



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC

PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS

MICHELLINE CAVALCANTI TOSCANO DE BRITO

**MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA CONTRA MICRORGANISMOS DA OROFARINGE EM
PACIENTES DE UTI E DESENVOLVIMENTO DE POMADA ORABASE**

JOÃO PESSOA - PB
2019

MICHELLINE CAVALCANTI TOSCANO DE BRITO

**MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA CONTRA MICRORGANISMOS DA OROFARINGE EM
PACIENTES DE UTI E DESENVOLVIMENTO DE POMADA ORABASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos.
ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
COORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

JOÃO PESSOA - PB
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B862m Brito, Michelline Cavalcanti Toscano de.

Micropartículas com clorexidina: Caracterização, atividade antimicrobiana contra microrganismos da orofaringe em pacientes de UTI e desenvolvimento de pomada orabase / Michelline Cavalcanti Toscano de Brito. - João Pessoa, 2019.

264 f. : il.

Orientação: Fábio Correia Sampaio Sampaio.

Coorientação: Fábio Santos de Souza Souza.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. pneumonia nosocomial; clorexidina; pomada orabase.

I. Sampaio, Fábio Correia Sampaio. II. Título.

UFPB/BC

MICHELLINE CAVALCANTI TOSCANO DE BRITO

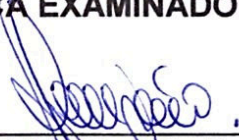
MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA MICRORGANISMOS DA OROFARINGE EM PACIENTES DE UTI E DESENVOLVIMENTO DE POMADA ORABASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos.

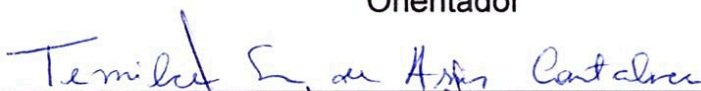
ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

COORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

BANCA EXAMINADORA



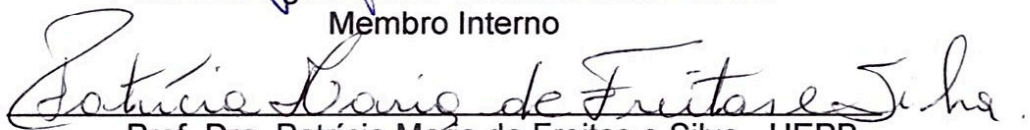
Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Orientador



Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice - UFPB
Membro Interno



Prof. Dr. Angelo Brito Pereira de Melo - UFPB
Membro Interno



Prof. Dra. Patrícia Maria de Freitas e Silva - UEPB
Membro Externo



Prof. Dra. Andrea Cristina Barbosa da Silva - UEPB
Membro Externo

João Pessoa, 07 de novembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PARAÍBA

REITOR

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

VICE-REITOR

Profa. Dra. Bernardina Maria Juvenal Freire De Oliveira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. João Euclides Braga

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

Profa. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá

*Ao meu esposo Rodrigo, e aos meus filhos
Germano e Victor. Vocês são parte de mim, e
eu de vocês, e juntos construímos uma família.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem entrego a minha vida. Sob as Suas bênçãos guio os meus passos e sob a Sua luz ilumino o meu caminho, e assim enfrento os desafios e ensinamentos dessa vida.

Aos meus pais, Aluizio e Fátima, a quem devo a minha formação e educação. Obrigada por me ensinarem os valores e princípios do bem, e por sempre me apoiarem nos meus projetos de vida. Amo muito vocês.

Ao meu esposo Rodrigo, meu amor, meu companheiro, meu porto seguro. Obrigada por sempre acreditar em mim, e por me apoiar em todos os momentos. Você é referência para mim, e o seu incentivo foi fundamental para a realização de mais esta conquista.

Aos meus filhos, Germano e Victor, minhas fontes de inspiração e presentes de Deus em minha vida. A vocês quero deixar o exemplo de que os valores, a educação e os conhecimentos que adquirimos são os nossos maiores bens na vida. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus irmãos Patrícia e Aluizio Filho que sempre me apoiaram e estiveram presentes na minha vida, e a Carlos pelo exemplo de determinação.

Ao meu sogro Germano e minha sogra Tereza que sempre me abraçaram e apoiaram como filha, obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos meus cunhados(as) Isabelle, Germana e Giordano, Vinícius e Livia, agradeço o carinho e as palavras de apoio para a realização dos meus projetos.

À todos os meus sobrinhos(as) pela alegria e pureza que me transmitem à minha vida.

Aos meus familiares e amigos, vocês são especiais para mim, obrigada por compreenderem a minha ausência em tantos momentos. Sou grata por sempre me apoiarem e torcerem pela minha realização pessoal e profissional, e se por me desejarem êxito nos meus projetos de vida.

À minha amiga Magdala, que de forma especial, me apoiou e acompanhou todas as fases do doutorado. Obrigada por estar sempre presente me incentivando em todos os momentos, a sua amizade e o seu carinho me fortalecem.

Aos amigos dentistas que acompanharam o trajeto desta conquista, sempre com palavras incentivos e desejos de sucesso.

À Conceição, Laura e Sissi agradeço a disponibilidade e alegria em me ajudar sempre que precisei.

Aos professores do curso de odontologia da UFPB, em especial do Departamento de Odontologia Restauradora, pelo carinho que acolheram o meu projeto de doutorado, e por transmitirem suas experiências como incentivo para o cumprimento desta etapa tão importante na minha trajetória acadêmica.

À professora Roseanne Uchôa, amiga de muitos anos, que foi uma grande incentivadora para a realização do doutorado. Obrigada pelo seu apoio, e pela disponibilidade em me substituir das minhas funções acadêmicas na UFPB.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora pelo apoio e disponibilidade em sempre me ajudar.

Ao meu professor e orientador Dr. Fábio Sampaio, foi uma honra tê-lo como orientador, que é referência aos professores, alunos e funcionários da UFPB, por suas qualidades de conhecimentos em diferentes áreas, humildade, tranquilidade, e uma impressionante capacidade de agregar pessoas em torno da pesquisa e da ciência. Obrigada por todo o incentivo e apoio na realização do doutorado, mesmo que em uma área diferente da minha formação, obrigada por ter acreditado em mim, e ter me conduzido nesta caminhada.

Ao meu coorientador professor Dr. Fábio Souza por todos os conhecimentos transmitidos na área de farmácia, pela paciência em me ensinar, pela compreensão das minhas dificuldades na área, e por ter me dado a oportunidade de aprender e admirar a pesquisa em ciências farmacêuticas. As suas orientações e ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço por tudo.

À professora Dra. Carmeli Sampaio, obrigada por ter compartilhado a sua experiência profissional e acadêmica, e por ter sido uma grande incentivadora.

Aos amigos do LABIAL, uma nova família da pesquisa, obrigada por compartilhar experiências, aprender juntos e buscar o interesse em pesquisar e descobrir mais. Todos foram especiais no desenvolvimento dessa pesquisa.

À Lília, uma verdadeira professora e amiga, que me acompanhou em muitos experimentos da microbiologia. Obrigada por ter me transmitido os seus conhecimentos com tanta simplicidade, encantamento e responsabilidade.

À Alessandra, por ter sido amiga e companheira de doutorado, trocando experiências e conhecimentos durante as disciplinas e execução de experimentos no LABIAL. Admiro muito você pela responsabilidade, determinação e competência.

À Alexandre, uma pessoa exemplar, que me ajudou e incentivou em muitos momentos difíceis da pesquisa e na formatação da tese. Obrigada por ter transmitido tranquilidade, pela sua paciência e por estar disponível sempre que precisei.

À D. Rita que com seu sorriso contagiante me transmitiu alegria e esperança durante suas visitas ao LABIAL.

Aos amigos do LUDEM, obrigada pelas experiências compartilhadas e por fazer do laboratório de farmácia um ambiente tão receptivo e produtivo para mim.

À Rayanne e Taynara, obrigada por toda a paciência e disponibilidade em me ensinar e me ajudar nos experimentos de farmácia no LUDEM. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido cumprir essa etapa da minha pesquisa.

Ao professor Dr. Ângelo Brito Pereira de Melo, coordenador do Núcleo de Odontologia da Residência Multiprofissional do Hospital Universitário Lauro Wanderley,

agradeço a oportunidade de participar da residência como professora tutora, na qual surgiu a idéia do meu trabalho de tese. Obrigada por ter confiado em mim.

À Sabrina Sales Lins de Albuquerque, dentista chefe da UTI do Hospital Universitário Lauro Wanderley, as nossas discussões junto aos residentes do hospital foram a motivação inicial para esta pesquisa. Obrigada por todo o apoio e incentivo.

À microbiologista Alba Lúcia Maria da Costa Carvalho pelo apoio na coleta de dados dos pacientes da UTI do Hospital Universitário Lauro Wanderley, e informações sobre microbiologia que foram fundamentais para esta pesquisa.

À Risoneide Viana da Silva, farmacêutica e pesquisadora, tenho profundo agradecimento a você no preparo das pomadas para a pesquisa, e transmissão de conhecimentos em técnicas farmacêuticas com tanta disponibilidade e competência.

À farmácia de manipulação Phormula&Art pelo apoio na produção das pomadas.

Ao Centro de Tecnologia da UFPB, à Instrutécnica - Campinas/SP e à CERTBIO - UFCG pelo apoio na realização das análises em microscopia.

Ao professor Dr. Raimundo Aprígio de Menezes Júnior pelo apoio na elaboração da patente deste trabalho.

Aos colegas do programa de doutorado pelo acolhimento, apoio, troca de experiências, e por todos os momentos compartilhados durante as disciplinas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos por todos os seus conhecimentos e experiências transmitidos.

Aos professores da banca de qualificação Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa, Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima, Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan, obrigada por todas as sugestões ao meu trabalho, foram todas muito importantes para a finalização da tese.

Aos professores Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice, Dr. Ângelo Brito Pereira de Melo, Dra. Patrícia Maria de Freitas e Silva e Dra. Andrea Cristina Barbosa da Silva, agradeço a disponibilidade em avaliar o meu trabalho e participarem da minha banca de defesa com contribuições importantes para a minha tese.

À Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pela oportunidade em realizar o doutorado.

À UFPB agradeço o apoio e a concessão do afastamento das minhas atividades acadêmicas para uma maior dedicação à realização do doutorado.

A todos que estiveram presentes nesta etapa profissional e acadêmica da minha vida, vocês contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Obrigada!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca
se cansa, nunca tem medo e nunca se
arrepende.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Introdução: Pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) apresentam condições limitantes que eleva o crescimento microbiano na orofaringe, sendo os antimicrobianos fundamentais na prevenção de pneumonia nosocomial nestes pacientes. **Objetivo:** Caracterizar micropartículas com clorexidina como produto farmacêutico intermediário e avaliar a atividade *in vitro* sobre microrganismos da orofaringe para desenvolvimento de pomada orabase. **Métodos:** Foi preparado micropartículas com digluconato de clorexidina como princípio ativo e maltodextrina como excipiente. Em seguida, as micropartículas foram caracterizadas quanto uniformidade, estabilidade, tempo de liberação da clorexidina do microparticulado, análises por microscopia, análise térmica e avaliação por infravermelho. Foi realizada a análise do tipo e prevalência das espécies bacterianas em banco de dados da coleta da secreção ou aspirado traqueal de pacientes internos na UTI do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPB), e análise de pH das soluções teste e controles. Os testes microbiológicos foram realizados em cepas planctônicas e em biofilme uniespécie quanto a eficácia das micropartículas com clorexidina contra os microrganismos da orofaringe *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*. Em sequência, foi preparada uma forma farmacêutica de pomada orabase com as micropartículas com clorexidina a 0,12% para testes microbiológicos e de estabilidade. **Resultados:** As micropartículas apresentaram características favoráveis como produto intermediário. Nas análises por microscopia, foram observados morfologia compatível com o processo de preparo e confirmada a incorporação de clorexidina nas micropartículas. Foi observada uniformidade da massa, estabilidade química em 24 meses, estabilidade quanto à absorção de água em 12 meses, e perfil de liberação lenta por um tempo aproximado de 2 horas. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais prevalente nos pacientes do HULW-UFPB, e o pH das soluções foi adequado para os estudos microbiológicos. Nos testes microbiológicos, as micropartículas com clorexidina apresentaram resultados semelhantes aos observados com a clorexidina livre frente à todas as cepas estudadas, e a pomada com as micropartículas teve atividade antimicrobiana compatível com os efeitos da liberação lenta da clorexidina para as mesmas cepas. Foi constatada perda da estabilidade física com a oxidação da pomada preparada com as micropartículas, a qual foi atribuída à incompatibilidade entre a maltodextrina e o agente de neutralização de pH, sendo sugerido a substituição deste, e ajustes do pH para futuros testes não-clínicos e clínicos. **Conclusão:** Micropartículas com clorexidina incorporadas à forma farmacêutica de pomada orabase pode apresentar benefícios na aplicação clínica intra-oral como sistema de liberação controlada.

Palavras chaves: Pneumonia nosocomial; clorexidina; micropartículas; pomada orabase.

ABSTRACT

Introduction: Patients in Intensive Care Unit (ICUs) have limiting conditions that elevate microbial growth in the oropharynx, and antimicrobials are fundamental in preventing nosocomial pneumonia in these patients. **Objective:** To characterize chlorhexidine microparticles as an intermediate pharmaceutical and to evaluate *in vitro* activity on oropharyngeal microorganisms for orabase ointment development. **Methods:** Microparticles were prepared with chlorhexidine digluconate as active agent and maltodextrin as excipient, then the microparticles were characterized for uniformity, stability, release time of microparticulate chlorhexidine, microscopy analysis, thermal analysis and infrared evaluation. The analysis of type and prevalence of bacterial species was performed in a database of secretion collection or tracheal aspirate from patients admitted to the Lauro Wanderley University Hospital (HULW-UFPB) ICU, and pH analysis of the test solutions and controls. Microbiological tests were performed on planktonic strains and unispecies biofilm for the efficacy of chlorhexidine microparticles against oropharyngeal microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Candida albicans*. In sequence, orabase ointment pharmaceutical form was prepared with 0,12% chlorhexidine microparticles for microbiological and stability testing. **Results:** The microparticles showed favorable characteristics as intermediate product. In the microscopy analysis, morphology was compatible with preparation process and the incorporation of chlorhexidine in the microparticles was confirmed. Mass uniformity, chemical stability at 24 months, water absorption stability at 12 months were observed, and slow release profile for approximately 2 hours. The *Pseudomonas aeruginosa* was the most prevalent bacterium in HULW-UFPB patients, and the pH of the solutions was appropriate for microbiological studies. In microbiological tests the chlorhexidine microparticles showed results similar to those observed with free chlorhexidine against all strains studied, and the microparticles ointment had antimicrobial effects compatible with slow release for the same strains. Loss of physical stability with oxidation of the ointment prepared with the microparticles was found, which was attributed to the incompatibility between maltodextrin and the pH neutralizing agent, its replacement and pH adjustments for future non-clinical and clinical tests are suggested. **Conclusion:** Chlorhexidine microparticles and incorporated into pharmaceutical form of orabase ointment may have clinical intraoral application advantages as a controlled release system.

Keywords: Nosocomial pneumonia; chlorhexidine; microparticles; orabase ointment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do digluconato de clorexidina. Imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.....	36
Figura 2 - Esquema ilustrativo dos diferentes tipos de micropartículas.....	53
Figura 3 - Fórmula estrutural da maltodextrina. Imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.....	56
Figura 4 - Microparticulado de clorexidina e maltodextrina obtido por liofilização.	66
Figura 5 - Representação da curva de calibração do digluconato de clorexidina.	69
Figura 6 - Curva de liberação de clorexidina das micropartículas em 1 hora. ..	79
Figura 7 - Curva de liberação de clorexidina das micropartículas em 2 horas.	80
Figura 8 - Espectros de frequência de diâmetro ESD (8a) e volume (8b) das micropartículas de clorexidina e maltodextrina por Flowcam®.	83
Figura 9 - Análise MEV em visão ampla do aspecto das micropartículas. LOTE 1 (9a) e LOTE 2 (9b e 9c).	85
Figura 10 - Análise MEV de micropartícula de maltodextrina e clorexidina - LOTE 1. Aumento de 250x (10a), 500x (10b), 1.000x (10c) e 2.500x (10d).	86
Figura 11 - Análise MEV de micropartículas - LOTE 2. Micropartícula 1 com aumento 500x (11a) e 1.000x (11b), micropartícula 2 com aumento 500x (11c) e 1.000x (11d), e micropartícula 3 com aumento 500x (11e) e 1.000x (11f).	87
Figura 12 - Análise MEV de amostra de maltodextrina pura, com aumento de 500x (12a), 1.000x (12b), 2.500x (12c) e 5.000x (12d).	89
Figura 13 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 1. Imagem de MEV gerada para leitura (13a); Espectro de leitura dos componentes químicos (13b).....	92
Figura 14 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 2. Imagem de MEV gerada para leitura (14a); Espectro de leitura dos componentes químicos (14b).....	93
Figura 15 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 3. Imagem de MEV gerada para leitura (15a); Espectro de leitura dos componentes químicos (15b).....	94
Figura 16 - Percentual atômico dos elementos químicos das micropartículas de maltodextrina e clorexidina por EDS.	95

Figura 17 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 1. Imagem de MEV gerada para leitura (17a); Espectro de leitura dos componentes químicos (17b).	96
Figura 18 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 2. Imagem de MEV gerada para leitura (18a); Espectro de leitura dos componentes químicos (18b).	97
Figura 19 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 3. Imagem de MEV gerada para leitura (19a); Espectro de leitura dos componentes químicos (19b).	98
Figura 20 - Percentual atômico dos elementos químicos da maltodextrina pura por EDS.....	99
Figura 21 - Molécula de clorexidina com marcação dos átomos de nitrogênio e cloro (21a), e molécula de maltodextrina (21b). Adaptado de imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.	100
Figura 22 - Curva dos eventos térmicos da análise por DSC.....	103
Figura 23 - Curva dos eventos térmicos da análise por TG entre as micropartículas.....	107
Figura 24 - Espectros de FTIR das micropartículas 1 e 2, maltodextrina pura e clorexidina.	110
Figura 25 - Desenho esquemático da placa de microdiluição.	145
Figura 26 - Leitura de placas de microdiluição após coloração com resazurina com teste do microparticulado a 0,12% (26a), e controles positivo e negativo (26b) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146
Figura 27 - Leitura de placas de microdiluição após coloração com resazurina com teste do microparticulado para <i>Streptococcus pneumoniae</i> a 0,012% (27a), <i>Porphyromonas gingivalis</i> a 0,06% (27b) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a 0,12% (27c).	147
Figura 28 - Placas de controle positivo com a clorexidina livre e controle negativo com a maltodextrina da <i>Klebsiella pneumoniae</i> nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.	152
Figura 29 - Placa de microdiluição com microparticulado a 0,012% para <i>Candida albicans</i> com resazurina em duplicada antes do preparo da placa Petri de reincubação para CFM.	153

Figura 30 - Placa Petri preparada para leitura de CFM da <i>Candida albicans</i> após período de incubação.....	153
Figura 31 - Desenho esquemático do preparo das soluções.	157
Figura 32 - Soluções preparadas nas diluições 10^0 , 10^{-2} e 10^{-4} , em saliva e em solução salina.....	158
Figura 33 - Desenho esquemático de preparo da placa Petri pela técnica do gotejamento para leitura de crescimento bacteriano/fúngico.	159
Figura 34 - Placas Petri preparadas para leitura de crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> em saliva e em solução salina por diluição após período de incubação.....	160
Figura 35 - Tubo endotraqueal para o preparo de corpos de prova.	166
Figura 36 - Corpos de prova de inox (36a) e tubo endotraqueal (36b).....	166
Figura 37 - Placas preparadas para crescimento de biofilme estático com corpos de prova em inox (37a) e corpos de prova de tubo endotraqueal (37b).....	167
Figura 38 - Placas com biofilme maduro após 48 horas de incubação com corpos de prova em inox (38a) e corpos de prova de tubo endotraqueal (38b).....	168
Figura 39 - Desenho esquemático do preparo da placa de cinética de viabilidade celular.....	169
Figura 40 - Desenho esquemático do preparo da placa Petri para contagem bacteriana.....	172
Figura 41 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em corpo de prova de inox.	173
Figura 42 – Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	174
Figura 43 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em corpos de prova de inox.	175
Figura 44 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	176
Figura 45 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em corpos de prova de inox.....	178
Figura 46 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	179

Figura 47 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em corpos de prova de inox.....	180
Figura 48 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	180
Figura 49 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em corpos de prova de inox.	182
Figura 50 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	183
Figura 51 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em corpos de prova de inox.	184
Figura 52 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.	184
Figura 53 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em corpos de prova de inox.	187
Figura 54 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal.....	188
Figura 55 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em corpos de prova de inox.	189
Figura 56 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em corpos de prova de tubo endotraqueal....	189
Figura 57 - Pomadas orabase preparadas para os testes microbiológicos <i>in vitro</i>	202
Figura 58 - Desenho esquemático do preparo da placa Petri marcada para análise por difusão em ágar.	206
Figura 59 - Medição do halo de inibição com paquímetro.	206
Figura 60 - Medidas das pomadas orabase com dosador e espátula para o teste da atividade antimicrobiana sobre biofilme.	210
Figura 61 - Desenho esquemático das placas de cultura para avaliação da atividade antimicrobiana sobre biofilme.	211
Figura 62 - Desenho esquemático dos poços preparados para o experimento. Poço com pomada orabase (62a) e Poço branco sem pomada orabase (62b).	212

Figura 63 - Preparo da placa com pomada orabase para leitura - Placa após o período de incubação (63a), Placa após destarte das soluções com biofilme aderido (63b), e Placa com solução salina para início da leitura (63c).	212
Figura 64 - Pomadas orabase logo após o preparo (64a), Pomadas orabase após 30 dias de preparo com alteração de cor (64b).....	217
Figura 65 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade - Inicial.	221
Figura 66 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 10.....	222
Figura 67 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 30.....	223
Figura 68 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 60.....	224
Figura 69 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 90.....	224
Figura 70 - Molécula de maltodextrina com marcação dos grupos hidroxila. Adaptado de imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.	225

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Registro ATCC, meio de cultura para crescimento, tipo de respiração e tempo de incubação das cepas estudadas.	140
Quadro 2 - Composição das pomadas preparadas para os testes de compatibilidade e estabilidade.	219

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores em absorbância da curva de calibração do digluconato de clorexidina.	68
Tabela 2 - Uniformidade do microparticulado logo após o preparo com valores de absorbância, concentração e percentual de recuperação da clorexidina. ...	72
Tabela 3 - Coeficiente de recuperação da clorexidina nas micropartículas em 24 meses.....	75
Tabela 4 - Percentual de liberação da clorexidina das micropartículas em 1 hora.	78
Tabela 5 - Percentual de liberação da clorexidina das micropartículas em 2 horas.	79
Tabela 6 - Análise por microscopia de imagem de fluxo das micropartículas de clorexidina e maltodextrina.....	83
Tabela 7 - Análise dos componentes químicos das micropartículas de maltodextrina e clorexidina por EDS.	95
Tabela 8 - Análise dos componentes químicos da maltodextrina pura por EDS.	99
Tabela 9 - Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas, clorexidina e maltodextrina pura	102
Tabela 10 - Análise térmica por termogravimetria das micropartículas.....	107
Tabela 11 - Principais bandas de absorção das micropartículas, maltodextrina e clorexidina pura a partir do FTIR.	109
Tabela 12 – Tipo e prevalência das cepas identificadas em número e percentual de pacientes internos na UTI do HULW, 2017.	130
Tabela 13 - Média e Desvio padrão (DP) dos valores de pH das soluções com as micropartículas com clorexidina (MP:CLX:MT), maltodextrina (MT), clorexidina padrão (CLX-P) e clorexidina comercial (CLX-C) a 0,12% em diferentes tempos de análise.....	135
Tabela 14 - Volumes das diluições para preparo da placa de microdiluição para testes de Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima com cálculos da quantidade de clorexidina (CLX) e quantidade de massa das micropartículas (MP) nas concentrações a 0,12%, 0,06% e 0,012%.	145

Tabela 15 - Concentração inibitória mínima das micropartículas com clorexidina nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.....	147
Tabela 16 - Concentração bactericida/fungicida mínima das micropartículas com clorexidina nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.....	154
Tabela 17 - Atividade bactericida e fungicida por diluição com saliva e solução salina.....	160
Tabela 18 - Análise por contagem bacteriana da cinética celular do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.	176
Tabela 19 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.	181
Tabela 20 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.	185
Tabela 21 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.	190
Tabela 22 - Relação da concentração de clorexidina nas micropartículas a 0,12% com a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cada cepa estudada nos experimentos de biofilme.....	192
Tabela 23 - Medidas do halo de inibição, com média, desvio padrão (DP) e mediana para as cepas estudadas.....	207
Tabela 24 - Medidas de absorbância para as cepas estudadas com as pomadas.....	213
Tabela 25 - Medidas de unidades formadoras de colônias para as cepas estudadas com as pomadas.....	215
Tabela 26 - Medidas do halo de inibição (mm), com média, desvio padrão (DP) e mediana para o <i>Staphylococcus aureus</i> das pomadas inicial e oxidada após 30 dias.....	218
Tabela 27 - Valores de pH dos componentes da pomada.	227
Tabela 28 - Valores de pH das pomadas preparadas.	228

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMIB – Associação de Medicina Intensiva Brasileira

AMP – Aminometil propanol

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

BSS – Branco com solução salina

BSV – Branco com saliva

C – Carbono

°C – Graus Celsius

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL – Cloro

CLX – Clorexidina

CMC – Carboximetilcelulose

CMRVS - Coleção de micro-organismos de referência em Vigilância Sanitária

CR% – Coeficiente de recuperação

CRF – Conselho regional de farmácia

CV% – Coeficiente de Variação Percentual

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

ED – Eficiência de dissolução

EDS – Espectroscopia por energia dispersiva

E.P.I. – Equipamentos de proteção individual

ESD – Equivalent Spherical Diameter

FDA – Food and Drug Administration (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)

FTIR – Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FR – Fator de recuperação

g – grama

h – hora

H – Hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

HULW – Hospital Universitário Lauro Wanderley

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

Kg – Kilograma

LABIAL – Laboratório de Biologia Bucal

LUDEM – Laboratório Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV-EDS – Microscópio eletrônico de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva

Min – Minutos

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mmHg – Milímetro de mercúrio

MP – Microparticulado

MP:CLX:MT – Micropartícula de clorexidina e maltodextrina

MR – Massa de recuperação do microparticulado

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MT – Maltodextrina

N – Nitrogênio

nm – Nanometro

O – Oxigênio

PAVM – Pneumonia associada à ventilação mecânica

p.f. – Ponto de fusão

pH – Potencial de hidrogênio

POP – Procedimento operacional padrão

PVC – Policloreto de vinila
PTFE – Politetrafluoretileno
q.s.p. – Quantidade suficiente para
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RE – Resolução
rpm – Rotação por minuto
SM0 – Solução mãe inicial
SM1 – Solução mãe 1
SM2 – Solução mãe 2
SM3 – Solução mãe 3
TG – Termogravimetria
T_{onset} – Temperatura inicial
T_{endset} – Temperatura final
T_{pico} – Temperatura do pico
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
UFPB – Universidade Federal da Paraíba
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
UV – Ultravioleta
VA – Valor de aceitação
 ΔH – Variação de entalpia
 μL – Microlitro
 μg – Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. FLUXOGRAMA DA PESQUISA.....	33
CAPÍTULO I	
4. CONSIDERAÇÕES SOBRE CLOREXIDINA	35
4.1 Características e atividade antimicrobiana da clorexidina	35
4.2 Indicações e formas farmacêuticas com clorexidina	39
4.3 Toxicidade e efeitos adversos da clorexidina	43
CAPÍTULO II	
5. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CLOREXIDINA.....	52
5.1 Sistema de liberação controlada de fármacos	52
5.2 Considerações sobre a maltodextrina	56
5.3 Desenvolvimento de micropartículas e microcápsulas com clorexidina	
60	
CAPÍTULO III	
6. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA.....	65
6.1 Preparo da micropartícula de maltodextrina e clorexidina	65
6.2 Caracterização das micropartículas.....	67
6.2.1 Curva de calibração do padrão de clorexidina	67
6.2.2 Avaliação da uniformidade do microparticulado	70
6.2.3 Teste de estabilidade da clorexidina nas micropartículas.....	72
6.2.4 Testes de liberação da clorexidina do microparticulado	76
6.2.5 Avaliação por microscopia de imagem de fluxo	81
6.2.6 Avaliação por microscópio eletrônico de varredura	83
6.2.7 Avaliação por microscópio eletrônico de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva	90
6.2.8 Avaliação por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	101

6.2.9 Avaliação por Termogravimetria (TG).....	105
6.2.10 Avaliação por infra-vermelho (FTIR).....	108
6.3 Conclusões.....	111

CAPÍTULO IV

7. A INDICAÇÃO DA CLOREXIDINA PARA PACIENTES INTERNOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA.....	114
7.1 A condição bucal do paciente hospitalizado em Unidade de Terapia Intensiva.....	114
7.2 Colonização por bactérias na orofaringe e sua relação com complicações no paciente hospitalizado em UTI	116
7.3 Colonização por fungos na orofaringe e sua relação com complicações no paciente hospitalizado em UTI.....	122
7.4 O uso da clorexidina no protocolo de cuidados bucais para pacientes hospitalizados em UTI	124
7.5 Análise de banco de dados da coleta da secreção traqueal de pacientes internos na UTI do HULW	129

CAPÍTULO V

8. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA.....	134
8.1 pH das micropartículas em solução aquosa	134
8.2 Metodologia para os estudos microbiológicos.....	138
8.2.1 Condições de trabalho para análises microbiológicas	138
8.2.2 Preparo e padronização dos inóculos para análises microbiológicas..	139
8.2.3 Preparo das soluções com as micropartículas com clorexidina.....	142
8.3 Avaliações microbiológicas das micropartículas com clorexidina in vitro	143
8.3.1 Testes microbiológicos em bactérias e fungos planctônicas	143
8.3.1.1 <i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em placa</i>	<i>143</i>
8.3.1.2 <i>Concentração Bacteriana Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) por microdiluição em placa.....</i>	<i>152</i>
8.3.1.3 <i>Análise bactericida e fungicida em saliva</i>	<i>156</i>
8.3.2 Testes microbiológicos em biofilme bacteriano	165
8.3.2.1 <i>Análise por absorbância</i>	<i>169</i>

8.3.2.2 <i>Análise por fluorescência</i>	170
8.3.2.3 <i>Análise por contagem bacteriana</i>	172
8.4 Conclusões	198
CAPÍTULO VI	
9. ESTUDOS DA POMADA ORABASE COM MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA	201
9.1 Preparo de pomada orabase com micropartículas com clorexidina.	201
9.2 Avaliações microbiológicas das pomadas orabase <i>in vitro</i>	204
9.2.1 <i>Análise por difusão em ágar</i>	205
9.2.2 <i>Análise da atividade antimicrobiana sobre biofilme em saliva</i>	210
9.3 Testes de estabilidade da pomada orabase	216
9.3.1 <i>Avaliação da estabilidade da atividade antimicrobiana</i>	218
9.3.2 <i>Avaliação da compatibilidade entre os excipientes e da estabilidade sob variação de temperatura</i>	219
9.3.3 <i>Avaliação do pH das pomadas orabase</i>	226
9.4 Conclusões	229
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	233
REFERÊNCIAS	236
ANEXOS	255

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O corpo humano é um bioma, um importante habitat para trilhões de células microbianas que encontram nichos de crescimento com uma diversidade de espécies e estruturas de crescimento diferentes (BONE, 2018). A cavidade bucal é um habitat para o crescimento microbiano, tendo características distintas de todas as outras superfícies do corpo que determinam o tipo de microrganismo capaz de colonizar. Existem habitats distintos na cavidade bucal que determina o crescimento de uma comunidade microbiana específica a depender de aspectos biológicos, cujas propriedades mudam durante a vida e as condições do indivíduo (MARSH, 2005).

Pacientes internos em UTI apresentam condições limitantes que os tornam susceptíveis à elevação do crescimento microbiano na cavidade bucal. Estas condições ocorrem pela impossibilidade de uma higiene bucal eficiente, mudanças nas características da saliva e redução da microbiota anaeróbica pelo uso de antibióticos, alterando a quantidade e complexidade do biofilme dental, que sofre alterações na sua composição e passam a abrigar uma maior quantidade de bactérias aeróbicas. Com isso, o biofilme dental passa a ser reservatório de patógenos respiratórios e aumenta o risco de desenvolver pneumonia após a internação (LABEAU et al., 2011; PASETTI et al., 2013; LINDAU et al., 2015).

A pneumonia adquirida em hospital ou pneumonia nosocomial, também definida como pneumonia relacionada à assistência à saúde, está fortemente relacionada à ventilação mecânica de pacientes intubados. Sua etiologia é principalmente de origem aspirativa, cuja principal fonte são as microaspirações das secreções das vias aéreas superiores, seguida pela inoculação exógena de material contaminado ou pelo refluxo do trato gastrointestinal (ANVISA, 2017).

Neste contexto, destaca-se a colonização da orofaringe por patógenos respiratórios que passam a colonizar o biofilme dental e o tubo endotraqueal como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida spp.* (SCANNAPIECO et al., 2003; EL-SOLH et al., 2004; MUNRO et al., 2006; HENRIQUES, 2013). Como aspecto de relevância, esses microrganismos que colonizam as vias aéreas são resistentes a muitas drogas,

tornando o tratamento mais problemático e com maior probabilidade de falhas e insucesso (MARINO et al., 2017).

Do ponto de vista epidemiológico, a pneumonia nosocomial representa 15% das infecções hospitalares e 25% das infecções adquiridas em UTI. É a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes hospitalizados em UTIs, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 33% nos pacientes acometidos. Além disso, destacam-se os problemas de saúde pública pelo aumento do tempo de internação, relacionados com a diminuição no número de leitos disponíveis e maiores custos hospitalares pela manutenção do paciente na UTI (ANVISA, 2009; ANVISA, 2017).

O controle do crescimento microbiano na cavidade bucal de pacientes internos em UTI faz-se necessário como mecanismo de prevenção da pneumonia nosocomial. Nesse contexto, a higiene da cavidade bucal desses pacientes no Brasil segue um protocolo desenvolvido pela Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB, 2014), seguindo uma tendência internacional, que preconiza a aplicação de solução de clorexidina a 0,12% a cada 12 horas com a finalidade de controlar a colonização microbiana e minimizar o risco para as pneumonias nosocomiais.

A clorexidina é considerada o padrão ouro quanto antisséptico bucal com ação fundamentada contra o crescimento de bactérias e fungos, e o seu uso associado à remoção mecânica do biofilme dentário diminui a colonização por patógenos bucais e respiratórios que podem colonizar a cavidade bucal (SNYDERS, KHONDOWE, 2011). Este antisséptico apresenta efeitos adversos como manchamento dos dentes, alteração reversível do paladar e irritação da mucosa, especialmente dependendo da concentração e sob uso prolongado (ZANATTA, RÖSING, 2007).

A ocorrência de pneumonia ainda continua alta em pacientes internos em UTI, por possibilidades de falhas no protocolo clínico de controle da colonização bacteriana na cavidade bucal, ou mesmo pelo desconhecimento de outras formas de utilização da clorexidina (ZAND et al., 2017). Ademais, é escassa a análise comparativa com novas formas farmacêuticas, e também de sistemas de liberação lenta da clorexidina para aplicação em pacientes com necessidades especiais.

O sistema de liberação controlada de medicamentos é representado pelo desenvolvimento de partículas com aplicação biomédica e de biotecnologia

preparadas para liberação controlada para serem absorvidas em locais específicos (MARCATO, DURÁN, 2008). As micropartículas preparadas para o mecanismo dos sistemas de liberação controlada de medicamentos se destacam devido ao potencial terapêutico, à maior estabilidade nos fluidos biológicos, além da estabilidade durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A liberação controlada de antimicrobianos apresenta eficácia terapêutica e vantagens quanto ao uso, com a liberação do fármaco durante um longo período de tempo e em baixas concentrações, com este propósito foram desenvolvidas as micropartículas com clorexidina, tendo como excipiente a maltodextrina (ONE, 2014). A maltodextrina é usada na indústria farmacêutica para liberação controlada de fármacos por influenciar nas propriedades de estabilidade e biodisponibilidade da droga, tendo por características segurança de uso, solubilidade, rendimento e ausência de atividade farmacológica (PARIKH, 2014; PEREIRA et al., 2018).

Dessa forma, a aplicação de micropartículas com clorexidina como produto intermediário para preparações farmacêuticas tem como característica a inovação tecnológica em sistema de liberação lenta que melhora a sua estabilidade e farmacocinética, e busca manter a sua eficácia antimicrobiana.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido tendo por escopo investigar novos meios de liberação da clorexidina, buscando aumentar o seu tempo de ação na cavidade bucal em sistema de liberação controlada. E, ainda, desenvolver uma nova forma farmacêutica na forma de pomada orabase com micropartículas com clorexidina, com testes da atividade antimicrobiana, que pode se apresentar como uma alternativa relevante de controle microbiano, cujas características ampliam a indicação da clorexidina como agente antimicrobiano para uso na cavidade bucal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar micropartículas com clorexidina como produto farmacêutico intermediário e avaliar a atividade *in vitro* sobre microrganismos da orofaringe para desenvolvimento de forma farmacêutica de pomada orabase.

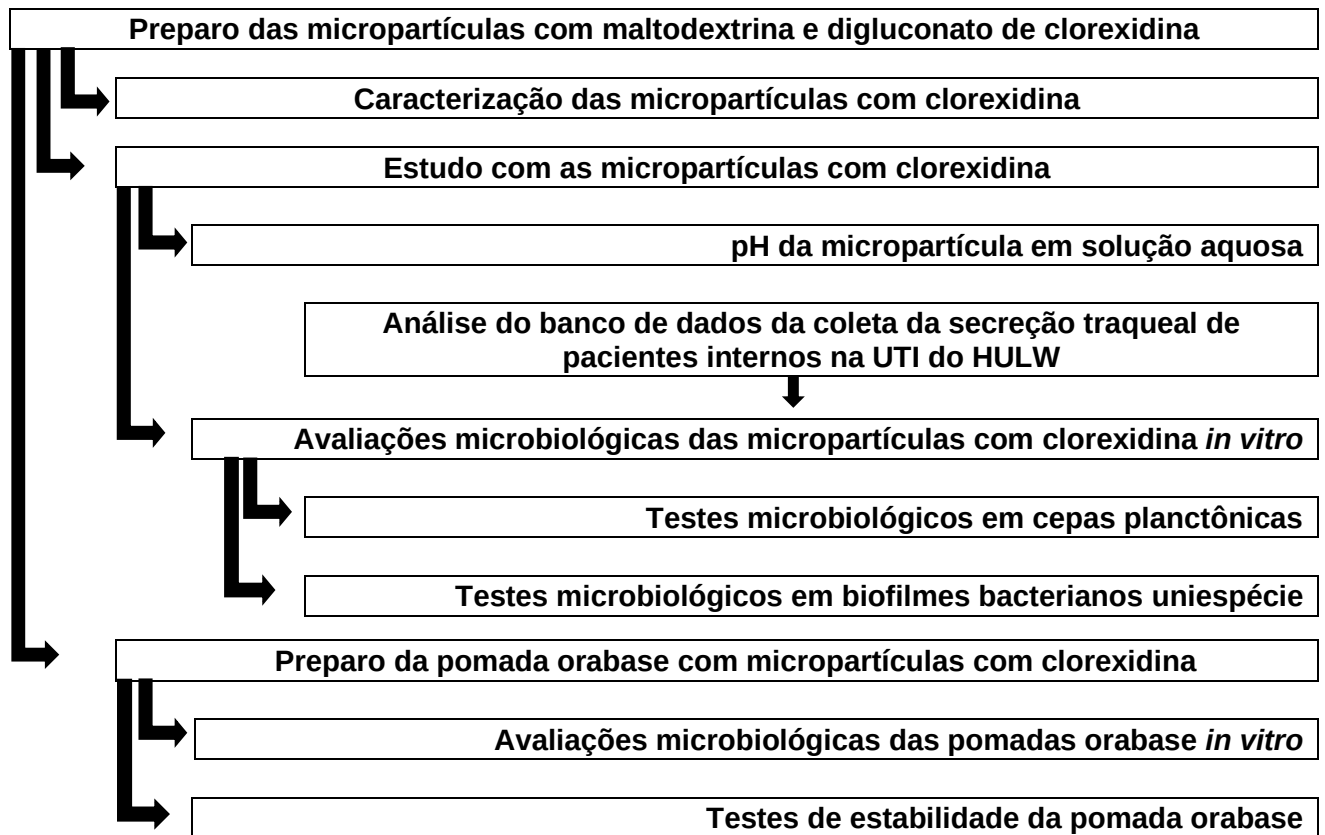
2.2 Objetivos Específicos

- Preparar as micropartículas com maltodextrina como excipiente e digluconato de clorexidina como princípio ativo;
- Caracterizar as micropartículas com clorexidina quanto a uniformidade, estabilidade, tempo de liberação da clorexidina do microparticulado, análises por microscopia, análise térmica e avaliação por infravermelho;
- Avaliar o tipo e prevalência das espécies bacterianas em banco de dados da coleta da secreção ou aspirado traqueal de pacientes internos na UTI do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, e comparar com as espécies de bactérias e fungos relatados na literatura para este grupo de pacientes;
- Avaliar o pH das micropartículas com clorexidina em solução aquosa para realização dos testes microbiológicos *in vitro*;
- Analisar *in vitro*, por testes microbiológicos cepas planctônicas e em biofilme uniespécie, a eficácia das micropartículas com clorexidina contra os microrganismos da orofaringe as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e o fungo *Candida albicans*;
- Desenvolver uma forma farmacêutica de pomada orabase a partir das micropartículas com clorexidina;
- Analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana da pomada orabase contendo as micropartículas com clorexidina contra os microrganismos da orofaringe as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e fungo o *Candida albicans*;

- Avaliar a estabilidade antimicrobiana da pomada orabase com micropartículas com clorexidina;
- Avaliar a compatibilidade entre os componentes da forma farmacêutica da pomada orabase com as micropartículas com clorexidina e a estabilidade sob variação de temperatura;
- Avaliar o pH dos componentes da forma farmacêutica e da pomada orabase preparada para futuro ajuste para uso na cavidade oral.

FLUXOGRAMA DA PESQUISA

3. FLUXOGRAMA DA PESQUISA



CAPÍTULO I

4. CONSIDERAÇÕES SOBRE CLOREXIDINA

4.1 Características e atividade antimicrobiana da clorexidina

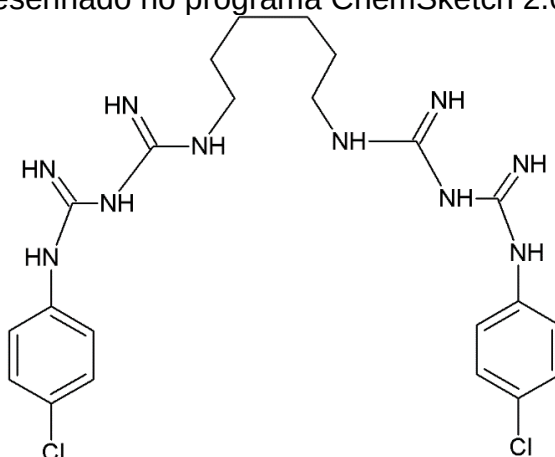
A clorexidina é uma molécula ativa que na forma de sal se torna mais estável, sendo as duas formas de sal o digluconato de clorexidina com ação antimicrobiana, e o dicloridrato de clorexidina com ação sobre a função intestinal. O digluconato de clorexidina é uma bisguamida di-catiônica, com características desinfetantes e antissépticas amplamente utilizada em produtos para a saúde humana e animal. A molécula de clorexidina foi descoberta na década de 40 em pesquisas sobre agentes ativos contra a malária, sendo introduzida no mercado para comercialização como antisséptico na década de 50 pela Imperial Chemical Industries em Manchester, Reino Unido, e utilizado amplamente até os dias atuais como antisséptico para ferimentos de pele na forma de digluconato de clorexidina (ZANATTA, RÖSING, 2007; LIM, KAM, 2008).

O digluconato de clorexidina tem alta atividade com ação antimicrobiana, visto que é um antisséptico de amplo espectro de ação, agindo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, alguns fungos e vírus (ZANATTA, RÖSING, 2007). Quando usado topicamente, o N-clorinato derivado da clorexidina se liga covalentemente a proteínas da pele e da mucosa, resultando em um efeito antimicrobiano persistente com absorção sistêmica limitada, mesmo após uma ingestão oral (BOYCE, PITTET, 2002).

A sua fórmula química é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com peso molecular 505,45 g/mol, com percentual de composição C 52,28%, H 5,98%, Cl 14,03% e N 27,71%, com pH 5,5 a 7,0, com fórmula estrutural apresentada na Figura 1. Possui características importantes que ampliam a sua utilização em muitos segmentos do mercado com baixa toxicidade, não apresenta absorção cutânea, não é absorvida pelo organismo quando ingerida, possui ação cicatrizante, não deixa resíduos, inodoro, incolor, não corrosiva, não volátil e biodegradável. Tem por característica ser anfótera podendo atuar como ácido ou com base, tem solubilidade total em água, e possui

incompatibilidade com tensoativos aniônicos (MERCK, 2019; Chlorhexidine Official FDA, 2018; NEOBRAX).

Figura 1 - Fórmula estrutural do digluconato de clorexidina. Imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.



Fonte: Autora.

O mecanismo de ação do digluconato de clorexidina ocorre por esta ser uma molécula dicatiônica, de forma que uma extremidade da molécula fica ligada à película adquirida que reveste a superfície do dente e estruturas da cavidade oral, enquanto a outra exerce a sua ação nos microrganismos. A ação antibacteriana ocorre pela molécula da clorexidina ser atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo esta adsorção concentração-dependente. Assim, em dosagens elevadas, ela causa danos irreversíveis à célula bacteriana com precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas, evoluindo para a morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada pela inibição de enzimas glicolíticas e proteolíticas, resultando num extravasamento dos componentes da célula bacteriana de baixo peso molecular (BONNESVOLL, 1977; LIM, KAM, 2008; ZANATTA, RÖSING, 2007; LABEAU et al., 2011).

A clorexidina é um antisséptico eficaz contra a colonização por microrganismos na cavidade oral, cuja ação contra o crescimento bacteriano ocorre pela alteração na adesão bacteriana ao dente, dificultando o processo de formação do biofilme dentário,

e também pela alteração da parede celular bacteriana que leva a sua morte. De forma que o uso da clorexidina associado à remoção mecânica do biofilme dentário diminui a colonização por patógenos bucais e respiratórios que podem colonizar a cavidade oral (SNYDERS, KHONDOWE, 2011).

A clorexidina também apresentou inibição da atividade proteolítica das bactérias em concentrações de 0,01 mM, em um estudo com amostras da placa subgengival de pacientes com periodontite crônica. Essa propriedade influencia na formação da placa bacteriana ou biofilme dentário que depende da liberação de nutrientes para se desenvolver (RADFORD et al., 1992). Além disso, a capacidade da clorexidina se reter à superfície do dente promove a diminuição da proliferação bacteriana no biofilme, que se associa a sua atividade bacteriostática e bactericida, impedindo o desenvolvimento da cárie e da doença periodontal (KLUK et al., 2016).

O estudo da ação da clorexidina contra fungos é mais escassa e contraditória na literatura, contudo apresenta relatos de efetividade. Em 1999, Giuliana e colaboradores realizaram um estudo *in vitro* com agentes antimicrobianos tópicos contra espécies de *Candida*, dentre os agentes foi avaliado a ação do digluconato de clorexidina que apresentou concentração inibitória mínima e fungicida satisfatória, porém os resultados com a clorexidina foram inferiores em relação ao cloreto de cetilpiridínio. Enquanto, ERCAN et al. (2006), avaliaram a efetividade da clorexidina gel a 2% e do hidróxido de cálcio associado a clorexidina a 2% para a descontaminação de canais radiculares por *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, tendo os resultados mostrado uma efetividade maior da clorexidina gel para a bactéria e para o fungo.

Outro estudo da efetividade da clorexidina contra fungos avaliou a atividade inibitória mínima e fungicida de enxaguatórios bucais contendo clorexidina e timol contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Os resultados mostraram que o enxaguatório bucal com clorexidina mostrou uma atividade melhor contra o crescimento das cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, além da atividade fungicida em um período de tempo mais curto comparado com o enxaguatório bucal com timol (SHRESTHA et al., 2011).

O mecanismo de ação da clorexidina para fungos é muito semelhante ao das bactérias, de forma que o fungo adsorve a molécula da clorexidina, o que prejudica a integridade da sua parede celular e membrana plasmática entrando no citoplasma, o que resulta no extravazamento do conteúdo celular (KUMAR, 2017).

