, a solução correspondente a metade da solução de uso, a solução correspondente à quarta parte da solução de uso, à oitava parte e à décima sexta parte), o que fornece 15 cruzamentos. E para cada uma dessas 15 possibilidades foram realizadas 9 (nove) observações da variável de resposta. A análise estatística realizada foi a ANOVA (Análise da Variância) para um experimento fatorial a dois fatores com três e cinco níveis, com variável de resposta identificada como o Percentual de Células Sobreviventes após a ação do agente químico durante 5 minutos (10). O resultado da análise da variância indicou, a um nível de significância de 5% ou até mesmo de 1%, a rejeição da hipótese nula, da igualdade dos percentuais de sobrevivência. O valor p é menor do que 0,001, o que indica um resultado altamente significativo. E a identificação das diferenças entre as 15 combinações foi procedida usando o método HSD (diferença mínima significativa) de Tuckey a 1% de significância, da forma que descrevemos abaixo. (Levin, 1817).

RESULTADOS

A leitura forneceu valores, que foram transferidos para o computador que forneceu planilhas que permitiram a confecção de gráficos para uma interpretação. Esta planilha possibilita um grau de excelência nos resultados já que subtrai os possíveis efeitos que o meio possa ter na placa, efeitos que a própria placa pode promover na leitura, que a solução possa reagir com a placa e na identificação das diferenças usado o método HSD (diferença mínima significante) de Tuckey à 1% de significância. Os dados ainda foram submetidos aos critérios de avaliação que constam das normas de testes de citotoxicidade número 9 da FDI de 1980. A análise estatística realizada foi a ANOVA (Análise da Variância) para um experimento fatorial a dois fatores com três e cinco níveis, com variável de resposta identificada como o Percentual de Células Sobreviventes após a ação do agente químico durante 5 minutos. O resultado da análise da variância indicou, a um nível de significância de 5% ou até mesmo de 1%, a rejeição da hipótese nula, da igualdade dos percentuais de sobrevivência. O valor p é menor do que 0,001, indica um resultado altamente significativo. Os resultados obtidos por este teste foram avaliados de duas maneiras. A primeira, através de uma análise estatística da variância. E a segunda, através das porcentagens obtidas de células mortas mostradas no gráfico 1.