Em uma publicação pioneira da farmacologia oral da clorexidina, Bonesvoll (1977), identificou que a concentração da clorexidina na saliva após o enxague bucal sofre uma queda durante as primeiras 4 a 8 h, seguida de uma concentração mais estável baixa, com identificação da clorexidina ainda presente após 24h. A clorexidina apresenta propriedades antimicrobianas de longa duração devido à sua capacidade de se ligar reversivelmente às superfícies dentais, hidroxiapatita, membranas celulares e mucinas salivares podendo se desligar dessas estruturas mediante a elevação do gradiente de concentração.

A natureza catiônica da clorexidina permite a sua adsorção a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares radicais, fosfatos e carboxílicos presentes no biofilme dental, película dental e macromoléculas presentes na boca, dessa forma essa propriedade favorece a retenção de aproximadamente 30% da clorexidina na boca após o bochecho. Devido à possibilidade de se formar reservas de clorexidina na superfície dental, e ser liberada lentamente há um efeito positivo que influencia na prevenção da colonização bacteriana e do desenvolvimento do biofilme, sendo essa característica conhecida pela propriedade de substantividade (ZANATTA, RÖSING, 2007). Além da superfície do dente, a molécula de clorexidina também possui propriedade de retentividade à gengiva e à mucosa bucal por afinidade à membrana celular das células das mucosas orais, com isso há uma conservação do seu efeito, retardando o seu tempo de ação em relação ao fluxo salivar (KLUK et al., 2016).

Após a sua administração por meio de bochechos, a clorexidina sofre a ação do fluxo salivar e do clearance salivar, diminuindo a sua concentração em um curto período de tempo. Ocorre uma alta concentração na cavidade oral logo após a utilização, e depois há uma perda da sua concentração que é influenciado por fatores como formulação, as propriedades químicas e físicas do agente, além da biologia e higiene oral de cada indivíduo (SNYDERS, KHONDOWE, 2011). De forma que, após o bochecho com clorexidina a saliva isoladamente exhibe a atividade antimicrobiana da

clorexidina por até 5 horas, enquanto a clorexidina retida na mucosa oral permanece sendo liberada para a cavidade oral por 12 horas (MANTHUR et al., 2011).

A concentração da clorexidina para uso na cavidade bucal pode variar entre 0,12%, 0,2% e 2%, sendo a concentração de 2% a que demonstra melhores efeitos sobre o controle do crescimento bacteriano, porém nesta concentração mais elevada ou em uso prolongado está associado ao aparecimento de efeitos adversos (LABEAU et al., 2011).

Devido à sua eficácia e segurança de emprego, o digluconato de clorexidina foi considerado em 1997 o antisséptico padrão-ouro *vitro/vivo* pela Organização Mundial de Saúde (ZANATTA, RÖSING, 2007).

4.2 Indicações e formas farmacêuticas com clorexidina

Na odontologia a clorexidina apresenta várias formas de apresentação, tendo como objetivos a redução do desenvolvimento da placa bacteriana ou biofilme dentário, além da prevenção da doença periodontal e da doença cárie. Neste contexto, as formas farmacêuticas de apresentação mais comuns do digluconato de clorexidina são as soluções orais, dentrífcios com clorexidina, além de soluções em géis e verniz com clorexidina (KLUK et al., 2016).

O uso da clorexidina na odontologia tem um significativo número de indicações com curto períodos de aplicação indicados quando a higiene mecânica não é possível, dificultada ou inadequada como após cirurgias orais, em ulcerações orais recorrentes, em tratamento de estomatites, ou durante tratamento de infecções orais. Por curto período intermitente ou médios períodos para pacientes com pobre higiene oral com deficiências física ou mental, com alto risco de cárie, com aparelhos ortodônticos ou reabilitação protética extensa ou com comprometimento médico com predisposição à infecções orais. E, ainda, por longos períodos de aplicação em diferentes concentrações para pacientes com problemas sistêmicos graves sob risco de infecções bucais (MANTHUR et al., 2011).

A utilização da clorexidina em solução a 0,12% ou a 0,2% são as formas farmacêuticas mais utilizadas com as indicações de prevenção da formação do biofilme dentário, controle da gengivite e controle de infecção pós-cirúrgicas. Sendo a solução para enxaguante bucal na concentração a 0,12% a mais utilizada por ter efetividade e menores efeitos adversos, e ser de fácil utilização pelos pacientes. É também indicado para uso em pacientes com limitação motora, deficientes mentais, portadores de aparelhos ortodônticos, pacientes geriátricos e pacientes hospitalizados, além da desinfecção de escovas de dentes. A solução na concentração a 2% é utilizada para descontaminação da superfície dentinária antes de restaurações ou cimentação de próteses, para descontaminação dos canais radiculares em endodontia, e para utilização como agente de descontaminação externa antes de procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal (HORTENSE et al., 2010).

Macedo et al. (2015), a partir de revisão sistemática, destaca a indicação do uso da solução de clorexidina para a prevenção e tratamento de mucosite em pacientes portadores de leucemia tratados com quimioterapia. A mucosite oral é caracterizada pelo aparecimento de eritema na mucosa bucal que evolui para ulcerações muito dolorosas, interferindo no estado nutricional e na qualidade de vida dos pacientes, que podem limitar ou interromper a terapia oncológica em casos considerados graves. A clorexidina, devido à sua atividade antibacteriana, antifúngica e ligação às superfícies teciduais é capaz de diminuir a frequência e intensidade das lesões de mucosite, sem apresentar efeitos deletérios significativos no paciente, reduzindo a dor e o desconforto.

A forma farmacêutica de solução oral da clorexidina a 0,12% tem ampla utilização como protocolo para pacientes críticos internos em unidades de terapia intensiva no controle da microbiota da orofaringe, principalmente para pacientes intubados sob uso do tubo endotraqueal. O uso tópico da solução de clorexidina na higiene bucal de pacientes internos em UTI, principalmente sob ventilação mecânica com o uso do tubo endotraqueal, auxilia na redução bacteriana na cavidade oral, em especial na colonização por bactérias patógeno respiratórias, e com isso reduz os riscos de pneumonia adquirida após o período de internação (VEITZ, 2007;

BERALDO, ANDRADE, 2008; AMES et al., 2011; RICHARDS, 2013; SANTOS, 2013; AMIB, 2014; HUA et al., 2016).

A utilização da clorexidina em dentrífcios para o controle do biofilme supragengival apresenta limitações, visto que a interação da clorexidina com produtos utilizados na formulação dos dentrífcios podem reduzir a ação antimicrobiana da mesma. Esta condição ocorre pela interação com o monofosfato de sódio e o lauril sulfato de sódio presentes na fórmula dos dentrífcios que exercem uma atração iônica com a molécula de clorexidina, diminuindo o seu efeito (MARTINS et al., 2012).

A clorexidina tem uma ação clínica importante na redução da cárie dentária, em especial pela sua ação sobre o principal causador, o *Streptococcus mutans*, com isso o seu efeito antimicrobiano previne a cárie em indivíduos de alto risco. O verniz com clorexidina a 20% para aplicação profissional se apresenta como a forma farmacêutica mais eficaz do controle da cárie dentária, liberando lentamente por um período de tempo prolongado (MARSH, MARTIN, 2005).

Os géis com clorexidina são formulados na concentração 0,5% e 1% para ser administrado com o auxílio de moldeiras de aplicação profissional sobre uma área de superfície dos dentes, e também são comercializados para prevenção e tratamento da cárie dentária. Nestas formas de apresentação de verniz e gel a ação da clorexidina é direcionada para os dentes, sendo na forma de gel com a menor retenção pelas superfícies da cavidade bucal (HORTENSE et al., 2010).

Uma outra forma de aplicação específica da clorexidina para tratamento de periodontite localizada são as matrizes biodegradáveis de gelatina hidrolisada com 2,5mg de gluconato de clorexidina, comercializado com a marca Periochip®. Esta forma de apresentação, teve indicação para aplicação profissional após terapia mecânica de raspagem e alisamento radicular em bolsas periodontais com profundidade de sondagem superior a 5mm, buscando a descontaminação química bacteriana local nas bolsas periodontais como um auxiliar ao tratamento mecânico periodontal (PERIOCHIP, 2015). A matriz ou pastilha com 2,5 mg de clorexidina permite a liberação mais lenta da clorexidina dentro da bolsa periodontal, com estudos *in vitro* mostrando uma liberação de 40% em 24 horas, e depois a liberação da clorexidina se estende por 7 a 10 dias (DODWAD, 2012).

Lima (2002), avaliou a matriz ou pastilha com 2,5 mg de clorexidina como dispositivo de liberação lenta, com a finalidade de ação associada à raspagem e alisamento radicular para descontaminação de bolsas periodontais no tratamento de periodontite crônica. Com as análises microbiológicas e avaliação clínica periodontal não foi observado diferenças significativas entre os sítios com o uso da matriz em relação à terapia mecânica isolada. Da mesma forma, Dodwad et al. (2012), realizou uma revisão sistemática de estudos clínicos com as matrizes ou pastilhas com clorexidina para liberação lenta, e mostram resultados de redução da profundidade de sondagem das bolsas periodontais tratadas com a terapia da raspagem mecânica associada a ação da clorexidina, entretanto estes resultados não foram clinicamente relevantes.

Ainda para a utilização da clorexidina com aplicação na odontologia, Muniz et al. (2018), desenvolveram e avaliaram o uso de fio dental impregnado com digluconato clorexidina a 2% para o controle do biofilme supragengival e do sangramento gengival a sondagem em pacientes. Foi observado que os melhores resultados foram atingidos com o uso do fio dental impregnado com digluconato a clorexidina em comparação com o fio dental convencional.

A clorexidina também apresenta aplicação nas diferentes áreas da medicina como agente de prevenção de enfermidades ou associados a procedimentos na área médica. Na neonatologia e obstetrícia, aplicações tópicas de clorexidina para lavagem vaginal, limpeza de pele do recém-nascido e do cordão umbilical foram eficazes no controle de infecção do pós-parto. Na cardiologia, nas cirurgias com a inserção de dispositivos intravasculares foi visto que o uso da clorexidina diminuiu a infecção local no uso do cateter. Na urologia, o uso tópico da clorexidina foi eficaz na prevenção da uretrite, e infecções associadas ao cateter urinário. Na oftalmologia, soluções com clorexidina são usadas na prevenção e tratamento de infecções oculares (AMORAS, 2013).

A clorexidina é utilizada rotineiramente em ambiente hospitalar para desinfecção da pele por swab com sabonete líquido ou irrigação com solução a 0,05% antes de procedimentos cirúrgicos (LIM, KAM, 2008). Nos procedimentos cirúrgicos, o uso do sabonete com clorexidina no preparo pré-operatório do paciente e lavagem

pré-cirúrgica das mãos dos profissionais de saúde foram eficientes no controle de infecção (AMORAS, 2013).

A clorexidina associada ao álcool apresenta aplicação como antisséptico para a preparação da pele antes de venopunção e acesso vascular. Em estudo clínico a clorexidina alcoólica reduziu a contaminação de hemoculturas, estando relacionado a um início de ação mais curta e persistente da atividade antimicrobiana na presença de material proteico como o sangue. Também sendo destacado que a preparação da pele antes do acesso vascular com clorexidina reduz a incidência de infecções da corrente sanguínea após hemorragia intravascular com a instalação do cateter endovenoso (LIM, KAM, 2008).

4.3 Toxicidade e efeitos adversos da clorexidina

Relatos pioneiros de observações sobre a toxicidade da clorexidina foi publicado por Foulkes (1973), que classificou a clorexidina com baixo nível de toxicidade em animais e humanos. Foram destacados estudos pioneiros da clorexidina que avaliou a dose letal para uso endovenoso e intra-oral em ratos, sendo observada uma dose letal em altas concentrações para ambos, principalmente por via intra-oral, o que caracteriza a sua baixa toxicidade, sendo estes estudos repetidos por 2 anos e as únicas mudanças observadas foram o aparecimento de células gigantes nos linfonodos abdominais, não sendo encontrado tumores ou outras manifestações nos animais. Avaliações suplementares de efeitos teratogênicos, reprodutor e sensibilidade da pele em ratos, e irritação de olhos em coelhos foram realizados e os resultados foram satisfatórios de forma que não foram encontradas alterações significativas. Em humanos, até a década de 70, apenas dez casos de sensibilidade à clorexidina foram reportados na literatura, e em muitos destes casos não ficou claro se a causa foi do uso da clorexidina ou de outros fatores associados.

Em relatos atuais, o digluconato de clorexidina é considerado estável, e dependendo da sua concentração tem baixa toxicidade aos tecidos, a absorção pela mucosa e pele é mínima, é bem tolerada quando administrada em animais e via

parenteral e intravenosa, não ultrapassa a barreira placentária e não provoca efeitos tóxicos colaterais sistêmicos com o uso tópico prolongado (ZANATTA, RÖSING, 2007; HORTENSE, 2010).

A irritação da pele é dependente da concentração, com baixa probabilidade de causar dermatite quando usados com frequência em lavagem antisséptica (BOYCE, PITTET, 2002). A clorexidina é utilizada rotineiramente para antisepsia da pele por swab ou irrigação com solução a 0,05% antes de procedimentos cirúrgicos, sendo nestes casos o uso tópico da clorexidina associado a dermatite de contato relatado em apenas 2,5 a 5,4% dos pacientes (LIM, KAM, 2008).

Para o uso na cavidade bucal, a clorexidina não penetra no epitélio oral e é pobremente absorvida pelo trato gastrointestinal. Estudos em animais sugerem que a clorexidina é principalmente excretada pelas fezes quando deglutida, e apenas uma pequena quantidade é metabolizada pelo fígado e rins. A dose letal para o digluconato de clorexidina LD₅₀ por via oral é de 1.800 mg/Kg, enquanto por via endovenosa a dose letal LD₅₀ é 22 mg/Kg (MANTHUR et al., 2011).

Reações de hipersensibilidade aguda à clorexidina raramente foram reportadas, embora existam relatos de reações de hipersensibilidade com a aplicação da clorexidina como antisséptico, sendo mais relacionado às aplicações sobre a mucosa do que sobre a pele, sendo um evento pouco comum pois a absorção da clorexidina é mínima. Considerando o amplo uso da clorexidina como antisséptico sobre a pele, a alergia de contato é considerada rara, de forma que a incidência de reações alérgicas à clorexidina esteve relacionado com apenas 1 a 2,5% dos casos (LIM, KAM, 2008).

A hipersensibilidade imediata, que se apresenta na forma de urticária aguda, e pode resultar em choque anafilático é mais rara que a hipersensibilidade tardia à clorexidina. Estas manifestações podem ocorrer durante o contato da pele ou mucosa com clorexidina, e dos cinquenta relatos de casos de anafilaxia relacionada à clorexidina publicados mundialmente em dez anos, quinze ocorreram durante a cirurgia, com os sinais geralmente aparecendo de 15 a 45 minutos após o início da anestesia. Recomenda-se que se houver qualquer suspeita de alergia imediata à

clorexidina, testes de picada ou mesmo técnicas de reação intradérmica sejam realizados antes de procedimentos com uso de clorexidina (BEAUDOUIN et al., 2004).

Um caso de hipersensibilidade imediata e retardada a clorexidina foi reportada em um paciente de 61 anos de idade antes de uma cirurgia de hérnia inguinal, de forma que o paciente apresentou erupção urticária durante a cirurgia nas costas, braços e estômago, o qual foi tratado com glicocorticosteróide endovenoso. Em teste de alergia posterior os resultados foram negativos para os testes cutâneos, intradérmicos e subcutâneos com o anestésico utilizado, o cloridrato de bupivacaína, e com o látex. Em contraste, o teste cutâneo e de contato com gluconato de clorexidina a 1% foi positivo (LAUERMA, 2001).

A ototoxicidade impede o uso da clorexidina em cirurgia envolvendo o ouvido interno ou médio, e também o contato direto com o tecido cerebral e as meninges deve ser evitado. Além disso, deve-se ter cuidado do contato com os olhos ao usar preparações com clorexidina maiores que 1%, podendo causar conjuntivite e danos severos à córnea (BOYCE, PITTET, 2002). Contudo, baixas concentrações de clorexidina são usadas em preparações oftalmológicas sem nenhuma toxicidade (LIM, KAM, 2008).

Alguns casos desenvolveram a síndrome do desconforto respiratório agudo a partir da aspiração de clorexidina diretamente para o pulmão, porém não há informações pré-clínicas sobre a toxicidade pulmonar da clorexidina, uma vez que os seus produtos são geralmente desenvolvidos para desinfecção por uso tópico. Neste contexto, um estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos tóxicos pulmonares agudos da clorexidina após uma introdução gradativa de clorexidina intratraqueal em ratos. Os ratos foram expostos a clorexidina em concentrações de 0,02% e 0,2% ou a água destilada a um volume de 500 µL/kg. Na concentração de 0,2% de clorexidina foi observado alterações nos valores hematológicos e bioquímicos, e também reações de inflamação incluindo edema intra-alveolar e hemorragias, e resultaram na concentração nos pulmões ao nível de cerca de 1,0 µg/g, mantendo-se durante mais de 1 semana (XUE et al., 2011).

A administração acidental endovenosa de 0,8 mg de gluconato de clorexidina foi relatada em um homem de 67 anos, que posteriormente desenvolveu síndrome do

desconforto respiratório agudo. O paciente foi tratado imediatamente com troca de plasma e oxigenação por membrana extracorpórea, apresentando a recuperação completa (ISHIGAMI, 2001).

Em estudo pré-clínico em animais, formulações sem e com digluconato de clorexidina a 0,5% e 4%, foram testadas quanto aos seus efeitos na cicatrização de incisões e abrasões induzidas cirurgicamente em cobaias machos. Cada incisão e abrasão foi irrigada com o material designado no momento da cirurgia e diariamente até a necropsia. As cobaias foram mortas nos dias 3, 6, 9, 14 e 21 e os locais da ferida foram removidos e fixados para avaliação histológica da cicatrização. Nos dias 6 e 9, as duas formulações contendo clorexidina a 4% produziram um ligeiro atraso na cicatrização quando comparadas com os outros grupos de tratamento. Estas diferenças diminuíram com o tempo e, no dia 21, não houve diferenças histológicas notáveis de evidência de toxicidade entre os animais dos vários grupos de tratamento (SAATMAN et al., 1986).

Uma análise da toxicidade foi realizada em ratos com o hidrogel de quitosana e clorexidina. Os resultados não apresentaram toxicidade aguda, sendo a dose máxima tolerada foi de 400 mg/mL (JI et al., 2010). Resultados positivos à toxicidade foram observados com aplicação subcutânea em ratos por FARIA et al. (2007), que analisaram *in vivo* a lesão induzida por injeções de clorexidina na pata de camundongos, e *in vitro* o modo de morte celular, e o estresse celular causado pela exposição de fibroblastos cultivados em clorexidina. A clorexidina injetada no espaço subplantar induziu efeitos tóxicos severos, evidenciados por alterações necróticas na epiderme, derme e tecido subcutâneo em associação com resposta inflamatória reativa, particularmente em altas concentrações. E na cultura de fibroblastos, a clorexidina induziu a apoptose em concentrações mais baixas e necrose em concentrações mais altas e aumentou a expressão da proteína indicadora de estresse celular.

A clorexidina apresenta toxicidade quando observado estudos *in vitro* dos efeitos diretos sobre células isoladas. A citotoxicidade *in vitro* da clorexidina foi avaliada com uma linhagem celular epitelial, onde foi observado a toxicidade da clorexidina dependente da duração da exposição e da composição do meio de

exposição. Foi observado que a toxicidade de uma exposição de 24 horas à clorexidina para as células foi progressivamente diminuída, em especial quando a exposição foi associado a outros componentes como o soro fetal bovino, a albumina, a lectina e a bactéria *Escherichia coli*, sendo estas reduções na toxicidade devidas à ligação catiônica da clorexidina às porções químicas carregadas negativamente dos outros componentes (BABISH et al., 1995).

O digluconato de clorexidina pode ser usado sobre a superfície de dentina antes da restauração do adesivo de cavidades dentárias, contudo em dentes com vitalidade pulpar este pode se difundir através dos túbulos dentinários para a monocamada de odontoblastos no interior da polpa dental. No mesmo contexto de estudo celular *in vitro*, foi avaliado o efeito citotóxico de diferentes concentrações de clorexidina em células do tipo odontoblasto cultivadas, Lessa e colaboradores, em 2010, avaliaram estas células expostas a soluções de clorexidina nas concentrações de 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% e 2% por 60 segundos, 2 horas ou 60 segundos com um período de recuperação, sendo analisado o metabolismo celular e a concentração total de proteínas. Ao longo do tempo, todas as concentrações de clorexidina tiveram um elevado efeito citotóxico direto nas células em cultura.

Fibroblastos humanos derivados da pele e tecidos orais foram testados quanto ao efeito da clorexidina sobre a viabilidade, crescimento, contrações do gel de colágeno e síntese total de proteínas. As células foram expostas durante uma hora a 0,005% e 0,002% de clorexidina, e durante 30 segundos a clorexidina a 0,12%. Os resultados indicaram que uma concentração de 0,002% da droga mostra citotoxicidade mínima, mas é capaz de suprimir quase completamente a divisão celular. A contração do gel de colágeno, como modelo de contração da ferida, também foi severamente afetada por todas as concentrações de clorexidina utilizadas, de forma que a síntese total de proteína foi suprimida pela clorexidina em cultura de gel de colágeno. Os dados suportam a hipótese de que a clorexidina é citotóxica para as células *in vitro*, afetando funções celulares como proliferação, contração de gel de colágeno e síntese de proteínas em diferentes concentrações da droga (PUCHER, DANIEL, 1993).

Uma análise da toxicidade em células tronco-mesenquimais humanas foi realizada para micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina, hidróxido de cálcio puro e clorexidina pura, tendo sido analisado o percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações. As micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina e o hidróxido de cálcio puro mostrou um percentual de viabilidade celular maior que 90%, enquanto a clorexidina pura reduziu a viabilidade celular para um percentual entre 60 a 80%, tendo o efeito citotóxico maior associado à maior concentração da clorexidina (PRIYADARSHINI et al., 2017).

Os efeitos adversos observados estão relacionados com o manchamento nos dentes, maior formação de cálculo, alteração reversível do paladar e irritação aos tecidos com sensação de queimação e descamação da mucosa. Contudo, o relato dos efeitos adversos é dependente da sua concentração, de forma que nas concentrações iguais ou inferiores a 0,2% os efeitos adversos são menos evidentes (ZANATTA, RÖSING, 2007). A clorexidina tem sua aplicação mais frequente em soluções orais a 0,12%, 0,2% e a 2%, tendo na concentração de 2% demonstrado os melhores efeitos antibacterianos, entretanto nesta concentração apresenta os maiores índices de efeitos adversos. Os efeitos adversos também podem ser observados nas concentrações de 0,12 e 0,2% de clorexidina, em especial sob protocolo clínico de uso prolongado (LABEAU et al., 2011).

Os efeitos adversos na mucosa bucal pelo uso da clorexidina são menos frequentes. Tendo sido encontrado em ensaios clínicos de adultos relatos de irritação, eritema, descamação superficial, úlcera, glossite e boca seca (KUMAR, 2017).

Em estudo clínico dos efeitos do bochecho de clorexidina com e sem álcool, utilizados por 4 dias, foi observado que os efeitos adversos mais frequentes relatados pelos participantes foram sensação de queimação na boca, gosto amargo após o enxágue, e alteração do paladar. A frequência de eventos adversos foi significativamente maior quando se utilizou a solução de clorexidina com álcool representando 57,1%, enquanto a frequência para a solução de clorexidina sem álcool foi de 28,6% (SANTOS et al., 2017).

Em análise recente de estudos clínicos randomizados foram avaliados os efeitos do enxaguatório bucal com clorexidina usado como adjuvante de

procedimentos mecânicos de higiene oral por pelo menos quatro semanas no tratamento de gengivite em crianças e adultos. O uso da clorexidina reduziu a gengivite leve e o acúmulo de placa bacteriana. Os efeitos adversos relatados foram a alteração do paladar, sintomas da mucosa oral incluindo dor, irritação, descamação na mucosa, sensação de queimação na língua, e a coloração extrínseca dos dentes (RICHARDS, 2017).

Não é totalmente esclarecida a etiologia dos manchamentos dentários extrínsecos por agentes químicos utilizados na prevenção da formação do biofilme. Considera-se três possíveis mecanismos: as reações de escurecimento não enzimáticas, também conhecida por reações de Maillard; a formação de sulfuretos metálicos pigmentados por Ferro (Fe) e Estanho (Sn); e os produtos de reação de constituintes de alimentos, bebidas e compostos químicos. Sendo as reações de escurecimento e a formação de sulfetos metálicos pigmentados as causas mais prováveis dessas colorações, enquanto fatores dietéticos podem ter um papel modificador (ERIKSEN et al., 1985). Há evidências de que a coloração é causada pela interação ou precipitação de cromogênios na dieta quando a clorexidina é adsorvida localmente, e na presença de componentes alimentares cromogênicos como chá, café e vinho tinto os corantes da clorexidina produzem compostos coloridos na hidroxiapatita do dente que leva ao manchamento (ZANATTA et al., 2010).

Zanatta et al. (2010) realizaram um estudo clínico randomizado para avaliar o efeito de manchamento dentário e formação de cálculos após bochechos de clorexidina a 0,12% em superfícies dentárias com e sem a formação de biofilme. No estudo, os participantes abandonaram os métodos mecânicos de higiene durante 25 dias, após 4 dias de acúmulo de biofilme os indivíduos tiveram dois quadrantes da boca limpos e permaneceram dois quadrantes com superfícies dentárias revestidas de placa, e em seguida os indivíduos iniciaram o bochecho com clorexidina a 0,12% por 21 dias para avaliação da intensidade e extensão do índice de manchamento, bem como a formação do cálculo. Foi observado que 26,19% das superfícies dentárias com acúmulo de biofilme apresentaram cálculo, enquanto o cálculo foi observado apenas em 4,52% nas superfícies dentárias que foram limpas. Com isso, foi

demonstrado que a remoção do biofilme antes do início dos enxaguatórios bucais com clorexidina reduz os efeitos colaterais de manchamento dentário e acúmulo de cálculo.

O gluconato de clorexidina tem um efeito reversível na percepção do paladar. Esse aspecto foi estudado por Helms et al. (1995), de forma que as classificações da intensidade do sabor e a identificação da qualidade do sabor para sacarose, cloreto de sódio, ácido cítrico e cloridrato de quinina foram obtidas de 15 humanos saudáveis que realizaram bochechos com clorexidina a 0,12% por 3 min duas vezes ao dia. Os bochechos com clorexidina reduziram a intensidade da percepção de cloreto de sódio associado ao salgado e cloridrato de quinina associado ao amargo, e não de sacarose ou ácido cítrico. Nenhum efeito na percepção do paladar foi detectado 4 dias após os testes, mostrando o seu efeito reversível. Segundo os autores, a clorexidina tem ação no epitélio gustativo, tendo efeitos sobre o reconhecimento do sabor salgado e amargo.

A clorexidina é o único bloqueador conhecido do sabor salgado humano, e para caracterizar os efeitos da clorexidina na identificação do estímulo, Gent et al. (2002), mediram a alteração gustativa para gluconato de clorexidina comparado com controles. Os resultados demonstram uma diminuição da capacidade de identificar estímulos gustativos, relacionado com as alterações na capacidade do estímulo de provocar percepções salgadas e sabor amargo. Os autores classificaram a clorexidina como bloqueador seletivo, efetivo, persistente e reversível das percepções gustativas, podendo ser útil na definição de mecanismos gustativos em humanos.

A partir de suas propriedades antimicrobianas comprovadas e segurança de utilização clínica há seis décadas, além de ser considerada desde 1997 o antisséptico padrão-ouro *vitro/vivo* pela Organização Mundial de Saúde, a clorexidina é uma alternativa na prevenção e no tratamento de doenças bucais, apesar de apresentar efeitos adversos (HORTENSE et al., 2010).

CAPÍTULO II

5. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CLOREXIDINA

5.1 Sistema de liberação controlada de fármacos

A tecnologia de liberação de drogas no local e tempo determinado, ou seja, em sistema de liberação controlada desenvolve partículas com aplicação biomédica e de biotecnologia. As drogas preparadas para liberação controlada podem ser integradas em uma matriz ou em partículas inseridas na superfície, de forma que a carga de partículas, as propriedades de superfície e a hidrofobicidade podem ser preparadas para serem adsorvidas em órgãos ou tecidos específicos (MARCATO, DURÁN, 2008).

Relativo ao tempo de liberação da droga, o fármaco pode ser classificado com o tempo de liberação prolongado. A Farmacopéia Brasileira (2010) define a liberação prolongada como o tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que possibilita pelo menos uma redução na frequência de dose quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação convencional. É obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação.

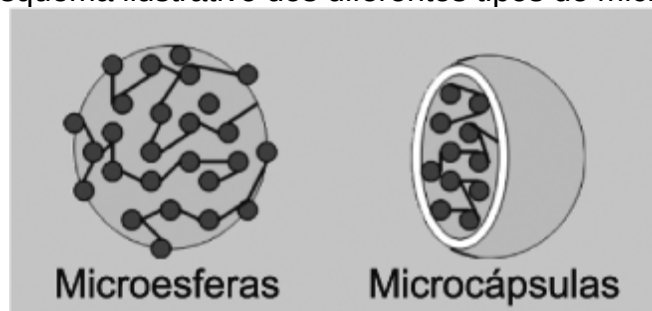
Nas últimas décadas, avanços significativos foram feitos no desenvolvimento de liberação controlada de medicamentos, que tem por objetivo manter a concentração do fármaco no sangue ou nos tecidos-alvo em um valor desejado pelo maior tempo possível. Há uma grande variedade de formulações dedicadas à liberação controlada de fármaco por via oral e também em propriedades físicas que influenciam na liberação de drogas a partir dessas formulações (DASH et al., 2010).

O mecanismo dos sistemas de liberação controlada tem se destacado devido ao potencial terapêutico, à maior estabilidade nos fluidos biológicos, além da estabilidade durante o armazenamento, sendo representados pelas micropartículas e os sistemas coloidais, dentre elas as nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanopartículas e micropartículas têm sido desenvolvidas para promover proteção contra agentes que causam degradação, e assim melhorar a estabilidade da droga, além de prolongar a sua exposição por liberação controlada (MARCATO, DURÁN, 2008; BIZERRA, SILVA, 2016).

As partículas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macropartículas com dimensões maiores ou iguais a 5.000 μm , em micropartículas com dimensões entre 0,2 a 5.000 μm , e nanopartículas cujas dimensões são menores ou iguais a 0,2 μm (PEREIRA et al., 2018). As vantagens das nanopartículas sobre as micropartículas estão relacionadas ao tamanho abaixo de micro das nanopartículas que eleva a absorção intracelular quando comparado com as micropartículas, isso determina a indicação das nanopartículas quando é esperada uma ação intracelular a partir de uma administração oral ou tópica (REIS et al., 2006).

Micropartículas são partículas poliméricas matriciais conhecidas por reservatórios que são classificadas em microesferas ou microcápsulas, de forma que ambas promovem a liberação controlada de fármacos ou substâncias biologicamente ativas hidrofílicas ou hidrofóbicas. Nas microesferas o fármaco está disperso na matriz polimérica, estando distribuído por toda a matriz que é composta por um material homogêneo, enquanto nas microcápsulas há uma cápsula formada pela parede polimérica ou agente encapsulante que envolve uma cavidade oca ou aquosa onde se encontra o fármaco, como ilustrado na Figura 2 (REIS et al., 2006; PIMENTEL et al., 2007; MARCATO, DURÁN, 2008; MATTÉ, DA ROSA, 2013).

Figura 2 - Esquema ilustrativo dos diferentes tipos de micropartículas.



Fonte: Pimentel et al., 2007.

A caracterização físico-química das micropartículas e nanopartículas apresenta dificuldades técnicas e envolve diferentes metodologias para a avaliação morfológica; a distribuição e tamanho de partícula; a distribuição da massa molar do polímero; a determinação do pH; a determinação da quantidade do fármaco associado às

nanoestruturas; a cinética de liberação do fármaco; e ainda a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os métodos de preparo das micropartículas se classificam em métodos físicos representados pelo Spray drying (secagem em atomização), Spray freezing (secagem por liofilização após congelamento), Spray chilling (nebulização em corrente ar frio), Spray cooling (secagem por resfriamento) e co-cristalização; métodos químicos representados por inclusão molecular e polimerização interfacial; e métodos físico-químicos representados por coacervação e separação de fase orgânica em formação de lipossomas (MATTÉ, DA ROSA, 2013).

Nas micropartículas ou nanopartículas de suspensões aquosas, com o decorrer do tempo, podem ocorrer problemas com o armazenamento formando precipitados, assim como problemas de estabilidade físico-química. Dessa forma, tem sido priorizado o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de micropartículas ou nanopartículas, cujos problemas de estabilidade podem ser reduzidos por meio da secagem das suspensões. Neste contexto, a metodologia de preparo por liofilização tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, empregando-se um carboidrato para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em processo de preparação de formas farmacêuticas, a liofilização se mostra como uma técnica com pré-requisitos que caracterizam a biodisponibilidade da droga a partir da formulação em pó (CALLENS, REMON, 2000).

A liofilização é uma técnica de secagem amplamente utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos para preservar materiais na forma seca. A técnica permite aumentar a estabilidade do produto preparado por impedir que reações químicas afetem os componentes, o que aconteceria na presença de água ou umidade. Na técnica ocorre um processo físico de sublimação, precedido por um processo de congelamento, ocorrendo em três etapas. A primeira etapa é o congelamento dos componentes líquidos e a formação de cristais de gelo que determina a formação, o tamanho e a conexão entre os poros, e também influencia no aspecto e consistência do produto final. Na segunda fase ocorre a sublimação dos cristais de gelo por aplicação de baixa temperatura em torno de -10°C e pressão aproximada de 2mmHg,

onde o gelo se torna vapor de água. E na terceira fase o final da água ainda presente, em torno de 10 a 35%, é retirada com temperaturas em torno de -20 a -50°C e com pressão ainda mais baixa, obtendo um material seco e poroso (MORAIS et al., 2016; BALLESTEROS et al., 2017).

Os materiais mais utilizados como excipientes encapsulantes para o preparo de microcápsulas ou microesferas são os carboidratos como amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celulosas e a quitosana; as gomas como a goma arábica, alginato de sódio, carragena; os lipídeos como cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas; os poliésteres naturais poli(hidroxicanoatos); os polímeros sintéticos como poli(D, L-ácido láctico), poliacrilatos, copolímeros de polietileno-co-propileno, poli(ϵ -caprolactona); e as proteínas como glúten, caseína, gelatina, albumina (MATTÉ, DA ROSA, 2013).

Entre os materiais comumente utilizados como excipiente em processos de preparo de micropartículas destaca-se os carboidratos, sendo as ciclodextrinas um carboidrato composto de unidades de glicose, resultante da degradação do amido pela ação da enzima denominada amilase ciclodextrina glicosil transferase. Com a modificação enzimática é possível obter a ciclização de seis, sete ou oito partes de glicose, dando origem a α , β e γ ciclodextrina. A estrutura da ciclodextrinas é formada por hidroxilas nas pontas tornando-as solúveis em água, devido à facilidade de ligações de hidrogênio com o solvente, enquanto as hidroxilas no interior da cavidade permitem um caráter hidrofóbico (BRITTO et al., 2004).

As ciclodextrinas e seus derivados têm aplicação em diferentes áreas para a liberação de fármacos, sendo sua aplicação indicada no desenvolvimento de lipossomas, microesferas, microcápsulas, micropartículas e nanopartículas com efeitos conhecidos na solubilidade, biodisponibilidade, segurança e estabilidade da droga (CHALLA et al. 2005). A aplicação das ciclodextrinas e seus derivados se estendem para a área farmacêutica, sistemas de liberação de drogas, cosméticos, nutrição, e ainda a indústria química e têxtil. Devido a possibilidade de mudanças nas propriedades químicas e físicas das moléculas de inclusão complexadas com a ciclodextrina, a aplicação desta são de grande interesse comercial e pode oferecer soluções em problemas na área de aplicação científica (SHAMA, BALDI, 2016).

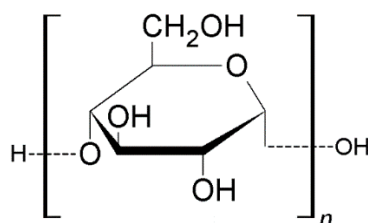
As ciclodextrinas podem formar complexos com vários tipos de moléculas incluindo moléculas inorgânicas, orgânicas ou organometálicas que pode ser radical, catiônica, aniônica ou moléculas neutras, sendo este fenômeno denominado de reconhecimento molecular (LAZA-KNOERR et al., 2010). As ciclodextrinas tem sido usada em formulações farmacêuticas para aumentar a biodisponibilidade oral, permitido pela interação entre a droga e a ciclodextrina que modificam as propriedades de dissolução e absorção da droga, sendo esta a chave para o processo de liberação controlada (CARRIER et al., 2007).

Dentre os derivados da ciclodextrina, destaca-se a maltodextrina que é obtida da mistura de carboidratos, usado como suplemento nutricional, e tem sido utilizado com sucesso como excipiente em preparações farmacêuticas para o sistema de liberação lenta de fármacos (WELSH, RHODES, 2001; CANO-HIGUITA et al., 2015; BALLASTEROS et al., 2017).

5.2 Considerações sobre a maltodextrina

A maltodextrina é um polímero sacarídeo nutritivo, que consiste de unidades D-glicose ligadas por cadeia α 1-4, resultante da hidrólise do amido de milho por ação ácida (HCl) ou enzimática (α -amilase) do amido gelatinizado resultando em oligossacarídeos com a média de 5 a 10 unidades de glicose por molécula. A sua forma estrutural está representada na Figura 3. Normalmente se apresenta comercialmente na forma de pó ou grânulos brancos, tem característica higroscópica, e possui pH ente 4.9 e 7.0 (CANO-HIGUITA et al., 2015).

Figura 3 - Fórmula estrutural da maltodextrina. Imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.



Fonte: Autora.

Na nutrição, a maltodextrina é um polímero que vem sendo utilizado como recurso dietético para a prática de atividades físicas, cuja função é manter os níveis de glicose durante o exercício. A sua indicação se justifica pois como o esvaziamento gástrico do polímero de glicose é mais lento que as soluções de glicose isoladas, com isso evita-se uma queda repentina da glicose no sangue e uma consequente hipoglicemia induzida pela hiperinsulinemia durante a realização da atividade física (HOSSEINI, ROOHI, 2010).

Yoshikawa et al. (2013) realizaram uma avaliação da segurança da maltodextrina resistente hidrogenada por meio de um ensaio de mutação reversa, toxicidade oral repetida aguda e subcrônica de 90 dias em ratos, além da reação por ingestão aguda sobre a diarreia em humanos. O ensaio de mutação reversa não mostrou mutagenicidade. Nos estudos em ratos de toxicidade oral aguda e subcrônica de 90 dias não foi observado morte ou reações tóxicas em nenhum grupo, incluindo o grupo que recebeu a dose única mais alta de 10 g/kg de peso corporal ou a dose mais alta de 5 g/kg de peso corporal por dia durante 90 dias. Os estudos realizados em humanos adultos saudáveis mostraram que o nível agudo de ausência de efeito da maltodextrina hidrogenada resistente para diarreia foi de 0,8 g/kg de peso corporal para homens e mais de 1 g/kg de peso corporal para mulheres. Com esses resultados de avaliação de segurança os autores sugerem que a maltodextrina resistente hidrogenada é segura para o consumo humano.

No Brasil, foi expedida uma petição junto à Gerência de Pós Registro de Alimentos da ANVISA para inclusão da maltodextrina resistente como constituinte na categorização de nutrientes como fibra alimentar para suplementos alimentares. A maltodextrina resistente já foi aprovada por outros órgãos reguladores internacionais com o registro para suplemento alimentar como Health Canada no Canadá, FDA nos Estados Unidos, além de órgãos reguladores da Nova Zelândia, Itália, Japão, México e outros países (VIVA NUTRIÇÃO, 2018).

A maltodextrina é resultado da hidrólise do amido, e segundo estudos clínicos o amido resistente tem propriedades semelhantes a fibras e mostra benefícios fisiológicos em humanos, podendo resultar em prevenção de doenças. Por ser um alimento resistente à digestão, é fermentado no intestino grosso, principalmente pelas

bifidobactérias, o amido resistente é um alimento prebiótico, inibindo o crescimento de células cancerígenas devido à redução do pH no intestino grosso. Além disso, contribui para a produção da energia liberada ao longo do tempo de uma digestão lenta, e para a queda do índice glicêmico dos alimentos, proporcionando uma menor resposta glicêmica e uma resposta insulínica mais adequada, além de manter o indivíduo com sensação de saciedade por mais tempo (PEREIRA, 2007).

Na indústria farmacêutica, a maltodextrina é utilizada como um excipiente em formulações interferindo em propriedades críticas da formulação, tais como estabilidade e biodisponibilidade. A maltodextrina fornece mais estabilidade ao fármaco, sendo considerada segura e não-tóxica, e com solubilidade em água. Se apresenta como um pó branco, sem sabor e sem atividade farmacológica, o que permite ser usado como diluente ou excipiente no processamento de formulações farmacêuticas (PARIKH, 2014).

A maltodextrina tem aplicação como agente encapsulante em processos de microencapsulação de fármacos, tendo sua utilização como excipiente na microencapsulação por sua baixa higroscopicidade, alta solubilidade e baixo custo. Mostra efeito antioxidante e boa retenção de substâncias voláteis, e apresentam também baixa viscosidade. Micropartículas produzidas com maltodextrina apresentam a vantagem de ter um alto percentual de rendimento e eficiência (PEREIRA et al., 2018).

Edgren et al. (1991) publicaram uma patente de invenção de uma forma farmacêutica de dosagem de medicamento com maltodextrina. A invenção preparou um compartimento de maltodextrina envolvendo a droga, e enquanto a maltodextrina foi sendo consumida, o medicamento foi sendo liberado e manteve a sua integridade química e atividade terapêutica. A maltodextrina foi compatível com a droga e promoveu a sua completa liberação.

Um método de suspensão foi desenvolvido para produzir proniossomas, que são vesículas tensoativas não iônicas que possuem potencial aplicação na liberação de drogas, usando maltodextrina como veículo. Foi descrito que a flexibilidade do método de preparação do proniossomo permitiu a otimização do encapsulamento do fármaco na formulação final com base no tipo e quantidade de maltodextrina,

caracterizando esta formulação como um método prático e simples de produção (WELSH, RHODES, 2001). Neste mesmo contexto, Chandra e Sharma (2008), desenvolveram um sistema de liberação de drogas com base em proniossomas de piroxicam produzidas com maltodextrina, tendo sido observado que a formulação farmacêutica em gel alcançou os objetivos terapêuticos com uma redução significativa da inflamação em estudo de aplicação tópica transdérmica em ratos.

A maltodextrina tem sido usada como polímero solúvel em água para o preparo de medicamentos em sistema de administração de dissolução rápida. Esta forma farmacêutica é uma alternativa a comprimidos, cápsulas e xaropes para pacientes pediátricos ou geriátricos que apresentam dificuldades para engolir formas tradicionais de solidificação oral. A maltodextrina pela sua solubilidade, tem a capacidade de se dissolver em pouco tempo quando exposto à saliva e formar uma solução com a droga que é facilmente engolida pelo paciente (ARYA et al., 2010).

Também com aplicação para pacientes com dificuldades de deglutir comprimidos, tiras de dissolução rápida foram preparadas com 2% de HPMC e 3,5% de maltodextrina para liberação do fármaco verapamil, que é um bloqueador de canais de cálcio usado como antianginal, antiarrítmico e anti-hipertensivo. Com base nos parâmetros de avaliação, a formulação contendo HPMC e maltodextrina apresentou um ótimo desempenho, com taxa de dissolução aumentada, mascaramento de sabor, melhor adesão do paciente e eficiência terapêutica (KUNTE, TANDALE, 2010).

Foi desenvolvido uma formulação em pó seco para testes de administração nasal de insulina em coelhos, tendo como excipientes o amido de milho ceroso seco em tambor ou maltodextrina com diferentes valores diferentes de Carbopol® 974P, preparados por liofilização de uma dispersão destes excipientes com insulina. A biodisponibilidade obtidas com as formulações em pó contendo o amido de milho ceroso seco em tambor/Carbopol® 974P foi maior do que aquelas contendo misturas de maltodextrinas/Carbopol® 974P. Contudo, quando associado 10% a mais de Carbopol® 974P com a maltodextrinas obteve-se um aumento significativo da biodisponibilidade (CALLENS, REMON, 2000).

Ballasteros et al. (2017), avaliaram a encapsulação de compostos fenólicos pelos métodos de freeze-drying ou liofilização e spray-drying usando diferentes

materiais como matriz encapsulante. Foi observado que os melhores resultados foram vistos quando os compostos fenólicos foram encapsulados por liofilização usando a maltodextrina como material encapsulante. Segundo os autores, a seleção do material da matriz e o método de secagem utilizado influenciam na eficiência da retenção dos ativos no interior da matriz.

5.3 Desenvolvimento de micropartículas e microcápsulas com clorexidina

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada a partir de micropartículas e nanopartículas tem sido aplicada visando inúmeras indicações clínicas, dentre elas a administração de antibióticos (SCHAFFAZICK et al., 2003). Com a ampla versatilidade de aplicação em diversas áreas de cuidado à saúde as formulações de liberação controlada são ferramentas inevitáveis para a exploração do conceito moderno de terapêutica de tratamento, cujo objetivo é aumentar a eficácia da droga e a adesão do paciente, para reduzir a frequência de administração e os efeitos adversos e colaterais associados à dosagem (DASH et al., 2010).

Os sistemas de liberação controlada de antimicrobianos tem demonstrado eficácia e vantagens em relação ao uso dos fármacos tradicionais. Visto que, com a liberação estável do fármaco durante um longo período de tempo e em baixas concentrações, há uma melhora da biocompatibilidade e redução dos efeitos adversos e citotóxicos com os mesmos resultados terapêuticos (ONE, 2014).

A tecnologia de microencapsulação para fármacos de uso oral ou tópica busca uma solução para minimizar os problemas de administração da droga convencional, e com isso promover uma alternativa de administração para melhorar a perfil de liberação e biodisponibilidade do fármaco. A escolha do excipiente para o preparo das micropartículas é fundamental para suas as propriedades funcionais, e consequentemente melhorar o desempenho do fármaco. A superfície das micropartículas e nanopartículas é também uma consideração muito importante para direcionar o alvo e o tempo de liberação da droga (REIS et al., 2006; ONE, 2014).

Micropartículas de quitosana contendo clorexidina foram desenvolvidas pela técnica de spray-drying para preparações de formulações de tabletes para uso na

cavidade bucal. A atividade antimicrobiana das micropartículas foi investigada, e a incorporação da clorexidina em quitosana foi capaz de manter ou melhorar a atividade antimicrobiana do fármaco, principalmente contra *Candida albicans*. Após a administração *in vivo*, a presença da clorexidina na saliva mostrou a capacidade dessas formulações em liberar o fármaco de forma prolongada na cavidade bucal (GIUNCHEDI, 2002).

Um hidrogel de clorexidina a 0,1% com quitosana foi sintetizado para liberação lenta para utilização em tratamento periodontal. A clorexidina foi liberada por mais de 18 horas, e apresentou uma excelente atividade inibitória contra os patógenos periodontais (JI et al., 2010). Uma análise de liberação sustentada da clorexidina com formação de micropartículas tendo como agente excipiente a quitosana e o alginato observou a liberação lenta da clorexidina durante o período de 7 dias em saliva artificial, mantendo a eficácia antimicrobiana comparáveis com a clorexidina livre (BARBOZA, 2013).

Lins (2011) estudou um sistema polimérico com quitosana para a liberação controlada de clorexidina com potencial aplicação na cavidade oral. Foram desenvolvidos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de clorexidina, reticulados com glutaraldeído e não reticulados, os mesmos foram caracterizados e analisados *in vitro* para avaliar a liberação e a atividade antimicrobiana. No estudo foi detectada uma liberação da clorexidina durante 8 horas a partir da membrana tripla de quitosana reticulada, e com o teste microbiológico de difusão em ágar foi mostrado que a clorexidina continuou ativa, mantendo as suas propriedades antimicrobianas após sua incorporação ao filme de quitosana.

A clorexidina foi incorporada às partículas poliméricas de Poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA) e associado à selante resinoso com flúor objetivando a liberação lenta dos agentes antimicrobianos para aplicação química de prevenção da cárie dentária, sendo obtido uma liberação lenta e gradual da clorexidina e do flúor com excelente atividade antimicrobiana (NOJOSA, 2014).

Neste mesmo contexto, outra aplicação da clorexidina incorporada ao PLGA foi desenvolvida para a associação com cimento de ionômero de vidro, cuja indicação são restaurações de cavidades de cárie. A incorporação de micropartículas de

clorexidina em cimento de ionômero de vidro não alterou as propriedades físico-químicas do material, manteve o efeito antibacteriano e permitiu a liberação lenta e gradual da clorexidina (MORAIS, 2015).

Micropartículas e nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco associadas a clorexidina a 0,4% foram preparadas como pastas para medicação intracanal. As pastas com incorporação de clorexidina apresentaram o melhor efeito contra o *Enterococcus faecalis* após 30 segundos de aplicação, enquanto as pastas sem clorexidina obtiveram resultados semelhantes após 60 segundos, e todas as pastas apresentaram aumento do pH. Tais resultados mostram a eficácia da preparação das partículas com a associação de clorexidina e o seu melhor efeito antimicrobiano (AGUIAR et al., 2015).

Micropartículas de hidróxido de cálcio carregadas com clorexidina foram preparadas para utilização como material de capeamento pulpar com o objetivo de liberação lenta da clorexidina, através do método de precipitação química aquosa modificada. As micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina apresentaram uma boa eficácia antibacteriana e demonstraram a liberação de clorexidina por um período de 15 dias enquanto manteve alta alcalinidade, sendo estas características importantes como habilidades potenciais para a aplicação com a indicação para material de capeamento pulpar (PRIYADARSHINI et al., 2017).

Buscando o desenvolvimento de um sistema de liberação lenta para a clorexidina, foi desenvolvido a microencapsulação da clorexidina, sendo testados como agentes encapsulantes a maltodextrina, a quitosana e a celulose microcristalina. A clorexidina a 0,12%, quando microencapsulada com o agente encapsulante maltodextrina formou um composto que apresentou o melhor efeito antibacteriano. Isto mostra que a clorexidina apresenta parâmetros viáveis para o processo de microencapsulação com a maltodextrina, e esta microencapsulação permite, por sua vez, um efeito de liberação lenta do fármaco. Este aspecto é importante para a utilização clínica, visto que pelo potencial de liberação lenta da microencapsulação, o composto pode ser produzido com uma concentração mais baixa que a clorexidina livre e apresentar efeitos semelhantes, ou mesmo o composto pode ser produzido

com a concentração da clorexidina a 0,12%, que representa o padrão comercial e ter a sua ação prolongada (ONE et al., 2014).

Micropartículas de clorexidina foram depositadas diretamente na superfície dos nanobastões de ouro e depois estabilizadas com encapsulação de multicamadas de polieletrólito, produzindo novas partículas compostas de fármaco-nanobastões de ouro com alta carga de fármaco e sensibilidade à luz infra-vermelho. Os compostos encapsulados de nanobastões de ouro-clorexidina respondem à luz infravermelho com comprimento de onda de 840 nm que aumenta a temperatura nos cristais de clorexidina, seguida pela dissolução das micropartículas e ruptura das cápsulas, produzindo uma liberação gradual da clorexidina por múltiplos ciclos de exposição à luz infra-vermelho, com boa biocompatibilidade e atividade antimicrobiana. O método proposto de liberação deste composto de clorexidina ativado por luz infra-vermelho pode ser útil para futuras aplicações clínicas (LUO et al., 2017).

CAPÍTULO III

6. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA

6.1 Preparo da micropartícula de maltodextrina e clorexidina

O preparo das micropartículas de maltodextrina e clorexidina teve por objetivo melhorar a estabilidade do princípio ativo clorexidina, mantendo as suas propriedades antimicrobianas, e assim promover a liberação lenta da clorexidina do microparticulado como sistema de liberação controlada.

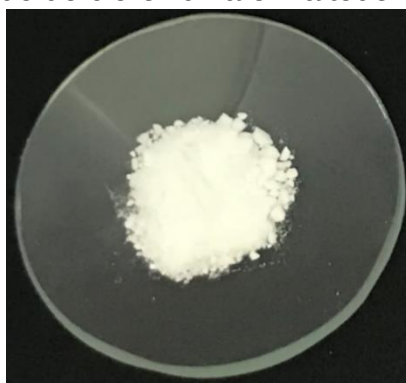
Dentro deste contexto, as micropartículas de clorexidina e maltodextrina foram preparadas com digluconato de clorexidina (CLX) e a maltodextrina (MT) como adjuvante tecnológico, o qual foi denominado pela sigla MP:CLX:MT, representando micropartículas de clorexidina e maltodextrina. Para o preparo das micropartículas foi seguido a técnica patenteada e validada segundo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez dos autores One et al. (2014), com registro no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual com número: BR 10121411241 e título: “Produto farmacêutico, liofilizado, antimicrobiano, microencapsulado consistindo de digluconato de clorexidina e maltodextrina”, tendo a patente registrada sob orientação dos professores Dr. Fábio Correia Sampaio e Dr. Fábio Santos de Souza, respectivos orientador e co-orientador deste trabalho de tese.

A técnica patenteada foi reproduzida misturando 2,4 mL da solução de digluconato de clorexidina a 20% (SIGMA-ALDRICH®, lote BCBK1284V), correspondendo a 0,48 g de clorexidina, com 40mL de água destilada durante 2 min no agitador mecânico (DHERMO-CHACKER VHTD MOD INC-4AG). Após a agitação foi adicionado 19,520 g de maltodextrina (GALENA®, lote 1611022102) como excipiente do microparticulado, durante 10 minutos no mesmo agitador mecânico. O microparticulado foi congelado num freezer a -20 °C durante 48 horas, e em seguida, colocado no liofilizador (L101 da marca LIOTOP®) com temperatura de -40 °C e vácuo 1250 mmHg, sendo mantido por um tempo de 12 horas até o ressecamento total pelo processo de liofilização.

Após o processo de liofilização, o produto liofilizado foi retirado das placas do liofilizador e triturado manualmente com grau e pistilo de porcelana, sob pressão leve executados pelo mesmo operador, para a obtenção do pó do microparticulado de clorexidina e maltodextrina MP:CLX:MT.

As micropartículas foram preparadas em um lote 1 para teste da reprodutibilidade da técnica, e um lote 2 para os testes de caracterização das micropartículas, os testes microbiológicos e o preparo da forma farmacêutica, obtendo uma cor branca e característica granular (Figura 4). O preparo do lote 2 foi realizado em uma proporção três vezes maior dos volumes descrito na patente, objetivando obter uma quantidade maior do produto de um mesmo lote para a realização dos experimentos.

Figura 4 - Microparticulado de clorexidina e maltodextrina obtido por liofilização.



Fonte: Autora.

Com a validação da patente One et al. (2014), confirmou-se a concentração de 2,4 mg de digluconato de clorexidina para cada 100 mg do pó do microparticulado. Sendo esta proporção da quantidade de clorexidina por mg do microparticulado utilizada como referência para cálculo de concentração da clorexidina em todos os experimentos.

O pó do microparticulado obtido foi armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechado, protegido da luz e da umidade, e sob temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. O microparticulado preparado do lote 2 foi distribuído em dois recipientes de volumes iguais, um para análises de caracterização realizados no

laboratório LUDEM, e outro para análises de atividade microbiológica no laboratório LABIAL (Laboratório de Biologia Bucal), ambos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – Campus I, e ainda um outro recipiente de volume menor para caracterização de análise térmica quanto a absorção de água e degradação do produto, realizado 12 meses após o preparo do mesmo.

As micropartículas de clorexidina e maltodextrina foram preparadas no Laboratório LUDEM (Laboratório Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – Campus I, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Santos de Souza. Assim como todos os experimentos de caracterização realizados, com exceção da microscopia por imagem de fluxo e microscopia eletrônica de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva.

6.2 Caracterização das micropartículas

6.2.1 Curva de calibração do padrão de clorexidina

- **Materiais e métodos**

A curva de calibração do padrão de clorexidina foi realizada em triplicata com três soluções de estoque de digluconato de clorexidina a 0,12%, a qual representa a concentração do padrão comercial, preparada a partir do digluconato de clorexidina a 20% (SIGMA-ALDRICH®) em água destilada. As três amostras foram preparadas em momentos diferentes com intervalo de tempo de 30 dias, as leituras por absorbância foram avaliadas em seis concentrações para obtenção da equação da reta, sendo esta utilizada como padrão da quantidade de clorexidina no microparticulado.

Para a leitura da curva de calibração de cada solução de estoque, foram preparadas seis amostras com concentrações diferentes de 0,006, 0,008, 0,010, 0,012, 0,014 e 0,016 mg/mL, tendo sido removido respectivamente da solução de estoque os volumes de 50 µL, 66 µL, 83 µL, 100 µL, 116 µL e 133 µL. Cada uma das amostras foi preparada em balão volumétrico de 10 mL onde foi adicionado etanol

q.s.p. (Álcool etílico absoluto 99,8% P.A. – NEON®). As leituras da curva de calibração do padrão de clorexidina foram realizadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV mini-1240 / UV-vis spectrophotometers – Shimadzu®), com comprimento de onda de 260nm, e obtido valores de absorbância para obtenção da equação da reta padrão.

A equação da reta obtida com a curva de calibração da clorexidina foi utilizada como parâmetro para todos os testes de caracterização realizados, cujo objetivo foi a quantificação da clorexidina nas micropartículas de clorexidina e maltodextrina.

• Resultados e discussão

A curva de calibração realizada com concentração crescente de digluconato de clorexidina com 0,006%, 0,008%, 0,010%, 0,012%, 0,014% e 0,016%, com leitura em espectrofotômetro com luz ultravioleta, em intervalos de tempo de 30 dias permitiu o cálculo da equação da reta do padrão de clorexidina, como apresentado na Tabela 1.

A leitura por espectrofotometria em ultravioleta visível permite uma análise espectrofotométrica quantitativa por absorção de luz, cuja referência é a lei de Beer que relaciona a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

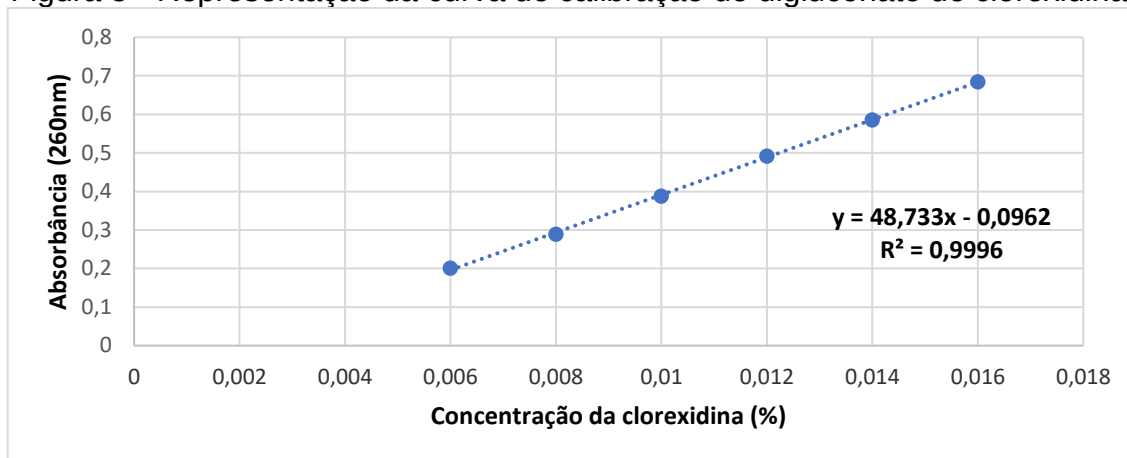
Tabela 1 - Valores em absorbância da curva de calibração do digluconato de clorexidina.

Concentração da CLX	Análise 1 (ABS)	Análise 2 (ABS)	Análise 3 (ABS)	MED	DP	CV
0,006	0,212	0,182	0,209	0,201	0,016	8,220
0,008	0,296	0,276	0,295	0,289	0,011	3,899
0,010	0,397	0,377	0,389	0,387	0,010	2,596
0,012	0,491	0,482	0,502	0,491	0,010	2,037
0,014	0,584	0,559	0,613	0,585	0,027	4,616
0,016	0,675	0,663	0,716	0,684	0,027	4,059

Fonte: Autora.

A reta representada na Figura 5 apresenta os valores de linha de tendência e equação da reta $Y = 48,733x - 0,0962$ com $r=0,9996$, de forma que este resultado é compatível com representação linear o que permitiu ser utilizada como padrão de cálculo da quantidade de digluconato de clorexidina no microparticulado.

Figura 5 - Representação da curva de calibração do digluconato de clorexidina.



Fonte: Autora.

O espectrofotômetro ultravioleta é um equipamento de análise utilizado com frequência em métodos de identificação e quantificação de fármacos, a partir da absorção de energia em leitura de luz ultravioleta de acordo com a estrutura da molécula e sua concentração, sendo a leitura por absorbância em comprimentos de onda específicos para cada molécula estudada. É um método que apresenta praticidade, baixo custo, simples interpretação dos dados e relativa sensibilidade e especificidade (GALO, COLOMBO, 2009).

Os valores obtidos por absorbância da clorexidina em espectrofotômetro ultravioleta resultou na equação da reta com $r=0,9996$, sendo este resultado de acordo com a resolução RDC nº166 de 2017 da ANVISA, que versa sobre a validação de métodos analíticos. A referida resolução expõe a corrida analítica como um conjunto de medições efetuadas em um grupo de amostras em intervalo de tempo pré-determinado, sob as mesmas condições de repetibilidade.

Para a avaliação da linearidade deve ser apresentado a avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficiente de correlação (r), que deve estar acima de 0,99 (RDC nº166 ANVISA, 2017). E o valor de (r) encontrado na equação da reta da curva de calibração da clorexidina foi 0,9996, assim a curva de calibração da clorexidina foi classificada como válida.

6.2.2 Avaliação da uniformidade do microparticulado

• Materiais e métodos

A avaliação da uniformidade do microparticulado de clorexidina e maltodextrina MP:CLX:MT foi realizado imediatamente após o preparo do mesmo, objetivando analisar se a quantidade de digluconato de clorexidina era equivalente em diferentes pontos na massa do microparticulado preparado.

Para a análise, foi removido 100 mg de 10 amostras de pontos diferentes do microparticulado preparado, pesado em balança analítica (AW220 – Shumadzu®). Cada amostra de 100 mg de micropartículas pesada foi colocada em um respectivo balão volumétrico de 10 mL onde foi acrescentado 5mL de água destilada, e posteriormente foi colocado para sonicação por 10 minutos (Ultrasonic ultracleaner 1400 – Unique Brasil®), em seguida o balão volumétrico foi completado com q.s.p. 10 mL de água destilada, e após homogenização manual obteve-se as soluções S1/1, S2/1, S3/1, S4/1, S5/1, S6/1, S7/1, S8/1, S9/1 e S10/1. De cada solução 1 preparada foi retirado 500µL para outro respectivo balão volumétrico de 10 mL, e completado com quantidade suficiente para 10 mL de etanol (Álcool etílico absoluto 99,8% P.A. – NEON®), e após homogenização manual obteve-se as soluções S1/2, S2/2, S3/2, S4/2, S5/2, S6/2, S7/2, S8/2, S9/2 e S10/2 para leitura em uma concentração de 0,012 mg/mL de digluconato de clorexidina.

O processo de diluição em água com sonicação e depois em álcool, seguido da filtragem das soluções com filtro PTFE de 0,45 µm para seringa, buscou o processo de separação total entre a maltodextrina e a clorexidina, ficando a maltodextrina presa no filtro da membrana. Após a filtragem obteve-se amostras com solução transparente para a leitura em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV mini – 1240 / UV-vis spectrophotometers – Shimadzu®) com comprimento de onda de 260nm.

• Resultados e discussão

Testes de uniformidade de doses unitárias permitem avaliar a quantidade de componente ativo em unidades individuais de um lote e verificar se esta quantidade é uniforme nas unidades testadas. Pode ser realizado pelo método de uniformidade de conteúdo que avalia o conteúdo individual do componente ativo de um número de doses unitárias para determinar se o conteúdo individual está dentro dos limites especificados, e se aplica a todos os casos; ou pelo método de variação de peso que pode ser aplicado para algumas formas farmacêuticas (ANVISA, 2010).

O estudo da uniformidade do MP:CLX:MT foi realizado a partir do método de uniformidade de conteúdo pela avaliação da absorbância da clorexidina isolada das micropartículas por leitura em espectrofotômetro ultravioleta (UV), tendo sido realizada logo após o preparo das mesmas. Com isso, foi analisado a quantidade de clorexidina em diferentes pontos na massa do microparticulado preparado.

O estudo da uniformidade de dose de bensilato de anlodipino em cápsulas foi realizado por Manganelli et al. (2016) também pelo método de espectrofotometria por UV em leitura por absorbância, permitindo avaliar a quantidade do fármaco distribuído nas amostras. Assim como Pires et al. (2017) também avaliaram a uniformidade de conteúdo de formas farmacêuticas contendo o fármaco carvedilol por espectrofotometria por luz ultravioleta.

A uniformidade foi medida em valores de absorbância da clorexidina no espectrofotômetro UV, com limite inferior de absorbância de 0,441 e limite superior de 0,465. E a partir dos valores de absorbância das 10 amostras foi possível calcular a concentração de clorexidina em mg/mL tendo como referência a equação da reta $y = 48,733x - 0,0962$, assim como o percentual da quantidade de recuperação da clorexidina em cada amostra. Relativo à concentração de clorexidina foi observado uma variação muito pequena entre as amostras com o valor mínimo obtido foi de 0,01101 mg/mL, o máximo de 0,0115 mg/mL, considerando o valor teórico na micropartícula de 0,012 mg/mL, a partir da concentração de diluição usada na curva de calibração da clorexidina. Enquanto o cálculo do percentual de recuperação de clorexidina nas amostras teve o limite inferior de 91,78% e o superior de 95,96%, valor médio de 93,74%, com desvio padrão de 1,42 e coeficiente de variação de 1,51%, conforme representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Uniformidade de dose de clorexidina do microparticulado logo após o preparo com valores de absorbância, concentração e percentual de recuperação.

Amostra	Absorbância (ABS)	Concentração (mg/mL)	Recuperação da CLX (%)	Média (%)	Desvio padrão (±)	Coefficiente de variação
1	0,441	0,0110	91,79	93,74	1,40	1,49%
2	0,455	0,0113	94,26			
3	0,451	0,0112	93,57			
4	0,453	0,0112	93,91			
5	0,449	0,0111	93,23			
6	0,443	0,0110	92,20			
7	0,444	0,0110	92,37			
8	0,458	0,0113	94,77			
9	0,465	0,0115	95,83			
10	0,463	0,0114	95,62			

Fonte: Autora.

De acordo com os métodos de uniformidade descritos na Farmacopeia Brasileira/5ª edição (ANVISA, 2010), o produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias quando o Valor de Aceitação (VA) calculado para as 10 primeiras unidades testadas não é maior que $L1$, sendo o valor considerado para $L1 = 15$. O Valor de Aceitação é calculado segundo a equação:

$$VA = (M - \bar{X}) + k.s$$

$M = 98,5\%$, se $\bar{X} < 98,5\%$
 $\bar{X}$ = Média dos conteúdos avaliados
 $k = 2,4$ se $n = 10$ (Constante de Aceitabilidade)
 s = Desvio padrão da amostra

Na equação foi considerado, $M = 98,5\%$, por média dos conteúdos avaliados ter sido $93,74\%$, menor que $98,5\%$, $k = 2,4$ pois o número de análise (n) foi de 10 amostras, e $s = 1,40$ o desvio padrão das amostras. Assim, o Valor de Aceitação (VA) foi de $8,12$, e não foi maior que $L1 = 15$, cumprindo o teste de uniformidade de doses unitárias para as micropartículas com clorexidina.

6.2.3 Teste de estabilidade da clorexidina nas micropartículas

- **Materiais e métodos**

Os testes de estabilidade da clorexidina nas micropartículas foram realizados a partir do doseamento da quantidade de clorexidina nas micropartículas. Para os testes foram removidos 100 mg de 3 amostras diferentes do microparticulado preparado, pesado em balança analítica (AW220 – Shumadzu®), cada amostra de 100 mg do microparticulado pesada foi colocada em um respectivo balão volumétrico de 10 mL onde foi acrescentado 5 mL de água destilada, e posteriormente foi colocado para sonicação por 10 minutos (Ultrasonic ultracleaner 1400 – Unique Brasil®), em seguida o balão volumétrico foi completado com quantidade suficiente para 10 mL de água destilada, e após homogeneização manual obteve-se as soluções S1/1, S2/1 e S3/1. De cada solução 1 preparada foi retirado 500 µL para outro respectivo balão volumétrico de 10 mL, e completado com quantidade suficiente para 10 mL de etanol (Álcool etílico absoluto 99,8% P.A. – NEON®, lote 32682), e após homogeneização manual obteve-se as soluções S1/2, S2/2 e S3/2 para leitura em uma concentração de 0,012 mg/mL de digluconato de clorexidina.

A leitura das amostras foi realizada por absorbância em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV mini-1240 / UV-vis spectrophotometers – Shimadzu®), com comprimento de onda de 260 nm, tendo sido realizadas leituras em sequência da amostra branco de álcool etílico e das amostras das soluções após filtragem com filtro para seringa PTFE de 0,45 µm para seringa, cujo objetivo foi remover a maltodextrina dissolvida na solução da amostra.

O processo de doseamento da clorexidina para avaliação da estabilidade foi realizado logo após o preparo do microparticulado, 30 dias após, e depois foi realizado periodicamente em intervalos aproximados de 60 dias, e após 10 meses do preparo as análises foram realizadas mensalmente até completar 24 meses do preparo inicial.

• Resultados e discussão

O doseamento da clorexidina no microparticulado liofilizado MP:CLX:MT teve por finalidade analisar a quantidade de recuperação de clorexidina nas micropartículas

preparadas em função do tempo em um período de 24 meses, tendo como padrão de referência a curva de calibração do digluconato de clorexidina.

Para que uma substância ativa tenha a sua estabilidade e efetividade é fundamental garantir a quantidade da mesma em uma determinada unidade de dosagem, assim como a sua uniformidade na massa preparada. Com isso, a uniformidade e a dose da substância ativa são fundamentais para o efeito desejado (MANGANELLI et al., 2016).

A uniformidade do microparticulado MP:CLX:MT cumpriu o teste do método de uniformidade de conteúdo, como preconiza a Farmacopeia Brasileira/5ª edição (ANVISA, 2010), tendo sido apresentado no tópico 6.2.2.

A quantidade de clorexidina avaliada por absorvância doseada nas micropartículas, relacionada com a equação da reta linear da curva de calibração do padrão de clorexidina, permitiu o cálculo do coeficiente de recuperação da clorexidina no microparticulado (CR%).

Com isso, a estabilidade da clorexidina nas micropartículas foi avaliada a partir do estudo do coeficiente de recuperação da clorexidina do microparticulado (CR%), obtendo-se uma média das três amostras realizada em uma análise de 24 meses, sendo o mesmo período até o término dos experimentos microbiológicos. O estudo possibilitou a avaliação da estabilidade do produto intermediário MP:CLX:MT, analisando se com o tempo há perdas ou degradação da clorexidina no microparticulado. Os resultados de coeficiente de recuperação da clorexidina estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Coeficiente de recuperação da clorexidina nas micropartículas em 24 meses.

Tempo (meses)	Média coeficiente de recuperação (%)	Desvio padrão (±)
0	95,62	0,85
1	97,62	3,16
3	98,02	2,03
5	99,56	1,73
7	95,79	1,71
10	95,28	3,25
11	99,04	1,85
12	102,12	1
13	95,45	0,65
14	95,62	2,85
15	97,67	1,29
16	96,99	0,68
17	98,70	0,82
18	96,48	2,04
19	98,02	0,62
20	98,70	1,37
21	99,03	0,52
22	99,89	1,07
23	99,89	1,31
24	97,50	1,89

Fonte: Autora.

A resolução nº01/2005 da ANVISA regulamenta os estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos e considera a estabilidade acelerada ou de longa duração de no mínimo 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5%, tendo um padrão de 100% como referência. Foi encontrado um valor de recuperação mínima de 95,28% e máxima de 102,12%, que está dentro de uma variação de 95% a 105% como determinado pela resolução 01/2005 da Anvisa que determina a estabilidade de longa duração com variação de até 5% em relação ao padrão. Dessa forma, o microparticulado de clorexidina e maltodextrina foi caracterizado como estável dentro dos parâmetros da ANVISA.

Vale destacar que a estabilidade apresentada da micropartícula ocorreu no período de 24 meses com armazenamento em temperatura ambiente, mantendo a sua atividade como apresentado nos estudos microbiológicos, os quais foram realizados no período de 6 a 24 meses após o preparo das micropartículas. Enquanto a forma livre do digluconato clorexidina em solução a 20% tem a recomendação do fabricante SIGMA-ALDRICH® de armazenamento sob refrigeração em temperatura de 2 a 8 °C, dessa forma as micropartículas com clorexidina apresentaram estabilidade

sob melhores condições de armazenamento, por se manter estável em temperatura ambiente, em relação à forma livre da solução de clorexidina.

Estes resultados estão de acordo com Callens e Remon (2000) e Schaffazick et al. (2003) que discorreram sobre a aplicação da metodologia de preparo por liofilização, que tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais e preparação de formas farmacêuticas a partir da droga em formulação de pó, conferindo ao produto final uma maior estabilidade. Segundo os autores, o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de micropartículas ou nanopartículas, reduzem os problemas de estabilidade por meio da secagem das suspensões.

6.2.4 Testes de liberação da clorexidina do microparticulado

- **Materiais e métodos**

O teste de cinética de liberação de clorexidina do microparticulado MP:CLX:MT foi realizado em 1 hora com intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, e depois em 2 horas nos tempos de análise de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 e 120 minutos, sendo as leituras realizadas por absorbância em comprimento de onda de 260 nm.

O preparo das soluções foi o mesmo para ambas as técnicas, em triplicata, com um volume de 50 mL em água deionizada e 250 mg do microparticulado com clorexidina pesada com a correção a massa dada pelo doseamento, correspondendo a uma concentração de 0,12 mg/mL. A água deionizada como solvente das soluções foi selecionada para os testes de liberação da clorexidina por ser a mesma utilizada no preparo das soluções dos experimentos de microbiologia. Foram testados antes a realização da análise de liberação da clorexidina em saliva artificial e em solução tampão, entretanto não se obteve sucesso com as técnicas pela interferência dos componentes químicos presentes na saliva artificial e solução tampão para leitura por absorbância.

As soluções preparadas nos dois testes foram mantidas em bequer de vidro de 10mL em estufa (Estufa com circulação e renovação de ar TE-394/2, TECNAL®) sem agitação até o momento das coletas, com vedação com filme de PVC e sob abrigo da luz com papel de alumínio. Ambos os testes foram realizados com uma temperatura de 36°C semelhante à cavidade bucal.

Com as soluções preparadas na concentração de 0,12 mg/mL de clorexidina foi retirado o volume 1 mL de cada amostra, e colocado um respectivo balão volumétrico de 10 mL para as amostras 1, 2 e 3, e em seguida completado com álcool (Álcool etílico absoluto 99,8% P.A. – NEON®, lote 32682), obtendo as soluções 1/2, 2/2 e 3/2 na concentração de 0,012 mg/mL para leitura por absorbância. A referência do padrão de clorexidina foi medido a partir da equação da reta da curva de calibração do padrão de clorexidina.

A leitura das amostras foi realizado em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV mini-1240 / UV-vis spectrophotometers – Shimadzu®), com comprimento de onda de 260 nm, tendo sido realizados leituras em sequência da amostra branco de álcool etílico PA, e das amostras das soluções após filtragem com filtro PTEF 45/25 de 0,45 µm para seringa (Chromafil® Xtra), cujo objetivo foi remover a maltodextrina dissolvida na solução da amostra e assim permitir a leitura da quantidade de clorexidina nas soluções.

• Resultados e discussão

Existem vários modelos de cinética de liberação que descreve a liberação total da dosagem da droga, a partir da análise de mudanças qualitativas e/ou quantitativas em uma formulação, o que permite estudar a liberação do fármaco. O uso de dados *in vitro* de dissolução de drogas é importante para prever o desempenho biológico *in vitro* e *in vivo*, e assim poder ser considerados como o desenvolvimento racional de formulações de liberação controlada (DASH et al., 2010).

O presente trabalho utilizou um modelo de cinética de liberação de análise quantitativa da liberação da clorexidina por meio da dissolução em água das

micropartículas com maltodextrina e clorexidina. Tendo a leitura da quantidade de clorexidina sido realizada por absorbância em espectrofotômetro de luz ultravioleta, com comprimento de onda de 260 nm, em diferentes períodos de tempo a partir da média do coeficiente de recuperação da clorexidina tendo como referência a curva de calibração da clorexidina, obtendo o perfil de liberação da clorexidina em relação ao tempo.

A eficiência de dissolução (ED) foi calculada baseada em um modelo independente, que foi definida como a área sob a curva de dissolução até um tempo t , expressa como a porcentagem da área do retângulo que corresponde a 100% de dissolução no mesmo tempo, como mostrado na equação descrita abaixo:

$$ED\% = \frac{\text{área(perfil)}}{\text{retângulo}(y_{100})}$$

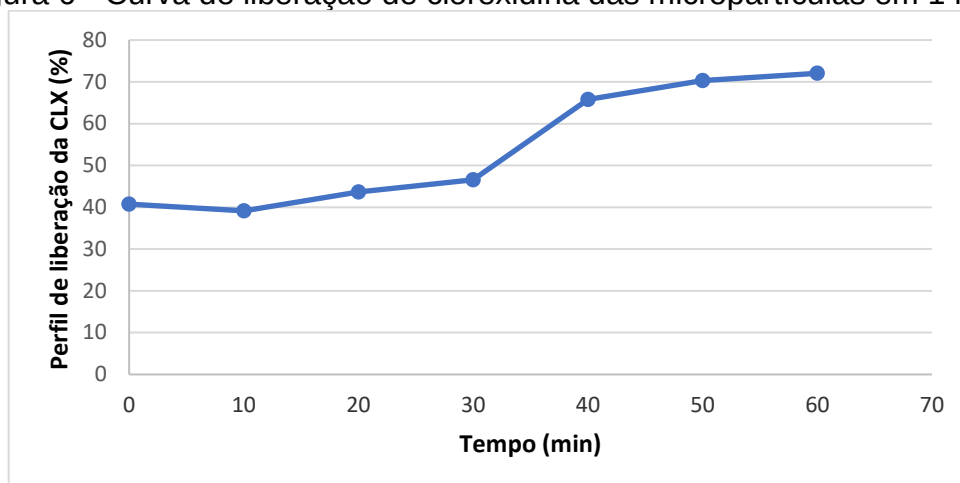
No teste de liberação de 1 hora houve uma liberação imediata (tempo 0) em água de 40,74%, seguido uma liberação progressiva de 39,13% em 10 minutos, 43,64% em 20 minutos, 46,54% em 30 minutos, 65,76% em 40 minutos, 70,28% em 50 minutos e 72,04% em 60 minutos, havendo uma diferença do perfil de liberação de 31,3% da relação entre o tempo de 0 e 60 minutos, conforme apresentados na Tabela 4 e Figura 6. Em relação à eficiência de dissolução (ED) calculada da área sob a curva de dissolução no tempo de 1 hora foi encontrado um valor de 53,62%.

Tabela 4 - Percentual de liberação da clorexidina das micropartículas em 1 hora.

Tempo (min)	Perfil de liberação (%)	Desvio padrão (±)
0	40,74	0,74
10	39,13	2,98
20	43,64	0,47
30	46,54	0,55
40	65,76	0,50
50	70,28	1,40
60	72,04	1,37

Fonte: Autora.

Figura 6 - Curva de liberação de clorexidina das micropartículas em 1 hora.



Fonte: Autora.

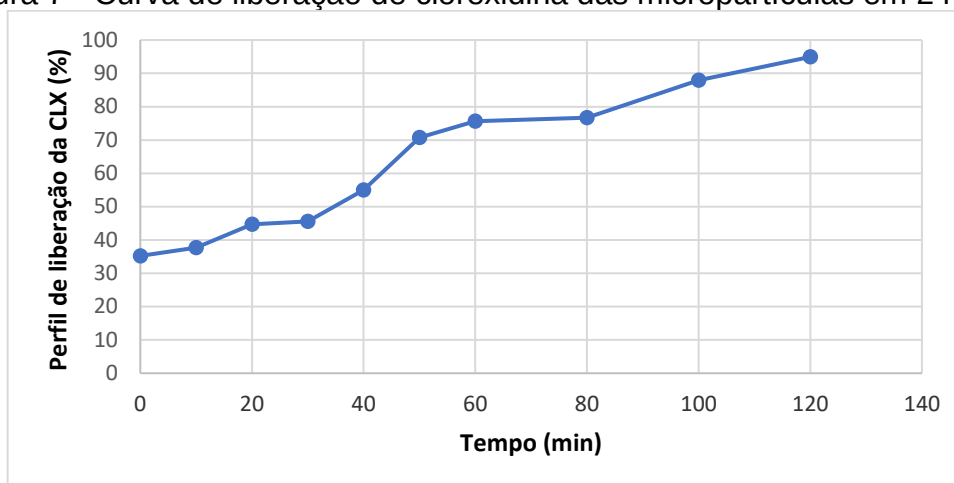
Nos resultados do teste de liberação de 2 horas foi observado uma liberação imediata em água de 35,22%, seguido uma liberação progressiva de 37,68% em 10 minutos, 44,67% em 20 minutos, 45,58% em 30 minutos, 54,97% em 40 minutos, 70,77% em 50 minutos, 75,60% em 60 minutos, 76,67% em 80 minutos, 94,76% em 100 minutos e 94,94% em 120 minutos, havendo uma diferença do perfil de liberação de 58,72% da relação entre o tempo de 0 e 120 minutos. Assim o tempo de liberação da clorexidina nas micropartículas foi de aproximadamente 2 horas, conforme apresentados na Tabela 5 e Figura 7. A eficiência de dissolução (ED) calculada da área sob a curva de dissolução no tempo de 2 horas foi de 52,73%.

Tabela 5 - Percentual de liberação da clorexidina das micropartículas em 2 horas.

Tempo (min)	Perfil de liberação (%)	Desvio padrão (±)
0	35,22	2,58
10	37,68	1,06
20	44,67	3,63
30	45,58	0,55
40	54,97	3,78
50	70,77	0,66
60	75,60	3,36
80	76,67	4,26
100	94,76	2,62
120	94,94	3,83

Fonte: Autora.

Figura 7 - Curva de liberação de clorexidina das micropartículas em 2 horas.



Fonte: Autora.

Comparando a cinética de liberação entre os testes de 1 e 2 horas, observou-se um perfil de liberação semelhante e reprodutível, com uma variação pequena entre os resultados nos tempos correspondentes. O comportamento da liberação da clorexidina nos dois testes foi de liberação lenta e gradativa da clorexidina nas soluções, a partir da solubilização do excipiente maltodextrina quando em contato com a água, até a liberação completa em aproximadamente 2 horas, mostrando o perfil de liberação lenta da clorexidina no microparticulado.

A técnica utilizada com metodologia de leitura por doseamento químico da quantidade de clorexidina recuperada das micropartículas em função do tempo não permitiu análise das características físicas dos perfis de liberação da clorexidina. É uma limitação da técnica adotada, porém neste estudo de caracterização das micropartículas de maltodextrina e clorexidina foi seguido um padrão de análise química com leitura da clorexidina por absorvância sob análise de luz ultravioleta, tendo como referência a curva de calibração da clorexidina pela equação da reta de linearidade. Esta metodologia por análise quantitativa química da clorexidina, de leitura por absorvância, foi a mesma leitura adotada para os estudos de uniformidade e teste de estabilidade de 24 meses.

Ainda vale ressaltar que os resultados dos testes de liberação da clorexidina das micropartículas foram associados com os testes microbiológicos *in vitro* realizados em microrganismos planctônicos e em biofilme, onde foi observado atividade

antimicrobiana das micropartículas em padrão semelhante à clorexidina livre como controle positivo, conforme apresentado no capítulo V. Esta associação mostra que a clorexidina é liberada da micropartícula e mantém as suas propriedades antimicrobianas.

No estudo do perfil de liberação de micropartículas de quitosana e alginato com incorporação de clorexidina, Barboza (2013) observou perfis de liberação com ordem de grandeza bem diferentes entre si a depender da quantidade dos excipientes, chegando a ser observada uma massa de recuperação com diferença até 50% maior entre experimentos. O estudo concluiu que a cinética de liberação e a concentração da clorexidina quando o sistema atinge o equilíbrio, dependem da composição das micropartículas e das interações que se estabelecem entre seus componentes.

Este contexto da relação da composição das micropartículas e das interações que se estabelecem entre seus componentes foi visto de forma indireta por One (2014), que desenvolveu e validou o método de preparo das microcápsulas de maltodextrina com clorexidina, e também realizou o preparo de microcápsulas de clorexidina com os excipientes celulose e quitosana pelo mesmo método. No estudo não foram realizados testes do perfil de liberação da clorexidina, entretanto os testes microbiológicos mostraram os resultados antimicrobianos superiores das microcápsulas de clorexidina com maltodextrina em relação às preparadas com quitosana e alginato, sugerindo a liberação ineficiente da clorexidina das microcápsulas com a quitosana e a celulose como excipientes.

6.2.5 Avaliação por microscopia de imagem de fluxo

- **Materiais e métodos**

A avaliação por microscopia de imagem de fluxo foi realizada para análise do tamanho das micropartículas MP:CLX:MT a partir de imagens obtidas do equipamento FlowCam® 8000 series. A análise foi realizada pela técnica química Danielle Cristina da Silva da empresa Instrutécnica – Equipamentos para pesquisa e tecnologia em Campinas-SP.

A amostra das micropartículas com clorexidina foi preparada para análise em meio líquido, sendo as micropartículas adicionadas a 20 mL de água destilada, com proporção aproximada de 1 mg/mL, e em seguida levada ao agitador magnético durante 60 segundos. Após a amostra preparada, a análise foi realizada injetando 1 mL para leitura no equipamento.

• Resultados e discussão

A análise com o FlowCam® permitiu a avaliação do tamanho das micropartículas com maltodextrina e clorexidina a partir do exame do fluido preparado sob microscopia. As imagens das partículas foram ampliadas dentro do fluido e caracterizadas sob medidas, enquanto a amostra do fluido passou por uma célula de fluxo perpendicular ao campo óptico onde foi realizado a leitura (Fluid imaging technologies, inc.).

Na microscopia por análise de fluxo a avaliação ocorre por volumetria, considerando teoricamente que todas as partículas têm um formato esférico, sendo gerando informações do diâmetro, área e volume do objeto de análise. Na análise das micropartículas de clorexidina e maltodextrina houve uma relação de diâmetro versus volume das micropartículas, evidenciando a variação de tamanho e distribuição irregular das micropartículas.

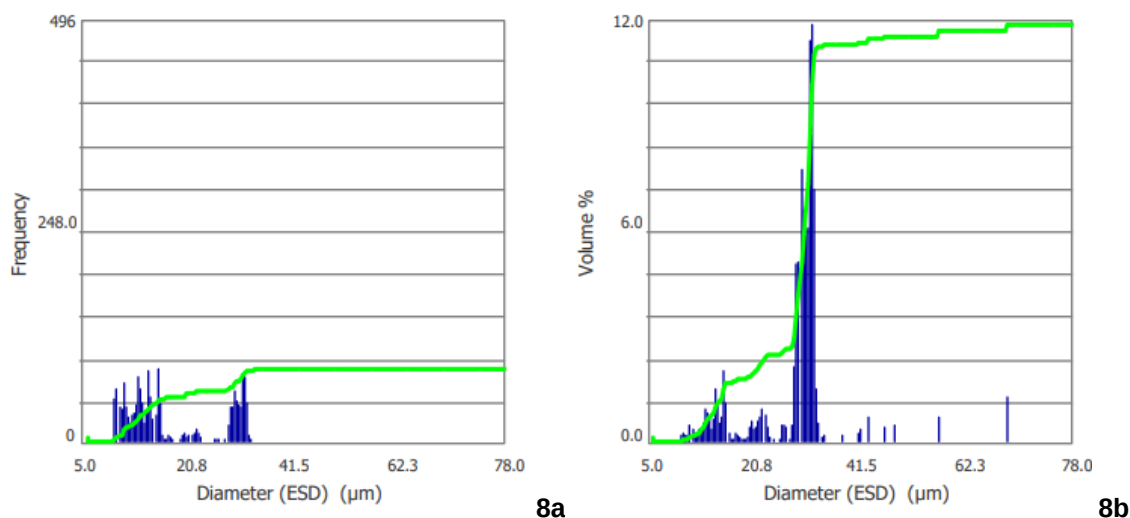
Na análise das micropartículas obteve-se os valores do diâmetro ESD que tem como base o diâmetro esférico equivalente, tendo sido apresentado uma média de 20,30 μm e variação de 41,75%. Os valores D [4,3] (ESD) são a média do momento de volume da partícula, sendo os diâmetros médios calculados pela ponderação do diâmetro ESD e volume de ESD da partícula, cujos valores foram a média de 29,72 μm e variação de 27,16%, ambos com valores mínimo de 10 μm e máximo de 67,01 μm como mostra a Tabela 6 e Figura 8.

Tabela 6 - Análise por microscopia de imagem de fluxo das micropartículas de clorexidina e maltodextrina.

Parâmetros	Média (µm)	Mínimo (µm)	Máximo (µm)	CV%
Diâmetro (ESD)	20,30	10,00	67,01	41,75
D [4,3] (ESD)	29,72	10,00	67,01	27,16

Fonte: Autora.

Figura 8 - Espectros de frequência de diâmetro ESD (8a) e volume (8b) das micropartículas de clorexidina e maltodextrina por Flowcam®.



Fonte: Autora.

Assim, com base nos valores obtidos na microscopia de fluxo de tamanho de partículas de diâmetro esférico equivalente médio de 20,30 µm, e valores da média do volume de 29,72 µm podemos classificar as partículas de clorexidina e maltodextrina como micropartículas. Segundo Pereira et al. (2018) as partículas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em micropartículas quando as dimensões se apresentam entre 0,2 a 5.000 µm.

6.2.6 Avaliação por microscópio eletrônico de varredura

• Materiais e métodos

A avaliação por microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada para caracterização morfológica do microparticulado MP:CLX:MT a partir da análise da

forma e do aspecto das micropartículas. Uma vez que o MEV produz imagens de alta ampliação e resolução através da transcodificação da energia emitida por elétrons do material de análise.

Foram realizadas duas diferentes análises, sendo uma do lote 1 preparado para teste do método validado, e outra do lote 2 preparado para caracterização e experimentos em microbiologia. Também foi realizado para avaliação comparativa em MEV do excipiente maltodextrina.

As amostras foram preparadas em stub (placa) de metal, sendo o pó do microparticulado pulverizado sobre fita dupla de carbono, e posteriormente metalizadas em ouro por 1,5 min no metalizador K550X - Emitech® antes das análises. A metalização das amostras permitiu a emissão de energia para a visualização do aspecto da estrutura da micropartícula. Após o preparo, as amostras foram imediatamente avaliadas, sendo as fotomicrografias obtidas em uma câmera com tensão de excitação de 15 kV.

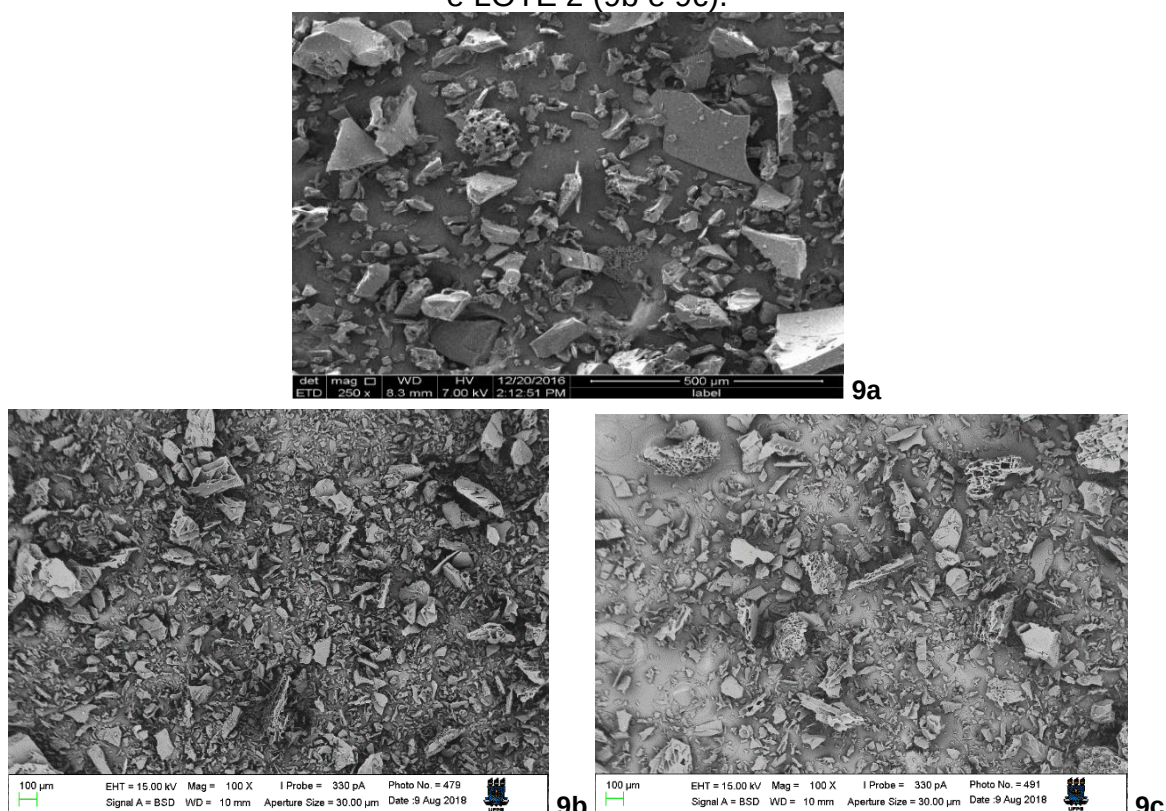
O lote 1 do microparticulado foi avaliado no laboratório de microscopia do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, no Microscópio Eletrônico de Varredura FEI - Quanta 450 FEG. Enquanto o lote 2 do microparticulado foi avaliado no laboratório LSR - Laboratório de Solidificação Rápida do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, no Microscópio Eletrônico de Varredura SEM ZEISS® – LEO 1430, com o programa SmartSEM®.

• Resultados e discussão

As imagens das micropartículas de maltodextrina com clorexidina dos lotes 1 e 2 realizadas pela análise em microscopia eletrônica de varredura apresentaram aspectos semelhantes entre os lotes, o que foi visto em aumento de 100 a 2.500 vezes. A metalização em ouro das amostras analisadas permitiu a incrustação do metal em toda a estrutura das micropartículas, e assim foi possível a visualização do aspecto quanto à irregularidade e porosidade da estrutura.

Nas imagens obtidas com o campo de visão amplo foi possível observar a irregularidade do tamanho e formato das micropartículas distribuídas entre os microfragmentos. Nos dois lotes esse aspecto se refere ao processo de preparo de trituração manual do produto após a liofilização para a obtenção do pó do microparticulado de clorexidina e maltodextrina, como observado na Figura 9.