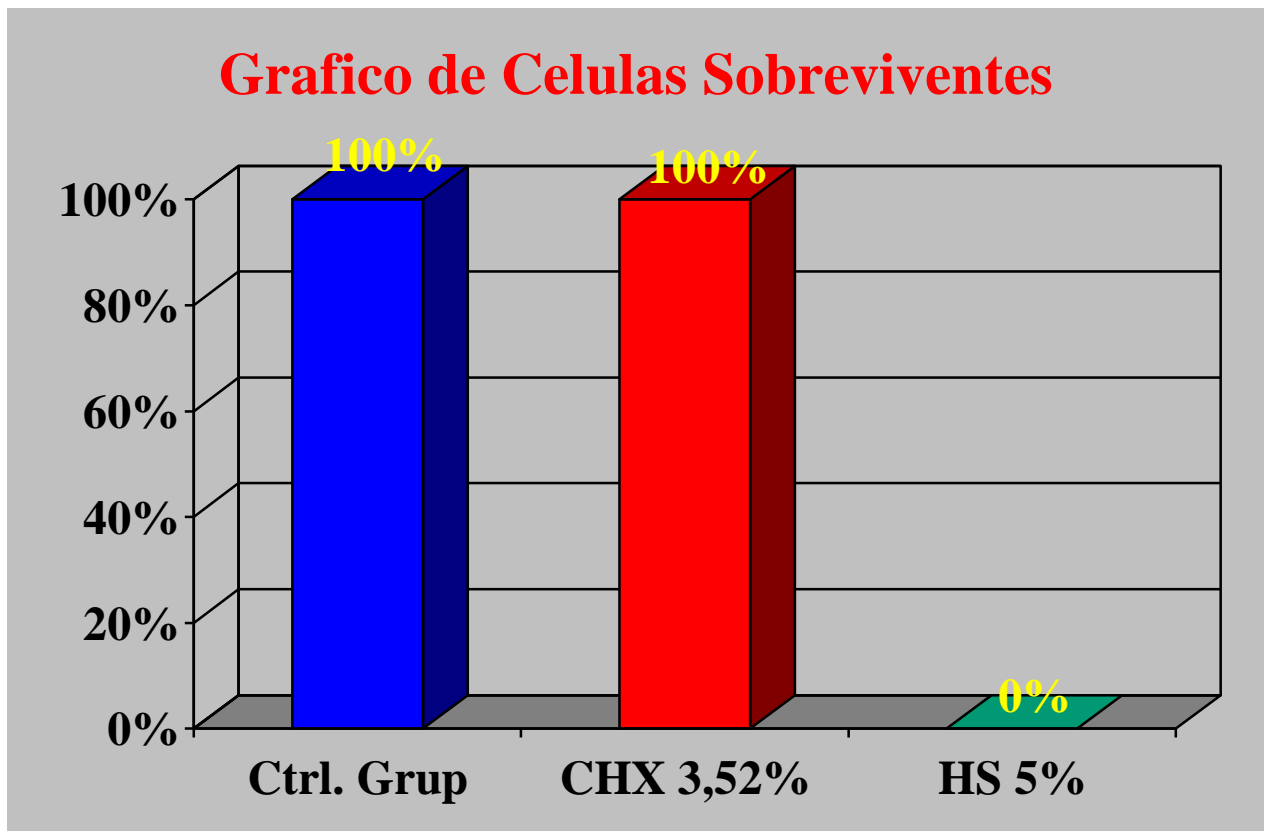


GRÁFICO 1. O gráfico acima mostra o resultado do agrupamento dos três gráficos percentuais de células sobreviventes referentes aos grupos controles.