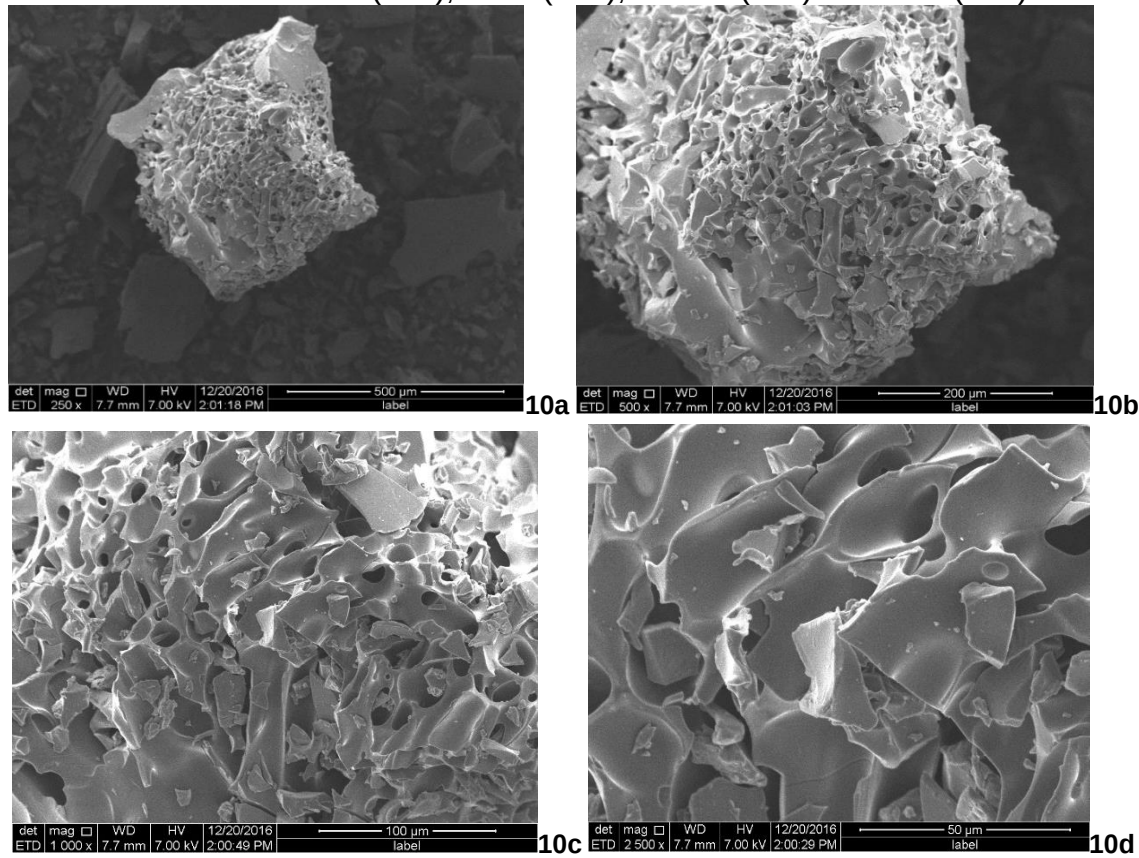
Figura 9 - Análise MEV em visão ampla do aspecto das micropartículas. LOTE 1 (9a) e LOTE 2 (9b e 9c).



Fonte: Autora.

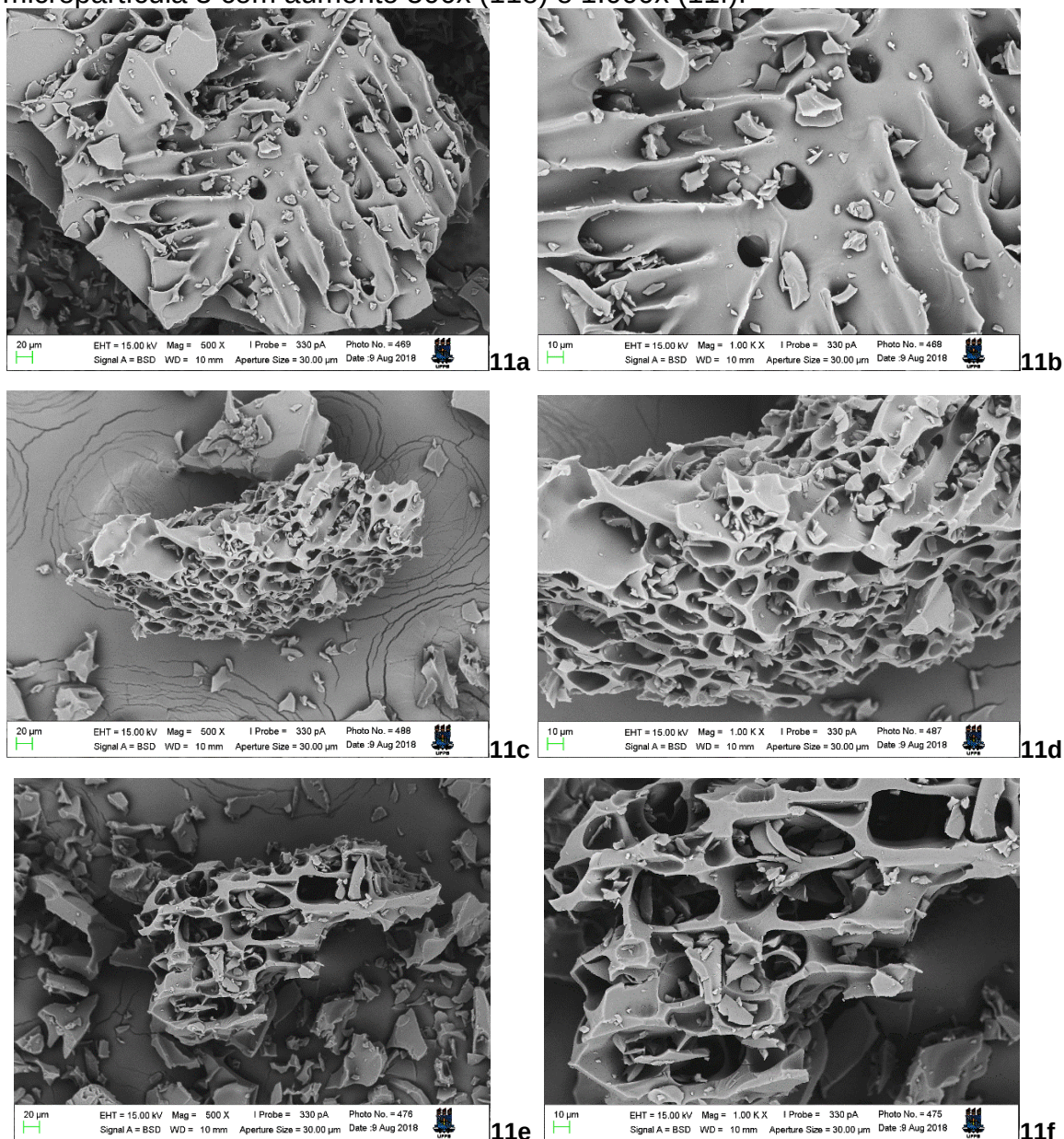
Nos dois lotes estudados foram observados micropartículas irregulares, com tamanhos e formatos diferentes, e estrutura porosa, sendo visualizado canaletas e poros de diferentes diâmetros distribuídos por toda a massa das micropartículas, como pode ser observado nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Análise MEV de micropartícula de maltodextrina e clorexidina - LOTE 1. Aumento de 250x (10a), 500x (10b), 1.000x (10c) e 2.500x (10d).



Fonte: Autora.

Figura 11 - Análise MEV de micropartículas - LOTE 2. Micropartícula 1 com aumento 500x (11a) e 1.000x (11b), micropartícula 2 com aumento 500x (11c) e 1.000x (11d), e micropartícula 3 com aumento 500x (11e) e 1.000x (11f).



Fonte: Autora.

As imagens observadas das micropartículas são compatíveis com a técnica de produção por liofilização. Sendo a liofilização ou secagem a frio um processo de conservação de produtos biológicos muito aplicado na indústria farmacêutica e de alimentos que envolve os métodos de congelamento seguindo de desidratação. Para

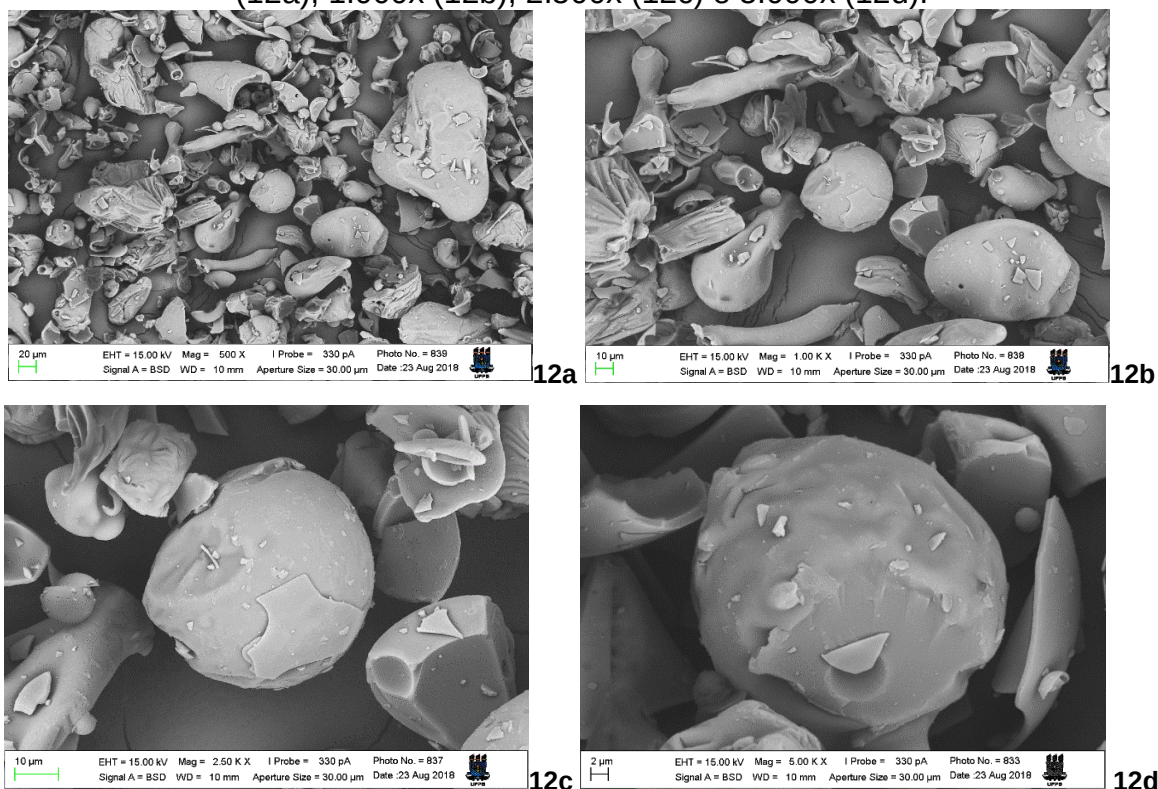
ser liofilizado, o produto é congelado e depois submetido a uma pressão negativa à vácuo, eliminando a água por sublimação. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade, podendo posteriormente ser reconstituída por adição de água (LIOTOP, 2014).

O aspecto de porosidade das micropartículas está de acordo com o que foi observado no estudo de Yu et al. (2002), que prepararam micropartículas de insulina pela técnica de liofilização, e a análise por microscopia eletrônica revelaram micropartículas altamente porosas. De forma semelhante, Peretz et al. (2012), em análises por microscopia eletrônica de micropartículas preparadas por liofilização observaram uma superfície delimitada com um padrão interno de grande rugosidade e porosidade.

Enquanto Nogueira et al. (2017), realizaram uma análise por microscopia eletrônica após microencapsulação de carotenoides por liofilização, e observaram um material granular, sem porosidades e com formatos diferentes.

Na análise da maltodextrina pura foram obtidas imagens com aumento de 5.000, 2.500, 1.000 e 500x, onde foi observado micropartículas de formatos e tamanhos variados, apresentando-se homogêneas sem a presença de porosidades na estrutura, diferente das micropartículas de maltodextrina com clorexidina que passaram pelo processo de liofilização. Confirmando, dessa forma, que o aspecto de porosidade observado nas micropartículas está relacionado com o processo de preparo por liofilização, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Análise MEV de amostra de maltodextrina pura, com aumento de 500x (12a), 1.000x (12b), 2.500x (12c) e 5.000x (12d).



Fonte: Autora.

O aspecto visualizado no microparticulado foi de uma estrutura porosa, com poros e canaletas dispersos em cada micropartícula, o que remete mais ao aspecto de microesfera e não de microcápsula, apesar de não ter se apresentado com formatos esféricos. Vale ressaltar que de acordo com a classificação de micropartículas estas podem se apresentar como microesferas, quando o fármaco se apresenta disperso na matriz polimérica e está distribuído por toda a matriz que é composta por um material homogêneo, ou microcápsulas quando há uma cápsula formada pela parede polimérica que envolve uma cavidade oca ou aquosa onde se encontra o fármaco (REIS et al., 2006; PIMENTEL et al., 2007; MARCATO, DURÁN, 2008; MATTÉ, DA ROSA, 2013).

A presença da clorexidina dispersa na matriz de maltodextrina das micropartículas preparadas pôde ser constatada pelos resultados obtidos a partir da

análise química proporcionada pela avaliação por microscópio eletrônico de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva, conforme descrito a seguir.

6.2.7 Avaliação por microscópio eletrônico de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva

- **Materiais e métodos**

A avaliação em microscópio eletrônico de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS) teve por objetivo determinar a composição química das micropartículas e assim confirmar a presença de clorexidina incorporada à maltodextrina nas micropartículas. O equipamento EDS é um espectrômetro de difração de Raio-X que permite determinar com precisão a composição química de qualquer material sólido.

As análises foram realizadas das micropartículas do lote 2 preparado para caracterização e experimentos em microbiologia, e também da maltodextrina pura. O preparo das amostras foram em stub (placa) de metal, onde o pó do microparticulado e da maltodextrina pura, separadamente, foram pulverizados sobre fita dupla de carbono, sem a realização prévia da metalização das amostras. Após o preparo de cada amostra, estas foram levadas para início da avaliação no microscópio eletrônico de varredura TM-1000, Hitachi®

Após obtida a imagem do microscópio eletrônico de varredura foram selecionados os pontos de avaliação em três micropartículas diferentes de cada amostra para aplicação da metodologia EDS para análise química por espectrômetro de difração Raio-X através do programa Sem Image File, TM-1000.

A seleção das micropartículas de maltodextrina e clorexidina foram realizadas com o aumento de 5.000x do MEV, enquanto a seleção das micropartículas de maltodextrina pura foram com o aumento de 1.500x, sendo o ponto de escolha para leitura por EDS sempre no centro de cada micropartícula.

O experimento foi realizado pelos técnicos do laboratório CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste da

Universidade Federal de Campina Grande/PB, e sob acompanhamento da pesquisadora.

• Resultados e discussão

A avaliação por microscópio eletrônico de varredura associado à espectroscopia por energia dispersiva – EDS, permitiu a caracterização química nas micropartículas de maltodextrina e clorexidina, e a comparação com a maltodextrina pura. O EDS é uma análise sobre a presença e quantidade de elementos químicos em uma partícula por espectrometria de Raio-X, visto que cada elemento químico tem uma caracterização diferente de absorção e de emissão de energia.

Os elementos químicos que formam as moléculas de clorexidina são carbono, hidrogênio, nitrogênio e cloro, enquanto as moléculas de maltodextrina são formadas por carbono, oxigênio e hidrogênio. De acordo com os resultados da análise realizada por EDS das micropartículas foram encontrados átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e cloro, enquanto na maltodextrina pura foram encontrados apenas átomos de carbono e oxigênio. Como os átomos de nitrogênio e cloro são encontrados apenas na molécula de clorexidina, foi confirmado a incorporação da clorexidina nestas micropartículas.

Os átomos de hidrogênio, que é encontrado nas duas moléculas de clorexidina e maltodextrina não foram observados nas análises, uma vez que o hidrogênio por ter o peso atômico 1, tem a energia muito baixa para ser observada pelo espectrômetro.

As análises foram realizadas em três micropartículas de maltodextrina e clorexidina e três micropartículas de maltodextrina, com os dados apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16, e Tabela 7 para as micropartículas, e Figuras 17, 18, 19 e 20, e Tabela 8 para a maltodextrina.

Figura 13 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 1. Imagem de MEV gerada para leitura (13a); Espectro de leitura dos componentes químicos (13b).

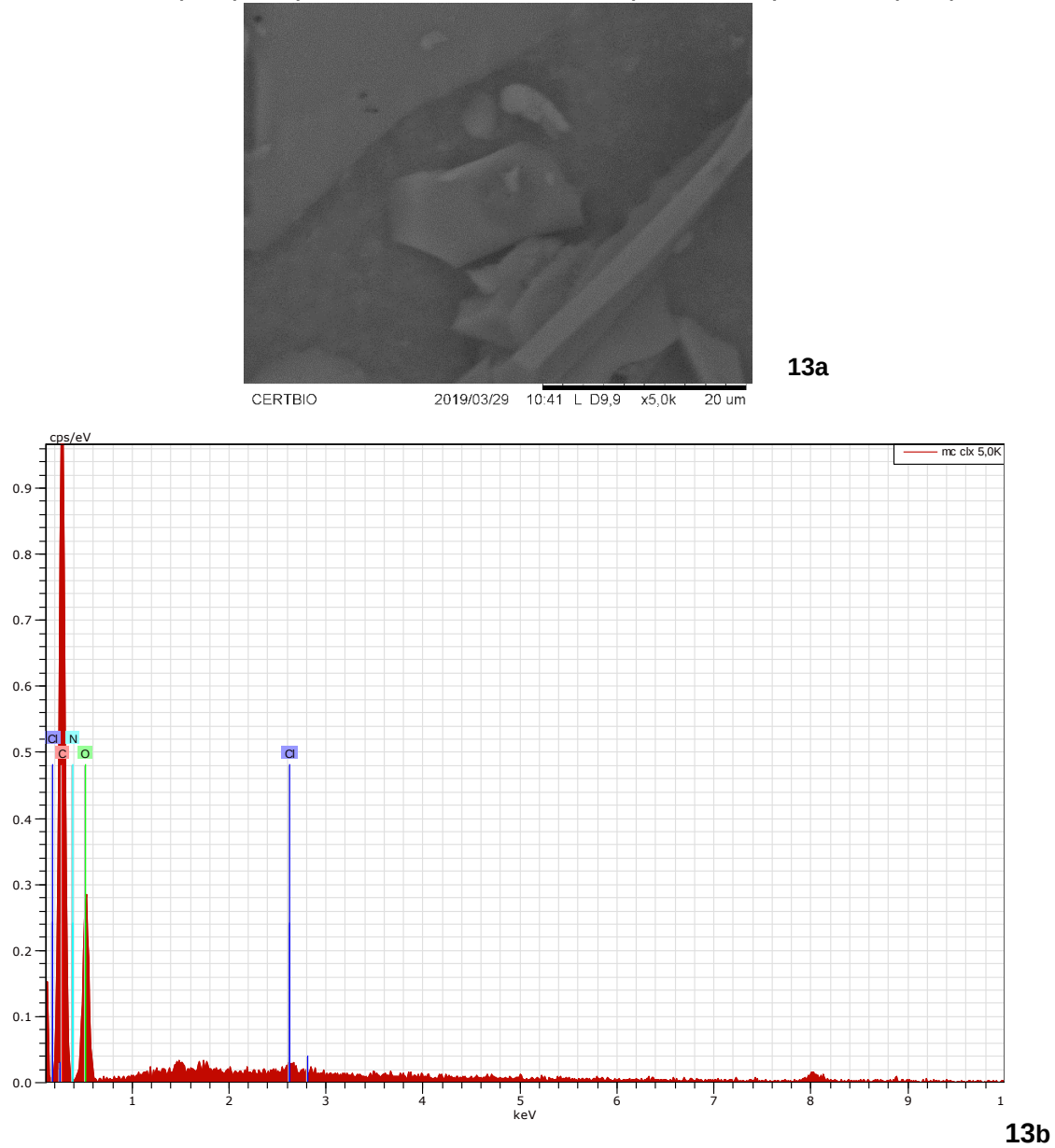
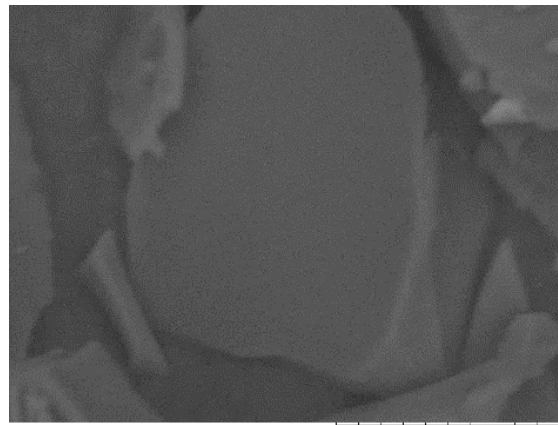
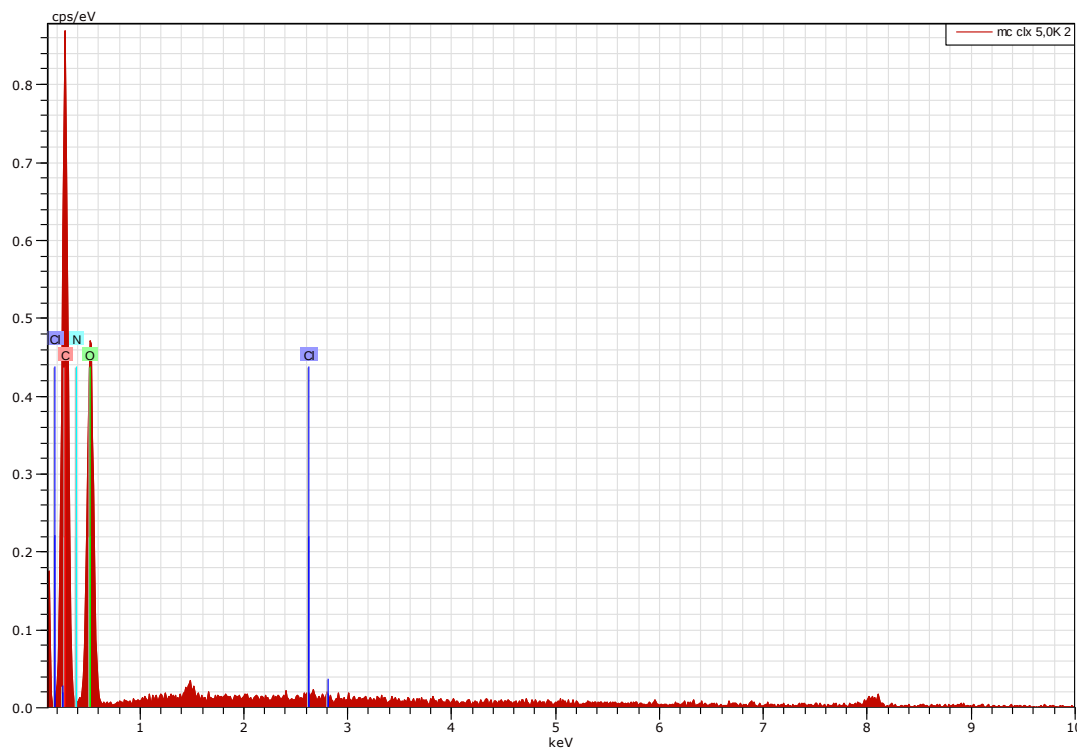


Figura 14 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 2. Imagem de MEV gerada para leitura (14a); Espectro de leitura dos componentes químicos (14b).



CERTBIO 2019/03/29 11:10 L D9,9 x5,0k 20 um

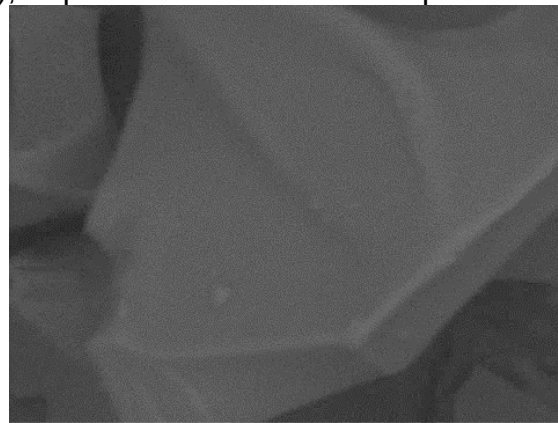
14a



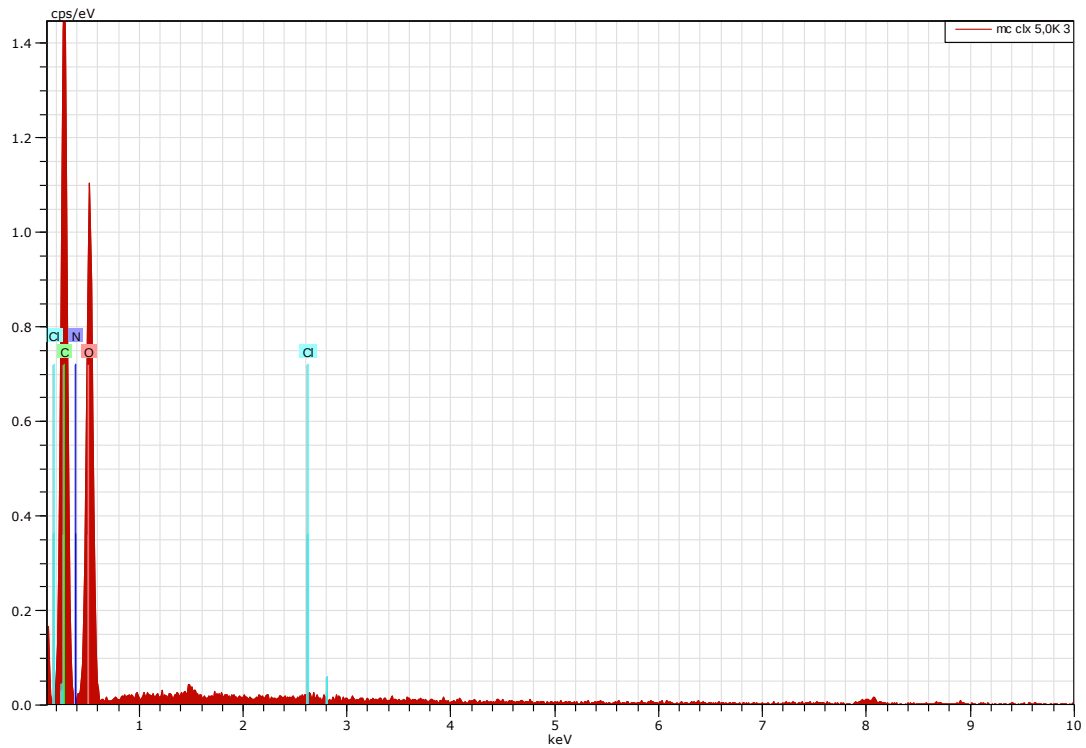
14b

Fonte: Autora.

Figura 15 - EDS da micropartícula MP:CLX:MT 3. Imagem de MEV gerada para leitura (15a); Espectro de leitura dos componentes químicos (15b).



15a



15b

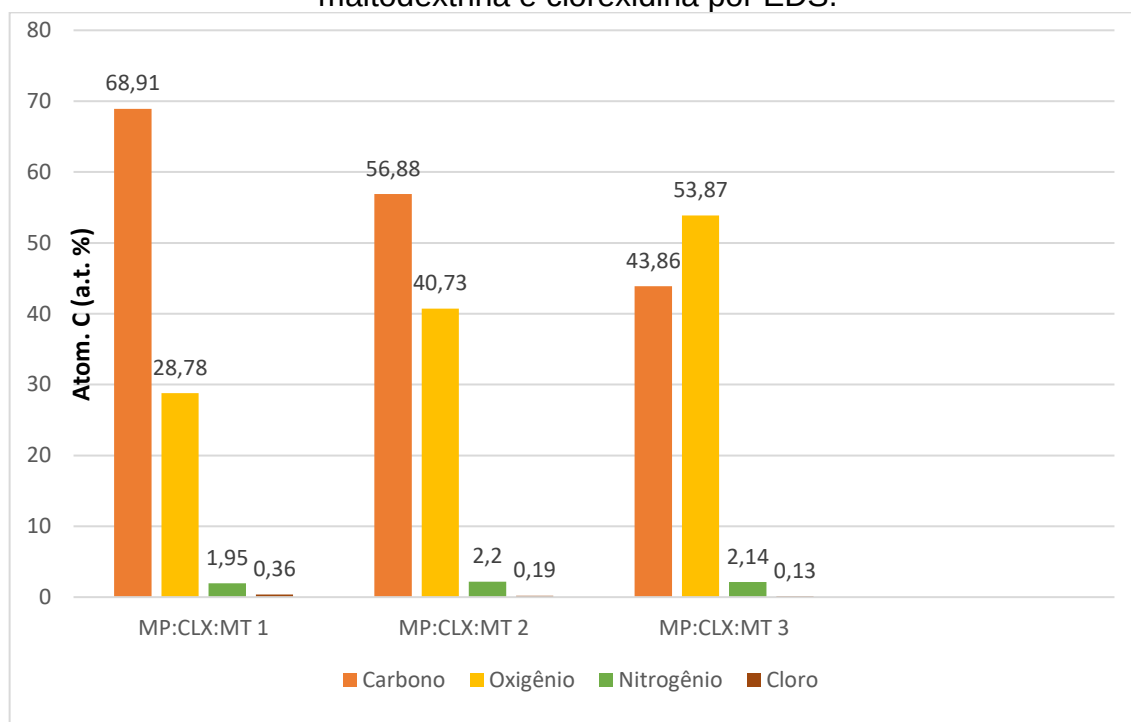
Fonte: Autora.

Tabela 7 - Análise dos componentes químicos das micropartículas de maltodextrina e clorexidina por EDS.

Elemento	AN	Séries	MP:CLX:MT 1		MP:CLX:MT 2		MP:CLX:MT 3	
			Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
Carbono	6	K-series	62,32	68,91	49,78	56,88	50,73	43,86
Oxigênio	8	K-series	34,67	28,78	47,49	40,73	46,78	53,87
Nitrogênio	7	K-series	2,06	1,95	2,25	2,20	2,16	2,14
Cloro	17	K-series	0,95	0,36	0,48	0,19	0,33	0,13
			100%		100%		100%	

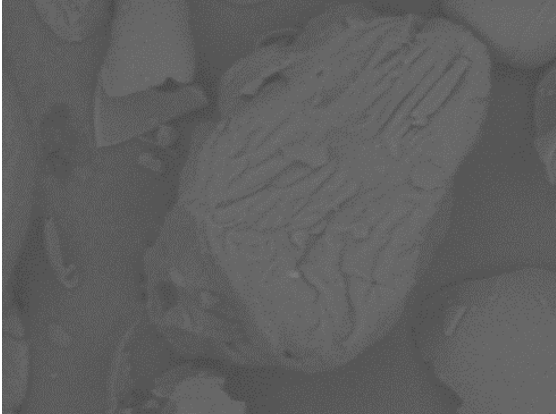
Fonte: Autora.

Figura 16 - Percentual atômico dos elementos químicos das micropartículas de maltodextrina e clorexidina por EDS.



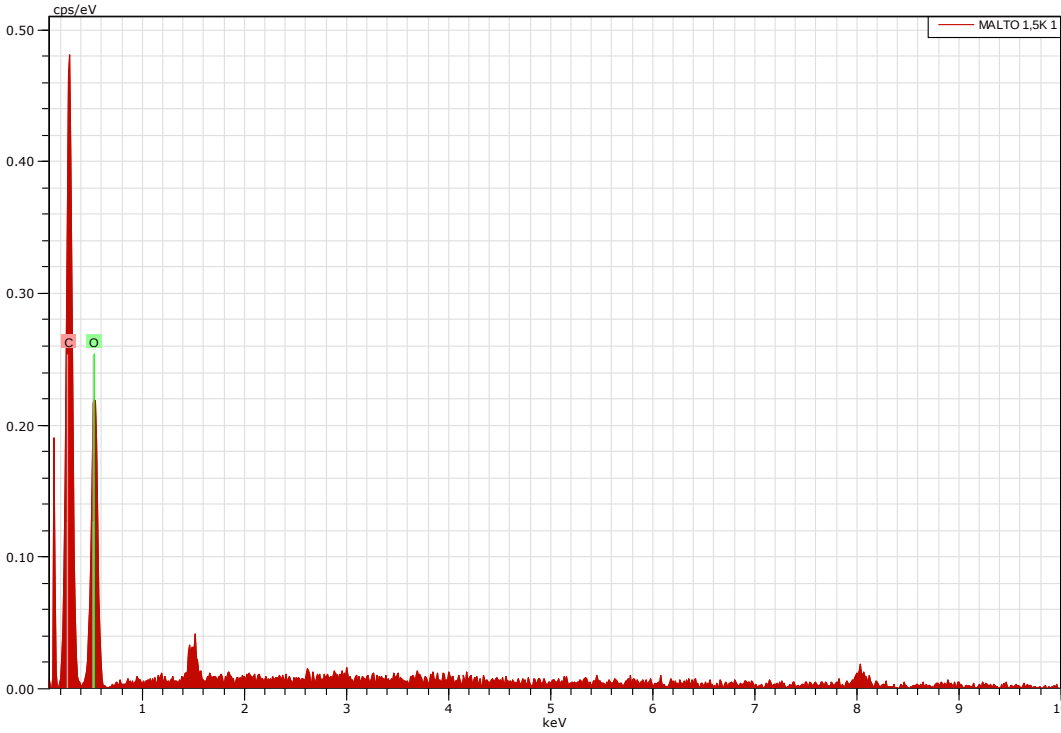
Fonte: Autora.

Figura 17 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 1. Imagem de MEV gerada para leitura (17a); Espectro de leitura dos componentes químicos (17b).



CERTBIO 2019/03/29 11:40 L D9,8 x1,5k 50 um

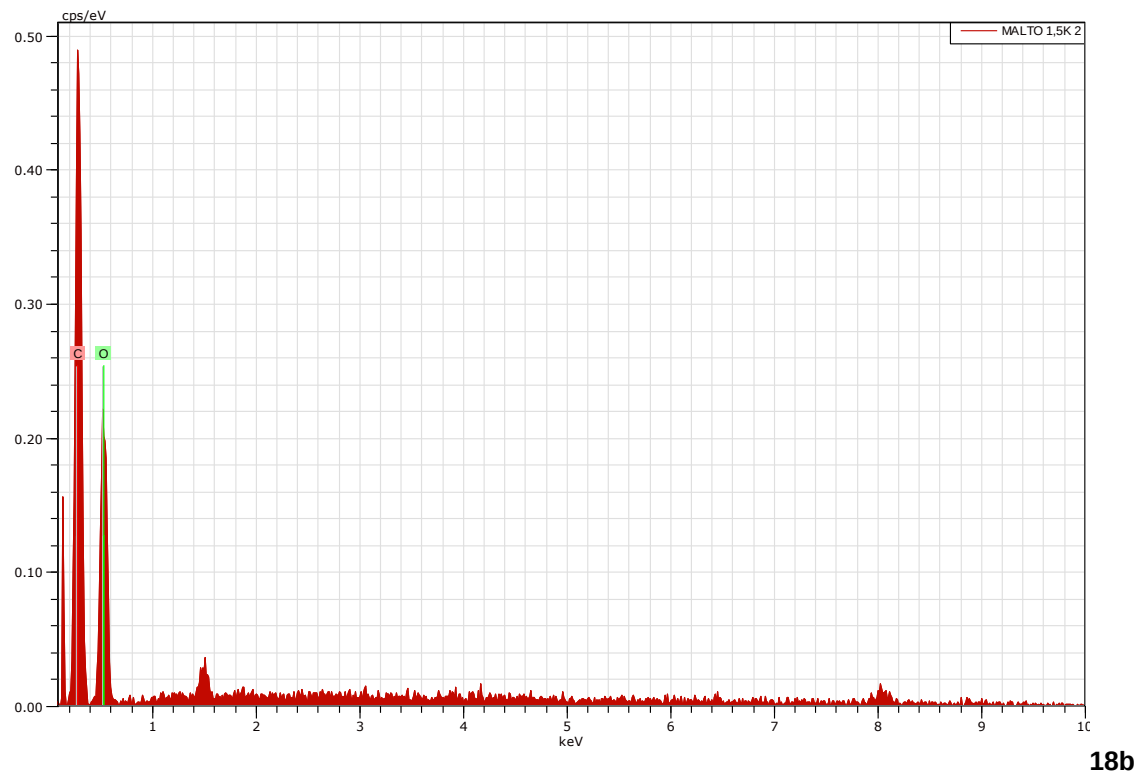
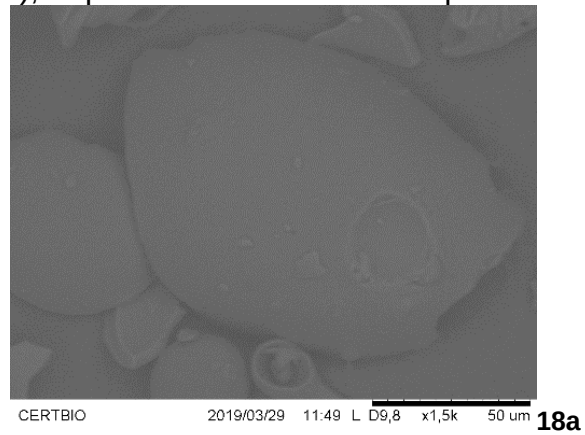
17a



17b

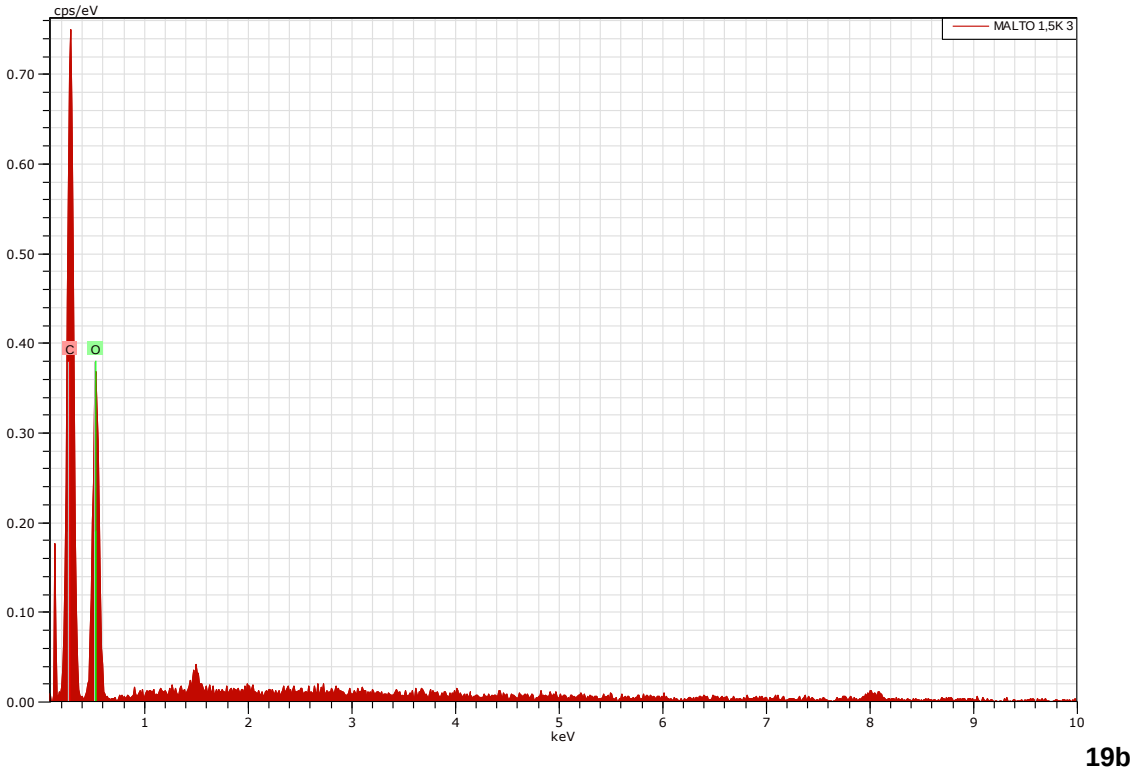
Fonte: Autora.

Figura 18 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 2. Imagem de MEV gerada para leitura (18a); Espectro de leitura dos componentes químicos (18b).



Fonte: Autora.

Figura 19 - EDS da micropartícula de maltodextrina pura 3. Imagem de MEV gerada para leitura (19a); Espectro de leitura dos componentes químicos (19b).



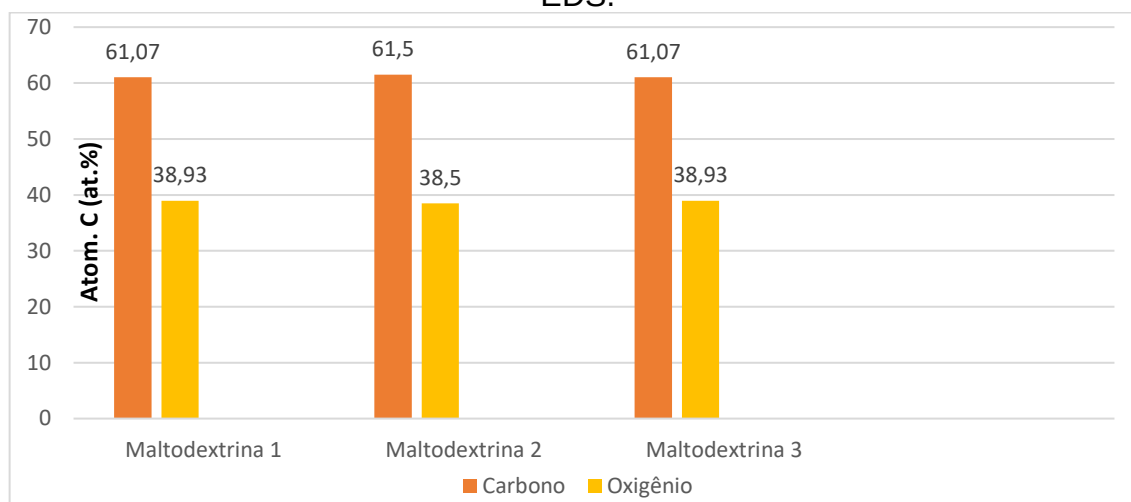
Fonte: Autora.

Tabela 8 - Análise dos componentes químicos da maltodextrina pura por EDS.

Elemento	AN	Séries	MP:CLX:MT 1		MP:CLX:MT 2		MP:CLX:MT 3	
			Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
Carbono	6	K-series	54,08	61,07	54,53	61,50	54,08	61,07
Oxigênio	8	K-series	45,92	38,93	45,47	38,50	45,92	38,93
			100%		100%		100%	

Fonte: Autora.

Figura 20 - Percentual atômico dos elementos químicos da maltodextrina pura por EDS.



Fonte: Autora.

Da mesma forma, o estudo de Priyadarshini et al. (2017) que analisaram por MEV-EDS micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina foram identificadas a presença de cloro, nitrogênio e carbono, sendo o cloro e o nitrogênio encontrados apenas nestas micropartículas quando comparadas com as partículas de hidróxido de cálcio puro. Com isso, foi confirmada a presença de clorexidina nas micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina.

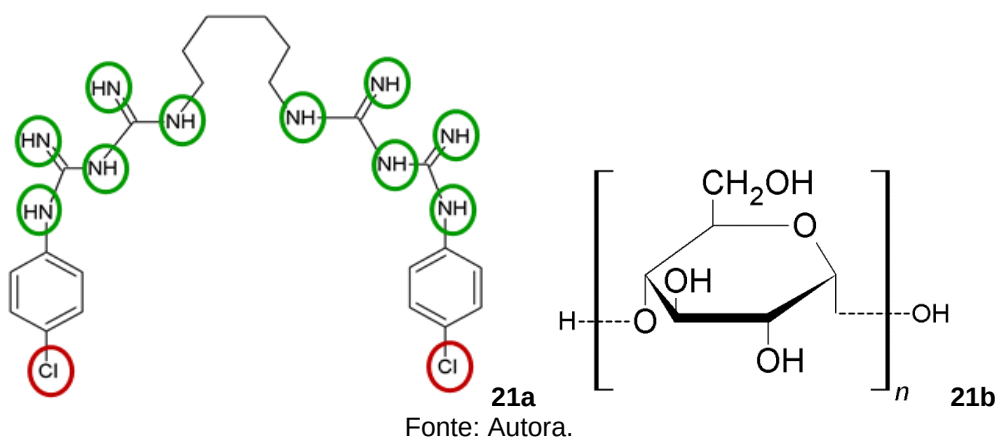
Lins (2011) comparou por análise EDS filmes de quitosana com e sem incorporação de clorexidina, encontrando o elemento cloro apenas no espectro do filme com a clorexidina. Assim foi constatado a presença da clorexidina pela marcação do cloro na análise por este se tratar de um constituinte químico exclusivo da clorexidina.

Na análise da proporção atômica dos componentes das micropartículas foi observado um maior percentual de carbono e oxigênio, enquanto o nitrogênio e o cloro

apresentaram um percentual atômico baixo, conforme apresentado na Tabela 7 e Figura 16.

Isso pode ser explicado pela proporção química dos elementos nitrogênio e cloro da molécula de clorexidina, justificando o percentual atômico baixo para nitrogênio e cloro encontrado nas micropartículas MP:CLX:MT 1, 2 e 3. A clorexidina tem a sua fórmula química $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com percentual de composição Carbono (C) 52,28%, Hidrogênio (H) 5,98%, Cloro (Cl) 14,03% e Nitrogênio (N) 27,71% (FDA Chlorhexidine Official), apresentando em cada molécula 10 átomos de nitrogênio e apenas 2 átomos de cloro, como representado na Figura 21.

Figura 21 - Molécula de clorexidina com marcação dos átomos de nitrogênio e cloro (21a), e molécula de maltodextrina (21b). Adaptado de imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.



Ademais o preparo do microparticulado de maltodextrina e clorexidina foi realizado com apenas 0,48 g de clorexidina e 19,520 g de maltodextrina em 40mL de água destilada, tendo em vista o alto potencial biológico da clorexidina como agente antimicrobiano. Assim a proporção no microparticulado é de 2,4% de clorexidina para 97,6% de maltodextrina, o que reforça a justificativa do baixo percentual atômico de nitrogênio e cloro encontrado nas amostras das micropartículas de clorexidina e maltodextrina.

Nas análises da maltodextrina pura só foram encontrados os componentes químicos carbono e oxigênio como já esperado pela sua composição molecular.

6.2.8 Avaliação por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

• Materiais e métodos

A análise térmica das micropartículas de clorexidina e maltodextrina pela técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada com as amostras das micropartículas do recipiente em uso para os experimentos (MP:CLX: MT 1), e comparado com o microparticulado que se manteve em recipiente de vidro hermeticamente fechado, sem contato com luminosidade e umidade, durante um período de 12 meses (MP:CLX:MT 2). O objetivo foi avaliar se as MP:CLX:MT 1 em contato com o ambiente durante a manipulação para os testes ou se as MP:CLX:MT 2 armazenadas sofreram degradação. As análises de DSC foram realizadas com as MP:CLX:MT 1 e 2, e também com a maltodextrina e a clorexidina liofilizada.

As curvas DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) das amostras foram obtidas por meio de um calorímetro modelo DSC-50 - Shimadzu®, de 25 – 300°C, utilizando cadinho de alumínio hermeticamente selado com cerca de 3 mg ($\pm 0,1$ mg) de cada amostra, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, na razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. Para calibração da célula de DSC foi utilizado índio (p.f. 156,2 °C; $\Delta H_{\text{fus}} = 28,54$ J g⁻¹) e zinco (p.f. 419,4 °C).

As análises de DSC foram realizadas através do software TasyS - Shimadzu®, sendo observados e avaliados processos endotérmicos, exotérmicos e eventos de degradação da amostra. Enquanto os resultados em espectro foram plotados para visualização com o auxílio do software Origin Pro8®.

• Resultados e discussão

A análise térmica por Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um método que mede a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento (OLIVEIRA et al., 2011).

A aplicação de análise térmica no campo farmacêutico é uma importante ferramenta envolvendo problemas de desenvolvimento, produção e controle de qualidade de medicamentos. Com as principais aplicações na determinação do grau de pureza das drogas, estabilidade e cinética de decomposição (ARAÚJO et al., 2010).

No presente estudo, a DSC por aquecimento foi aplicada para caracterização térmica das micropartículas de maltodextrina com clorexidina removida do recipiente em uso para os experimentos (MP:CLX:MT 1) e do recipiente que se manteve hermeticamente fechado durante um período de 12 meses (MP:CLX:MT 2), além da maltodextrina (MT) e clorexidina liofilizada (CLX), analisando diferenças do perfil térmico com mudanças físico-químicas entre os objetos do estudo.