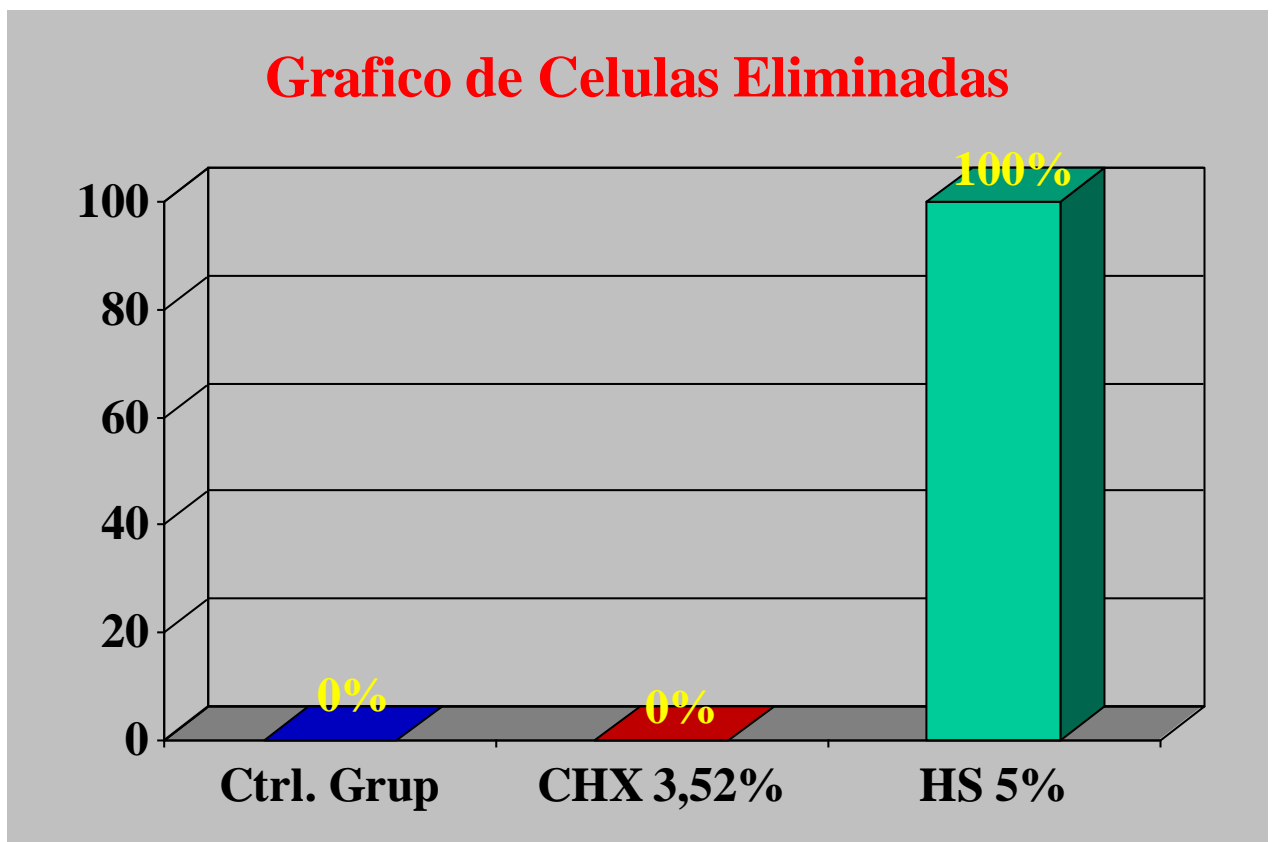


GRÁFICO 2 - O gráfico acima mostra o resultado do agrupamento dos três gráficos percentuais de células eliminadas referentes aos grupos controles.

Os resultados do gráfico1 representam as percentagens de células que sobreviveram e foram coradas e eluídas, já que as lesadas foram desprezadas após o tempo de exposição,

e as lavagens das células com solução PBS e posterior fixação com a solução de PBS + Formol 0,01% por 15'. Os resultados do gráfico 2, representam a diferença entre os grupos controles e a quantidade de células que sobreviveram. Dando um resultado que representa aproximadamente o número de células lesadas, nos permitindo uma conclusão sobre o grau de citotoxicidade das substâncias.

Os resultados obtidos através da análise do gráfico de células lesadas neste experimento foram submetidos aos critérios que constam da norma número 9 da FDI para a classificação dos diferentes testes de citotoxicidade .

TABELA 1 - Norma número 9 da FDI.

Zero	Não citotóxico	Sem lise celular	Soluções
1,0	Pouco citotóxico	Lise celular até 20%	CHX 3,52% 0%
2,0	Moderadamente citotóxica	Lise até 40%	
3,0	Severamente citotóxico	Lise acima de 40%	HS 100%

DISCUSSÃO

Testes de citotoxicidade, aplicados em cultivo celular, de monocamadas celulares, por leitura em espectrofotômetro, tem demonstrado ser um recurso eficiente. Visa medir, a sobrevivência ou proliferação celular, demonstrando um alto grau de rapidez e precisão. Sendo ainda, um método automatizado (Leitor de ELISA) que possibilita a manipulação de um grande número de amostras, com alto grau de precisão, proporcionando uma adicional vantagem, a de, se trabalhar os resultados com processadores computadorizados. Estes testes, medem o número de atividades de células vivas ao fim da pesquisa, sendo também, visualmente aparentes e de fácil reprodução (MOSMANN, 1983).

Os testes “*in vitro*”, são muito úteis, para a compreensão dos efeitos biológicos básicos dos materiais dentários. Mas eles, podem ser limitados no que diz respeito à habilidade de simularem condições clínicas. Pode ser irreal, transferir descobertas *in vitro*, para dentro de situações *in vivo*. Entretanto, uma interpretação comparativa, de dados de toxicidade, nos fornece valiosa informação, do potencial geral de toxicidade dos materiais tratados (KOULAOUZIDOU, 1999; LOPES e SIQUEIRA Jr, 1999).

Para, realização de testes, “*in vitro*”, de citotoxicidade em monocamadas celular, uma metodologia sob bases científicas deve ser estabelecida. E neste momento, alguns critérios devem ser padronizados para possibilitarem sua reprodução. Como por

exemplo, o tipo de célula. Já que, diferentes linhagens celulares foram utilizadas em muitos trabalhos para realização de seus experimentos.(KOULAOUZIDOU et al.1999; CHANG et al. 1999; CHANG et al. 1998; OSORIO et al. 1998; VAJRABHAYA et al. 1997) .