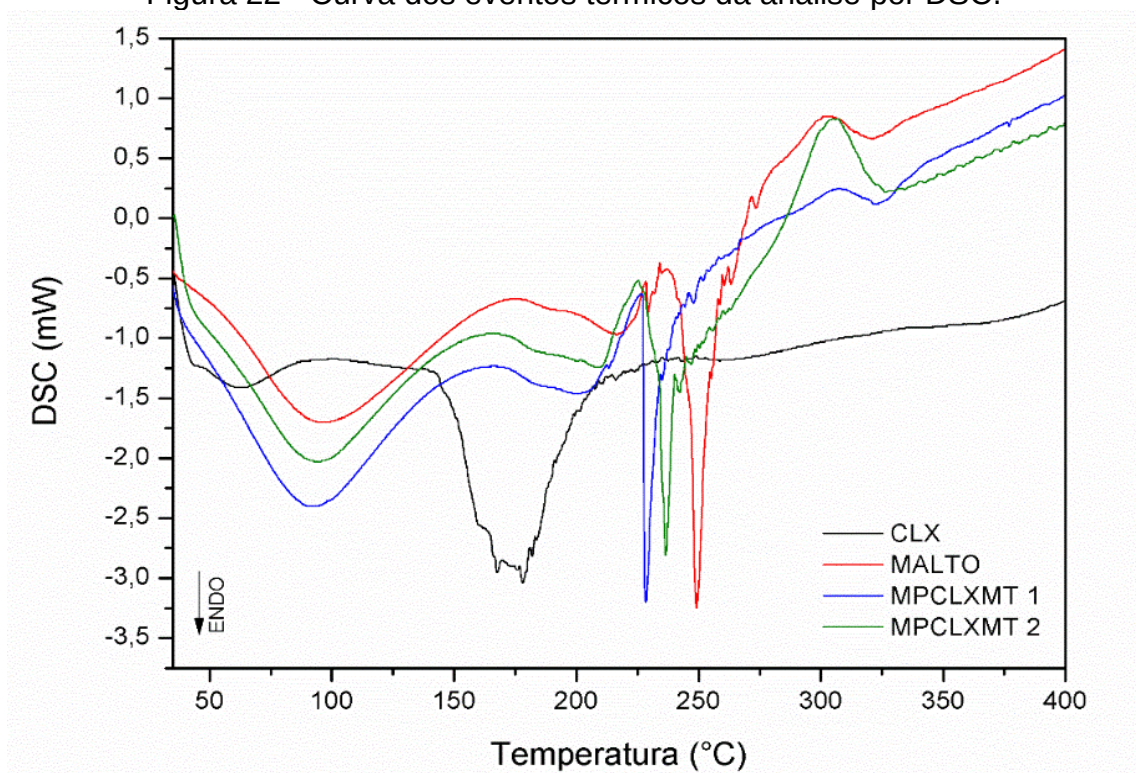
Com a análise por DSC foi possível observar dois eventos endotérmicos para todas as amostras analisadas, quando ocorre uma absorção de energia. Os dados dos eventos térmicos estão representados na Tabela 9 e Figura 22.

Tabela 9 - Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas, clorexidina e maltodextrina pura

Amostra	DSC					
	Evento 1			Evento 2		
	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
MP:CLX:MT 1	38,28	92,42	176,77	227,17	228,41	28,82
MP:CLX:MT 2	42,78	94,49	149,18	233,77	236,52	14,48
CLX	47,75	62,60	9,29	159,91	178,04	119,18
MT	54,90	96,25	139,78	246,35	249,14	40,11

Fonte: Autora.

Figura 22 - Curva dos eventos térmicos da análise por DSC.



Fonte: Autora.

Na análise de DSC das micropartículas foi observado que entre 0°C até 100°C houve perda de água com processo de gelatinização das micropartículas na faixa de temperatura de 38,28°C a 94,49°C, tendo o evento endotérmico 1 da MP:CLX:MT 1 com T_{onset} em 28,28°C, T_{pico} 92,42°C e entalpia de 176,77 Jg⁻¹, e da MP:CLX:MT 2 com T_{onset} em 42,78°C, T_{pico} 94,49°C e entalpia de 149,18 Jg⁻¹, não havendo mudança no comportamento térmico das micropartículas com relação à maltodextrina que ocorreu na faixa entre 54,90°C e 96,26°C, com T_{onset} em 54,90°C, T_{pico} 96,25°C e entalpia de 139,78 J.g⁻¹. Houve apenas uma pequena variação entre o T_{onset} e entalpia entre as micropartículas 1 e 2, com T_{pico} muito próximos, demonstrando que o período e a forma de armazenamento, assim como a exposição ao meio das micropartículas em uso não alteraram as características físico-químicas entre elas. Quanto as avaliações das micropartículas em relação à maltodextrina, apesar de haver uma variação pequena entre os T_{onset} e a energia de entalpia, as temperaturas de T_{pico} também foram muito próximas entre as análises mostrando que o processo de

obtenção por liofilização não mudou as características físico-químicas do adjuvante tecnológico.

Em relação ao evento endotérmico 2 na faixa de 227 a 250°C, referente a degradação da maltodextrina houve uma mudança em relação à temperatura de pico e entalpia entre as micropartículas obtidas com relação à maltodextrina. O comportamento térmico observado para a MP:CLX:MT 1 foi T_{onset} em 227,17°C, T_{pico} 228,82°C e entalpia de 28,82 Jg⁻¹, e da MP:CLX:MT 2 foi T_{onset} em 223,77°C, T_{pico} 236,52°C e entalpia de 14,48 Jg⁻¹, enquanto a maltodextrina foi com T_{onset} em 246,35°C, T_{pico} 249,14°C e entalpia de 40,11 Jg⁻¹. Avaliando esse evento térmico entre as micropartículas MP:CLX:MT 1 e MP:CLX:MT 2 em diferentes tempos de armazenamento houve um deslocamento da temperatura de pico 228,41°C para 236,52°C, respectivamente, e quando comparado com a maltodextrina que apresentou temperatura de pico de 249,14°C, houve uma pequena diferença de comportamento térmico de degradação entre as micropartículas 1 e 2 e a maltodextrina. Assim, como as micropartículas apresentaram esse evento em temperaturas inferiores em relação à maltodextrina, sugere-se que a mudança de comportamento ocorreu pela interação entre a clorexidina e a maltodextrina para a formação das micropartículas.

A análise de DSC da clorexidina pura foi realizada após o processo de liofilização de solução de digluconato de clorexidina a 20%, tendo sido observado também um evento endotérmico, porém este não foi considerado como pico de fusão por não ter forma definida e não se assemelhar a um pico correspondente à fusão de compostos. A temperatura encontrada para o evento da clorexidina foi na faixa de 178,04°C, com T_{onset} em 155,12°C e T_{pico} em 178,04°C. Isso ocorreu, provavelmente, pelo processo de liofilização do digluconato de clorexidina que resultou em um material amorfo, com isso o evento que foi observado pode corresponder a uma transição vítrea (T_g) ou uma degradação da clorexidina.

A ausência de pico de fusão característico no evento endotérmico da clorexidina pura também foi observado no estudo de Priyadarshini et al. (2017). Enquanto, Oliveira (2004) realizou análise por DSC da associação de clorexidina a 0,12% com quitosana tendo sido observado um pico de fusão de 142°C, sendo este

resultado compatível com o valor do ponto de fusão da clorexidina que é 142,9°C. Em relação aos resultados da análise de DSC do presente estudo, pode-se considerar que o processo de obtenção da clorexidina por liofilização em que há secagem por sublimação pode ter influenciado nas propriedades físicas da clorexidina.

Relacionando o perfil térmico entre as micropartículas 1 e 2, a maltodextrina e a clorexidina pura liofilizada, as micropartículas e a maltodextrina apresentaram eventos endotérmicos característicos como picos de fusão, enquanto a clorexidina não apresentou um pico de fusão com forma definida. Esse aspecto de não detecção de evento térmico dominante da clorexidina pura nas micropartículas, enquanto o comportamento térmico das micropartículas e da maltodextrina pura são semelhantes, sugerem que houve uniformidade da dispersão da clorexidina nas micropartículas e estas seguem as características do excipiente maltodextrina. Este dado está de acordo com a proporção de volume de 19,520 g de maltodextrina para 2,4 ml de clorexidina, que corresponde 0,48 g, no preparo das micropartículas.

O mesmo foi observado por Priyadarshini et al. (2017), que realizaram a análise térmica por DSC de micropartículas de hidróxido de cálcio carregadas com clorexidina para observar o comportamento da clorexidina nas micropartículas. Foi observado picos endotérmicos do hidróxido de cálcio puro a 222,38°C das micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina com 25 mg a 252,28°C e 50 mg a 228,40°C, e para a clorexidina pura não foi encontrado um evento endotérmico característico, apresentado uma temperatura de 135,45°C. De acordo com os autores, a ausência de domínio detectável da clorexidina pura nas micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina indicam uniformidade da dispersão da clorexidina nas micropartículas. Consequentemente, o deslocamento do pico endotérmico nas micropartículas indicam sucesso na incorporação da clorexidina nas formulações.

6.2.9 Avaliação por Termogravimetria (TG)

- **Materiais e métodos**

Na análise térmica do microparticulado de clorexidina e maltodextrina por Termogravimetria (TG) foram realizadas avaliações com as micropartículas do recipiente em uso para os experimentos (MP:CLX: MT 1), e comparado com o micropartículas que se mantiveram em recipiente de vidro hermeticamente fechado, sem contato com luminosidade e umidade, durante um período de 12 meses (MP:CLX:MT 2), tendo por objetivo avaliar se nesse período com a exposição das MP:CLX:MT 1 ao ambiente durante das manipulações para os testes houve a absorção de umidade, de forma que as MP:CLX:MT 2 serviram como parâmetro comparativo. As análises por TG foram realizadas apenas das MP:CLX:MT 1 e 2.

As curvas de TG das amostras foram obtidas através de analisador térmico TGA-50 - Shimadzu®, na faixa de temperatura de 25 – 900°C em cadinhos de alumina, que resiste ao calor e é inerte em relação aos produtos, com 3 mg de amostra, sob atmosfera de nitrogênio 100 mL min⁻¹, na razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

Todas as curvas foram realizadas e analisadas através do software TasyS - Shimadzu®, sendo observados e avaliados os eventos de perda de massa. Os resultados em espectro foram plotados para visualização com o auxílio do software Origin Pro8®.

• Resultados e discussão

A análise térmica por Termogravimetria (TG) tem aplicação na medição de variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob aquecimento (OLIVEIRA et al., 2011). No âmbito da análise térmica a análise por Termogravimetria permite avaliar o grau de pureza e estabilidade das drogas, sendo importante como aplicação no controle de qualidade de medicamentos (ARAÚJO et al., 2010).

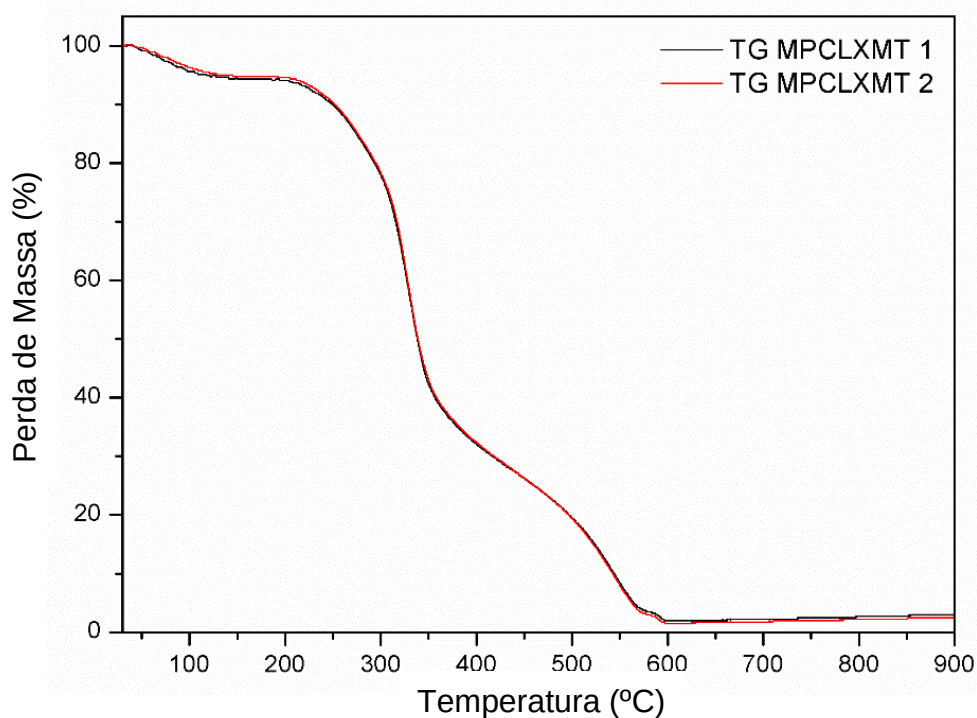
A análise térmica por TG foi utilizada para determinar variações de umidade entre as micropartículas MP:CLX:MT 1 e MP:CLX:MT 2, representando o perfil de estabilidade entre os microparticulados no período de tempo estudado de 12 meses, conforme apresentados na Tabela 10 e Figura 23.

Tabela 10 - Análise térmica por termogravimetria das micropartículas.

Amostra	TG							
	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Evento 4	
	T_{onset}	Perda de massa (%)	T_{onset}	Perda de massa (%)	T_{onset}	Perda de massa (%)	T_{onset}	Perda de massa (%)
MP:CLX:MT 1	64,31	4,57	293,93	53,78	520,38	16,65	594,78	1,85
MP:CLX:MT 2	63,41	4,68	296,08	56,69	523,74	16,40	585,81	1,50

Fonte: Autora.

Figura 23 - Curva dos eventos térmicos da análise por TG entre as micropartículas.



Fonte: Autora.

Os mesmos eventos termogravimétricos foram observados nas micropartículas 1 e 2, com mínimas variações de temperatura (T_{onset}) e percentual de perda de massa entre as amostras.

Com base nos dados de TG dos perfis termogravimétricos a análise gráfica permitiu observar uma sobreposição das amostras dos dois microparticulados, com resultados semelhantes em todos os eventos, portanto não havendo absorção de umidade o que evidencia a manutenção da estabilidade das micropartículas expostas

ao meio ambiente (MP:CLX:MT 1) em relação as micropartículas mantidas sem contato com o meio (MP:CLX:MT 2), em um período de 12 meses.

Este fato corrobora com os dados da curva de DSC realizada entre as micropartículas do presente estudo, mostrando que pequenas diferenças apresentadas no perfil calorimétrico das amostras das micropartículas de maltodextrina com clorexidina não altera a estabilidade do produto, apresentando apenas uma alteração física da mesma, sem demonstrar influência na estabilidade.

Na avaliação termogravimétrica de Priyadarshini et al. (2017) houve uma diferença na faixa da temperatura de decomposição das curvas de TGA do hidróxido de cálcio puro (350 - 400°C) em relação às micropartículas de hidróxido de cálcio com clorexidina (450 - 500°C) que se mostrou mais alta. Sendo apresentado pelos autores, que o aprisionamento das moléculas de clorexidina nas micropartículas podem resultar em mudanças estruturais nas mesmas.

6.2.10. Avaliação por infra-vermelho (FTIR)

- **Matérias e métodos**

As avaliações por infra-vermelho com transformadora de Fourier (FTIR) foram realizadas em amostras do microparticulado removido do recipiente em uso para os experimentos (MP:CLX:MT 1), e do microparticulado do recipiente que se manteve hermeticamente fechado durante um período de 12 meses (MP:CLX:MT 2), além da maltodextrina e clorexidina pura.

A obtenção dos espectros na região do infravermelho das amostras foi realizada através do espectrofotômetro Agilent Cary 630 FTIR, ao longo de um intervalo de 400 - 4.000 cm^{-1} . As amostras foram preparadas em um sedimento de brometo de potássio (KBr) formando pastilhas e levadas a leitura no aparelho. Os resultados em espectros também foram plotados com o auxílio do software Origin Pro8®.

• Resultados e discussão

A avaliação por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permite detectar características estruturais a partir da visualização de grupos funcionais em moléculas. No espectro de infravermelho da clorexidina pura há a referência as bandas características de 2947 cm^{-1} para o grupo funcional C-H, 3325 cm^{-1} para N-H, e 1093 cm^{-1} para C-N (PRIYADARSHINI et al., 2017). Para a maltodextrina pura, a banda de absorção de 1646 cm^{-1} se refere aos grupos C-OH, as bandas de absorção entre $3416 - 3475\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída aos grupos O-H e a banda em 2925 cm^{-1} foi atribuída aos grupos C-H (PAULINO et al., 2009).

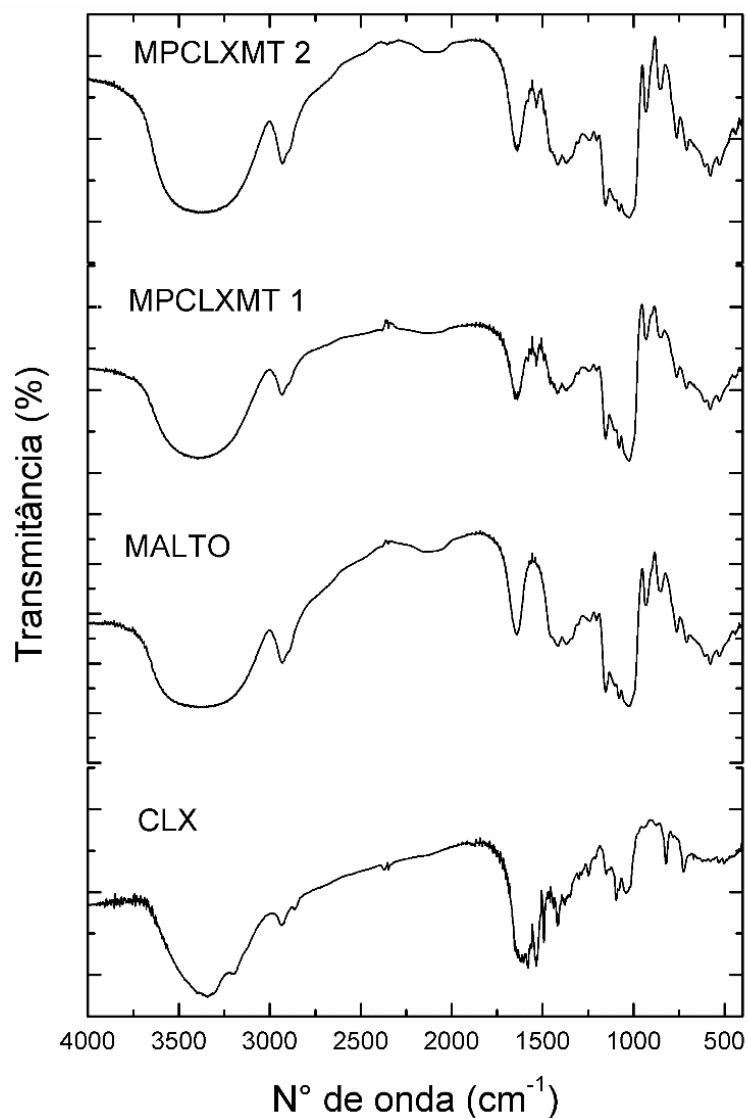
Nos espectros de absorção no infravermelho com transformadora de Fourier (FTIR) da análise da clorexidina pura foi observado uma banda de absorção por volta de 1097 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo funcional CN, a banda de 3344 cm^{-1} se refere ao estiramento do grupo NH, enquanto a banda de 3325 cm^{-1} se refere ao estiramento do grupo CH. Para a maltodextrina pura e as micropartículas MP:CLX:MT 1 e 2 foram observadas as bandas semelhantes de 1638 cm^{-1} que se refere ao estiramento do grupo COH, e banda de 2936 cm^{-1} representando o estiramento do grupo CH, enquanto para a maltodextrina pura e a MP:CLX:MT 1 a banda 3392 cm^{-1} representou o estiramento do grupo OH, e o mesmo grupo apresentou a banda 3368 cm^{-1} na MP:CLX:MT 2. Dados apresentados na Tabela 11 e Figura 24.

Tabela 11 - Principais bandas de absorção das micropartículas, maltodextrina e clorexidina pura a partir do FTIR.

	Bandas de absorção (cm^{-1})				
	C-N	C-OH	C-H	N-H	OH
CLX lit.	1093	----	2947	3325	----
CLX	1097	----	2936	3344	----
Maltodextrina lit.	----	1646	2925	----	3416-3475
Maltodextrina	----	1638	2936	----	3392
MP:CLX:MT 1	----*	1638	2936	----*	3392
MP:CLX:MT 2	----*	1638	2936	----*	3368

Fonte: Autora.

Figura 24 - Espectros de FTIR das micropartículas 1 e 2, maltodextrina pura e clorexidina.



Fonte: Autora.

Comparando-se a análise de FTIR entre as micropartículas 1 e 2, maltodextrina e clorexidina a banda de absorção de 2936 cm^{-1} que se refere ao grupo funcional CH foi simultânea entre todas as amostras, evidenciando uma superposição da maltodextrina nas micropartículas em relação à clorexidina.

As bandas de absorção referentes aos grupos funcionais CN e NH, com a presença do nitrogênio (N), que são próprios da clorexidina, não foram vistos nas micropartículas 1 e 2. Essa condição pode ser justificada pela baixa proporção da clorexidina utilizada no preparo das micropartículas de clorexidina e maltodextrina,

quando apenas 2,4% de clorexidina foi utilizada para 97,6% de maltodextrina, havendo assim um baixo percentual atômico de nitrogênio (N) que representa a proporção de 27,71% na molécula de clorexidina. Além disso, houve uma sobreposição das bandas de absorção dos grupos funcionais da maltodextrina na região das bandas dos grupos funcionais CN e NH da clorexidina nas micropartículas.

Um resultado similar foi observado por Lins (2011) que realizou a análise por FTIR de filmes de quitosana com clorexidina, onde a análise da membrana tripla de quitosana com clorexidina 0,12% não apresentou as bandas características da clorexidina, tendo sido sugerido que o aumento da quantidade de quitosana em relação à quantidade de clorexidina nos filmes tenha dificultado o aparecimento das bandas dos grupos funcionais da clorexidina. Enquanto o grupo funcional CH foi o único grupo característico da clorexidina que apresentou banda de absorção no espectro de FTIR dos filmes.

Priyadarshini et al. (2017) avaliaram por FTIR micropartículas de hidróxido de cálcio com incorporação de clorexidina a partir da análise do espectro infravermelho onde características de pico de grupos funcionais da clorexidina e hidróxido de cálcio foram observados simultaneamente nas micropartículas.

6.3 Conclusões

Diante dos resultados obtidos com os testes de caracterização das micropartículas de clorexidina e maltodextrina podemos concluir que:

- O microparticulado preparado apresentou uniformidade logo após o preparo, e estabilidade em 24 meses de forma a garantir o efeito desejado;
- Os testes de liberação da clorexidina das micropartículas demonstraram um perfil de liberação lenta e gradativa em um tempo aproximado de 2 horas em solução aquosa;
- A avaliação por microscopia de imagem de fluxo mensurou o tamanho das partículas caracterizando-as como micropartículas;

- A avaliação morfológica em microscópio eletrônico de varredura mostrou um aspecto de micropartículas irregulares, com tamanho e formatos diferentes, e estrutura porosa, compatível com a técnica de preparo por liofilização;
- A avaliação por microscópio eletrônico de varredura associado à espectroscopia por energia dispersiva comprovou por análise química a incorporação da clorexidina nas micropartículas;
- Na análise térmica por DSC foi observado um comportamento térmico semelhante das micropartículas e da maltodextrina, sugerindo que houve uniformidade da dispersão da clorexidina nas micropartículas e estas seguem as características de degradação do excipiente maltodextrina;
- A análise térmica por TG mostrou eventos térmicos semelhantes entre as micropartículas com e sem exposição ao ambiente, não havendo absorção de umidade em 12 meses o que evidencia a manutenção da estabilidade das micropartículas;
- A análise por FTIR entre as micropartículas 1 e 2, maltodextrina e clorexidina não evidenciou mudanças nas características estruturais dos grupos funcionais dos componentes das micropartículas estudadas, tendo as micropartículas um perfil semelhante à maltodextrina, mostrando a incorporação da clorexidina nas micropartículas.

CAPÍTULO IV

7. A INDICAÇÃO DA CLOREXIDINA PARA PACIENTES INTERNOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA

7.1 A condição bucal do paciente hospitalizado em Unidade de Terapia Intensiva

Pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) apresentam fatores limitantes condicionados ao seu quadro clínico que impedem uma higiene oral eficiente, com isso permite o desenvolvimento de uma alta concentração de patógenos na cavidade bucal que desencadeiam o aparecimento de patologias (LINDAU et al., 2015). Esta condição bucal de pacientes críticos favorece o desenvolvimento de patologias bucais como gengivites, periodontites e cáries, além de condições de risco como a xerostomia que influencia essas e outras patologias, determinando uma evolução mais rápida das doenças bucais e levando a um risco aumentado de infecções que podem repercutir em complicações sistêmicas (PASETTI et al., 2013).

A redução da quantidade de saliva ou xerostomia é um achado comum em pacientes hospitalizados em UTI. Em condições normais, a função da circulação da saliva na cavidade bucal é promover a remoção de restos de alimentos e bactérias, além disso a saliva contém componentes da resposta imunológica que controlam o crescimento de microrganismos. Assim, a diminuição da quantidade de saliva resulta na redução das suas propriedades mecânicas, e também de componentes salivares como a lactoferrina e a imunoglobulina A, com isso anormalidades no fluxo salivar podem colocar os pacientes em risco para o crescimento de micro-organismos na orofaringe (KAPLAN, BAUM, 1993).

Os tubos de ventilação mecânica para pacientes hospitalizados em UTI atravessam a cavidade oral e a mantém aberta permanentemente, contribuindo para potencializar a xerostomia, de forma que o paciente perde parte da função protetora da saliva, e dessa forma aumenta o acúmulo de biofilme dental (MUNRO et al., 2006). O uso de alguns medicamentos por estes pacientes pode também contribuir para a redução do fluxo salivar (BARBOSA et al., 2010).

Após 48 horas de admissão na UTI, os pacientes apresentam mudanças na composição da sua microbiota bucal, que se torna mais virulenta (SCANNAPIECO et al., 1996). A predominância de bactérias no biofilme dental é de bactérias Gram negativas e anaeróbias, entretanto com as condições dos pacientes hospitalizados em UTI que apresentam dificuldade na higiene oral, mudanças nas características da saliva e redução da microbiota anaeróbica pelo uso de antibióticos, ocorrem alterações na composição do biofilme dental que passa a abrigar uma maior quantidade de bactérias aeróbicas. Dessa forma, com o tempo de internação em UTIs há o aumento da colonização de bactérias aeróbicas no biofilme dental, servindo como um reservatório para patógenos respiratórios (BERGMANS et al., 2001; LABEAU et al., 2011).

A higiene bucal deficiente neste grupo de pacientes conduz ao aumento da quantidade e complexidade do biofilme dental, que é capaz de abrigar patógenos pulmonares e promover seu crescimento, podendo levar à colonização das vias aéreas superiores (MORAIS et al., 2006).

Com as mudanças na condição bucal, o biofilme dentário sofre transformações e se torna mais complexo, passando a servir como reservatório para a colonização de patógenos respiratórios da saliva, a partir da interação bacteriana entre bactérias indígenas do biofilme dental e patógenos respiratórios como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (SCANNAPIECO et al., 1992; SCANNAPIECO, MYLOTTE, 1996).

O biofilme dental como reservatório de patógenos respiratórios foi identificado em um estudo que analisou em 49 pacientes hospitalizados sob ventilação mecânica, sendo realizada uma análise microbiológica com teste de DNA para bactérias patógeno respiratórias do biofilme dentário e da mucosa da orofaringe. Os resultados mostraram que em 20 pacientes as espécies bacterianas do biofilme dental e das bactérias da orofaringe eram semelhantes. Dentre as espécies bacterianas encontradas, 33 espécies eram patógenos respiratórios identificados no biofilme dentário, e 11 dessas espécies foram colhidos de pacientes com evidências clínicas de pneumonia adquirida em hospital. Na análise microbiológica, 57% dos pacientes tiveram colonização do biofilme dental por bactérias aeróbicas, dentre estes sendo

45% dos pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus*, 42% por bacilos Gram negativos e 13% por *Pseudomonas aeruginosa* (EL-SOLH et al., 2004).

A avaliação da condição bucal de pacientes em UTI é essencial para que se possa buscar um diagnóstico de alterações bucais no momento da internação, e assim intervir no tratamento de doenças bucais que afetam a saúde geral desses pacientes críticos, bem como buscar medidas de controle sobre o acúmulo de biofilme dentário, e medidas de manutenção da saúde bucal nestes pacientes. Diante deste contexto, a atuação do cirurgião-dentista dentro da equipe multiprofissional aos cuidados ao paciente crítico busca a estabilização ou melhora do quadro de saúde do paciente, visando à promoção da saúde nestes pacientes (ARAÚJO et al., 2009; PASETTI et al., 2013).

7.2 Colonização por bactérias na orofaringe e sua relação com complicações no paciente hospitalizado em UTI

Pacientes hospitalizados em UTI apresentam um maior risco para o desenvolvimento de pneumonia, pois nestes pacientes as condições de proteção natural contra a invasão do trato respiratório por microrganismos estão deficientes devido a diminuição do fluxo salivar, do reflexo da tosse, da capacidade de expectoração, e das barreiras imunológicas. Sendo estas condições associadas a uma higiene bucal inadequada, que torna o biofilme dental um reservatório para microrganismos que podem instalar ou agravar um processo infeccioso nos tecidos periodontais, ou mesmo favorecer infecções nas vias aéreas (SCANNAPIECO et al., 2003; BARBOSA et al., 2010).

A pneumonia representa um grupo de doenças resultantes de infecção nas vias aéreas e que chegam até o pulmão causada por uma grande variedade de agentes infecciosos que incluem bactérias, micoplasma, fungos, parasitas e vírus, sendo a pneumonia bacteriana a forma mais comum da doença. São infecções de origem endógena, seguindo uma colonização prévia da orofaringe, e também infecções

subsequentes que podem ocorrer por inalação traquiobronquial ou após translocação bacteriana na corrente sanguínea (FOURRIER et al., 1998).

As pneumonias podem ser classificadas conforme a disseminação no pulmão, ou seja, broncopneumonia ou pneumonia lobar; de acordo com o microrganismo causal; ou conforme a circunstância em que o indivíduo desenvolveu a pneumonia, sendo classificada pneumonia adquirida. Podendo esta última ser dividida em pneumonia adquirida na comunidade ou pneumonia adquirida em hospital, causadas por espécies bacterianas diferentes, sendo a pneumonia adquirida em hospital relacionada a bactérias de maior virulência e ocorrem em pacientes mais debilitados sistemicamente, e por isso apresentam maior morbidade e mortalidade (SCANNAPIECO, MYLOTTE, 1996; SCANNAPIECO et al., 2003; RICCI, 2005).

A pneumonia bacteriana comunitária é usualmente associada com infecção por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, ou por outras espécies bacterianas como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Enquanto isso, o espectro de microrganismos responsáveis pela pneumonia adquirida em hospital é diferente, sendo representados pelos bacilos Gram negativos incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* espécies de *Serratia* e *Enterobacter*, bem como de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sendo estas as mais prevalentes (SCANNAPIECO; MYLOTE, 1996; HENRIQUES, 2013).

Staphylococcus aureus tem sido reconhecido como causador de pneumonia, sendo importante na pneumonia associado à assistência à saúde, principalmente associado à ventilação mecânica em pacientes internos em UTI. Uma cepa mais agressiva é *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), sendo isolado em comunidades com evolução rápida da infecção e grande contaminação, e também em ambientes hospitalares onde responde por infecções hospitalares graves. Inicialmente o MRSA foi exclusivamente associado à contaminação em hospitais e locais de saúde, sendo denominado MRSA-HA, e depois surgiram cepas associados às comunidades como o MRSA-CA. Ambas as cepas têm em comum a tipagem molecular e a susceptibilidade antimicrobiana, apresentando muitos casos de resistência a antibióticos (DEFRES et al., 2009).

A pneumonia adquirida em hospital, também conhecida por pneumonia nosocomial, é uma infecção do parênquima pulmonar causada por agentes etiológicos diferentes, incluindo bactérias, vírus e fungos, sendo caracterizada pelo desenvolvimento em pacientes que não apresentavam o quadro de pneumonia na internação, diagnosticada 48 horas após a internação do paciente. Representam um alto índice dentre as infecções hospitalares, especialmente em pacientes idosos e/ou imunocomprometidos (SCANNAPIECO et al., 2003; BARBOSA et al., 2010).

A pneumonia nosocomial corresponde em torno de 15% das infecções hospitalares e por volta de 25% de todas as infecções adquiridas em UTIs, sendo a sua principal causa relacionada à aspiração de conteúdo contaminado da cavidade oral. Este tipo de pneumonia é a maior causa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados em UTI, apresentando uma alta mortalidade de aproximadamente 33% nos indivíduos acometidos, gera dificuldades na melhora do quadro clínico do paciente, prolongando da sua estada na UTI, gerando diminuição no número de leitos disponíveis e ocasionando maiores custos para a instituição (ANVISA, 2009).

Nos Estados Unidos a cada ano ocorrem entre 5 e 10 episódios de pneumonia relacionada à assistência à saúde por 1.000 admissões, dentre estas aproximadamente 25% são adquiridas nas UTIs. Enquanto isso, os dados epidemiológicos sobre a pneumonia relacionada à assistência à saúde nos hospitais brasileiros ainda são imprecisos, por não serem dados nacionais. Assim, a notificação de pneumonia associado à ventilação mecânica ocorridas nas UTIs brasileiras tornou-se obrigatória a partir de 2017, para que dados epidemiológicos nacionais possam ser conhecidos, cujas taxas podem variar de acordo com a população de pacientes e os métodos diagnósticos disponíveis (ANVISA, 2017).

A ventilação mecânica é uma intervenção essencial em muitos pacientes críticos, sendo necessário a instalação de um tubo endotraqueal que aumenta o risco para a infecção nosocomial, principalmente a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM). Nesta condição, os microrganismos que colonizam as vias aéreas são resistentes a muitas drogas e o tratamento se torna mais problemático e com maior probabilidade de falhas e insucesso (MARINO et al., 2017; SANDS et al., 2017).

A pneumonia associada a ventilação mecânica é normalmente associada à microaspiração de conteúdos microbianos para as vias aéreas inferiores, cujos fatores de risco são o aumento da colonização da orofaringe e estômago por microrganismos, condições que favorecem aspiração do trato respiratório ou refluxo do trato gastrointestinal, condições que requerem uso prolongado de ventilação mecânica com exposição potencial a dispositivos respiratórios e contato com mãos contaminadas de profissionais da área da saúde, além de fatores do hospedeiro como idade e imunossupressão. Para o desenvolvimento desse tipo de pneumonia existem os fatores não modificáveis como idade, a gravidade do paciente na entrada na UTI e presença de comorbidades, enquanto os fatores modificáveis se relacionam com a microbiota encontrada na UTI, o que determina a importância de conhecer os agentes microbianos mais frequentes em cada ambiente (ANVISA, 2017; SANTOS et al., 2018).

A PAVM se relaciona com a presença do tubo endotraqueal que leva oxigênio às vias aéreas inferiores atravessando a cavidade bucal e a traquéia. Nos pacientes com ventilação mecânica há uma relação positiva entre a diminuição do volume da saliva, o aumento da quantidade de biofilme e o aumento do risco de pneumonia, sendo o maior fator de risco a colonização da orofaringe por patógenos respiratórios como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e bastonetes Gram negativos como a *Klebsiella pneumoniae*, a *Escherichia coli* e espécies de *Enterobacter* (BERGMANS, 2001; MUNRO et al., 2006).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de pneumonia nosocomial são a pobre higiene oral, o desenvolvimento de doença periodontal, a diminuição da quantidade e do pH da saliva, a colonização do biofilme dental por patógenos respiratórios, o tempo de internação, o uso de medicamentos, bem como alterações da resposta imunológica de pacientes hospitalizados (SCANNAPIECO et al., 2003).

A PAVM ocorre em pacientes internos em UTI com uso do tubo endotraqueal ou traqueostomia por pelo menos 48 a 72 horas. Após 24 horas da admissão dos pacientes na UTI, ocorrem mudanças na microbiota da orofaringe para patógenos Gram negativos que se acumulam no biofilme dental, de forma que este passa a servir para o crescimento e acúmulo de patógenos respiratórios, e o tubo traqueal serve de

conduto dos patógenos da cavidade oral para o pulmão. A pneumonia associada à ventilação mecânica aumenta a duração da intubação, o tempo de internação e o aumento da mortalidade nestes pacientes (ZAND et al., 2017).

A microbiota oral que pode promover pneumonia associado à ventilação mecânica está associado a uma rápida colonização de sítios da cavidade bucal por patógenos respiratórios incluindo *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter* que podem se disseminar para o pulmão. Estas bactérias que passam a colonizar a cavidade oral e colonizam o lumen do tubo endotraqueal, e posteriormente se deslocam para as vias aéreas inferiores e provocam pneumonia. Por outro lado, após a extubação dos pacientes, há uma mudança nas condições bucais, havendo uma reversão da colonização microbiana da cavidade oral que volta a apresentar predominantemente a microbiota oral (SANDS et al., 2017).

Uma análise microbiológica do biofilme dental, do biofilme do tubo endotraqueal e do aspirado traqueal mostrou a relação da composição bacteriana entre estes locais de pacientes sob ventilação mecânica. No estudo foram identificados a composição bacteriana com avaliação do DNA bacteriano, tendo sido observado que não houve diferenças na composição bacteriana nos três locais avaliados. Foram identificadas espécies orais como *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus salivarius* e *Prevotella melaninogenica* associados com patógenos respiratórios como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Os autores concluíram que a alta similaridade entre a microbiota do biofilme dental, do biofilme do tubo endotraqueal e do aspirado traqueal sugerem que a cavidade oral é um local importante de crescimento bacteriano que favorece a colonização do tubo endotraqueal seguido da aspiração para as vias aéreas inferiores (MARINO et al., 2017).

Um estudo microbiológico analisou os microrganismos mais frequentes na secreção da traqueal de pacientes hospitalizados em UTI com diagnóstico de pneumonia nosocomial, sendo observado 23,3% de *Streptococcus pneumoniae*, 20% de *Pseudomonas aeruginosa*, 13,3% de *Staphylococcus aureus*, 13,3% de *Klebsiella pneumoniae*, 6,6% de *Candida albicans*. Neste estudo ainda foi observado que dessas espécies 70% foram encontradas colonizando o biofilme dental, 63,33% a língua,

73,33% o tubo endotraqueal do respirador artificial e 43,33% as espécies encontradas estavam colonizando todas as áreas simultaneamente (OLIVEIRA et al., 2007). Outra análise microbiológica de pacientes com pneumonia nosocomial encontrou 30,7% de *Staphylococcus aureus* no biofilme dental, comprovando que a cavidade bucal pode ser um reservatório para patógenos respiratórios (BARBOSA et al., 2010).

O estudo de Sands et al. (2017) mostrou que o biofilme dental é uma fonte potencial para patógenos da pneumonia associada à ventilação mecânica, através da realização de análises das mudanças microbiológicas no biofilme dental e nas vias aéreas inferiores durante e após a ventilação mecânica. Tendo sido demonstrado que, durante a ventilação mecânica, o biofilme dental passa a ser colonizado por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que também colonizam as vias aéreas inferiores e o tubo endotraqueal. Após a extubação as análises mostraram que 70% dos pacientes com *S. aureus* e 55% com *P. aeruginosa* tiveram a reversão da colonização do biofilme dentário para bactérias comuns da cavidade oral.

Além dos patógenos respiratórios que podem colonizar o biofilme dental e a orofaringe e serem aspirados para as vias aéreas inferiores, bactérias anaeróbias da microbiota bucal que colonizam o biofilme dentário como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e espécies de *Bacteroides*, que são agentes etiológicos na patogênese das doenças periodontais, também podem ser aspirados para as vias aéreas inferiores e causar pneumonia (SCANNAPIECO, MYLOTTE, 1996; FOURRIER, 1998; RAGHAVENDRAM et al., 2007).

As bactérias orais podem participar de infecções respiratórias por diversos mecanismos por via direta ou indireta. Por via direta, os periodontopatógenos podem ser aspirados e causar infecção no pulmão. Enquanto por via indireta, as enzimas presentes na saliva provenientes de doença periodontal podem provocar mudanças na superfície da orofaringe e promover a adesão e colonização por patógenos respiratórios, ou quando ocorre destruição das películas salivares protetoras pelas bactérias orais e isso diminuem a proteção contra a adesão de patógenos respiratórios, ou ainda, quando as citocinas originadas pela doença periodontal podem

alterar o epitélio respiratório e promover infecção pelos patógenos respiratórios (SCANNAPIECO, 2002).

Assim, compreende-se a necessidade de uma descontaminação eficiente da cavidade oral dos indivíduos hospitalizados em UTI, principalmente aqueles pacientes sob ventilação mecânica, a fim de reduzir a colonização pulmonar por patógenos orais e consequentemente as taxas de incidência da citada doença (ANVISA, 2009; PASETTI et al., 2013).

A descontaminação da cavidade bucal e da orofaringe pode reduzir a incidência de pneumonia nosocomial em pacientes sob ventilação mecânica em UTI. Isso foi visto em uma pesquisa que desenvolveu um protocolo de descontaminação da orofaringe com uma solução de antibióticos tópicos contendo 2% de gentamicina, 2% de colistina e 2% de vancomicina aplicado 24 horas após a intubação, e comparado com um mesmo protocolo aplicado com uma solução placebo. Para os pacientes que receberam o protocolo de descontaminação com antibióticos tópicos, houve uma redução de 67% do índice de pneumonia nosocomial associado à ventilação mecânica (BERGMANS et al., 2001).

7.3 Colonização por fungos na orofaringe e sua relação com complicações no paciente hospitalizado em UTI

A candidose bucal é uma infecção oportunista causada pelo fungo do gênero *Candida*, sendo a espécie *albicans* a mais associada. A *Candida albicans* é comumente encontrada na mucosa bucal, gastrointestinal e vaginal de pessoas saudáveis e por si só não é capaz de desencadear doença. O desenvolvimento da doença ocorre em condições de diminuição da resistência imunológica do indivíduo, quando o fungo deixa de existir na condição saprófita e passa a ser parasita (STRAMANDINOLI et al., 2010).

Pacientes hospitalizados fazem uso de terapia medicamentosa prolongada, que alteram a resposta imunológica, e além disso estão sob cuidados precários da higiene oral. Estas condições potencializam o aparecimento de infecções oportunistas que tendem a se manifestar com maior frequência e severidade (GICLIO et al., 2012).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas nos pacientes hospitalizados são o uso de medicamentos como antibióticos de largo espectro e corticosteróides que afetam a resposta imunológica, e de psicotrópicos que alteram o fluxo salivar, modificam a microbiota bucal e provocam alterações epiteliais na mucosa. Também estando relacionados com outras condições como presença de diabetes mellitus, desordens imunológicas, neoplasias malignas, deficiência nutricional, anemia e idade avançada (STRAMANDINOLI et al., 2010).

A infecção nosocomial por fungos é considerada grave, sendo as espécies de fungos mais associados a esta infecção a *Candida* e o *Aspergillus*. A infecção pelos fungos da espécie *Aspergillus* é uma infecção oportunista em pacientes críticos que pode se difundir e envolver múltiplos órgão e sistemas, apresentando alto grau de mortalidade. Em uma análise de complicações de pacientes críticos em UTI 1,9% foram de infecções por fungos que desenvolveram candidose ou aspergillose, e a mortalidade para estes pacientes com infecções por fungos foi de 58,8% (BADIEE et al., 2011).

Em uma investigação de candidose bucal foi encontrado uma prevalência de 30% em pacientes hospitalizados, havendo uma forte associação deste índice com a faixa etária e o uso de sonda nasogástrica. Na faixa etária de 70 a 98 anos, 41,3% dos pacientes apresentaram candidose bucal, e 88,9% dos pacientes que desenvolveram *Candida* na cavidade bucal faziam uso de sonda nasogástrica (STRAMANDINOLI et al., 2010).

Leveduras são parte da microbiota fisiológica da mucosa oral, e do trato intestinal de 40 a 65% de indivíduos adultos, entretanto em pacientes imunossuprimidos e com uso prolongado de medicamentos, os fungos podem provocar infecções graves (LINDAU et al., 2015). Sendo observado que colonizações isoladas por *Candida albicans* aumentam o risco para infecções sistêmicas por *Candida* em pacientes hospitalizados. A incidência de infecção nosocomial por *Candida* é alta e crescente, e associada a altas taxas de mortalidade (GIGLIO et al., 2012). A colonização por *Candida* foi comum no trato respiratório de pacientes com ventilação mecânica, e associada ao tempo prolongado de internação (BADIEE et al., 2011).

Uma análise para terapia sistêmica antifúngica foi realizada em 500 pacientes com colonização pulmonar por *Candida* spp, no estudo foram excluídos 178 pacientes com colonização multifocal por *Candida*, e 147 pacientes com pneumonia pré-existente. Dos 175 pacientes analisados, 44 receberam terapia antifúngica sistêmica, e 131 não receberam. Os resultados mostraram que no grupo de tratamento 47,8% adquiriram pneumonia e destes 50% faleceram, no grupo controle 16,8% adquiriram pneumonia e 29,8% faleceram. Com os resultados, os autores discutiram que existem muitas variáveis associadas ao aparecimento de pneumonia, de forma que a terapia antifúngica pode não ter um efeito independente em pacientes doentes críticos com colonização por *Candida* spp. Segundo os autores, os resultados conflitantes quanto ao resultado da terapia antifúngica pode estar relacionada ao fato do tratamento ser instituído apenas com a presença da colonização por *Candida* no pulmão, sem uma pneumonia pré-existente; por não ter sido considerado outros fatores de risco para pneumonia associado à ventilação mecânica; e por diferentes espécies de *Candida* terem diferentes patogenicidade e sensibilidade a drogas, o que não foi considerado na amostra (LINDAU et al., 2015).

Para o controle da instalação de candidoses em pacientes internados em UTI foi avaliado a eficácia da profilaxia com nistatina oral. Sendo observado que o uso de nistatina oral como medida profilática à infecção por fungos foi eficaz, reduzindo significativamente a colonização por fungos em pacientes sob cuidado de terapia intensiva, mesmo naqueles já colonizados pelo fungo *Candida* no momento da internação (GIGLIO et al., 2012).

7.4 O uso da clorexidina no protocolo de cuidados bucais para pacientes hospitalizados em UTI

O atendimento odontológico em UTI faz-se necessário como suporte no diagnóstico das alterações bucais e como coadjuvante na terapêutica médica. A atuação da odontologia hospitalar tem a sua importância frente a atuação em procedimentos emergenciais por trauma, procedimentos curativos e restauradores na

adequação do meio bucal e maior conforto ao paciente, e em procedimentos preventivos quanto ao agravamento da condição sistêmica ou o surgimento de uma infecção hospitalar. Sob esse último aspecto, destaca-se a associação da melhora da higiene oral pelo acompanhamento profissional qualificado com o controle da progressão de doenças respiratórias em pacientes de alto risco e internados em UTIs (RABELO et al., 2010).

Diante desse contexto, a Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB), seguindo um padrão internacional, desenvolveu um protocolo para prescrição e orientação dos procedimentos de higiene bucal sob responsabilidade das equipes de odontologia e/ou enfermagem. O protocolo de higiene bucal do paciente adulto internado em UTI da AMIB preconiza um plano de cuidados odontológicos individualizado para cada paciente, com a frequência da higiene bucal relacionada à necessidade do usuário, determinada após avaliação do profissional odontólogo (AMIB, 2014).

Considerando o digluconato de clorexidina como um antisséptico padrão-ouro *vitro/vivo*, a AMIB desenvolveu um procedimento operacional padrão (POP) para os cuidados com a higiene bucal de pacientes internos em UTI com a solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12%, sendo sua aplicação indicada com uma frequência de 12 horas associado a realização da higiene oral. A técnica de aplicação da clorexidina deve ocorrer com o auxílio de gaze umedecida em toda a cavidade oral da região posterior em direção à região anterior, evitando a translocação bacteriana da cavidade oral para a orofaringe que pode propiciar a aspiração de microrganismos para as vias aéreas inferiores. Como preconizado no POP, nos intervalos de aplicação da clorexidina, a higiene bucal poderá ser realizada com água destilada ou filtrada e ou aromatizante bucal sem álcool de acordo com a prescrição (AMIB, 2014).

A higiene oral com gluconato de clorexidina para pacientes internos em unidades de terapia intensiva tornou-se uma prática padrão na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica. Pesquisas reportam que 60% a 70% das unidades de terapia intensiva na Europa e na América do Norte realizam os cuidados com a higiene oral com clorexidina pelo menos uma vez ao dia em todos os pacientes com ventilação mecânica (HOUSTON et al., 2002).

A descontaminação da orofaringe com clorexidina em pacientes críticos tem uma aplicação fácil e de baixo custo, e reduz as taxas de infecções respiratórias nosocomial e o uso de antibióticos sistêmicos não profiláticos, e assim reduz os custos de um tratamento com antibiótico adicional (DeRISO et al., 1996). A realização de criteriosa higiene oral com clorexidina a 0,12% ou 0,2% tem sido indicada para pacientes internos em UTIs para a redução das pneumonias nosocomiais (BERALDO, ANDRADE, 2008; SCANNAPIECO et al., 2003). Associado a higiene oral com clorexidina, é fortemente recomendada a aspiração da secreção subglótica como procedimento de rotina para a prevenção de pneumonias (ANVISA, 2009).

O biofilme dental é considerado um reservatório para patógenos respiratórios, e a descontaminação da orofaringe em pacientes hospitalizados com antissépticos pode reduzir a incidência de infecções respiratórias (FOURRIER et al., 1998).