As células Hep-2, utilizadas neste trabalho, demonstraram ser um tipo de célula de fácil manipulação, originadas, de célula epitelioídes de carcinoma de laringe humana (Departamento de Imunologia - INCQS). Sendo uma linhagem, que faz parte da Coleção Americana de Tipos de Culturas Celulares (ATCC) desde 1961. ATCC, foi o primeiro organismo internacional aprovado e aceito pela International Depository Authority (IDA), seguido do Budapest Treaty no International Recognition do Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. ATCC, é também, um aprovado depositário de procedimentos de patentes seguido da Organização Européia de Patentes, os Estados Unidos Japão e muitos outros países (ATCC Catalogue of Cell lines and Hybriomas, 1988). E também, faz parte, do Banco de células do Rio de Janeiro, sendo descrita, em seu catálogo de células humanas e animais sob o código ATCC CCL 23 (Catálogo de Células Humanas e Animais, 1990).

KURUVILLA J.R., em 1998 avaliando a capacidade antimicrobiana das soluções aquosas de Hipoclorito de Sódio 2,5% e Clorexidina 0,2%. Concluiu que o uso combinado destas duas substâncias como agentes irrigantes dos canais radiculares é mais eficiente que do que separadamente.

FERRAZ et al em julho de 2001, avaliaram em estudo in vitro a ação antimicrobiana e habilidade mecânica do gel de clorexidina como irrigante dos canais

radiculares. E seus resultados concluindo que gluconato de clorexidina tem potencial para ser utilizado como solução irrigante dos canais radiculares.

A padronização, do tempo de exposição ou tempo de incubação das substâncias testadas, parece, não encontrar um consenso. (SEMRA et al. 2002, ERSEV et al.1999; LEYHAUSEN et al. 1999; KOULAOUZIDOU et al.1999; CHANG et al. 1999; CHANG et al. 1998; OSORIO et al. 1998; VAJRABHAYA et al. 1997; BOUILLAGUET et al. 1996; GEROSA et al. 1996; BRISEÑO&WILLERSHAUSEN, 1992; DANILEWICZ-STYSIAK, 1980) Mas, obedecem a critérios individuais e pertinentes a característica de cada material utilizado, levando-se em conta, o tempo de permanência da substância no organismo. Por exemplo, no caso, da utilização do Eugenol puro (GEROSA et al, 1996), o tempo de incubação utilizado foi de 48 horas. Já, na testagem de cimentos de uso em Endodontia BRISEÑO e WILLERSHAUSEN, 1992 utilizaram, como tempo de incubação, 21 dias. Neste experimento, convencionou-se o tempo de exposição em cinco (5,0) minutos, levando-se em conta o tempo de exposição ao organismo (CARVALHO et al. 1999; OSTBY, 1957).

As dificuldades, como a atresia do canal radicular, assim como, a existência da dentina agregada (Smear Layer), tornam imperativo o emprego de substâncias químicas, para o sucesso do preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. (TROSTAD, 1992) Agindo, sobre as paredes dentinárias, favorecem o uso de instrumentos, promovendo sua limpeza e desinfecção. (ESTRELA e FIGUEIREDO, 1999; LEONARDO e LEAL, 1998)

A remoção do smear layer, ampara-se em grande parte, na escolha adequada do agente irrigador, e, com vistas a isto, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a

finalidade de esclarecer qual o agente irrigador de maior efetividade. Dentre eles, o Ácido Cítrico e o EDTA. (BATISTA, 1997)

A maioria dos trabalhos, relacionados ao uso da solução de EDTA, estão relacionados a suas propriedades quelantes e antimicrobianas. (McCOMB, 1975; ORSTAVIK e HAAPASALO, 1990). No entanto, SILVEIRA, em 1994, avaliou a capacidade irritativa da solução de EDTA 15% em conjuntivo de ratos, demonstrando, ser severamente irritantes comparados a solução de soro fisiológico, recomendando sua utilização clínica, mas, de forma cautelosa para evitar levá-los a intimidade dos tecidos vivos.

Já, KOULAOUZIDOU (1999), avaliando, os efeitos citotóxicos da solução de EDTA em cultura celular em monocamada, em linhagem de célula L929, fibroblastos de tecido de ratos. Pela técnica, de observação direta da alteração celular em microscopia, observaram, que em todas as concentrações avaliadas, a substância demonstrou de moderada a severa ação citotóxica. O que, está em consonância, com os resultados obtidos no presente trabalho.

Da mesma forma, em trabalhos realizados com as soluções de ácido cítrico, avaliaram sua capacidade desmineralizante e antimicrobiana (YAMAGUCHI et al. 1996; LOEL, 1975).

Já, MOTTA (1987), em trabalho de irritabilidade tecidual em olho de coelho, verificou, que nas concentrações estudadas foram observadas alterações macroscópicas reversíveis em todos os casos, mas, com retorno a normalidade. Observe-se, no entanto, que no mesmo tempo de observação, a conjuntiva e a córnea apresentaram uma reação

inflamatória extensa, provocando uma irritação com dificuldade aparente de descerrar a pálpebra. O que, representa uma irritabilidade severa aos tecidos, em consonância com outros trabalhos (PAIVA e ANTONIAZZI, 1993). Fato este, que, apesar de ter sido desenvolvido com metodologia diferente do presente trabalho, coincide com os resultados encontrados em nossa pesquisa, não inviabilizando sua indicação para utilização clínica (TIDMARSH, 1978). Visto que, a finalidade do processo inflamatório seja, o combate aos agentes que sejam lesivos ao organismo e deste modo o reparo dos tecidos. (SIQUEIRA Jr, 1996)

A solução, de hipoclorito de sódio, é, a substância mais utilizada durante a terapia endodôntica. (BAUGARTMER e CUENIN, 1992; BAUGARTMER, 1984). Promove, a limpeza, do resto pulpar contaminado ou vital, auxiliando na instrumentação dos canais radiculares. Principalmente, devido, à suas reconhecidas propriedades bactericidas, (HARRISON e HAND, 1981; PATTERSON, 1963; PUPO, 1994) e solvente de matéria orgânica, (SENIA , 1971; GROSSMAN, 1983; SIQUEIRA Jr, 1999) servindo de parâmetro para avaliação em trabalhos como controle positivo (KOULAOUZIDOU, 1999).

Com relação, ao tratamento das infecções endodônticas, (SIQUEIRA Jr, 1997) é sabido, que, qualquer substância antimicrobiana, invariavelmente, irá apresentar toxicidade as células vivas, isto porque, não detém propriedade de seletividade para bactérias. Portanto, seria difícil, querer conciliar ação antibacteriana ou solvente de tecido ou ainda quelante, com a compatibilidade biológica. Visto que, quanto maior a concentração das soluções, mais efetiva se torna a sua ação antibacteriana (LOPES e SIQUEIRA Jr, 1999). No entanto, é sabido também, que a resposta inflamatória é

necessária, para que haja a restauração do processo de qualquer agressão. (MONTENEGRO e FRANCO, 1992, SIQUEIRA Jr e DANTAS, 1996) Mas, apesar de ser um processo de defesa, quando exagerada, pode prejudicar o organismo, (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995) sendo considerado, que, a correta interpretação dos resultados de testes “in vitro” de citotoxicidade em monocamadas celulares, seja uma ajuda importante, para a determinação do potencial relativo da toxicidade dos agentes químicos. (HARRISSON, 1984) Sendo que, um dos requisitos mais importantes para escolha de um material, seja o de ser bem tolerado biologicamente. (PAIVA e ANTONIAZZI, 1993)

Sendo assim, avaliando-se os resultados obtidos através deste experimento, comparados aos de outros trabalhos, fica evidente, que apesar de utilizarem diferentes metodologias existe uma correspondência de resultados. Confirmando assim, este método, como mais um recurso ao estudo da citotoxicidade *in vitro*. (HARRISON, 1978 ; KOULAOUZIDOU, 1999 ; MOTTA, 1978)

O presente estudo, avalia, o potencial de citotoxicidade relativa entre as soluções testadas, que comparadas aos trabalhos de reação tecidual realizados em cobaias, nos permite uma indicação mais segura das mesmas. Não permitindo, no entanto, uma extrapolação clínica direta, sob pena de uma interpretação enganosa. (MOTTA, 1987; ALVARES, 1990, MOTTA, 1995; LOPES, 1999)

O tempo de incubação, de cinco minutos, utilizado pelo presente experimento, se comparado com a dos demais trabalhos, demonstrou-se eficaz. Visto que, segue o parâmetro do tempo de permanência das substâncias, quando de suas indicações. Podendo

ser considerado , suficiente para avaliação das substâncias testadas. (OSÓRIO, 1998; CHANG, 1998; CRAIG, 1997)