O efeito positivo de um cuidado sistemático com a saúde oral em pacientes hospitalizados em estado crítico de UTI foi evidenciado em um estudo que adotou um protocolo com remoção de biofilme da cavidade bucal associado à aplicação de clorexidina a 0,12%. O protocolo foi associado a avaliações da condição de saúde da cavidade oral, e de medidas de placa e scores da mucosa, sendo observado que pacientes que receberam o protocolo sistemático de cuidados orais apresentaram diminuição dos índices de alterações orais. Entretanto, para pacientes hospitalizados em UTI o tempo de utilização da clorexidina excede o período preconizado de duas semanas consecutivas, aumentando a probabilidade de aparecimento de efeitos adversos (AMES et al., 2011).

O protocolo de remoção do biofilme lingual associado a outros dispositivos de higiene bucal resulta em benefícios no controle da colonização microbiana em pacientes internos em unidades de terapia intensiva sob ventilação mecânica. Tendo em vista que espécies bacterianas envolvidas no desenvolvimento de pneumonia nosocomial colonizam concomitantemente a secreção traqueal, o biofilme dentário e também o biofilme lingual (SANTOS et al., 2013).

Um estudo piloto foi realizado para determinar se existe diferença entre as taxas de pneumonia nosocomial em pacientes intubados que receberam cuidados de higiene bucal duas vezes ao dia com clorexidina a 0,12% em relação a pacientes que

receberam o cuidados de higiene oral padrão com haste de algodão e peróxido de hidrogênio seis vezes ao dia. Os resultados sugeriram que o cuidado com a higiene bucal duas vezes ao dia com gluconato de clorexidina a 0,12% reduziu o risco de pneumonia nosocomial em pacientes intubados mais do que o protocolo padrão de higiene bucal seis vezes ao dia (BOPP et al., 2006).

Houston et al. (2002) testaram a eficácia do enxágue oral com digluconato de clorexidina a 0,12% sobre a colonização microbiana do trato respiratório e pneumonia nosocomial em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca. Foi observado que a taxa de pneumonia nosocomial foi reduzida em 52% nos pacientes tratados com clorexidina a 0,12%. Entre pacientes intubados por mais de 24 horas que apresentavam culturas com crescimento microbiano e com pneumonia, a taxa de pneumonia foi reduzida em 58% nos pacientes tratados com clorexidina a 0,12%, assim como a redução da colonização bacteriana.

Uma higiene oral efetiva é importante para pacientes sob ventilação mecânica internos em unidades de terapia intensiva, sendo observado que a higiene oral incluindo o uso da clorexidina está relacionado com uma redução de 40% dos índices de pneumonia associado à ventilação mecânica. Análises de estudos clínicos não mostraram evidências de que há diferenças entre a higiene oral associando clorexidina à escovação e o uso isolado da clorexidina (RICHARDS, 2013).

O uso tópico da clorexidina na higiene bucal de pacientes internos em UTI e sob ventilação mecânica auxilia na redução da colonização bacteriana na cavidade bucal, incluindo a colonização por *Staphylococcus aureus*, com isso pode reduzir a incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica. Sendo a utilização da clorexidina eficaz e segura, não havendo efeitos colaterais graves, e representando um baixo custo durante o período de hospitalização (BERALDO, ANDRADE, 2008).

Em análises de estudos clínicos randomizados, que avaliaram os efeitos da higiene oral na incidência da pneumonia associado à ventilação mecânica em pacientes críticos internos em unidades de terapia intensiva, foi visto a ação preventiva do uso da clorexidina. Sendo observado que a higiene oral associada a enxaguatório bucal ou gel com clorexidina reduziu o risco de pneumonia associado à ventilação mecânica em pacientes críticos. Entretanto, não houve evidências de

diferenças nos resultados sobre a mortalidade, duração da ventilação mecânica ou permanência de internação na UTI (HUA et al., 2016; VEITZ, 2007).

Os cuidados com a higiene oral, que abrangem cuidados mecânicos e intervenções farmacológicas, ajudam a fornecer conforto para os pacientes internos em UTI e a prevenir a ocorrência de pneumonia associada à ventilação mecânica. Neste contexto, um estudo avaliou o efeito da higiene oral com clorexidina a 0,2% e 2% sobre a colonização da orofaringe e a pneumonia associado à ventilação mecânica em pacientes adultos internos em UTI. Os resultados mostraram uma redução significativa da pneumonia associada a ventilação mecânica e colonização da orofaringe por patógenos respiratórios nos pacientes sob uso de solução de clorexidina a 2% em relação a clorexidina a 0,2%, embora não houve diferença significativa entre os grupos para duração da ventilação mecânica e taxa de mortalidade, apesar desses fatores serem menor nos pacientes sob uso da clorexidina a 2%. Foi observado que a clorexidina a 2% foi mais efetiva para bactérias Gram negativas e Gram positivas, entretanto foi menos efetiva para *Acinetobacter*, podendo estar associado a uma prevalência desta bactéria ou mesmo a uma resistência à clorexidina. Com relação aos efeitos adversos da clorexidina, a alta concentração de clorexidina revelou efeitos adversos de irritação da mucosa em ambos os grupos e mudança na coloração dos dentes no grupo da clorexidina a 2% (ZAND et al., 2017).

Klompas et al. (2014), sugerem uma reavaliação da rotina de higiene oral em pacientes com ventilação mecânica. Segundo os autores, a partir de estudo de revisão sistemática e meta-análise, a utilização da clorexidina na prevenção de pneumonia associado à ventilação mecânica é questionável. Os autores observaram que os cuidados bucais de rotina com clorexidina previnem a pneumonia nosocomial em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca, mas não parece diminuir o risco de pneumonia em pacientes sem cirurgia cardíaca, por não apresentar resultados equivalentes em qualquer população de estudo. Ainda sendo questionado que mesmo reduzindo a incidência de pneumonia nosocomial, não se observa uma redução significativa da mortalidade, duração da intubação ou tempo de permanência na UTI.

7.5 Análise de banco de dados da coleta da secreção traqueal de pacientes internos na UTI do HULW

• Materiais e métodos

Foi realizada a análise do banco de dados da avaliação microbiológica arquivados pelo Laboratório de microbiologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, Campus I - UFPB, João Pessoa, Paraíba. O objetivo foi avaliar o tipo e a prevalência das cepas bacterianas identificadas pela análise microbiológica da secreção ou aspirado traqueal de pacientes intubados, com quadro clínico de pneumonia ou suspeita de pneumonia, da UTI adulta e pediátrica do referido hospital, e comparar com os relatos na literatura do mesmo grupo de pacientes. Foram coletados os dados de todas as análises realizadas no período do ano de 2017, registrados no arquivo de programa Excel® do laboratório de microbiologia do HULW-UFPB.

O objeto da análise do banco de dados do laboratório de microbiologia do HULW foi resultado do processamento do material biológico da coleta da secreção ou aspirado traqueal realizada após a solicitação do médico responsável pelos pacientes internos nas UTIs do hospital. O banco de dados possuía informações da identificação do paciente, identificação microbiológica da cepa encontrada no material coletado, e análise da resposta a antibióticos das cepas encontradas. Todos os procedimentos de armazenamento de dados foram realizados pelos técnicos do laboratório de microbiologia do referido hospital, sob coordenação da microbiologista Alba Lúcia Maria da Costa Carvalho.

O sigilo da identificação dos pacientes foi mantido, e obedecidos os aspectos éticos e legais de trabalhos envolvendo seres humanos, preconizados pela Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HULW/UFPB, com parecer número 2.894.075, CAAE 564 166 16.8.0000.5183 (ANEXO A).

• Resultados e discussão

A análise do banco de dados foi de 106 pacientes intubados com pneumonia em um período de 1 ano (2017), sendo identificadas diferentes cepas bacterianas e levedura, como representados na Tabela 12:

Tabela 12 – Tipo e prevalência das cepas identificadas em número e percentual de pacientes internos na UTI do HULW, 2017.

Cepa	Número de casos	Percentual (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	49,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	14,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	10,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	7,5
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	5	4,7
<i>Escherichia coli</i>	4	3,8
Leveduras	9	8,4
Outros (cepas isoladas)	2	1,9

Fonte: Autora.

Os resultados da análise da secreção traqueal dos pacientes intubados internos no Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB, mostraram um predomínio de prevalência da contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* com 49%, seguidos do *Acinetobacter baumannii* com 14,2%, da *Klebsiella pneumoniae* com 10,5%, leveduras, sem identificação de espécie, com 8,4%, e *Staphylococcus aureus* com 7,5%.

Segundo Camargo et al. (2004), a avaliação microbiológica do aspirado traqueal é uma ferramenta importante para confirmar o diagnóstico clínico da pneumonia associada à ventilação mecânica, e também para o direcionamento do tratamento com agente antimicrobiano específico. Para tanto, os resultados qualitativos de avaliação do tipo de cepa na análise microbiológica se mostram mais sensíveis e eficazes que os métodos quantitativos, quando se observa a quantidade de colônias encontradas na amostra em análise. Diante disso, as análises de culturas quantitativas da secreção traqueal não podem substituir as avaliações qualitativas, quando o propósito é confirmar o diagnóstico clínico de pneumonia e ajustar o tratamento com agentes antimicrobianos.

Oliveira et al. (2007), em sua análise microbiológica da secreção traqueal de pacientes hospitalizados em UTI com diagnóstico de pneumonia, observaram 23,3% de *Streptococcus pneumoniae*, 20% de *Pseudomonas aeruginosa*, 13,3% de *Staphylococcus aureus*, 13,3% de *Klebsiella pneumoniae*, e 6,6% de *Candida albicans*, sendo 70% das espécies bacterianas também encontradas no biofilme dentário. Outra análise microbiológica de Barbosa et al. (2010), em pacientes com pneumonia nosocomial encontrou 30,7% de *Staphylococcus aureus* no biofilme dental, comprovando que a cavidade bucal pode ser um reservatório para patógenos respiratórios.

No estudo de El-Solh et al. (2004) foi observado que em mais da metade dos pacientes hospitalizados em UTI as espécies bacterianas do biofilme dental e das bactérias da orofaringe eram semelhantes, sendo em 57% dos pacientes a colonização do biofilme dental foi por bactérias aeróbicas, nas quais 45% eram colonizados por *Staphylococcus aureus*, 42% por bacilos Gram negativos e 13% por *Pseudomonas aeruginosa*.

Estudos de monitoramento microbiológicos, realizados por Carvalho (2005) e Guimarães (2011), através do isolamento de bactérias em pacientes na Unidade de Terapia Intensiva mostraram que nos primeiros dias após início da ventilação mecânica a bactéria *Staphylococcus aureus* foi a mais predominante, no qual foi identificada em pacientes com pneumonia de origem hospitalar associada a ventilação mecânica. Dias após a internação, existe um aumento significativo por *Pseudomonas spp.*, bactéria esta capaz de sobreviver a condições mínimas nutricionais.

Em análise da composição bacteriana do aspirado traqueal de pacientes sob ventilação mecânica, Marino et al. (2017), observaram que as espécies mais prevalentes foram *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Zand et al. (2017), observaram que os microrganismos mais frequentes isolados na orofaringe foram *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* e *Serratia*. Contudo, os microrganismos mais comumente isolados de amostra da secreção traqueal em pacientes com pneumonia associado à ventilação mecânica foram *Acinetobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Candida albicans* e *Escherichia*

coli. Estes resultados foram contraditórios por não ter sido encontrado a espécie *Pseudomonas* na secreção traqueal de pacientes com pneumonia.

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* no presente estudo se mostrou evidente, representando 49% das cepas isoladas na secreção ou aspirado traqueal. Dentre estas, muitas cepas foram resistentes a antibióticos como amicacina (38%), aztreonam (51,4%), cefotaxina (93,3%), tobramicina (51,6%) e gentamicina (64,7%).

Algumas bactérias encontradas em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica como *Klebsiella pneumoniae* possuem características de resistência à tratamento, como destacado por Tragante et al. (2008), por serem produtoras de β -lactamase, enzimas que inativam vários antibióticos, como as cefaloporinas.

Ainda neste contexto de bactérias resistentes ao tratamento, *Actinobacter baumannii* encontrada neste estudo, são causadoras de pneumonia, meningite, sepse e entre outras patologias. Segundo Richards et al. (2005), estas bactérias veem mostrando resistência à desinfecção por alguns grupos de antibióticos, e podem induzir morte celular apoptótica em células epiteliais. *Actinobacter baumannii* também são encontradas nos biofilmes dentários, pois estas bactérias sobrevivem em comunidades polimicrobianas. Na colonização subgengival, quando associadas principalmente com *Pseudomonas aeruginosa* promovem o aumento do risco de periodontites, como a periodontite avançada.

O monitoramento microbiológico é importante por proporcionar a avaliação e qualificação do perfil microbiano, promovendo uma confirmação do diagnóstico clínico, e um guia preventivo e terapêutico adequado para a pneumonia nos pacientes internos em UTI.

• Conclusões

Pseudomonas aeruginosa foi a bactéria mais prevalente isolada na secreção traqueal de pacientes internos nas unidades de terapia intensiva do Hospital Universitário Lauro Wanderley, seguido de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

CAPÍTULO V

8. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA

8.1 pH das micropartículas em solução aquosa

- **Materiais e métodos**

A avaliação do pH das micropartículas MP:CLX:MT foi realizada e comparada com a maltodextrina e o digluconato de clorexidina livre, todos preparados em solução aquosa na concentração de 0,12%, e também com um padrão comercial de solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®, lote 8073BR122A). Para os testes, foram preparadas soluções de 5 ml com água destilada com concentrações correspondendo a 1,2 mg/mL do microparticulado calculado a partir do coeficiente de recuperação do doseamento descrito no preparo das soluções com as micropartículas. A mesma concentração da massa do microparticulado foi medida para a maltodextrina, e a clorexidina pura na concentração a 0,12% preparado a partir de solução de digluconato de clorexidina a 20% (SIGMA-ALDRICH®, lote BCBK1284V).

Todas as amostras foram preparadas em triplicata e mantidas em béquer de vidro em estufa (Estufa com circulação e renovação de ar TE-394/2, TECNAL®) a uma temperatura de 36°C, vedadas e sem contato com luminosidade. As soluções foram transferidas para tubos de vidro e levadas para leitura direta no equipamento Quimis® – pH neutro microprocessado, sendo realizadas nos tempos 0h, 24h e 48 horas.

Este experimento foi realizado no LUDEM (Laboratório Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – Campus I.

- **Resultados e discussão**

Na análise do tempo zero do pH foi observado valores mais baixos para as soluções com maltodextrina com média 5,8 seguido das soluções com as

micropartículas com 6,1, e a solução comercial com 6,2, enquanto um pH mais alto de 6,9 foi observada da solução preparada com a clorexidina pura a 20%. Com os resultados observou-se que houve uma variação mínima do pH das soluções em 24 horas, e com a análise do pH em 48 horas, todas as soluções apresentaram uma redução do pH, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Média e Desvio padrão (DP) dos valores de pH das soluções com as micropartículas com clorexidina (MP:CLX:MT), maltodextrina (MT), clorexidina padrão (CLX-P) e clorexidina comercial (CLX-C) a 0,12% em diferentes tempos de análise.

Tempo (h)	MP:CLX:MT	MT	CLX-P	CLX-C
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
0	6,1 (0,1) ^a	5,8 (0,1) ^a	6,9 (0,0) ^b	6,2 (0,0) ^a
24	6,2 (0,1) ^a	5,9 (0,0) ^a	6,6 (0,0) ^a	6,2 (0,2) ^a
48	4,9 (0,0) ^{a,c}	4,3 (0,3) ^a	5,5 (0,0) ^{b,c}	5,3 (0,1) ^{b,c}

Obs.: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste ANOVA com teste de Tukey, $p < 0,01$. Fonte: Autora.

Na análise após 24 horas, a solução comercial manteve a mesma média de pH, e um aumento decimal foi observado nas soluções com as micropartículas com clorexidina e com a maltodextrina, enquanto uma redução do pH de 6,9 para 6,6 foi observado na solução com a clorexidina padrão preparada com solução de clorexidina a 20%, que mesmo assim se manteve com o pH mais alto em relação às outras soluções. De acordo com o fabricante SIGMA[®] da clorexidina a 20%, a solução de clorexidina se mantém estável com o pH variando entre 5,0 a 8,0. Todas as soluções contendo clorexidina apresentaram-se dentro deste intervalo de variação de pH na análise inicial e após o período de 24 horas, porém após 48 horas a solução das micropartículas com clorexidina apresentaram o pH inferior a 5,0. Devendo ser ressaltado que as análises foram realizadas com a temperatura de aproximadamente 36°C, simulando a temperatura da cavidade bucal, e em condições clínicas as soluções não ficarão expostas à cavidade bucal durante o período de 48 horas, sendo mantido em um tempo inferior a 24 horas. Do ponto de vista clínico, o teste de 48 horas não tem aplicação, o mesmo foi realizado apenas para conhecer e acompanhar o comportamento do pH dessas soluções em um intervalo maior de tempo.

A análise estatística dos resultados foi realizada com a aplicação do teste de Tukey - ANOVA, sendo considerado diferença significativa quando $p < 0,01$. No tempo zero, apenas a clorexidina padrão teve um pH significativamente maior em relação aos outros grupos. Na análise de 24 horas os resultados de todos os grupos foram considerados iguais estatisticamente, mesmo com valores maiores para a clorexidina padrão. E na análise de 48 horas, a maltodextrina teve o pH significativamente mais baixo em relação à clorexidina padrão e à clorexidina comercial, porém não apresentou o resultado com diferença significativa em relação a solução com as micropartículas. Devendo-se ressaltar que a solução com as micropartículas ficou em uma posição intermediária quanto a média de pH em 48 horas, não apresentando diferença significativa em relação à clorexidina padrão e à clorexidina comercial, e estas no período de análise apresentaram pH significativamente iguais.

As soluções com maltodextrina mostraram o pH mais baixo nos três tempos analisados, caracterizando acidez. Segundo especificações do fabricante GALENA®, o pH da maltodextrina pode variar de 4,0 a 7,0. A tendência à acidez da maltodextrina remete à sua origem por ser um polissacarídeo produzido por hidrólise enzimática parcial do amido, sendo este um carboidrato consistindo de um grande número de unidades de glicose ligada por ligações glicosídicas, tendo uma equivalência com a dextrose com menos de 20 cadeias de glicose (PARIKH et al., 2014).

Neste contexto, por a maltodextrina ser uma fonte de carboidrato substituto do açúcar muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, Stegues (2014) avaliou o efeito da maltodextrina e sua associação com a sacarose na acidogenicidade e crescimento de bactérias cariogênicas como o *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei in vitro*. Foram realizadas análises de acidogenicidade e crescimento microbiano frente aos carboidratos glicose, sacarose, maltodextrina e maltodextrina associada à sacarose. Na análise da acidogenicidade das bactérias, a maltodextrina demonstrou ser estatisticamente menos acidogênica que os outros carboidratos, e quanto ao crescimento bacteriano a maltodextrina é metabolizada lentamente por *S. mutans* e *L. casei*, e não alterou o crescimento microbiano, enquanto a maltodextrina associada à

sacarose possuiu comportamento semelhante à sacarose quanto à acidogenicidade e crescimento bacteriano.

O pH das soluções com as micropartículas de clorexidina e maltodextrina (MP:CLX:MT) assumiram um comportamento próximo às soluções com a maltodextrina, visto que as micropartículas foram preparadas da associação da maltodextrina com a clorexidina livre, sendo a maltodextrina o excipiente em maior proporção. Mesmo sob estas condições, os valores de pH das soluções com as micropartículas foram próximos aos valores das soluções com a clorexidina comercial, cujas médias foram respectivamente nas análises de 0h, 24h e 48h foram 6,1, 6,2 e 4,9 para as micropartículas, e 6,2, 6,2 e 5,3 para a clorexidina comercial, e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos em nenhum dos tempos.

Nesta mesma ordem, Priyadarshini et al. (2017) avaliaram o pH de micropartículas preparadas com hidróxido de cálcio e clorexidina, e compararam com o pH de hidróxido de cálcio puro utilizado como excipiente. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o pH das micropartículas e o hidróxido de cálcio nos períodos avaliados, com as micropartículas com clorexidina assumindo um pH alto assim como observado no excipiente hidróxido de cálcio.

Bonesvoll et al. (1974) estudaram a influência da concentração, tempo, temperatura e pH sobre a retenção de clorexidina na cavidade oral após bochecho. Foi observado pelos autores que a retenção da clorexidina na cavidade oral foi proporcional à concentração, tendo após o bochecho de 60 segundos uma retenção maior que após 30 segundos de bochecho, não sendo observado mudanças de retenção quanto à temperatura. E quanto ao pH das soluções, o pH padrão para melhor retenção na cavidade bucal foi o de 6,4, sendo observado que o aumento do pH não alterou a retenção, enquanto quando a solução com clorexidina atinge o pH ácido entre 3,0 e 1,5 obteve uma retenção inferior a metade da obtida com o pH 6,4.

Sob esse aspecto, em 24 horas o pH das soluções com as micropartículas e a clorexidina padrão se mantiveram próximas ao pH ideal de 6,4 com pH 6,2 e 6,6, respectivamente, enquanto a solução com maltodextrina teve média de pH de 5,9. Tendo sido considerado na análise estatística de 24 horas os resultados iguais

estatisticamente entre todos os grupos, mesmo com valores maiores para a clorexidina padrão.

Vale ainda ressaltar que as condições do experimento reproduziram as condições de temperatura da cavidade bucal, sendo todas as soluções avaliadas na mesma concentração a 0,12%. Todos os experimentos microbiológicos foram realizados com análise em 24 horas para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, e 48 horas para *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*, com a temperatura de incubação de 37°C, próximo à temperatura da cavidade bucal de 36°C usada no experimento de análise do pH. Quanto à variação de pH observado entre as soluções, em 24 horas não houve diferença estatística entre os grupos. Em 48 horas, tempo de análise das cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans*, foi observado a diferença estatística com pH mais baixo para a maltodextrina usada como controle negativo em relação à clorexidina padrão como controle positivo, porém não apresentou o resultado com diferença significativa em relação a solução com as micropartículas, e esta também não apresentou diferença estatística significativa em relação à clorexidina padrão, permanecendo em uma posição intermediária. Como demonstrado no estudo de Stegues (2014) a acidogenicidade da maltodextrina não alterou o crescimento microbiano.

Dessa forma, não se considerou que a variação de pH observada nas soluções preparadas influenciaram nos resultados dos testes microbiológicos realizados neste estudo.

8.2 Metodologia para os estudos microbiológicos

8.2.1 Condições de trabalho para análises microbiológicas

O local de desenvolvimento dos experimentos microbiológicos foi determinado pelas condições respiratórias de cada cepa estudada. Para as cepas aeróbias e aeróbias facultativas, os experimentos foram realizados em bancadas de Fluxo unidirecional horizontal (FUH12, Veco®) ou Fluxo laminar vertical (PA 300/ECO,

Pachane[®]). E para as cepas anaeróbias, os experimentos foram realizados dentro da câmara de anaerobiose (Whitley DG250 – Anaerobic Workstation, don Whitley Scientific[®]), previamente comissionada com mistura de gases e mantida sem a presença de oxigênio.

Para todos os experimentos, desde o preparo e padronização das cepas, bem como testes microbiológicos, os processos de desinfecção de superfícies foram realizados. Para os experimentos realizados em capela de fluxo laminar, as superfícies de trabalho foram previamente desinfetadas com álcool etílico 70% e mantida em luz UV por 20 minutos dentro da cabine de segurança biológica antes do início de cada experimento, enquanto para os experimentos realizados em câmara de anaerobiose esta foi previamente desinfetada com álcool etílico 70%.

Os experimentos foram realizados com vidrarias, tubos, ponteiras, instrumentos, meios de cultura e soluções previamente esterilizados em autoclave. Assim como foram utilizadas placas de 96 e 24 poços em embalagens estéreis e descartáveis (Kasvi[®]).

Em todos os experimentos realizados utilizou-se equipamentos de proteção individual (E.P.I.) como jaleco, gorro, máscara, luvas e óculos de proteção.

Todos os testes microbiológicos foram realizados no LABIAL (Laboratório de Biologia Bucal), no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Campus I.

8.2.2 Preparo e padronização dos inóculos para análises microbiológicas

As cepas bacterianas e de fungo utilizadas nas análises microbiológicas foram do sistema ATCC - American Type Culture Collection, seguindo o controle de qualidade microbiológico que objetivou a seleção de culturas padronizadas planctônicas para a pesquisa laboratorial. As cepas foram obtidas na coleção de micro-organismos de referência em Vigilância Sanitária – CMRVS do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ).

Os microrganismos da orofaringe estudados foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 15656), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), as periodontopatogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), sendo as bactérias periodontopatogênicas testadas apenas quanto à Concentração inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). E ainda o fungo *Candida albicans* (ATCC 26645).

As bactérias e fungo foram preparadas com meio de cultura específico para cada cepa, sendo os meios de cultura utilizados o BHI caldo – Brain Heart Infusion Broth (SIGMA-ALDRICH® 53286-500G) ou BHI caldo suplementado com solução de Hemina 5 mg/mL (SIGMA-ALDRICH®) e solução de Menadiona 1 mg/mL (CRISTÁLIA®) para as bactérias periodonto-patogênicas, ou ainda Sabouraud Dextrose Broth (KASVI® K25-610104) para fungo *Candida albicans*, e foram acrescidos de glicerol a 20% e mantidas congeladas a -20°C até o momento do preparo para a realização dos testes microbiológicos. As cepas estudadas apresentavam diferentes tipos de respiração em aerobiose, anaerobiose facultativos, ou anaerobiose, bem como diferentes tempos de incubação de 24 ou 48 horas. Os dados de cada cepa estudada estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 - Registro ATCC, meio de cultura para crescimento, tipo de respiração e tempo de incubação das cepas estudadas.

Cepa	Registro ATCC	Meio de cultura	Tipo de respiração	Tempo de incubação
<i>Staphylococcus aureus</i>	15656	BHI / BHI ágar	Aerobiose	24 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	BHI / BHI ágar	Aerobiose	24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	BHI / BHI ágar	Aerobiose	24 horas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6303	BHI / BHI ágar	Anaeróbio facultativo	48 horas
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	49417	BHI suplementado / Brucella ágar	Anaerobiose	48 horas
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	29522	BHI suplementado / Brucella ágar	Anaerobiose	48 horas
<i>Candida albicans</i>	76645	Sabouraud / Sabouraud ágar	Aerobiose	48 horas

Fonte: Autora.

Para a execução de cada experimento a cepa selecionada foi removida do freezer a -20°C onde se mantinha estocada no LABIAL, e deixada em temperatura ambiente para descongelar.

O preparo de cada inóculo foi realizado em tubo tipo falcon com 6 mL de meio de cultura BHI, BHI suplementado ou sabouraud dependendo da cepa selecionada e 400 μL da cepa selecionada após o descongelamento e agitação em vortex. O tubo falcon com o inóculo preparado foi novamente agitado em vortex e incubado pelo tempo de 24 ou 48 horas dependendo da cepa estudada com a tampa semiaberta. As cepas de estoque, após removido o inóculo, foram agitadas novamente e devolvidas ao freezer para novo congelamento.

Os tubos das cepas aeróbias foram mantidos durante o período de incubação em estufa (Eletrolab[®]), a uma temperatura de aproximadamente 37°C . Os tubos com a cepa anaeróbia facultativa foram transferidos para jarra de microaerofilia com uma vela acesa dentro de um recipiente de vidro para promover um ambiente com baixa concentração de oxigênio, sendo a jarra fechada e mantida também na estufa sob mesma temperatura. Enquanto os inóculos anaeróbios foram mantidos também dentro da câmara de anaerobiose, visto que a mesma também funciona como estufa microbiológica com temperatura aproximada de 37°C .

Como teste de crescimento de cada inóculo, foi preparado uma placa de Petri com meio de cultura BHI ágar, Brucella ágar ou Sabouraud ágar para as cepas que crescem com meio de cultura respectivamente, BHI, BHI suplementado ou Sabouraud caldo. Para o cultivo, 100 μL de cada inóculo estoque foi removido e colocado na placa petri através de esfregaço (Swab) e mantido incubado sob as mesmas condições de tempo e respiração que o tubo falcon da cepa do inóculo preparado.

Os inóculos foram padronizados em leitura por absorbância, sendo o valor de absorbância correspondente a 0,5 da escala de McFarland representado por uma concentração celular de 10^8 UFC/mL de 0.135 para bactérias, em uma variação entre 0.125 e 0.145, e para fungos 10^6 UFC/mL de 0.100 em uma variação entre 0.090 e 0.110. (FILOCHE, 2005)

Após o período de incubação na estufa ou câmara de anaerobiose a 37°C , o tubo contendo o inóculo foi centrifugado por 12 min em 5000 RPM (Centrífuga

Quimis®). Após o período de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e acrescentado solução salina a 0,9%, preparado com cloreto de sódio (Fmaia®, reg. 114571), no processo de padronização em sucessivas diluições até a padronização dentro da escala de McFarland. O inóculo com salina foi homogeneizado em vortex, e em seguida levado para leitura por espectrofotometria em aparelho OPTIMA®, sob o programa Optima – Data analysis para absorbância com comprimento de onda de 640nm, usando placas de fundo chato de 96 poços, onde 100 µL do inóculo foi colocando em um poço da placa e comparado a outro poço uma amostra de 100 µL de solução salina a 0,9% usado como referência ou branco. O processo de diluição para padronização foi repetido até atingir o valor de absorbância dentro da variação estabelecida para bactérias e fungos.

8.2.3 Preparo das soluções com as micropartículas com clorexidina

O preparo das soluções com as micropartículas foi realizado com a pesagem calculada pela correção de massa a partir da técnica de doseamento do teste de estabilidade realizado periodicamente, conforme descrito no capítulo III, tópico 6.2.3, permitindo quantificar a massa necessária do microparticulado para a realização dos experimentos microbiológicos com a quantidade de clorexidina recuperada em cada período. Para isso, foi calculado o fator de recuperação da clorexidina (FR) a partir do coeficiente de recuperação do doseamento (CR%), conforme a fórmula:

$$FR = \frac{CR\%}{100}$$

A proporção entre a massa e a quantidade de clorexidina validada pela técnica de preparo das micropartículas foi de 100 mg de microparticulado para 2,4 mg de digluconato de clorexidina. Dessa forma, para obter a quantidade de massa de recuperação do microparticulado (MR) em miligramas (mg), dividiu-se 100 mg do microparticulado pelo fator de recuperação (FR), com a fórmula:

$$MR = \frac{100}{FR}$$

Com a massa de recuperação do microparticulado e a quantidade de clorexidina necessária para os experimentos foi possível calcular as concentrações

para uso nos experimentos a 0,012%, 0,06% e 0,12%, correspondendo respectivamente a 0,12 mg/mL, 0,6 mg/mL e 1,2 mg/mL. Para isso, foi considerada a relação de 2,4 mg de clorexidina para 100 mg do MP:CLX:MT para cada mL, conforme demonstrado abaixo:

2,4 mg de CLX – 100 mg do MP:CLX:MT – 1 mL – 0,12%

1,2 mg de CLX – 50 mg do MP:CLX:MT – 1 mL – 0,12%

0,6 mg de CLX – 25 mg do MP:CLX:MT – 1 mL – 0,06%

0,12 mg de CLX – 5 mg do MP:CLX:MT – 1 mL – 0,012%

8.3 Avaliações microbiológicas das micropartículas com clorexidina *in vitro*

8.3.1 Testes microbiológicos em bactérias e fungos planctônicas

8.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em placa

- **Materiais e métodos**

O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado com as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, e o fungo *Candida albicans*. E também as cepas bacterianas periodonto-patogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* com finalidade de observar a atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina sobre essas bactérias anaeróbias, visando pesquisas futuras de aplicação das micropartículas com clorexidina para formas farmacêuticas a serem desenvolvidas para controle e tratamento de doença periodontal.

- **Preparo das soluções**

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) das micropartículas com clorexidina foram realizadas em diferentes concentrações das soluções mãe iniciais (SM0) com clorexidina correspondendo a 0,012%, 0,06%, e 0,12%, calculado

respectivamente em 0,12 mg/mL, 0,6 mg/mL e 1,2 mg/mL. As concentrações foram preparadas em 3 mL de água deionizada e pó do microparticulado MP:CLX:MT pesado em balança analítica em quantidade correspondente a cada concentração, com a correção de massa do doseamento da clorexidina. Em seguida foram preparadas as soluções mãe 1 (SM1), 2 (SM2) e 3 (SM3) para cada concentração 0,012%, 0,06% e 0,12% nas seguintes proporções de SM0 e meio de cultura BHI, BHI suplementado ou sabouraud a depender da cepa estudada: SM1 em 1:1 (v/v) de 1,5 mL de SM0 + 1,5 mL de meio de cultura; SM2 em 1:5 (v/v) de 0,5 mL de SM0 + 2,5 mL de meio de cultura; e SM3 em de 1:9 (v/v) de 0,5 mL de SM0 + 4,5 mL de meio cultura.

As soluções controles positivos foram preparadas com clorexidina nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12% diluídas em 3 mL de água deionizada, a partir de digluconato de clorexidina a 20% (SIGMA-ALDRICH®). E as soluções controles negativos com maltodextrina (GALENA®) pesada em balança analítica nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12% diluídas em 3 mL de água deionizada.

➤ Montagem das placas de microdiluição teste e controle

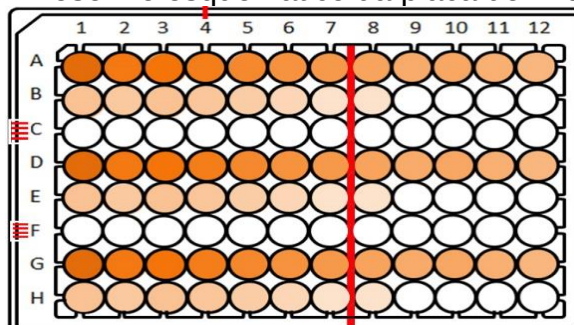
Para cada cepa foram preparadas placas nas concentrações teste do microparticulado a 0,012%, 0,06% e 0,12%, em placas de 96 poços de fundo redondo. Os poços foram preenchidos em triplicata de forma a conter diferentes volumes do produto teste nas soluções SM1 nos poços A, D, G 1 a 7, SM2 nos poços A, D, G 8 a 12 e SM3 nos poços B, E, H 1 a 8, associado a diferentes concentrações do meio de cultura e 20 µL de inóculo, de forma que cada poço tivesse um volume final de 100 µL, conforme representado na Tabela 14 e Figura 25.

Tabela 14 - Volumes das diluições para preparo da placa de microdiluição para testes de Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima com cálculos da quantidade de clorexidina (CLX) e quantidade de massa das micropartículas (MP) nas concentrações a 0,12%, 0,06% e 0,012%.

Poços	Poços Duplicata	Poços Triplicata	Solução Mãe	Volume de Solução Mãe (μL)	Meio caldo (μL)	Inóculo (μL)	Concentração 0,12%		Concentração 0,06%		Concentração 0,012%	
							CLX (μg/mL)	MP (mg/mL)	CLX (μg/mL)	MP (mg/mL)	CLX (μg/mL)	MP (mg/mL)
A1	D1	G1	1	80	-	20	480	20	240	10	48	2
A2	D2	G2	1	70	10	20	420	17,5	210	8,75	42	1,75
A3	D3	G3	1	60	20	20	360	15	180	7,5	36	1,5
A4	D4	G4	1	50	30	20	300	12,5	150	6,25	30	1,25
A5	D5	G5	1	40	40	20	240	10	120	5	24	1
A6	D6	G6	1	30	50	20	180	7,5	90	3,75	18	0,75
A7	D7	G7	1	20	60	20	120	5	60	2,5	12	0,5
A8	D8	G8	2	55	25	20	110	4,58	55	2,29	11	0,45
A9	D9	G9	2	50	30	20	100	4,17	50	2,08	10	0,41
A10	D10	G10	2	45	35	20	90	3,75	45	1,87	9	0,37
A11	D11	G11	2	40	40	20	80	3,33	40	1,65	8	0,33
A12	D12	G12	2	35	45	20	70	2,92	35	1,46	7	0,29
B1	E1	H1	3	50	30	20	60	2,5	30	1,25	6	0,25
B2	E2	H2	3	45	35	20	54	2,25	27	1,12	5,4	0,22
B3	E3	H3	3	40	40	20	48	2	24	1	4,8	0,2
B4	E4	H4	3	35	45	20	42	1,75	21	0,87	4,2	0,17
B5	E5	H5	3	30	50	20	36	1,5	18	0,75	3,6	0,15
B6	E6	H6	3	25	55	20	30	1,25	15	0,62	3	0,12
B7	E7	H7	3	20	60	20	24	1	12	0,5	2,4	0,1
B8	E8	H8	3	15	65	20	18	0,75	9	0,37	1,8	0,07

Fonte: Autora.

Figura 25 - Desenho esquemático da placa de microdiluição.



Fonte: Protocolo da técnica de microdiluição Labial.

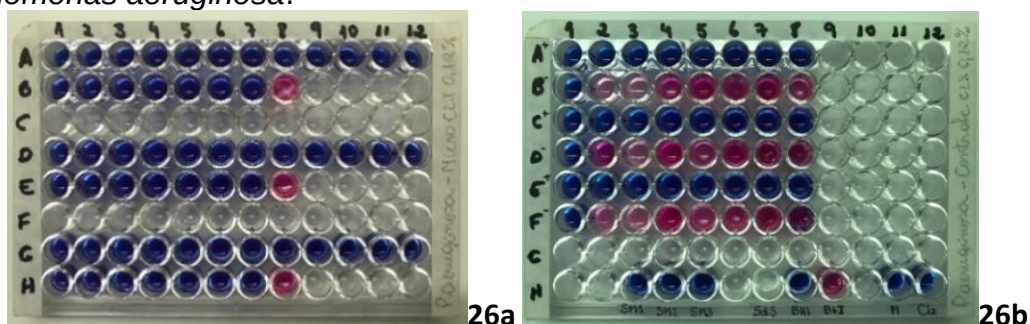
As placas de controles positivo com a clorexidina livre e negativo com a maltodextrina foram preparadas nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%. Em cada poço foram colocadas diferentes concentrações do meio de cultura e solução controle positivo ou negativo com as colunas distribuídas nos números de 1 a 8, e as linhas nas letras de A até F, intercalando entre linhas A, C e E para controle positivo, e linhas B, D e F para controle negativo, em triplicata. O volume final de cada poço contendo o meio de cultura, a solução controle, e 20 μ L de inóculo foi de 100 μ L.

Ao final do preenchimento de todos os poços, as placas testes e controles foram tampadas com a tampa plástica própria e envolvidas em filme de PVC, e imediatamente incubadas a aproximadamente 37°C, com tempo de incubação de 24 ou 48 horas, e nas condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose de acordo com cada cepa estudada.

➤ Leitura visual das placas com resazurina

Após o período de incubação foi adicionado em cada poço 35 μ L de resazurina preparado em solução aquosa a 0,01%, sendo as placas teste mantidas a amostra triplicada sem o corante até a realização do teste de Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM ou CFM). As placas foram incubadas novamente por aproximadamente mais 1 hora para se fazer a leitura a partir da mudança de cor nos poços de azul para rosa/vermelho, como apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Leitura de placas de microdiluição após coloração com resazurina com teste do microparticulado a 0,12% (26a), e controles positivo e negativo (26b) para *Pseudomonas aeruginosa*.

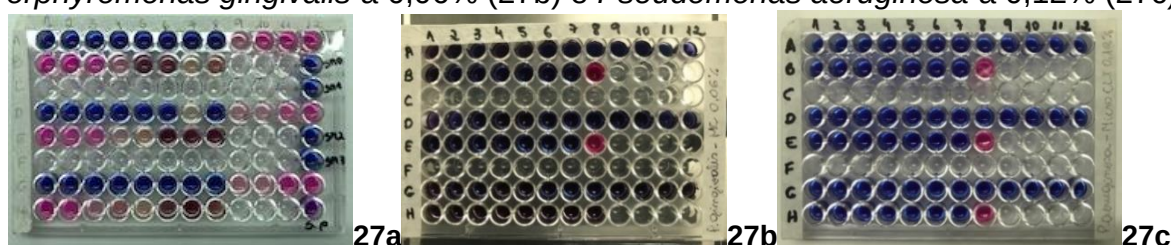


Fonte: Autora.

• Resultados e discussão

A concentração inibitória mínima foi considerada observando o último poço azul mantido, pela ausência da reação química que indica a atividade celular. O valor da CIM no poço correspondente lido de acordo com a tabela de diluições calculada (Tabela 14), com a quantidade de clorexidina presente em $\mu\text{g/mL}$ e a massa do microparticulado em mg/mL correspondente à quantidade de clorexidina na CIM para as concentrações de 0,012%, 0,06% e 0,12%, como ilustrado na Figura 27.

Figura 27 - Leitura de placas de microdiluição após coloração com resazurina com teste do microparticulado para *Streptococcus pneumoniae* a 0,012% (27a), *Porphyromonas gingivalis* a 0,06% (27b) e *Pseudomonas aeruginosa* a 0,12% (27c).



Fonte: Autora.

Os valores da quantidade de clorexidina em $\mu\text{g/mL}$ e a relação com a quantidade de micropartículas em mg/mL apresentadas na Tabela 15 foram corrigidas com o fator de recuperação da clorexidina dada pelo doseamento no período de realização do experimento, conforme exposto no tópico 6.2.3.

Tabela 15 - Concentração inibitória mínima das micropartículas com clorexidina nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.

Microrganismo	MP:CLX:MT					
	0,012%		0,06%		0,12%	
	CLX ($\mu\text{g/mL}$)	MP (mg/mL)	CLX ($\mu\text{g/mL}$)	MP (mg/mL)	CLX ($\mu\text{g/mL}$)	MP (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,35	0,38	NCIM	NCIM	NCIM	NCIM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,23	0,88	24,78	1	28,32	1,18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28,32	1,18	24,78	1	28,32	1,18
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11,43	0,47	NCIM	NCIM	NCIM	NCIM
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	NR	NR	17,9	0,74	NCIM	NCIM
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NR	NR	14,4	0,60	NCIM	NCIM
<i>Candida albicans</i>	18,70	0,78	NCIM	NCIM	NCIM	NCIM

MP:CLX:MT (Micropartículas com clorexidina), CLX (Quantidade de clorexidina para concentração inibitória mínima), MP (Quantidade de micropartículas para concentração inibitória mínima), NR (Experimento não realizado), e NCIM (Não houve CIM na concentração estudada). Fonte: Autora.

A determinação da concentração inibitória mínima de crescimento bacteriano ou fúngico na técnica de microdiluição em placa foi dada com um indicador de viabilidade celular através da resazurina, que permite a mudança de cor nos poços pela análise visual após o período de incubação, sendo este considerado um método confiável de avaliação da atividade celular. A mudança de cor de azul para rosa ou vermelho é interpretada como resistência do micro-organismo ao produto, visto que a resazurina é um indicador de óxido-redução que permite determinar a presença de atividade celular. A reação química de mudança de cor representa a redução da resazurina para resorufina, que é o indicativo de atividade celular por acidificação do meio devido extrusão de prótons H^+ . Quando ocorre a mudança de cor rosa para a incolor ou perda de coloração, também representa atividade celular, pela mudança da resorufina para dihidroresorufina (ANDREWS, 2001; ALVES et al., 2008).

Segundo Andrews (2001) a análise por concentração inibitória mínima é uma excelente ferramenta para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, assim ser usada para julgar a performance de todos os outros métodos de susceptibilidade.

Segundo Holetz et al. (2002) os valores abaixo de 100 $\mu g/mL$ para uma substância se apresentam como indicativo de boa atividade antimicrobiana. Dentro deste parâmetro, o microparticulado com clorexidina e maltodextrina apresentou a CIM com boa atividade antimicrobiana para todos os microrganismos analisados, com uma variação de 9,3 a 28,32 $\mu g/mL$ de clorexidina no microparticulado.

Dentre as bactérias estudadas, *Staphylococcus aureus* teve a CIM nos poços A10/D10/G10 na concentração do microparticulado a 0,012% que corresponde a 9,35 $\mu g/mL$ de clorexidina e equivalente de 0,38 mg/mL de pó do microparticulado, e não apresentou atividade celular nas concentrações de 0,06% e 0,12%.

Para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foi observado a CIM nas três concentrações estudadas, visto que para ter uma inibição da atividade celular dessas bactérias foi necessária uma concentração maior de clorexidina. *Pseudomonas aeruginosa* teve a CIM a 0,012% nos poços A6/D6/G6 correspondente a uma concentração de 21,23 $\mu g/mL$ de clorexidina e 0,88 mg/L de pó do microparticulado, enquanto *Klebsiella pneumoniae* teve a CIM a 0,012% nos poços

A5/D5/G5 correspondente a uma concentração de 28,32 µg/mL de clorexidina e 1,18 mg/mL de pó do microparticulado. Sendo as CIMs de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Klebsiella pneumoniae* equivalentes nos poços B4/E4/H4 a 0,06% e nos poços B7/E7/H7 a 0,12% com uma concentração de 24,78 µg/mL e 28,32 µg/mL de clorexidina, e 1 mg/mL e 1,18 mg/mL de pó do microparticulado, respectivamente. Para as duas bactérias, entre as três concentrações das soluções do microparticulado estudadas 0,012%, 0,06% e 0,12%, houve uma variação discreta da quantidade de clorexidina necessária para a inibição do crescimento bacteriano, com isso foi considerado a maior quantidade de clorexidina no pó do microencapsulado da CIM com 28,32 µg/mL de clorexidina e 1,18 mg/mL de pó do microparticulado, sendo o maior valor de CIM encontrado coincidente entre as duas bactérias.

Streptococcus pneumoniae teve a CIM nos poços A8/D8/G8 na concentração do microparticulado a 0,012% que corresponde a uma concentração de 11,43 µg/mL de clorexidina e equivalente de 0,47 mg/mL de pó do microparticulado, não apresentando atividade celular em nenhum poço nas concentrações de 0,06% e 0,12%.

As bactérias periodontopatogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foram analisadas na concentração do microparticulado a 0,06% e 0,12%, não apresentando atividade celular em nenhum poço nas concentrações de 0,12%. Na concentração do microparticulado de 0,06% a CIM do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi corresponde a uma concentração de 15,9 µg/mL de clorexidina e equivalente de 0,74 mg/mL de pó do microparticulado, enquanto a CIM de *Porphyromonas gingivalis* foi corresponde a uma concentração de 14,4 µg/mL de clorexidina e equivalente de 0,6 mg/mL de pó do microparticulado.

O fungo *Candida albicans* estudado teve a CIM nos poços A6/D6/G6 na concentração do microparticulado a 0,012% que corresponde a uma concentração de 18,70 µg/mL de clorexidina e equivalente de 0,78 mg/mL de pó do microparticulado, não apresentando atividade celular em nenhum poço nas concentrações de 0,06% e 0,12%.

Os resultados apresentaram atividade antimicrobiana frente às concentrações inibitórias mínimas para todas as cepas estudadas, representando atividade de

inibição de crescimento bacteriano e fúngico, em concentrações do microparticulado bem abaixo da concentração equivalente do padrão comercial que é a clorexidina a 0,12%, representado por 1,2 mg/mL. As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans* tiveram uma CIM na concentração do microparticulado a 0,012%, as cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* com CIM na concentração do microparticulado a 0,06%. Apenas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* apresentaram a CIM na concentração do microparticulado a 0,12%, com valores equivalentes também nas concentrações 0,06% e 0,012%.

Lim e Kam (2008) discorrem sobre o mecanismo de ação da clorexidina em concentrações bactericidas, destacando que a clorexidina penetra e rompe a membrana bacteriana e resulta em vazamento de componentes citoplasmáticos. A partir disso, a concentração inibitória mínima da clorexidina tende a ser mais baixa para bactérias Gram positivas que para bactérias Gram negativas, devido a maior afinidade da clorexidina pela membrana de bactérias Gram positivas. Neste contexto, os autores publicaram médias de concentrações inibitórias mínimas da clorexidina para as bactérias patógeno respiratórias *Staphylococcus aureus* 1,6 µg/mL e *Streptococcus pneumoniae* 11 µg/mL, ambas bactérias Gram positivas. E para as bactérias Gram negativas uma concentração maior de clorexidina foi necessário para atingir a concentração inibitória mínima para *Pseudomonas aeruginosa* com 20 µg/mL e *Klebsiella pneumoniae* 64 µg/mL. A concentração inibitória mínima média do fungo *Candida albicans* publicado foi 9 µg/mL.