Embora, exista, uma similaridade entre os resultados das leitura ótica realizada pelo leitor de microplacas Bio-Tec ELX-800 a um comprimento de onda de 595 nm, quando comparados as observações das diferenças morfológicas na observação da reação tecidual. A confiabilidade da reprodução, no primeiro caso nos parece maior, visto que, reduz as variáveis, na medida que prescinde de agentes externos. (MOSMANN, 1983; MOTTA, 1987; CRAIG, 1997; WIGG, 1997)

Os resultados, obtidos através deste experimento, se avaliados quanto as presentes utilização clínicas das soluções testadas, podem nos fornecem um indicativo comparativo importante, quanto a suas possíveis indicações. Visto que, as soluções de hipoclorito de sódio em suas diferentes concentrações vem sendo largamente utilizadas durante todo o preparo cirúrgico dos canais radiculares em endodontia., apesar, de sua característica severamente citotóxica e solvente de matéria orgânica. (DAKIN, 1915; HARRISON, 1981) Sendo assim, as soluções aquosas de ácido cítrico à 10% e EDTA à 15%, por terem demonstrado características bem menos citotóxicas que a solução de hipoclorito de sódio, indicam que, não somente as soluções aquosas de hipoclorito de sódio podem ser utilizadas durante todo o preparo cirúrgico dos canais radiculares. Mas, também, as soluções aquosas de ácido cítrico à 10% e EDTA à 15%, (OSTBY, 1957; WAYMAN, 1979) se levado em conta os resultados deste experimentos *in vitro* em cultivo celular.

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi demonstrado que:

- a) a solução aquosa de Clorexidina 3,52% se comportou como uma solução não citotóxica.
- b) que a solução aquosa de Hipoclorito de sódio 5%, utilizada como controle positivo, se comportou como uma solução severamente citotóxica.
- c) a solução aquosa de hipoclorito de sódio 5% serviu perfeitamente como controle positivo.
- d) quanto a análise estatística, podemos afirmar que existem evidências estatísticas suficientes pelo teste aplicado, para sustentar que exista diferença significativa entre a solução aquosa de Clorexidina 3,52 comparada ao grupo controle positivo(HS).
- e) e no que concerne à aplicabilidade clínica deste experimento, podemos inferir que em condições normais, o uso criterioso das substâncias testadas como soluções irrigadoras dos canais radiculares deve confinar-se tão somente ao interior dos mesmos, com cuidado especial, para a solução aquosa de hipoclorito de sódio à 5%, por se tratar de uma solução muitas vezes mais citotóxica do que as outras duas soluções testadas neste experimento.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos da solução aquosa de Clorexidina 3,52%, pelo teste de citotoxicidade em monocamadas celulares através de linhagens de células Hep-2. Em cultivo de monocamadas por leitura em espectrofotômetro.

Na análise estatística utilizada o teste de Tuckey e os dados submetidos aos critérios de avaliação que constam das normas de testes de citotoxicidade número 9 da FDI de 1980. O tempo de exposição foi de 5 minutos. O valor p é menor do que 0,001, o que indica um resultado altamente significativo. Foram encontradas, pelo teste aplicado, evidências suficientes para sustentar que exista diferença estatisticamente significativa entre a solução aquosa de Clorexidina 5%. A solução aquosa de Hipoclorito de Sódio 5% (HS), estatisticamente diferiu de maneira significativa da solução testada. A solução aquosa de Clorexidina 3,52% poder ser considerada não citotóxica e que a solução aquosa de Hipoclorito de Sódio à 5% severamente citotóxica.

ANEXOS

Estudo comparativo das soluções de clorexidina de 2% à 5% (Análise Estatística)

Comparadas as amostras de clorexidina nas concentrações de 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% e 5% pelo método da análise da variância (ANOVA), o resultado mostrou que a um nível de significância de 5% há diferenças entre os tratamentos. O valor-p de $1,03 \times 10^{-17}$ mostra um resultado altamente significativo.

ANOVA Efeito clorexidina nas células

Diferenças	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	Significância
Entre amostras	118722,74	5	23744,54	98,958	$1,03 \times 10^{-17}$
Intra amostras	7198,35	30	239,945		
Total	125921,09	35			

O teste de Levene forneceu a informação de que as variâncias não são diferentes.

Teste de Homogeneidade das Variâncias Efeito clorexidina nas células

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,312	5	30	0,286

O teste de Tukey foi utilizado, então, para detectar as diferenças entre as diversas concentrações de clorexidina:.

Testes de Comparações Múltiplas
 Variável Dependente: EFEITO CLOREXIDINE NAS CÉLULAS

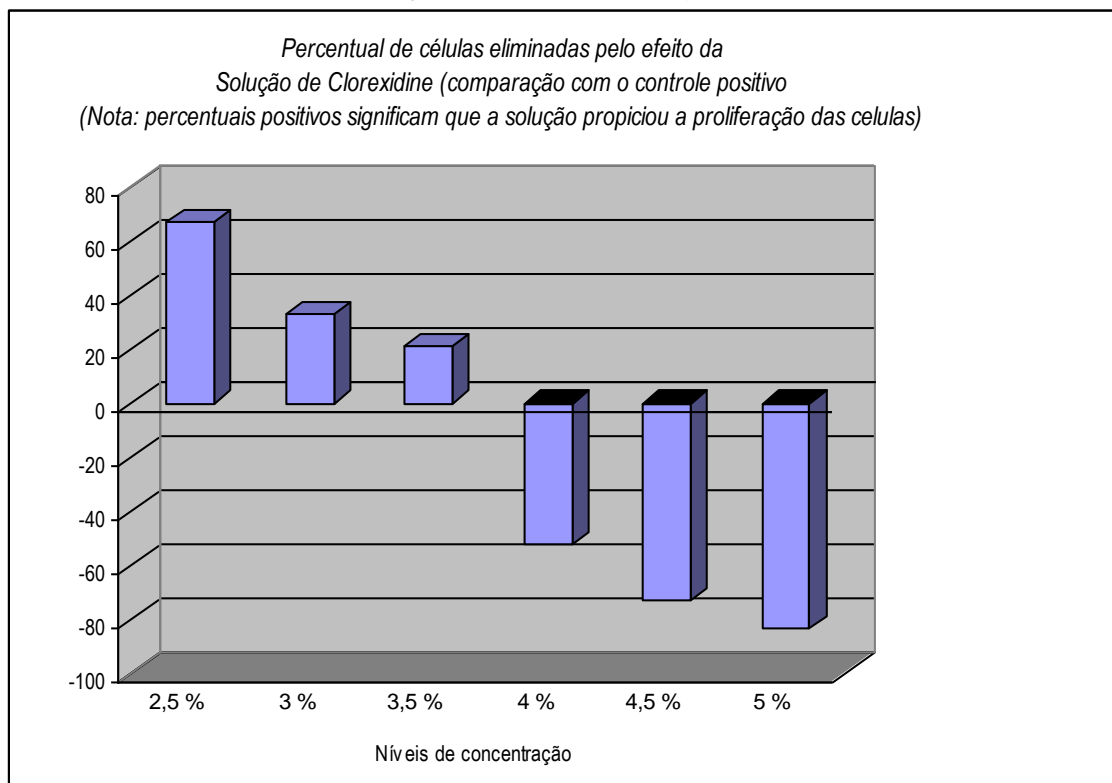
Teste de Tukey	(I) TRATAMENTO	(J) TRATAMENTO	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	Significância (valor-p)
1		2	34,2921*	8,943	,007
		3	45,7582 *	8,943	,000
		4	119,1380 *	8,943	,000
		5	140,0071 *	8,943	,000
		6	150,7768 *	8,943	,000
2		1	-34,2921 *	8,943	,007
		3	11,4661	8,943	,792
		4	84,8458 *	8,943	,000
		5	105,7150 *	8,943	,000
		6	116,4846 *	8,943	,000
3		1	-45,7582 *	8,943	,000
		2	-11,4661	8,943	,792
		4	73,3797 *	8,943	,000
		5	94,2489 *	8,943	,000
		6	105,0185 *	8,943	,000
4		1	-119,1380 *	8,943	,000
		2	-84,8458 *	8,943	,000
		3	-73,3797 *	8,943	,000
		5	20,8692	8,943	,212
		6	31,6388 *	8,943	,015
		6	10,7696	8,943	,831
5		1	-140,0071 *	8,943	,000
		2	-105,7150 *	8,943	,000
		3	-94,2489 *	8,943	,000
		4	-20,8692	8,943	,212
		6	10,7696	8,943	,831
		6	10,7696	8,943	,831
6		1	-150,7768 *	8,943	,000
		2	-116,4846 *	8,943	,000
		3	-105,0185 *	8,943	,000
		4	-31,6388 *	8,943	,015
		5	-10,7696	8,943	,831

* A diferença media é significante ao nível 0,05 (5%).