Este aspecto também foi observado no nosso estudo das micropartículas com clorexidina com concentrações inibitórias mínimas mais baixas para as bactérias Gram positivas, sendo a MIC das micropartículas de 9,35 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 11,43 µg/mL para *Streptococcus pneumoniae*. Enquanto para as bactérias Gram negativas estudadas as MICs tiveram valores maiores com 28,32 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, 14,4 µg/mL para *Porphyromonas gingivalis* e 17,9 µg/mL para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Para *Candida albicans* a concentração inibitória mínima para a micropartícula com clorexidina foi 18,70 µg/mL.

Diferentes métodos e excipientes no preparo micropartículas com clorexidina encontraram concentração inibitória mínima mais satisfatórias que os resultados observados no presente estudo, como Teixeira (2008) que avaliou a clorexidina microencapsulada com beta-ciclodextrina e observou a CIM para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de 2 µg/mL e para *Candida albicans* de 1 µg/mL. Barboza (2013) analisou micropartículas de quitosana e alginato com clorexidina para o fungo *Candida albicans* em diferentes formas de veiculação da clorexidina, e encontraram uma CIM variando de 0,5 a 4 µg/mL. Deve-se considerar que a eficácia do produto analisado depende de fatores como concentração e capacidade de liberação do agente antimicrobiano estudado, bem como diferenças na metodologia do experimento.

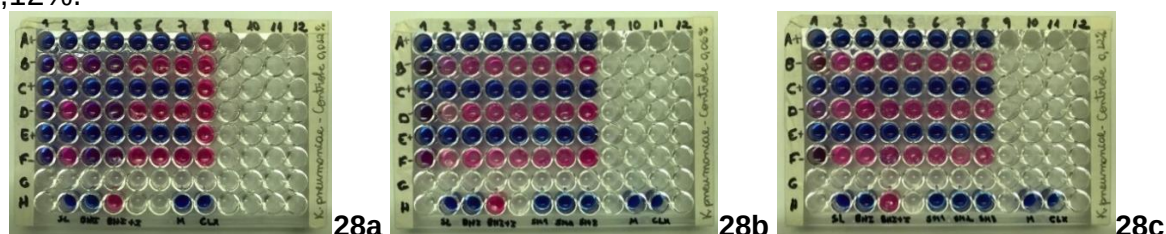
Shrestha et al. (2011) avaliaram a concentração inibitória mínima de colutórios orais com clorexidina a 0,2% e com óleos essenciais com timol para cepas *Candida albicans* e *Candida tropicallis* isoladas de pacientes com candidose. A CIM do colutório com clorexidina para *Candida albicans* e *Candida tropicallis* foi encontrada em uma diluição de 1:32, enquanto a CIM do colutório com óleos essenciais foi na diluição de 1:8 para *Candida albicans* e 1:16 para *Candida tropicallis*, mostrando um melhor resultado da atividade fungistática da clorexidina em relação ao timol.

Nas placas de controle foram testadas a clorexidina livre como controle positivo e a maltodextrina como controle negativo nas concentrações a 0,012% com correspondente de clorexidina variando de 1,2 µg/mL a 9,6 µg/mL, a 0,06% com variação da clorexidina de 6 µg/mL a 48 µg/mL, e a 0,12% com variação da clorexidina de 12 µg/mL a 96 µg/mL, como ilustrado na Figura 28.

Como resultado do controle negativo, foi observado crescimento bacteriano e fúngico em todas as concentrações avaliadas, comprovando a ausência da atividade antimicrobiana da maltodextrina. Para o controle positivo com a clorexidina livre foi observado ausência de atividade celular em todas as concentrações para as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, entretanto para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* a ausência de

atividade celular foi observada com uma concentração da clorexidina livre a partir de 2,4 µg/mL na placa de controle com a concentração 0,012%.

Figura 28 - Placas de controle positivo com a clorexidina livre e controle negativo com a maltodextrina da *Klebsiella pneumoniae* nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.



Fonte: Autora.

A clorexidina livre representa o “Padrão ouro” como atividade antimicrobiana em microbiologia, apresentando-se mais potente que a forma microparticulada em estudo para o teste da concentração inibitória mínima por microdiluição, tendo o seu tempo de ação rápida. Contudo, a forma microparticulada da clorexidina com a maltodextrina apresentou resultados significativos de valores baixos da CIM para todas as cepas testadas, apresentando a vantagem de ter a sua forma de liberação lenta e ser ativa por um período de tempo maior, sendo esta uma das fundamentações para sua indicação.

8.3.1.2 Concentração Bacteriana Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) por microdiluição em placa

• Materiais e métodos

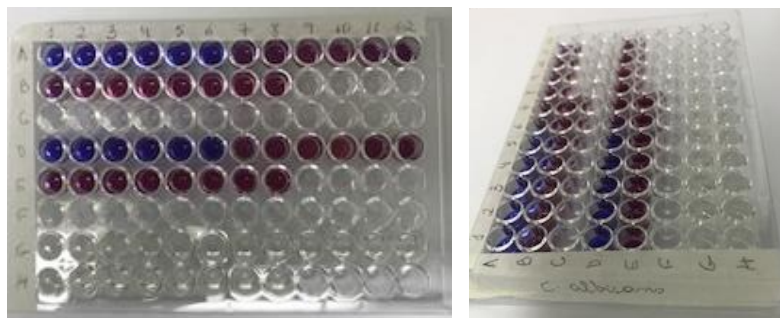
As mesmas cepas de bactérias e fungo analisadas quanto à concentração inibitória mínima (CIM) foram estudadas quanto a concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

A avaliação da concentração bactericida mínima ou concentração fungicida mínima foi determinada pela reincubação dos poços triplicata da placa de microdiluição a partir do resultado da CIM de cada cepa. Nos poços de triplicata não

corados inicialmente para a CIM (Figura 29), foi retirado 10 µL de cada poço da CIM e mais 5 poços de concentrações proporcionais maiores, e colocado em 3 gotas em áreas marcadas com o poço correspondente na placa de Petri com meio de cultura BHI ágar, brucella ágar ou sabourraud ágar. As placas foram reincubadas no período de 24 ou 48 horas, e em condições de aerofilia, microaerofilia ou anaerobiose específico de cada cepa.

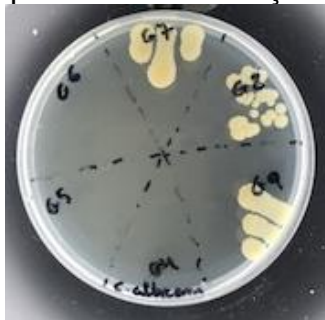
Após o período de reincubação, a confirmação de morte bacteriana e determinação da CBM ou CFM foi dada pela área marcada na placa correspondente a ausência de crescimento do microrganismo (Figura 30).

Figura 29 - Placa de microdiluição com microparticulado a 0,012% para *Candida albicans* com resazurina em duplicada antes do preparo da placa Petri de reincubação para CFM.



Fonte: Autora.

Figura 30 - Placa Petri preparada para leitura de CFM da *Candida albicans* após período de incubação.



Fonte: Autora.

• Resultados e discussão

Na avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM) por microdiluição das micropartículas de clorexidina com

maltodextrina foi observada a morte bacteriana ou fúngica em diferentes concentrações do microparticulado, a depender da cepa estudada, conforme representada na Tabela 16.

Tabela 16 - Concentração bactericida/fungicida mínima das micropartículas com clorexidina nas concentrações 0,012%, 0,06% e 0,12%.

Microrganismo	MP:CLX:MT					
	0,012%		0,06%		0,12%	
	CLX (µg/mL)	MP (mg/mL)	CLX (µg/mL)	MP (mg/mL)	CLX (µg/mL)	MP (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,35	0,38	NR	NR	NR	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35,40	1,47	31,86	1,3	35,40	1,47
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	42,47	1,77	35,40	1,47	42,47	1,77
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11,43	0,47	NR	NR	NR	NR
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	NR	NR	NCBM	NCBM	NR	NR
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NR	NR	NCBM	NCBM	NR	NR
<i>Candida albicans</i>	18,70	0,78	NR	NR	NR	NR

MP:CLX:MT (Micropartículas com clorexidina), CLX (Quantidade de clorexidina para concentração bactericida/fungicida mínima), MP (Quantidade de micropartículas para concentração bactericida/fungicida mínima), NR (Experimento não realizado), e NCBM (Não houve concentração bactericida mínima na concentração estudada). Fonte: Autora.

Da mesma forma que para a CIM, os valores da CBM e CFM da quantidade de clorexidina em µg/mL e a relação com a quantidade de micropartículas em mg/mL foram calculadas pela Tabela 14 de microdiluição, com o fator de recuperação da clorexidina dada pelo doseamento no período de realização do experimento, conforme cálculos expostos no tópico 8.2.3.

Para a concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM) é esperada uma concentração da substância teste igual ou maior que a encontrada na CIM, como foi observada nos resultados deste estudo. Para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* a CBM foi a mesma que a CIM. A CBM de *Staphylococcus aureus* foi encontrada no poço G10 com 0,38 mg/mL microparticulado a 0,012% correspondendo a uma concentração de 9,35 µg/mL de clorexidina, e a CBM do *Streptococcus pneumoniae* foi observada no poço G8 com 0,47 mg/mL do microparticulado a 0,012% que corresponde a uma concentração de 11,43 µg/mL de clorexidina. Assim também ocorreu com *Candida albicans* em que a

CFM foi a mesma da CIM no poço G6 com 0,78 mg/mL do microparticulado a 0,012% que corresponde a uma concentração de 18,70 µg/mL de clorexidina.

Para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* a CBM foi maior que a CIM em todas as concentrações testadas. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou a CBM no poço G4 com 1,47 mg/mL do microparticulado a 0,012% correspondente a uma concentração de 35,40 µg/mL de clorexidina, no poço H2 com 1,3 mg/mL do microparticulado a 0,06% correspondente a uma concentração de 31,86 µg/mL de clorexidina, e no poço H6 com 1,47 mg/mL do microparticulado a 0,12% correspondente a uma concentração de 35,40 µg/mL. Enquanto *Klebsiella pneumoniae* apresentou a CBM no poço G3 com 1,77 mg/mL do microparticulado a 0,012% correspondente a uma concentração de 42,47 µg/mL de clorexidina, no poço H1 com 1,47 mg/mL do microparticulado a 0,06% correspondente a uma concentração de 35,40 µg/mL de clorexidina, e no poço H6 com 1,77 mg/mL do microparticulado a 0,12% correspondente a uma concentração de 42,47 µg/mL de clorexidina. Apesar da variação discreta entre as concentrações estudadas, para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* a CBM foi considerada a de maior valor, sendo com 35,40 µg/mL de clorexidina e 1,47 mg/mL de pó do microparticulado e 42,47 µg/mL de clorexidina e 1,77 mg/mL de pó do microparticulado, respectivamente.

Para as cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* a CBM não foi encontrada em nenhum dos 8 poços testados H1 a H8 para a concentração de 0,06% onde foi encontrado a CIM, com uma concentração de clorexidina variando de 35,40 µg/mL a 9,35 µg/mL de CLX. Este resultado representa que nas concentrações de clorexidina testadas não houve atividade bactericida, podendo ter ocorrido uma atividade bacteriostática, já que a concentração inibitória mínima foi observada para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com 17,90 µg/mL de CLX em 0,74 mg/mL do microparticulado, e para *Porphyromonas gingivalis* com 14,4 µg/mL de CLX em 0,6 mg/mL do microparticulado.

A ação do digluconato de clorexidina é rápida, dependendo da concentração da formulação e do tipo de microrganismo. O mecanismo de ação da clorexidina ocorre por mudanças na estrutura das células bacterianas, causando danos irreversíveis com precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas, evoluindo para a morte

bacteriana (LIM, KAM, 2008; ZANATTA, RÖSING, 2007; LABEAU et al., 2011). O mecanismo de ação da clorexidina para fungos é semelhante ao das bactérias, ocorrendo a adsorção da clorexidina pela membrana do fungo que prejudica a sua integridade, e resulta no extravasamento do conteúdo celular (KUMAR, 2017).

Na fase Log da curva de crescimento microbiano, ou fase exponencial, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa sendo o período de maior atividade metabólica da célula. Lim e Kam (2008), publicaram a atividade bactericida e fungicida da clorexidina a partir da média de redução da fase Log com clorexidina a 0,05% em três momentos de tempo diferentes após 20 segundos, 1 minuto e 10 minutos. Foi observado para *Staphylococcus aureus* 0.4, 0.7 e 2.5, para *Streptococcus pneumoniae* 0.8, 1.5 e >3.5, para *Candida albicans* 2.8, >4.1 e >4.2, para *Klebsiella pneumoniae* 3.0, 4.8 e >6.2, e para *Pseudomonas aeruginosa* 1.7, 2.7 e 4.9.

O presente estudo avaliou a atividade bactericida das micropartículas com clorexidina em diferentes concentrações encontrando valores da concentração de clorexidina em µg/mL em análise após 24 ou 48 horas. Apesar da metodologia de análise diferente da adotada por Lim e Kam (2008), que avaliaram a média de redução da fase Log, os resultados da atividade bactericida foram semelhantes ao do presente estudo, quando se observa a atividade bactericida maior para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*, e menor para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

8.3.1.3 Análise bactericida e fungicida em saliva

- **Materiais e métodos**

O teste de análise bactericida ou fungicida em saliva teve por objetivo avaliar a morte das bactérias e fungo nas concentrações a 0,06% e 0,12% das micropartículas com clorexidina na presença de saliva e comparar com solução salina, tendo como controle positivo a clorexidina livre nas mesmas concentrações. A concentração a 0,012% foi excluída da análise visto que representava 10 vezes menos a concentração comercial utilizada nos testes clínicos em pacientes.

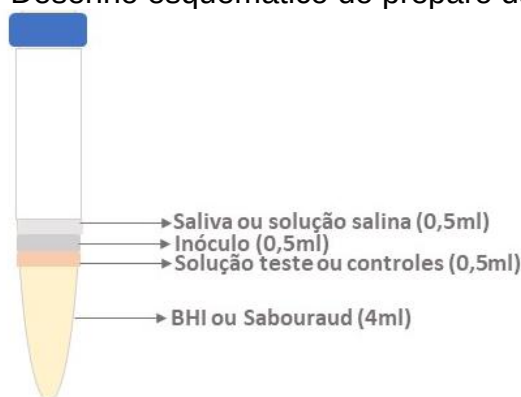
A análise foi a partir do crescimento em placa de cultura após diluição. Este teste foi realizado com as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, e o fungo *Candida albicans*.

➤ Preparo das soluções

Para os experimentos foram preparadas seis soluções, sendo para teste o microparticulado a 0,06% e a 0,12%, os controles positivos como clorexidina livre a 0,06% e 0,12%, e os controles negativos com a maltodextrina a 0,12%, e solução salina a 0,9%. Destas soluções foram preparadas soluções com saliva humana fresca para analisar o potencial de atividade do microparticulado na presença de saliva frente a seus controles positivo e negativo, e como controle da análise em saliva outras mesmas soluções foram preparadas substituindo a saliva por solução salina.

Dessa forma, foram preparadas seis soluções com 0,5mL de saliva humana fresca + 4 mL de meio de cultura + 0,5 mL de inóculo de bactéria ou fungo + 0,5 mL de solução teste do microparticulado a 0,06% e 0,12%, ou solução controle positivo do digluconato de clorexidina a 0,06% e 0,12%, ou solução controle negativo maltodextrina, ou solução salina a 0,9%. E, as mesmas seis soluções foram preparadas substituindo 0,5 mL da saliva humana fresca por 0,5 mL de solução salina a 0,9% (Figura 31).

Figura 31 - Desenho esquemático do preparo das soluções.



Fonte: Autora

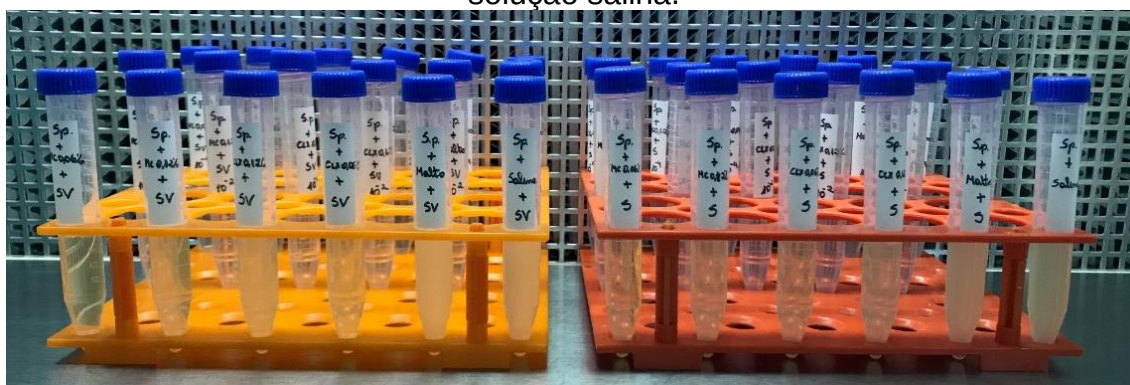
A saliva humana fresca foi coletada da própria pesquisadora após estímulo mastigatório com hiperbolóide por 1 minuto, e coletada em funil e tubo de vidro previamente esterilizados. Posteriormente a saliva foi transferida para um tubo falcon de 15 mL estéril e centrifugada por 10 minutos, em sequência o sobrenadante foi imediatamente utilizado para o experimento.

As soluções preparadas foram agitadas em vortex e levadas para incubação a 37°C por 24 ou 48 horas, a depender da cepa estudada.

➤ Preparo das placas

Após o período de incubação, cada uma das seis soluções com saliva e das seis soluções com solução salina foram diluídas em solução salina a 0,9% a 10^{-2} e 10^{-4} para o preparo das placas, sendo as soluções preparadas inicialmente considerada a concentração 10^0 , a partir da qual foi realizada as demais diluições (Figura 32). A diluição da solução 10^0 para 10^{-2} foi realizada removendo-se 50 μ L da solução 10^0 para 4.950 μ L de salina, e sucessivamente a diluição da solução 10^{-2} para 10^{-4} foi realizada removendo-se 50 μ L da solução 10^{-2} para 4.950 μ L de salina, sendo realizado agitação em vortex entre as diluições.

Figura 32 - Soluções preparadas nas diluições 10^0 , 10^{-2} e 10^{-4} , em saliva e em solução salina.

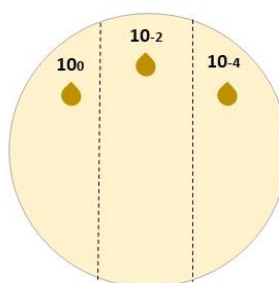


Fonte: Autora.

As placas de Petri com BHI ágar para as cepas bacterinas e Sabouraud ágar para *Candida albicans* foram preparadas com 10 μ L de cada uma das soluções nas

diferentes concentrações 10^0 , 10^{-2} e 10^{-4} . Seguiu-se a técnica do gotejamento em que uma gota foi colocada e deixada escorrer em local marcado na placa para 10^0 , 10^{-2} e 10^{-4} , sendo o procedimento repetido para cada uma das soluções com saliva e com solução salina (Figura 33). As placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas para leitura quanto à morte das bacteriana ou do fungo, constatando ou não a morte do microrganismo, ou permitindo a contagem de colônias bacterianas presentes nas soluções de acordo com a concentração.

Figura 33 - Desenho esquemático de preparo da placa Petri pela técnica do gotejamento para leitura de crescimento bacteriano/fúngico.

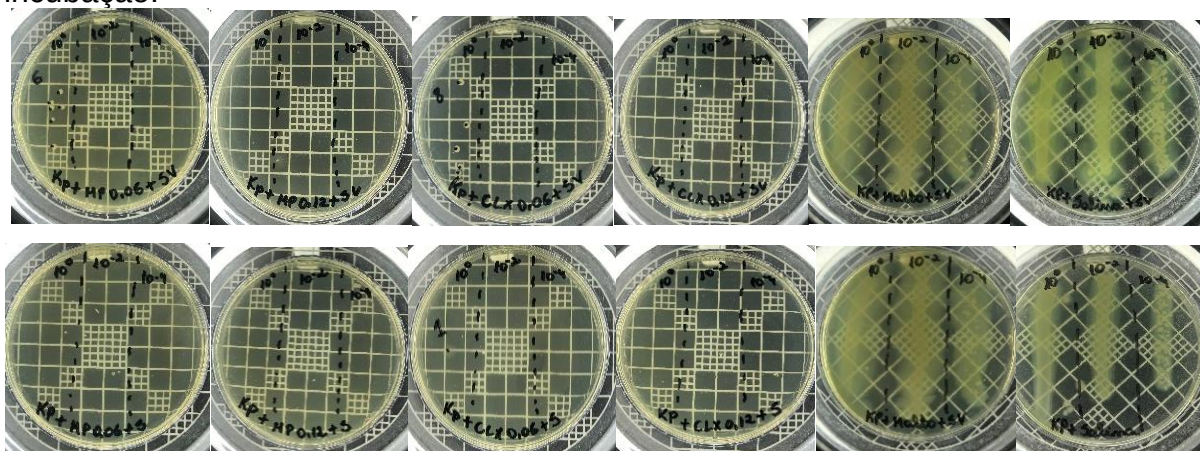


Fonte: Autora.

• Resultados e discussão

As placas preparadas pela técnica do gotejamento permitiram uma avaliação qualitativa dicotômica de presença ou ausência de crescimento bacteriano ou fúngico entre as soluções testadas em presença de saliva ou em solução salina, e ainda permitiu quantificar o crescimento quanto às colônias formadas após o período de incubação, conforme apresentado na Figura 34 e Tabela 17 a seguir.

Figura 34 - Placas Petri preparadas para leitura de crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* em saliva e em solução salina por diluição após período de incubação.



Fonte: Autora.

Tabela 17 - Atividade bactericida e fungicida por diluição com saliva e solução salina.

Microrganismo / Método	MP 0,06%	MP 0,12%	CLX livre 0,06%	CLX livre 0,12%	M 0,12%	Solução salina
UFC/mL						
<i>Staphylococcus aureus</i>						
SALIVA	0	0	0	0	Inc	Inc
SOLUÇÃO SALINA	0	0	0	0	Inc	Inc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
SALIVA	2.10 ²	0	0	0	Inc	Inc
SOLUÇÃO SALINA	0	0	0	0	Inc	Inc
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
SALIVA	6.10 ²	0	8.10 ²	0	Inc	Inc
SOLUÇÃO SALINA	0	0	1.10 ²	0	Inc	Inc
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
SALIVA	1.10 ²	0	1.10 ²	0	Inc	Inc
SOLUÇÃO SALINA	0	0	0	0	Inc	Inc
<i>Candida albicans</i>						
SALIVA	0	0	0	0	Inc	Inc
SOLUÇÃO SALINA	0	0	0	0	Inc	Inc

MP (Micropartículas com clorexidina), CLX (Clorexidina), M (Maltodextrina), UFC (Unidades formadoras de colônias) e Inc (Número incontável de colônias). Fonte: Autora.

Para todas as cepas testadas foi observado um número incontável de colônias nas soluções com maltodextrina e com solução salina, demonstrando que ocorreu o crescimento bacteriano e fúngico em todas as diluições das soluções, não havendo diferenças entre as cepas estudadas. Isto comprovou a ausência de atividade antimicrobiana dos controles negativos.

Com a análise das soluções testes das micropartículas com clorexidina e do seu controle positivo com a clorexidina livre, os resultados apresentaram atividade bactericida total nas duas concentrações 0,06% e 0,12% das micropartículas com clorexidina e da clorexidina livre nas soluções com saliva e com solução salina para *Staphylococcus aureus*. Sendo o mesmo resultado observado em relação à atividade fungicida para a *Candida albicans*.

Pseudomonas aeruginosa apresentou crescimento bacteriano apenas na solução inicial de micropartículas com clorexidina a 0,06% em saliva com contagem de 2.10^2 UFC/mL, e sem crescimento de colônias na clorexidina livre a 0,06% em saliva, e em todas as soluções preparadas na concentração a 0,12%. Para *Streptococcus pneumoniae* o crescimento bacteriano foi observado apenas nas soluções iniciais de micropartículas com clorexidina e de clorexidina livre a 0,06% em saliva com contagem de 1.10^2 UFC/mL para ambas as soluções. Nestas cepas o crescimento bacteriano esteve ausente nas soluções de micropartículas com clorexidina e clorexidina livre a 0,12% em saliva, e nas duas concentrações das micropartículas e clorexidina livre em solução salina.

Para a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi observado crescimento bacteriano nas soluções de micropartículas com clorexidina e de clorexidina livre a 0,06% em saliva com contagem de 6.10^2 e 8.10^2 UFC/mL respectivamente, e na solução de clorexidina livre a 0,06% em solução salina com contagem de 1.10^2 UFC/mL. O crescimento bacteriano foi ausente nas soluções de micropartículas com clorexidina e de clorexidina livre a 0,12% em saliva, e na solução de micropartículas com clorexidina a 0,06% e a 0,12% em salina.

A análise da atividade das micropartículas com clorexidina na presença de saliva e em solução salina no presente estudo mostrou resultados semelhantes aos observados com a clorexidina livre, pela ausência de crescimento microbiano independente da concentração estudada para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, e crescimento de poucas colônias para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae* com as clorexidinas em micropartículas ou livre na concentração a 0,06%. Este aspecto demonstra que a clorexidina está sendo liberada das micropartículas e que está mantendo as propriedades antimicrobianas,

sendo estes aspectos observados tanto nos meios com saliva como em solução salina.

A cavidade bucal funciona como um habitat para o crescimento de microrganismos no qual a presença dos dentes, superfícies mucosas especializadas, fluido do sulco gengival e saliva tornam a cavidade bucal uma área distinta de outras áreas do corpo em relação às condições de crescimento microbiano. A saliva apresenta em sua composição componentes proteicos na forma de macromoléculas e anticorpos, e compostos iônicos como bicarbonatos, potássio, sódio, cálcio e fosfato, que exercem um efeito de tamponamento frente aos ácidos e bases, além da presença de microrganismos. Os principais constituintes orgânicos da saliva são macromoléculas de proteínas e glicoproteínas, que influenciam na microbiota oral funcionando como agentes de adesão bacteriana à superfície dos dentes, como fontes primárias de nutrientes para as bactérias, e como agentes facilitadores para a agregação bacteriana (MARSH, MARTIN, 2005; PESSAN et al., 2006).

Neste contexto, a presença da saliva no experimento teve por objetivo simular condições da cavidade bucal, tendo a saliva um papel importante sobre as condições de crescimento das cepas estudadas nas soluções preparadas, isso porque a composição orgânica com as macromoléculas proteicas da saliva fornece substrato para o crescimento dos microrganismos. Assim, no presente estudo era esperado um maior crescimento das cepas estudadas nas soluções preparadas com saliva em relação às soluções preparadas com solução salina. Este aspecto foi observado nos resultados do experimento, em que a formação de unidades formadoras de colônias ocorreram em soluções preparadas com saliva e micropartículas com clorexidina a 0,06% para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, e com a clorexidina livre a 0,06% para as cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, enquanto o crescimento de uma unidade formadora de colônia só foi observado em solução salina com clorexidina livre a 0,06% para a *Klebsiella pneumoniae*.

Quanto a atividade bactericida da clorexidina em saliva, observa-se a ação da clorexidina sobre os microrganismos livres, além da formação e recolonização do biofilme bacteriano, visto pela redução do número de bactérias na saliva em estudos

clínicos após o bochecho com a clorexidina. Ademais, após o bochecho com clorexidina, por esta ser uma molécula dicatiônica, ocorre a ligação à proteínas salivares, além da película adquirida do esmalte e à mucosa bucal, sendo liberada lentamente e mantém a sua atividade antimicrobiana na cavidade bucal (ZANATTA, 2007; HORTENSE, 2010).

Bambace et al. (2003) avaliaram a atividade bactericida e fungicida a partir de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de diferentes concentrações de soluções aquosas de clorexidina a 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4% contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e do fungo *Candida albicans* para desinfecção de superfícies. Foi observado uma atividade bactericida total com ausência de unidades formadora de colônias para todas as cepas bacterianas em todas as concentrações de clorexididina, e para a *Candida albicas* foi observado a formação de colônia na concentração da clorexidina a 0,5%, tendo a atividade fungicida total a partir da concentração a 1%.

Em relação a atividade fungicida da clorexidina, Shrestha et al. (2011) avaliaram o tempo de morte dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isolados de pacientes com candidoses após uso de solução oral com clorexidina a 0,2%, e comparou com solução oral de óleos essenciais com timol. Foi observado uma atividade fungicida para solução oral com clorexidina com ausência de formação de colônias após 30 minutos para *Candida albicans*, e após 60 minutos para *Candida tropicalis*. E para a solução oral de óleos essenciais com timol a atividade fungicida com ausência de formação de colônias ocorreu após 60 minutos para *Candida albicans*, e após 90 minutos para *Candida tropicalis*.

A eficácia da clorexididina foi observada em intervenção preventivas contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) associados à contaminação em pacientes internos em unidades de terapia intensiva. Um protocolo anti-séptico com clorexidina a 1% foi adotado para estes pacientes, cujo resultado apresentou uma redução imediata significativa de 70% na aquisição de cepas de MRSA que demonstrou uma redução no número de locais de colonização, pela morte e ausência de crescimento bacteriano, em resposta ao tratamento com clorexidina. Com isso, os

autores concluíram que um protocolo anti-séptico à base de clorexidina pode interromper a transmissão de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em UTIs (BATRA et al., 2010). O uso da clorexidina para o controle da colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em pacientes hospitalizados também foi reportado com sucesso na redução da incidência de transmissão e bacteremia em acessos intravasculares, e associados a antibiótico para lavagem nasal (ALVAREZ et al., 2010).

Semenoff et al. (2008) compararam a eficácia antibacteriana *in vitro* de enxaguatórios bucais à base de clorexidina a 0,12%, cloreto de cetilpiridínio e triclosan para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade bactericida foi medida por halos de inibição em placa de Petri, sendo observado que em relação à *Pseudomonas aeruginosa*, o antisséptico à base de clorexidina foi significativamente mais eficaz que os outros enxaguatórios bucais, e para *Staphylococcus aureus*, todos os enxaguatórios bucais tiveram efeito inibitório significativo. Segundo os autores, os resultados das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentam respostas diferentes aos princípios ativos dos enxaguatórios bucais, sendo a clorexidina o mais eficaz.

Os estudos que avaliaram a atividade bactericida da clorexidina foram desenvolvidos com diferentes metodologias, e tendo como objeto de análise a clorexidina em diferentes concentrações, tornando difícil uma análise comparativa direta em relação ao presente estudo. Contudo, vale ressaltar a concordância em relação aos bons resultados bactericidas e fungicidas apresentados pela clorexidina livre e as micropartículas com clorexidina.

De acordo com Moreira et al. (2010) a concentração de digluconato de clorexidina a 0,12% é a mais recomendada, em razão da eficácia contra os microrganismos e a redução dos efeitos adversos comumente observados, quando comparados com concentrações mais elevadas da clorexidina.

Nesta análise os resultados mostraram crescimento bacteriano com as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre a 0,06% para algumas cepas, especialmente em saliva. E para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina na concentração a 0,12% ocorreu uma total atividade bactericida e fungicida. Assim a

concentração das micropartículas com clorexidina a 0,12% foi adotada para os testes microbiológicos subsequentes, sendo esta a concentração adotada como padrão comercial.

8.3.2 Testes microbiológicos em biofilme bacteriano

- **Materiais e métodos**

Os testes de biofilme foram realizados para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*. Estas são algumas das bactérias encontradas em infecções respiratórias associadas à ventilação mecânica pelo uso do tubo endotraqueal, sendo o fator de risco mais associado à pneumonia nosocomial (BERGMANS, 2001; MUNRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; BARBOSA et al., 2010; SANDS et al., 2017). Como também observado nesta pesquisa com a análise do banco de dados microbiológico da secreção ou aspirado traqueal de pacientes internos nas UTIs do HULW em ano, com uma maior prevalência para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, nesta ordem, conforme apresentado no tópico 7.5., capítulo IV.

Foi avaliada a ação da micropartícula com clorexidina sobre os biofilmes maduros, após 48 horas de crescimento, das cepas referidas na concentração referente ao padrão comercial de 0,12% ou 1,2 mg/mL de clorexidina na micropartícula, frente ao controle positivo da clorexidina livre a 0,12%, também na concentração de 1,2 mg/mL de clorexidina, e ao controle negativo da maltodextrina na mesma concentração a 0,12%.

- **Preparo das placas de formação dos biofilmes**

Para o preparo do biofilme estático foram utilizadas placas de 24 poços com espécimes ou copos de prova de inox para simular o crescimento bacteriano e a formação do biofilme em superfícies lisas que não sofrem descamação da cavidade

bucal como dentes, e áreas metálicas polidas como próteses, restaurações e aparelhos ortodônticos. E outra placa com corpos de prova cortados de tubos endotraqueal, de polietileno de baixa densidade com superfície ultrapolida, utilizados para ventilação mecânica de pacientes intubados de UTI, cujas especificações são: marca Solidor®, diâmetro interno de 7,5 mm e externo de 10,2 mm, lote nº 01117122, como apresentado na Figura 35.

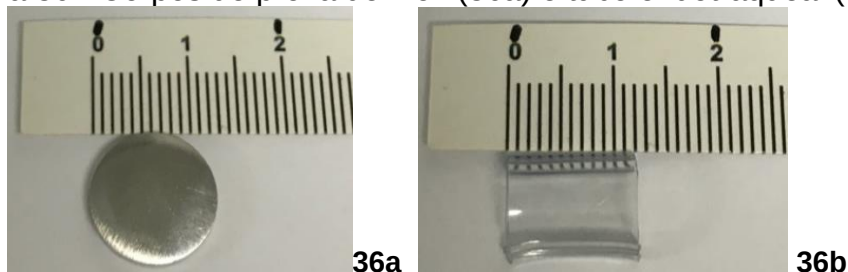
Figura 35 - Tubo endotraqueal para o preparo de corpos de prova.



Fonte: Autora.

Os corpos de prova de inox foram confeccionados em formato de disco com as dimensões de 12 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (Figura 36a), enquanto os corpos de prova de tubo de polietileno foram cortados dos tubos endotraqueal em formato de canaleta com as dimensões de 12 mm de comprimento, 14 mm de largura e 1 mm de espessura (Figura 36b). Ambos preparados com dimensões para permanecer totalmente submersos nos poços das placas com volume padronizado de 2 mL. Os corpos de prova de inox e do tubo de polietileno foram esterilizados previamente ao preparo das placas.

Figura 36 - Corpos de prova de inox (36a) e tubo endotraqueal (36b).



36a

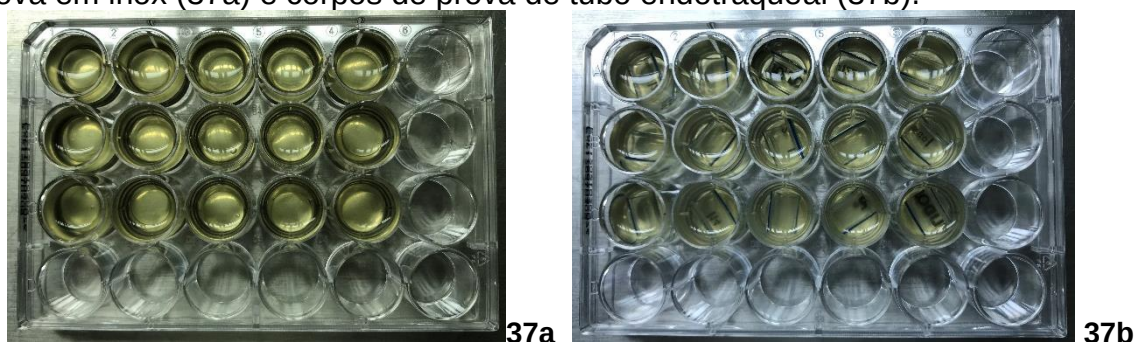
36b

Fonte: Autora.

As cepas utilizadas para a técnica do biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foram preparadas 24 horas antes na presença de oxigênio, e cepas de *Streptococcus pneumoniae* preparadas 48 horas antes em condições de microaerofilia.

Para cada cepa foram preparadas duas placas, uma com o corpo de prova de inox e outra com o tubo endotraqueal. Em cada placa foram preparados 15 poços, sendo colocado em cada poço o corpo de prova no fundo e acrescentado 1,6 mL de BHI e 400 μ L do inóculo, como apresentado na Figura 37. As placas foram incubadas por 48 horas para a formação de biofilme maduro.

Figura 37 - Placas preparadas para crescimento de biofilme estático com corpos de prova em inox (37a) e corpos de prova de tubo endotraqueal (37b).

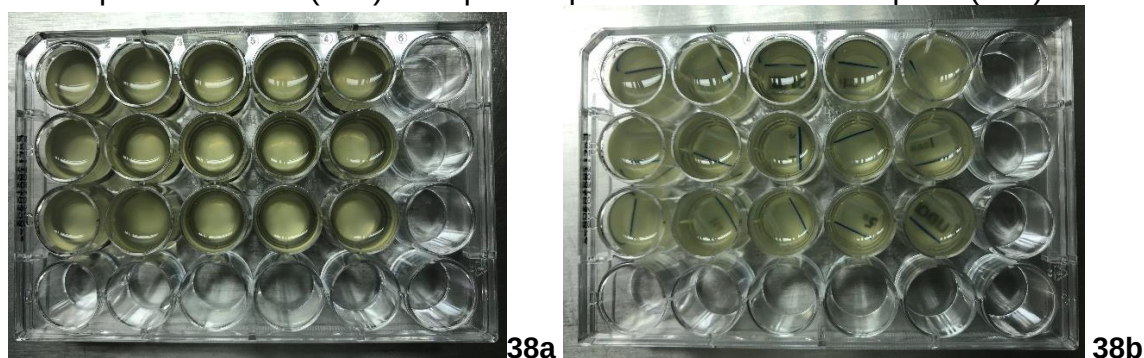


Fonte: Autora.

➤ Preparo das placas para cinética de viabilidade celular e para leitura

Após o período de incubação, a formação do biofilme foi observada pela turbidez dos corpos de prova e do meio de cultura, como apresentado na Figura 38.

Figura 38 - Placas com biofilme maduro após 48 horas de incubação com corpos de prova em inox (38a) e corpos de prova de tubo endotraqueal (38b).

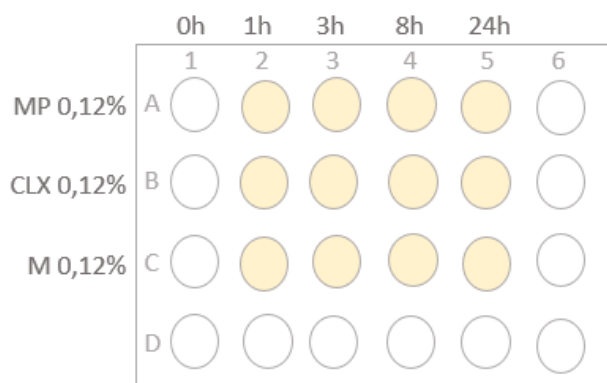


Fonte: Autora.

Os corpos de prova para a leitura de 0h não passaram pela placa de cinética de viabilidade celular com os agentes teste, visto que estes foram lidos no tempo inicial sem a interferência de nenhum agente, tendo sido avaliado apenas o crescimento do biofilme maduro. Estes foram imergidos três vezes em cada poço correspondente de solução salina da placa de banho para a remoção de células bacterianas planctônicas sobre o biofilme formado, antes de serem transferidos imediatamente para o poço correspondente na placa de leitura para as sucessivas leituras por absorbância, fluorescência e contagem bacteriana.

Enquanto os corpos de prova para as leituras nos tempos 1h, 3h, 8h e 24h foram preparados para a placa de cinética de viabilidade celular com 12 poços contendo 1,8 mL de BHI e 200 μ L de cada solução teste ou controle, correspondendo aos tempos de 1h, 3h, 8h e 24h, conforme Figura 39. As soluções foram preparadas com solução salina, sendo a solução teste com as micropartícula com clorexidina na concentração de 1,2 mg/mL correspondente à concentração de 0,12% do padrão comercial, a solução controle positivo com a clorexidina livre na concentração 0,12% obtida a partir de diluição da clorexidina 20% da Sigma-Aldrich®, e a solução controle negativo com a maltodextrina também na concentração de 0,12%.

Figura 39 - Desenho esquemático do preparo da placa de cinética de viabilidade celular.



Fonte: Autora.

Antes da colocação dos corpos de prova nas placas de cinética de viabilidade celular, estes também passaram por uma placa de banho, sendo imergidos e retirados três vezes nos poços correspondentes da placa de banho contendo os mesmos poços da placa inicial preenchidos com 2 mL de solução salina. A manipulação dos corpos de prova entre as placas de crescimento do biofilme, placa de banho e placa de cinética de viabilidade celular foram realizadas com o auxílio de pinças esterilizadas. Os corpos de prova de 1h, 3h, 8h e 24h, após o banho em solução salina, foram transferidos para os seus poços correspondentes na placa teste de cinética de viabilidade celular, e levados novamente para incubação.

Após o tempo de incubação de 1h, 3h, 8h e 24h os corpos de prova dos poços correspondentes com a solução teste e controles, em cada tempo determinado, foram removidos para a placa de leitura contendo em cada poço 2 mL de solução salina.

Para a realização das leituras por absorvância, fluorescência e contagem bacteriana por diluição, as placas de leitura com os corpos de prova em solução salina foram levadas para sonicação por 3 minutos (Ultrasonic cleaner, ISC 750 - Unique®) para permitir a liberação das células do biofilme na solução de leitura.

8.3.2.1 Análise por absorvância

A análise por absorvância foi realizada nos tempos determinados para a leitura em cinética de 0h, 1h, 3h, 8h e 24h, sendo removido 100 µL dos poços da placa de

leitura correspondentes da micropartícula com clorexidina 0,12%, clorexidina livre 0,12% e maltodextrina 0,12%. Antes da remoção de cada poço de leitura foi realizado a agitação do conteúdo por aspiração e eliminação do conteúdo com a ponteira, em seguida, a amostra retirada foi imediatamente colocada em poços de placa de 96 poços de fundo chato.

A realização da leitura foi por espectrofotometria em aparelho OPTIMA®, sob o programa Optima – Data analysis para absorvância com comprimento de onda de 640 nm.

8.3.2.2 *Análise por fluorescência*

A análise por fluorescência seguiu o protocolo de fluorescência para viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ da Invitrogen usando o programa OPTIMA®, permitindo detectar a presença de bactérias vivas e mortas, a partir do cálculo da razão das bactérias vivas sobre mortas que fornece um parâmetro para confirmação da atividade antimicrobiana do agente testado.

O reagente para leitura da fluorescência foi preparado a partir da mistura de SYTO® 9 com o Iodeto de propídio do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ da Invitrogen. Para o preparo do reagente, cada componente foi diluído em um tubo falcon de 15 mL com 2,5 mL de água deionizada, em seguida os dois componentes foram misturados em uma proporção de 1:1 em um microtubo de 2 mL para as leituras. Todo o processo foi realizado protegendo a exposição dos reagentes à luz, e foram seguidos todos os cuidados de biossegurança com EPIs para evitar o contato com o reagente, e todo o material foi descartado em recipiente separado.

Foi preparado uma curva de calibração para a leitura com bactérias vivas e mortas. Para isso, um tubo falcon com cada cepa após o período de incubação foi agitado em vórtex e dividido em partes iguais em outro tubo falcon, os quais foram identificados em separado em tubo de bactérias vivas e outro tubo de bactérias mortas. Os dois tubos foram centrifugados (Centrífuga Quimis®) por 12 minutos em uma velocidade de 5.000 RPM para a separação das colônias bacterianas, e em seguida o sobrenadante foi descartado. No tubo de bactérias vivas foi acrescentado 5

mL de solução salina a 0,9%, e no tubo de bactérias mortas foi acrescentado 240 µL de solução salina a 0,9% e 4,8 mL de álcool isopropílico a 70% para permitir a morte das bactérias. Em sequência, ambos os tubos foram agitados em vórtex e levados para a estufa por 40 minutos, sendo retirados da estufa e agitados a cada 10 minutos. Após este período, o tubo de bactérias mortas foi levado novamente para a centrífuga por 12 minutos em uma velocidade de 5.000 RPM para a separação das colônias bacterianas, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 5 mL de solução salina a 0,9%. Decorrido todo o processo, ambos os inóculos de bactérias vivas e bactérias mortas foram padronizados na Escala de MacFarland.

A curva de calibração com as bactérias vivas e mortas foi usado como referência para a leitura dos poços analisados com os testes e controles. A curva foi preparada nas concentrações de 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de microrganismos vivos. As concentrações foram preparadas em microtubos de 2 mL com os volumes de 0 µL de bactérias vivas + 100 µL de bactérias mortas no tubo 0%, 20 µL de bactérias vivas + 80 µL de bactérias mortas no tubo 20%, 50µL de bactérias vivas + 50 µL de bactérias mortas no tubo 50%, 80 µL de bactérias vivas + 20 µL de bactérias mortas no tubo 80%, e 100 µL de bactérias vivas + 0 µL de bactérias mortas no tubo 100%. Em seguida todos os tubos foram agitados em vórtex, e um volume 30 µL de cada concentração foi levado para poços específicos para leitura na placa preta de fluorescência. O processo de preparo da curva de calibração foi repetido em cada tempo de leitura 0h, 1h, 3h, 8h e 24h.

Para a análise das soluções teste, removeu-se 30 µL nos tempos determinados de 0h, 1h, 3h, 8h e 24h dos poços correspondentes da micropartícula com clorexidina 0,12%, clorexidina livre 0,12% e maltodextrina 0,12% na placa de leitura. Antes da remoção de cada poço de leitura foi realizado a agitação no poço por aspiração e eliminação do conteúdo com a ponteira, em seguida, a amostra retirada foi imediatamente colocada nos poços da placa de fluorescência.

O reagente para fluorescência previamente preparado foi adicionado a cada poço da curva de calibração e das soluções teste em um volume de 30 µL, totalizando um volume de 60 µL em cada poço para leitura. Em seguida a placa foi levada para

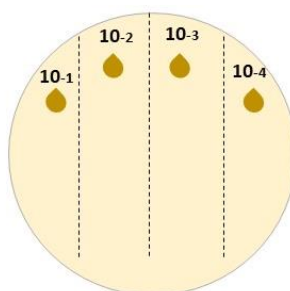
leitura no aparelho OPTIMA®, sob o programa Optima – Data analysis para fluorescência.

8.3.2.3 Análise por contagem bacteriana

Para o preparo das placas de ágar para leitura por contagem bacteriana foi removido, com agitação prévia, 100 µL nos tempos determinados de 0h, 1h, 3h, 8h e 24h, nos poços da placa de leitura correspondentes da micropartícula com clorexidina, clorexidina livre e maltodextrina. Cada solução foi diluída em 900 µL de solução salina a 0,9%, com agitação em vórtex, nas concentrações consecutivas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para o preparo das placas, preparadas em microtubos de 2 mL.

As placas de Petri com ágar BHI foram preparadas com 10 µL de cada uma das soluções nas diferentes concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , a partir da técnica do gotejamento em que uma gota de 10 µL foi colocada e deixada escorrer em local marcado de cada placa (Figura 40). Após o tempo de secagem, as placas foram novamente incubadas para serem lidas quanto a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no contador de colônias manual (CP 608 – Phoenix®).

Figura 40 - Desenho esquemático do preparo da placa Petri para contagem bacteriana.



Fonte: Autora.

• Resultados e discussão

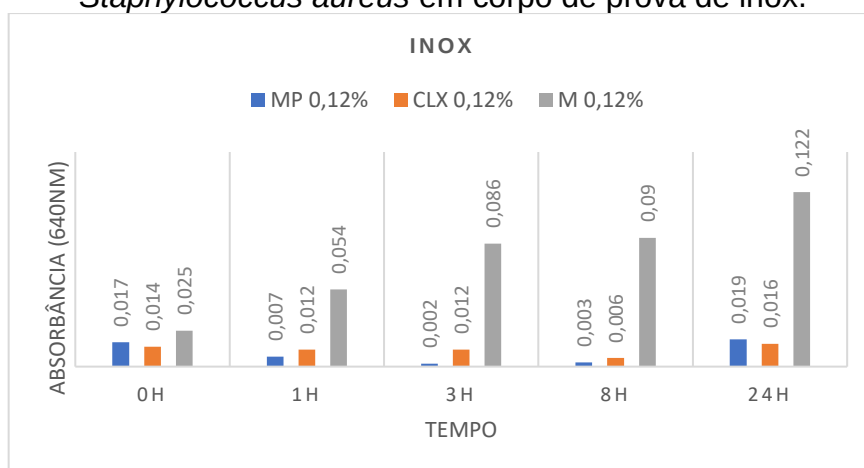
Os resultados da cinética celular sobre biofilmes uniespécies das cepas estudadas em todas as análises por absorbância, fluorescência e contagem bacteriana mostraram eficiência antimicrobiana semelhante entre as micropartículas

com clorexidina e a clorexidina livre. Foi evidenciado que a atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina sobre os biofilmes bacterianos estudados em ambos os corpos de prova, inox e tubo endotraqueal, não sofreu alterações quando comparado com a clorexidina livre, confirmando que a clorexidina liberada das micropartículas foi capaz de atuar sobre as bactérias estruturadas do biofilme maduro. Os resultados estão apresentados nos gráficos e tabelas a seguir:

➤ *Staphylococcus aureus*

A formação de biofilme em 0h foi constatado nos corpos de prova de inox com valores de absorbância de 0,017, 0,014 e 0,025. Na análise por absorbância da cinética celular do biofilme sobre inox nos tempos de análise de 1, 3, 8 e 24 horas foi observado um perfil semelhante das micropartículas com clorexidina, com valores de absorbância de 0,007, 0,002, 0,003 e 0,019, em relação à clorexidina livre cujos valores de absorbância foram de 0,012, 0,012, 0,006 e 0,016, tendo no tempo de análise de 3 horas as micropartículas com clorexidina um desempenho melhor em relação à clorexidina livre. A maltodextrina apresentou um aumento progressivo da absorbância durante os períodos de análise (Figura 41).