O gráfico a seguir apresenta a quantidade de células eliminadas pelo efeito das soluções de clorexidine. Os percentuais médios foram os seguintes, para cada solução:

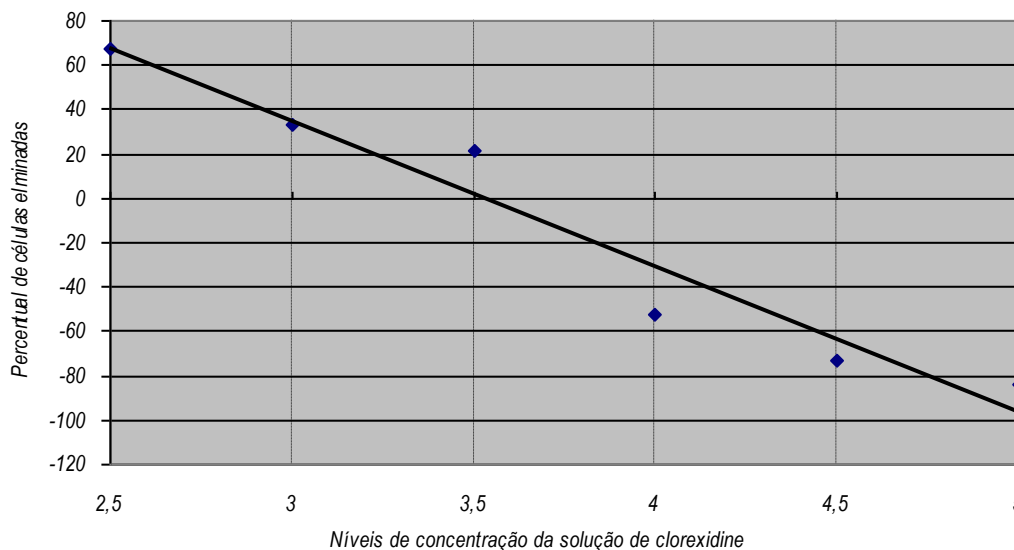
Clorexidine	Percentual de eliminação
2,5%	67,0%
3%	32,7%
3,5%	21,3%
4%	-52,1%
4,5%	-73,0%
5%	-83,8%

O percentual acima deve ser entendido da seguinte forma: os valores positivos do percentual significam a quantidade de células reproduzidas em função do meio em comparação com a quantidade de células do controle positivo; os valores negativos significam a quantidade de células que foram eliminadas da colônia posta em experimentação. O quadro a seguir apresenta a visão resumida:



A seguir apresenta-se o diagrama de dispersão que mostra a relação de dependência entre o nível de concentração e a quantidade de células eliminadas:

Diagrama de dispersão entre os níveis de concentração da solução de clorexidine e o percentual de células eliminadas
 (Nota: percentuais positivos significam que a solução propiciou a proliferação das células)



$$y = -65,395x + 230,59 \text{ (para } y = 0, \quad x = 3,52\% \text{ (valor de concentração em que a clorexidine para a ser citotóxica))}$$

$$R^2 = 0,9455 \text{ (o modelo explica 94,55\% da variação do fenômeno)}$$

Considerando que os dados para um controle negativo com hipoclorito de sódio a 5% (soda clorada) forneceu o percentual de -9% de células sobreviventes (ou 109% de células eliminadas) significando que destruiu todas as células postas em teste e mais um pouco da própria placa, o modelo de regressão acima permite concluir que a soda clorada a 5% é mais citotóxica do que qualquer uma das concentrações de clorexidine testadas. A potência destrutiva do clorexidine estará igualada à da soda clorada a 5% quando sua concentração alcançar o nível de 5,2%.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)