Figura 41 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de *Staphylococcus aureus* em corpo de prova de inox.

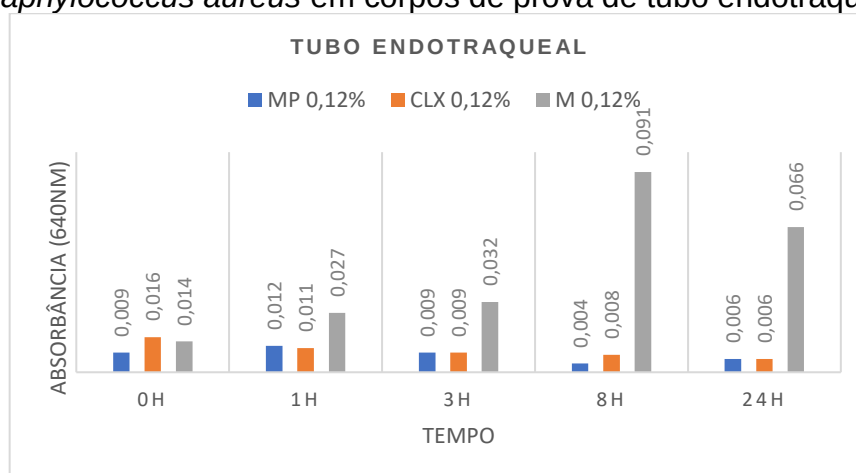


MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

A formação de biofilme nos corpos de prova do tubo endotraqueal foi comprovada com valores de absorbância de 0,009, 0,016 e 0,014. Na cinética celular do biofilme sobre tubo endotraqueal um perfil semelhante do valor de absorbância das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre foi observada em todos os tempos de análise. Sendo observado nos tempos de 1, 3, 8 e 24 horas para as micropartículas com clorexidina os valores respectivos de 0,012, 0,009, 0,004 e 0,006, e para a clorexidina livre os valores de 0,011, 0,009, 0,008 e 0,006. Enquanto a maltodextrina apresentou um aumento progressivo da absorbância durante os períodos de análise, com um maior aumento no tempo de 8 horas (Figura 42).

Figura 42 – Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de *Staphylococcus aureus* em corpos de prova de tubo endotraqueal.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%)

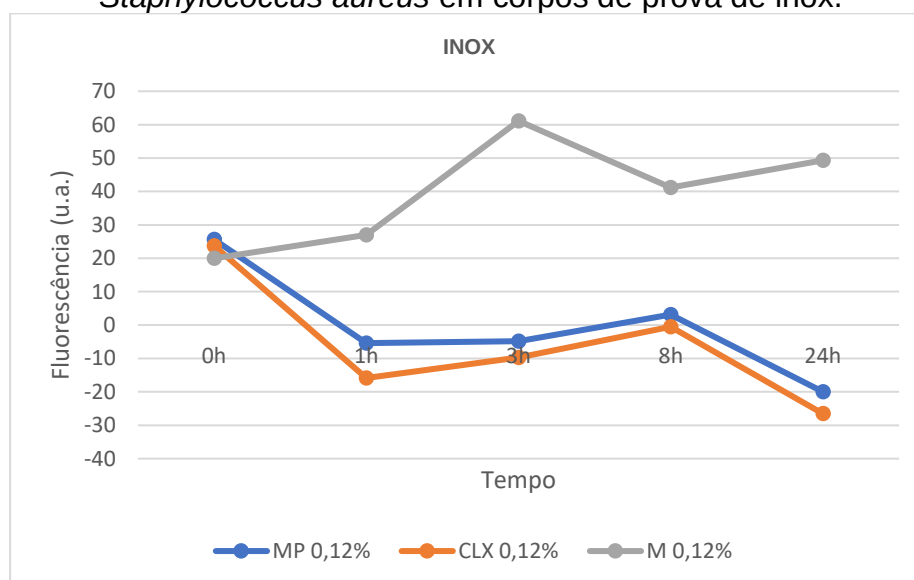
Fonte: Autora.

Neste estudo a formação do biofilme uniespécie de *Staphylococcus aureus* foi observado com um comportamento equivalente tanto para o corpo de prova de inox quanto para o tubo endotraqueal. Este aspecto está em concordância com Boari et al (2009) que observaram a formação de biofilme uniespécie de *Staphylococcus aureus* sobre aço inoxidável, apesar desta bactéria ser Gram positiva, não apresentar estrutura de membrana para motilidade e adesão, e ser pouco hidrofóbica que favorece a formação do biofilme. Neste mesmo contexto, Marino et al. (2017)

observaram, por análise de DNA, a presença de *Staphylococcus aureus* em biofilme formado sobre o tubo endotraqueal de pacientes com ventilação mecânica.

Para ambos os corpos de prova, a cinética de viabilidade celular por fluorescência seguiu o mesmo perfil decrescente para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre, com um desempenho discretamente melhor para a clorexidina livre no biofilme dos corpos de prova de inox, como pode ser observado nas Figuras 43 e 44. A maltodextrina adotou um perfil cinético de viabilidade oposto e crescente, demonstrando uma proporção maior de bactérias vivas sobre mortas, ratificando a ausência de atividade antimicrobiana.

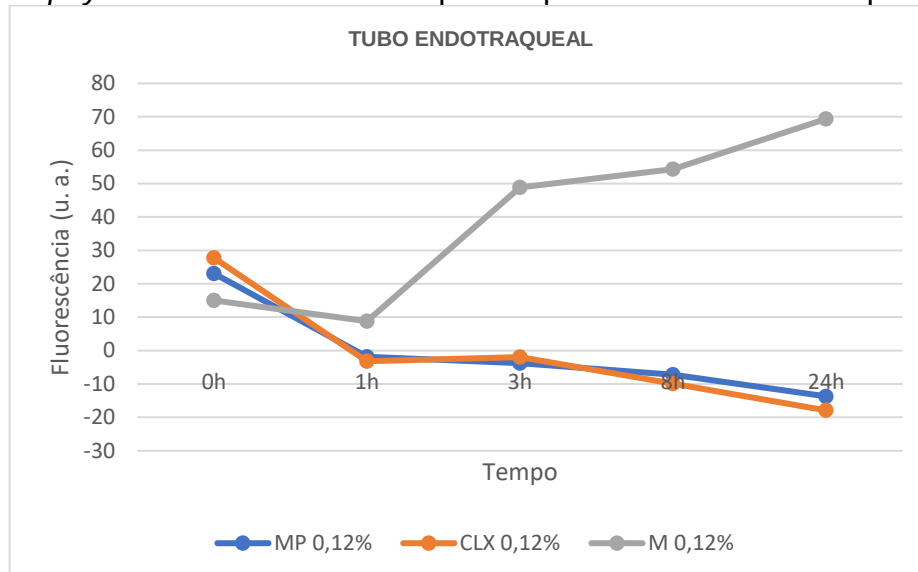
Figura 43 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Staphylococcus aureus* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Figura 44 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Staphylococcus aureus* em corpos de prova de tubo endotraqueal.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

A Tabela 18 mostra a quantidade de unidades formadoras de colônias por mL em cada tempo de análise para ambos os corpos de prova.

Tabela 18 - Análise por contagem bacteriana da cinética celular do biofilme de *Staphylococcus aureus* em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.

Tempo de análise/ Biofilme	1h			3h			8h			24h		
	<i>Staphylococcus aureus</i> - UFC/mL											
	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M
INOX	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	8.10 ⁶	6.10 ⁶	Inc	2.10 ⁶	5.10 ⁶	Inc
TUBO	Inc	Inc	Inc	0	1.10 ⁶	Inc	4.10 ⁶	10.10 ⁶	Inc	4.10 ⁶	5.10 ⁶	Inc

MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%), UFC (Unidades formadoras de colônias) e Inc (Número incontável de colônias). Fonte: Autora.

Sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus* em inox, a redução do crescimento bacteriano só foi observado nos tempos de análise de 8 e 24 horas com quantidades de colônias de 8 e 2 UFC/mL para as micropartículas com clorexidina, e 6 e 5 UFC/mL para a clorexidina livre respectivamente, enquanto com 1 e 3 horas foi incontável. Isso pode ser justificado pela quantidade de biofilme formado, no qual a ação da clorexidina

que ocorre pela penetração nas camadas do biofilme, com desagregação do mesmo e morte das bactérias só foi efetivo a partir de 8 horas.

Sob esta mesma visão, a quantidade de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre os corpos de prova do tubo endotraqueal foi menor em relação ao de inox, pela observação da quantidade de colônias incontáveis apenas no tempo de 1 hora, e com o tempo de 3, 8 e 24 horas foi observado uma redução do número de colônias. No tempo de 3 horas houve ausência de crescimento com as micropartículas com clorexidina, e uma UFC/mL foi formada com a clorexidina livre, em 8 horas 4 UFC/mL foram formadas sob a ação das micropartículas e 10 UFC/mL com a clorexidina livre, e no tempo de 24 horas 4 e 5 foram as UFC/mL formadas com as micropartículas e a clorexidina livre, respectivamente.

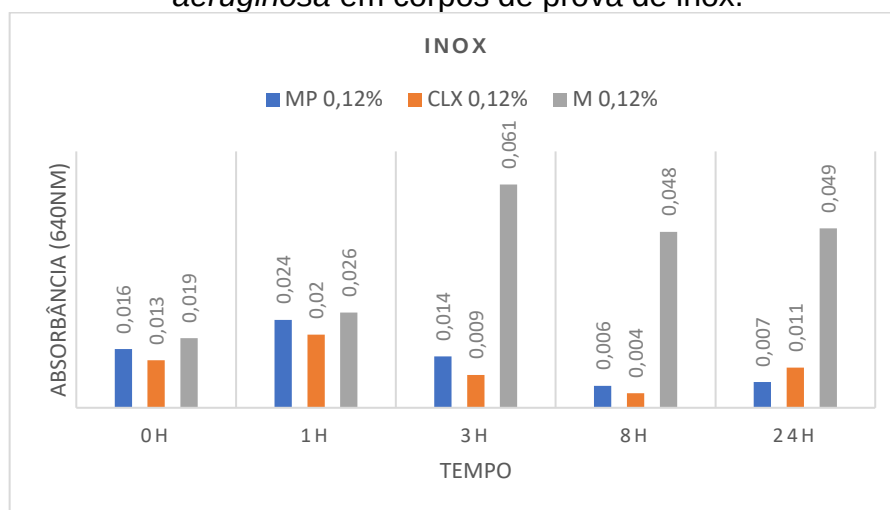
Estes dados da quantidade de biofilme formado de *Staphylococcus aureus* sobre os dois tipos de corpos de prova do presente estudo está de acordo com as observações de Santos et al. 2007, que destaca as propriedades desta bactéria quanto à capacidade de adaptação a diferentes superfícies, e formação e resistência em biofilme.

Para ambos os corpos de prova a quantidade incontável de colônias foi observado sobre a ação da maltodextrina em todos os tempos de análise.

➤ ***Pseudomonas aeruginosa***

O biofilme uniespécie de *Pseudomonas aeruginosa* nos corpos de prova de inox foi formado com valores de absorbância de 0,016, 0,013 e 0,019. Na cinética celular foi observado um perfil semelhante do valor de absorbância das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre em todos os tempos de análise, com valores para as micropartículas com clorexidina de 0,024, 0,014, 0,006 e 0,007, e para a clorexidina livre de 0,020, 0,009, 0,004 e 0,011, finalizando com um desempenho melhor para as micropartículas com clorexidina em 24 horas. Enquanto a maltodextrina apresentou valores de absorbância altos a partir de 3 horas de análise (Figura 45).

Figura 45 - Análise por absorvância da cinética celular do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

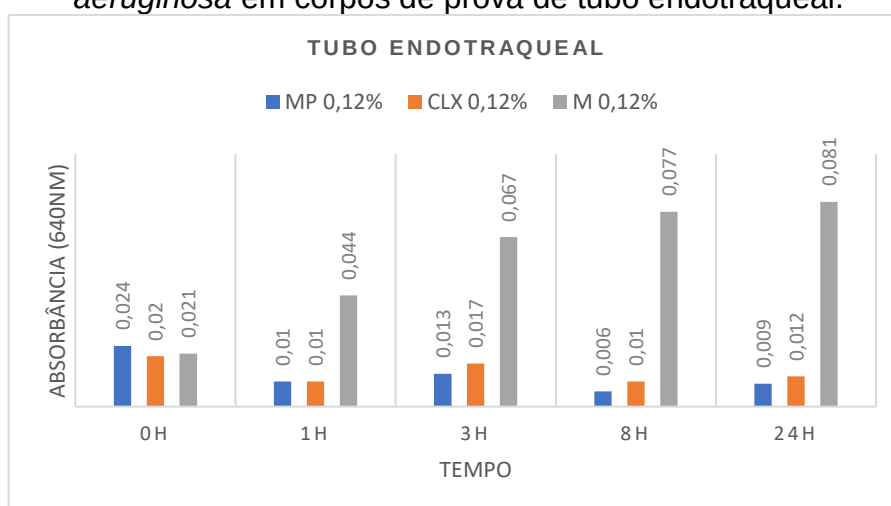
Fonte: Autora.

É importante destacar nesta análise que após 1 hora de exposição às soluções testes foram observados resultados semelhantes em relação às micropartículas e seus controles positivos e negativo, sendo a absorvância das micropartículas com clorexidina 0,024, da clorexidina livre 0,020, e da maltodextrina 0,026. Apenas após 3 horas que a solução teste e controle positivo começaram a apresentar a atividade antimicrobiana contra a *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando uma resistência inicial desta bactéria à clorexidina, tanto na forma livre como na forma microparticulada.

Os biofilmes compostos por *Pseudomonas aeruginosa* são reconhecidos como de difícil tratamento e causadores de infecções persistentes. Estas bactérias segregam compostos chamados de fatores de virulência, como é o caso do pigmento ciânico, que eliminam bactérias de espécies semelhantes de forma a favorecer o crescimento das bactérias produtoras do pigmento por anular a concorrência para a utilização de nutrientes. Possuem ainda a capacidade de produção e secreção de ramnolipídeos que fazem parte do seu arsenal de compostos utilizados para “quorum sensing” e que lhe permite serem mais eficazes a colonizarem superfícies como tubos endotraqueais e cateter venosos, para iniciarem uma infecção (HENRIQUES, 2013).

Sobre os corpos de prova do tubo endotraqueal foi observada a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* com os valores de absorbância de 0,024, 0,020 e 0,021. Na cinética celular dos tempos de análise de 1, 3, 8 e 24 horas, o comportamento da atividade antimicrobiana foi semelhante com valores de absorbância das micropartículas com clorexidina de 0,010, 0,013, 0,006 e 0,009, da clorexidina livre de 0,010, 0,017, 0,010 e 0,012. E a maltodextrina comprovou a ausência de atividade antimicrobiana com valores de absorbância altos e crescentes nos tempos de análise (Figura 46).

Figura 46 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de tubo endotraqueal.

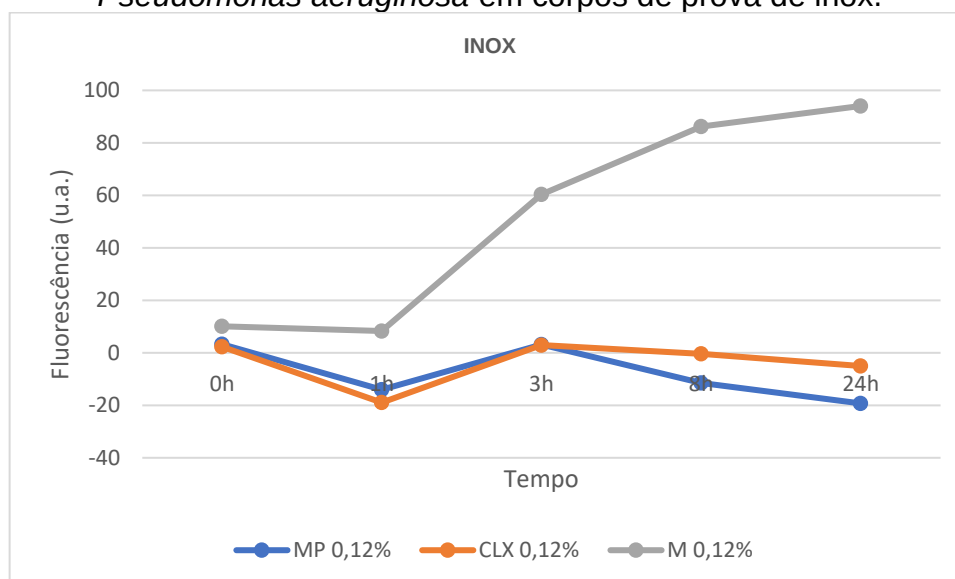


MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

As Figuras 47 e 48 representam o perfil de cinética de viabilidade celular dos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* da análise por fluorescência. Foi observado que para ambos os corpos de prova, a cinética de viabilidade celular seguiu o mesmo perfil para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre. A análise por fluorescência mostrou um perfil discretamente melhor para as micropartículas com clorexidina com os corpos de prova de inox nos tempos de análise de 8 e 24 horas, no tubo endotraqueal no tempo de 8 horas. Para a maltodextrina o perfil observado também foi oposto e crescente em relação as micropartículas e à clorexidina livre.

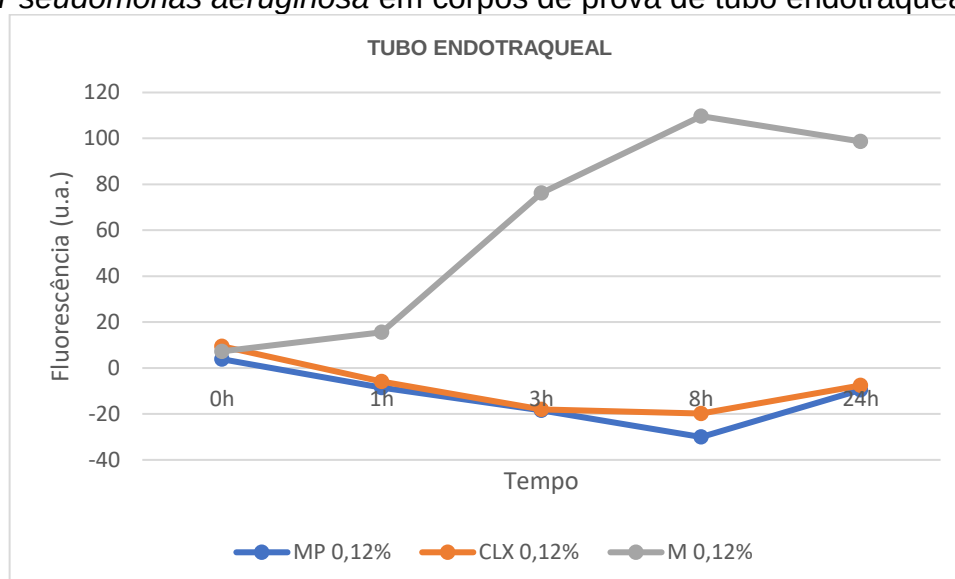
Figura 47 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Figura 48 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de tubo endotraqueal.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Os resultados da contagem bacteriana sobre os biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentados na Tabela 19, também demonstraram resultados

antimicrobianos semelhantes entre as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre. Com os corpos de prova de inox as unidades formadoras de colônias foram, para os tempos de 1, 3, 8 e 24 horas, com as micropartículas com clorexidina 86, 69, 70 e 56 e com a clorexidina livre 74, 60, 74 e 63. E a quantidade de unidades formadoras de colônias para os corpos de prova do tubo endotraqueal com as micropartículas foi 69, 1, 6 e 7 e com a clorexidina livre foi 57, 1, 5 e 5 para os respectivos tempos de análise de 1, 3, 8 e 24 horas. Assim, com a contagem bacteriana também foi observado um crescimento maior de *Pseudomonas aeruginosa* sobre os corpos de prova de inox.

Tabela 19 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.

Tempo de análise/ Biofilme	1h			3h			8h			24h		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - UFC/mL											
	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M
INOX	86.10 ⁶	74.10 ⁶	Inc	69.10 ⁶	60.10 ⁶	Inc	70.10 ⁶	74.10 ⁶	Inc	56.10 ⁶	63.10 ⁶	Inc
TUBO	69.10 ⁶	57.10 ⁶	Inc	1.10 ⁶	1.10 ⁶	Inc	6.10 ⁶	5.10 ⁶	Inc	7.10 ⁶	5.10 ⁶	Inc

MP (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M (Maltodextrina na concentração a 0,12%), UFC (Unidades formadoras de colônias) e Inc (Número incontável de colônias). Fonte: Autora.

A maior resistência a ação antimicrobiana sobre o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em corpos de prova de inox, para todas as metodologias de análise deste trabalho, ressalta a característica de virulência e resistência desta bactéria Gram negativa. Como destacado por Boari et al. (2009), o aço inox forma uma camada de óxido de cromo que determina hidrofobicidade à sua superfície, o qual permite a adesão inicial principalmente por bactérias hidrofóbicas como as Gram negativas.

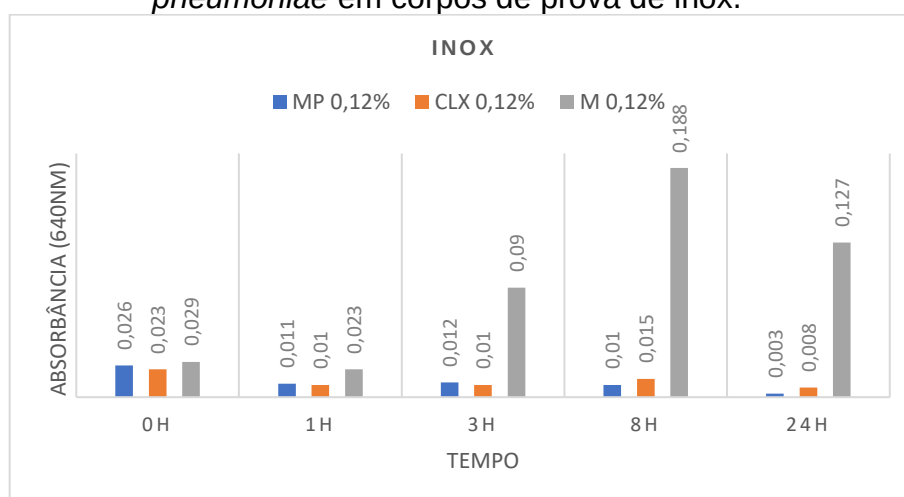
➤ *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um bastonete Gram negativo que tem como fatores de patogenicidade a produção de enterotoxina, a metabolização de lactose, a presença de cápsula ou lipopolissacarídeo, e a presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas e protege a bactéria dos fatores

bactericidas. Foi isolada da boca de indivíduos com ou sem doença periodontal, e em orofaringe de portadores assintomáticos. A colonização da orofaringe é fonte de infecções pulmonares e está fortemente relacionada a infecções hospitalares com alta taxa de mortalidade (SANTOS, 2007).

A Figura 49 representa os resultados de análise por absorvância da cinética celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de inox, sendo comprovado o crescimento do biofilme com os valores de absorvância inicial de 0,026, 0,023 e 0,029. Os valores observados nos tempos 1, 3, 8 e 24 horas para as micropartículas com clorexidina foram respectivamente 0,011, 0,012, 0,010 e 0,003, mostrando-se semelhantes aos valores para a clorexidina livre com 0,010, 0,010, 0,015 e 0,008.

Figura 49 - Análise por absorvância da cinética celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

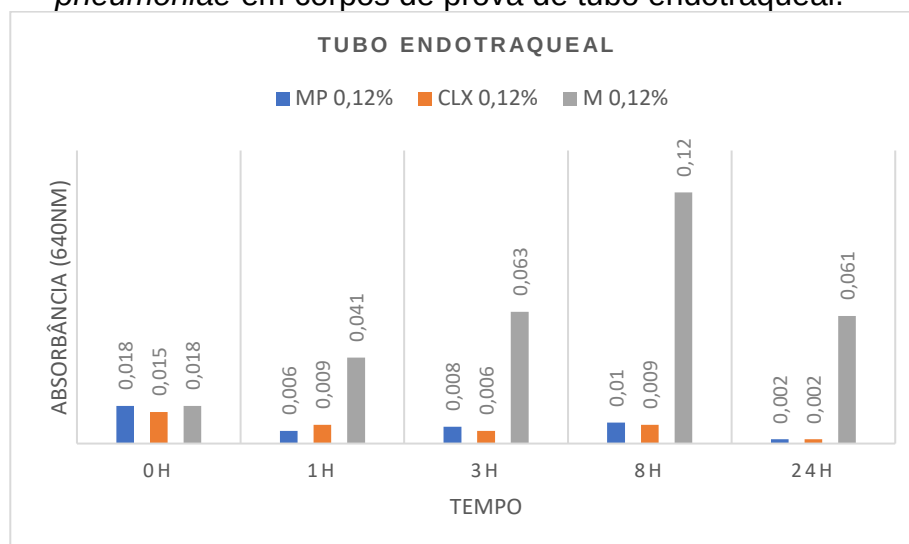
Fonte: Autora.

Nos corpos de prova do tubo endotraqueal foi visto o crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* com valores de absorvância de 0,018, 0,015 e 0,018. Na cinética celular do biofilme sobre tubo endotraqueal um perfil semelhante do valor de absorvância das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre foi observada em todos os tempos de análise. Sendo observado nos tempos de 1, 3, 8 e 24 horas para as micropartículas com clorexidina os valores respectivos de 0,006,

0,008, 0,010 e 0,002, e para a clorexidina livre os valores de 0,009, 0,006, 0,009 e 0,002 (Figura 50).

A absorbância para a maltodextrina apresentou valores altos, especialmente no tempo de análise de 8 horas nos corpos de prova de inox e do tubo endotraqueal.

Figura 50 - Análise por absorbância da cinética celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de tubo endotraqueal.

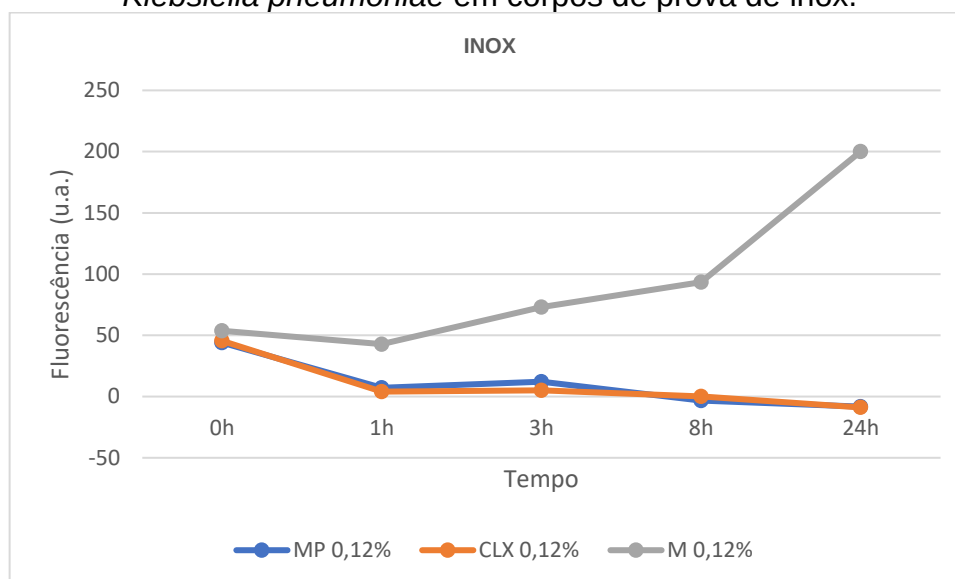


MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

A cinética de viabilidade celular por fluorescência, com análise de bactérias vivas sobre bactérias mortas do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou também resultados equivalentes do comportamento das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre em ambos os corpos de prova avaliados. Enquanto a maltodextrina como controle negativo apresentou um comportamento oposto, demonstrando uma quantidade maior de células bacterianas vivas, com diferença maior observada principalmente após 3 horas de análise, conforme pode ser observado nas Figuras 51 e 52.

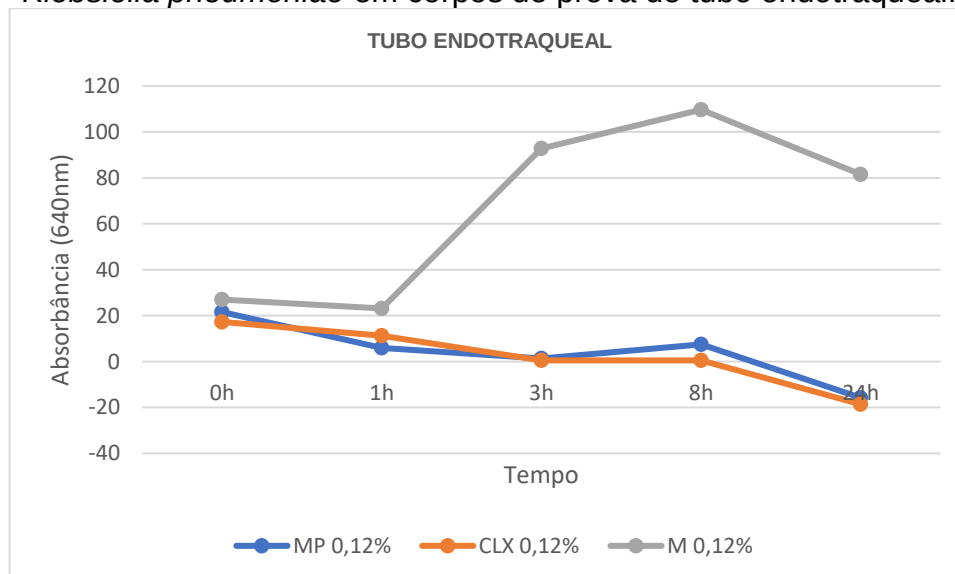
Figura 51 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Figura 52 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de tubo endotraqueal.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

A contagem de unidades formadoras de colônias para os biofilmes de *Klebsiella pneumoniae* estão representadas na Tabela 20. Para esta cepa também foi observado

um crescimento maior sobre os corpos de prova de inox, como já justificado pela característica hidrofóbica das bactérias Gram negativas que tem afinidade pela superfície do inox (BOARI et al., 2009). A quantidade incontável de colônias só foi observada com a maltodextrina com os corpos de prova de inox nos tempos de análise de 8 e 24 horas.

Os resultados da contagem de unidades formadoras de colônias foram equivalentes entre as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre em todos os tempos de análise. Para os corpos de prova de inox as quantidades de UFC/mL apresentadas para as micropartículas foram 32 e 2 colônias para 1 e 3 horas respectivamente, e ausência de crescimento em tempo 8 horas, e para a clorexidina livre 24 e 1 UFC/mL para 1 e 8 horas, e ausência de crescimento em tempo 3 horas. No tubo endotraqueal as micropartículas com clorexidina apresentaram 2, 5 e 5 UFC/mL, nos tempos de 1, 3 e 8 horas, e para clorexidina livre apresentaram 2, 5 e 1 UFC/mL nos tempos 1, 3 e 8 horas. Houve ausência de crescimento em ambos os corpos de prova com 24 horas para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre.

Tabela 20 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.

Tempo de análise/ Biofilme	Klebsiella pneumoniae - UFC/mL											
	1h			3h			8h			24h		
	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M
INOX	32.10 ⁶	24.10 ⁶	49.10 ⁶	2.10 ⁶	0	45.10 ⁶	0	1.10 ⁶	Inc	0	0	Inc
TUBO	2.10 ⁶	2.10 ⁶	6.10 ⁶	5.10 ⁶	5.10 ⁶	27.10 ⁶	5.10 ⁶	1.10 ⁶	53.10 ⁶	0	0	27.10 ⁶

MP (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M (Maltodextrina na concentração a 0,12%), UFC (Unidades formadoras de colônias) e Inc(Número incontável de colônias). Fonte: Autora.

➤ *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae são bactérias Gram positivas capsuladas, imóveis, não formadoras de esporos e anaeróbios facultativos. Possui uma cápsula polissacarídica que representa um dos mais importantes fatores de virulência pneumocócica. *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno respiratório que coloniza

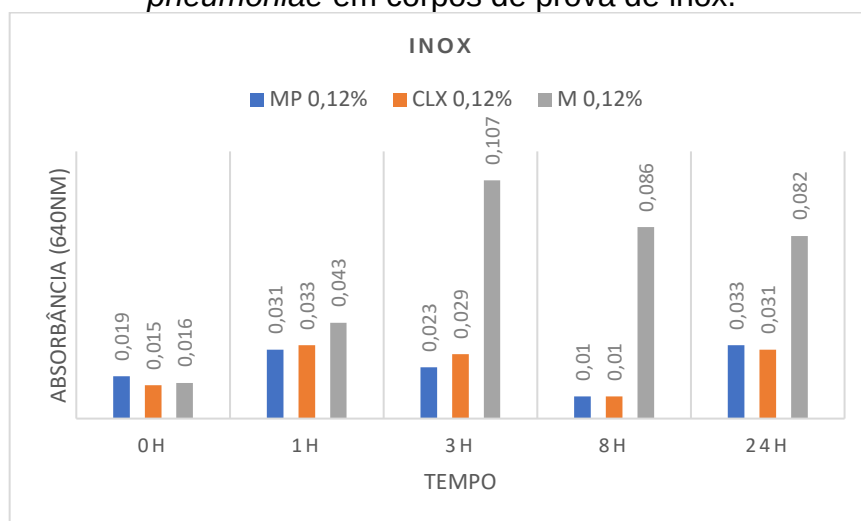
assintomaticamente a nasofaringe de humanos, e está associado a infecções bacterianas invasivas, incluindo bacteremia, pneumonia e meningites, sendo também o agente mais freqüente em infecções não invasivas como otite média aguda e sinusite (OLIVEIRA, 2007).

A formação de biofilme de *Streptococcus pneumoniae* apresentou valores mais baixos de absorbância em relação às outras cepas estudadas. Nos corpos de prova de inox foram registrados valores de absorbância de 0,019, 0,015 e 0,016, enquanto nos corpos de prova do tubo endotraqueal foram registrados os valores de 0,011, 0,012 e 0,015. A justificativa pode estar relacionada às características do *Streptococcus pneumoniae* de ser Gram positivo e anaeróbio facultativo, cujo crescimento *in vitro* é mais limitado.

Na cinética celular dos corpos de prova de inox foi observado um perfil equivalente do valor de absorbância das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre em todos os tempos de análise, com valores para as micropartículas com clorexidina de 0,031, 0,023, 0,010 e 0,033, e para a clorexidina livre de 0,033, 0,029, 0,010 e 0,031. E a maltodextrina mostrou valores de absorbância altos a partir de 3 horas de análise (Figura 53).

No tempo de 1 hora houve um crescimento da absorbância em todas as análises, demonstrando que não houve uma atividade antibacteriana das micropartículas com a clorexidina e com a clorexidina livre nesta fase. A atividade foi vista com 3 e 8 horas, e em 24 horas o biofilme voltou a crescer, podendo representar resistência à clorexidina nesse período.

Figura 53 - Análise por absorvância da cinética celular do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* em corpos de prova de inox.



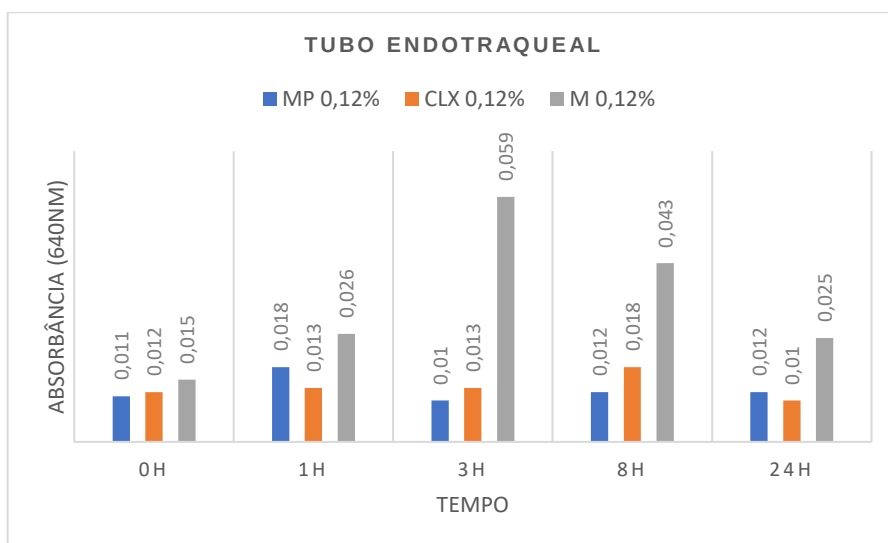
MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Na cinética celular do biofilme sobre tubo endotraqueal um perfil semelhante do valor de absorvância das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre foi também observada em todos os tempos de análise. Sendo observado nos tempos de 1, 3, 8 e 24 horas para as micropartículas com clorexidina os valores respectivos de 0,018, 0,010, 0,012 e 0,012, e para a clorexidina livre os valores de 0,012, 0,013, 0,018 e 0,010. Enquanto a maltodextrina apresentou valores altos de absorvância durante os períodos de análise, com um maior aumento no tempo de 3 horas (Figura 54).

O mesmo comportamento de crescimento da absorvância em inox foi observado com o corpo de prova do tubo endotraqueal, sendo a atividade das micropartículas com clorexidina e clorexidina livre melhor observada a partir de 3 horas de análise.

Figura 54 - Análise por absorvância da cinética celular do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* em corpos de prova de tubo endotraqueal.

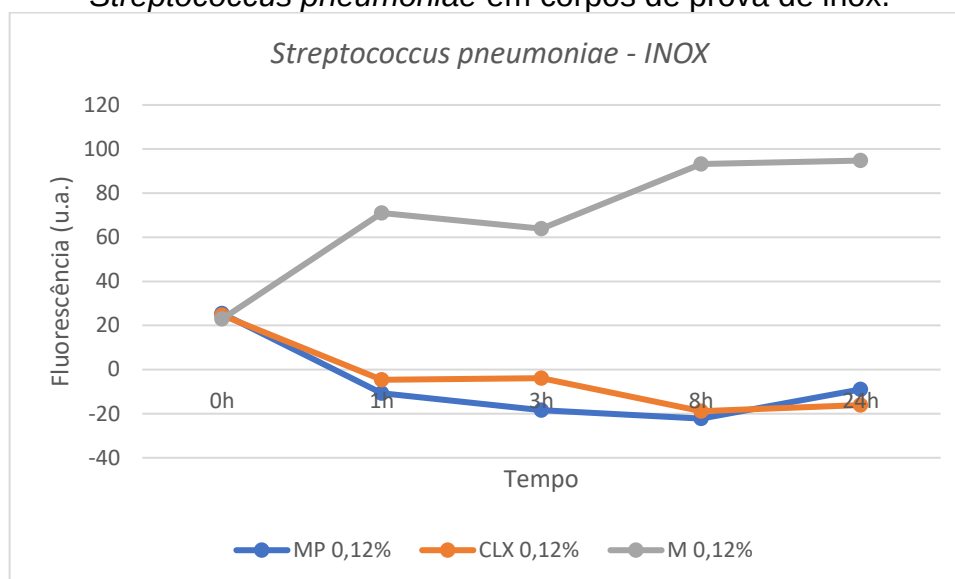


MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

As Figuras 55 e 56 representam o perfil de cinética de viabilidade celular dos biofilmes de *Streptococcus pneumoniae* da análise por fluorescência, onde observado que para ambos os corpos de prova, a cinética de viabilidade celular seguiu o mesmo perfil para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre. A análise por fluorescência mostrou um perfil discretamente melhor para as micropartículas com clorexidina com os corpos de prova de inox nos tempos de análise de 1 e 3 horas. Para a maltodextrina o perfil observado também foi oposto e crescente em relação as micropartículas e à clorexidina livre.

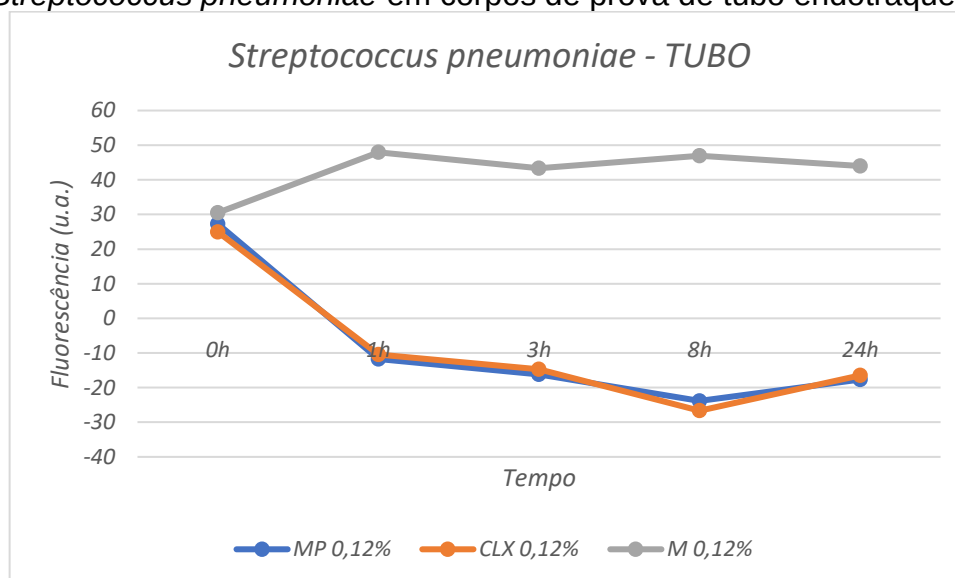
Figura 55 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* em corpos de prova de inox.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

Figura 56 - Análise por fluorescência da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* em corpos de prova de tubo endotraqueal.



MP 0,12% (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX 0,12% (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M 0,12% (Maltodextrina na concentração a 0,12%).

Fonte: Autora.

A Tabela 21 a seguir representa a contagem de unidades formadoras de colônias para os biofilmes de *Streptococcus pneumoiae*, onde uma quantidade

incontável de colônias só foi observada com a maltodextrina com os corpos de prova de inox nos tempos de análise de 3, 8 e 24 horas.

A contagem de unidades formadoras de colônias foi equivalente entre as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre em todos os tempos de análise. Para os corpos de prova de inox as quantidades de colônias apresentadas para as micropartículas foram 7 e 2 UFC/mL para 1 e 3 horas respectivamente, e ausência de crescimento em tempo 8 horas, e para a clorexidina livre 3, 4 e 4 UFC/mLs para 1, 3 e 8 horas. No tubo endotraqueal as micropartículas com clorexidina apresentaram crescimento de 5 UFC/mL apenas no tempo de 1 hora, e para clorexidina livre apresentaram crescimento de 4 UFC/mL apenas no tempo de 1 hora. Houve ausência de crescimento de colônias em ambos os corpos de prova com 24 horas para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre.

Tabela 21 - Análise por contagem bacteriana da cinética de viabilidade celular do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* em corpos de prova de inox e de tubo endotraqueal.

Tempo de análise/ Biofilme	1h			3h			8h			24h		
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> - UFC/mL											
	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M	MP	CLX	M
INOX	7.10 ⁶	3.10 ⁶	7.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	Inc	0	4.10 ⁶	Inc	0	0	Inc
TUBO	5.10 ⁶	4.10 ⁶	7.10 ⁶	0	0	27.10 ⁶	0	0	25.10 ⁶	0	0	9.10 ⁶

MP (Micropartículas com clorexidina na concentração a 0,12%), CLX (Clorexidina na concentração a 0,12%), e M (Maltodextrina na concentração a 0,12%), UFC (Unidades formadoras de colônias) e Inc (Número incontável de colônias). Fonte: Autora.

Biofilme representa comunidades de microrganismos ligados à uma superfície, organizados em uma estrutura tridimensional e incluídos em uma matriz de material extracelular, denominada de exopolissacarídeos, que é derivada do metabolismo das células e do meio ambiente. Os microrganismos crescendo como biofilme apresentam propriedades únicas que diferem das células bacterianas que crescem na forma planctônica, dentre estas destaca-se a resistência a antimicrobianos. Quanto à resistência a antimicrobianos, os biofilmes podem chegar a ser mil vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos que a mesma quantidade de células crescendo em um meio de cultura líquido ou planctônico, tendo a estrutura do biofilme uma

importante participação sobre este aspecto. Em adição, o meio ambiente de crescimento dentro do biofilme, com limitação de nutrientes e alterações do pH, pode diferir significativamente de uma cultura planctônica, de forma que sob estas condições podem ocorrer alterações nos genes e fenótipo do microrganismo que alteram as suas propriedades, mudando de forma indireta o crescimento do biofilme e a resposta à antimicrobianos (MARSH, MARTIN, 2005).

Devido às características e à natureza heterogênea do biofilme, acredita-se que existam múltiplos mecanismos envolvidos na resistência à antimicrobianos. Dentre os quais, a capacidade de alteração do ritmo de crescimento bacteriano, a estrutura química ou física dos exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias que dificulta a ação dos antimicrobianos sobre as comunidades, e ainda as bactérias cultivadas em biofilme desenvolvem um fenótipo que passam a apresentar características de resistência aos antimicrobianos (MAH, O'TOOLE, 2001).

Através de um mecanismo de comunicação presente em biofilmes, denominado de “quorum sensing”, ocorre uma rápida adaptação a alterações ambientais. Há também outra vantagem evolutiva das bactérias presentes no biofilme de distinguirem a densidade populacional da mesma espécie dentro de um biofilme, que muitas vezes é composto por mais de um tipo de microrganismo, e esta capacidade de detecção, através da concentração de produtos metabólicos segregados permite aos microrganismos gerir o seu metabolismo de forma a utilizar os recursos disponíveis mais eficientemente e também responder mais eficazmente a desafios, como a agentes antimicrobianos (HENRIQUES et al., 2013).

Neste contexto, o presente estudo optou pela metodologia de avaliação sobre o biofilme estático maduro, sendo objeto de análise a atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina sobre as cepas já organizadas na forma de biofilme. O estudo desenvolveu os testes com a análise da cinética de viabilidade celular com as bactérias em biofilme uniespécie, o que permitiu avaliar independentemente a sensibilidade à micropartícula com clorexidina e aos controles em cada espécie bacteriana estudada.

A análise da atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina em biofilme teve por base a concentração da clorexidina do padrão comercial a 0,12%,

onde 1,2 mg de clorexidina está presente em 50 mg do microparticulado, de acordo com a validação do processo de preparo das micropartículas de maltodextrina e clorexidina. A relação da massa do microparticulado a 0,12% preparado para os experimentos de biofilme em relação à concentração inibitória mínima das cepas está relacionada na Tabela 22 abaixo:

Tabela 22 - Relação da concentração de clorexidina nas micropartículas a 0,12% com a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cada cepa estudada nos experimentos de biofilme.

Cepas	MIC		Concentração CLX 0,12%	
	CLX (µg/mL)	MP (mg/mL)	MP 0,12% (mg/mL)	x MIC
<i>S. aureus</i>	9,35	0,38	50	131,6
<i>P. aeruginosa</i>	28,32	1,18	50	42,4
<i>K. pneumoniae</i>	28,32	1,18	50	42,4
<i>S. pneumoniae</i>	11,43	0,47	50	106,4

*x MIC (Número de vezes MIC)

CLX (Quantidade de clorexidina para concentração inibitória mínima), MP (Quantidade de micropartículas para concentração inibitória mínima), MP 0,12% (Quantidade de micropartículas para concentração a 0,12%). Fonte: Autora.

Considerando a resistência aumentada de biofilme a agentes antimicrobianos, foi planejado a concentração da clorexidina de 1,2 mg/mL para o teste com as micropartículas e os controles, visto que nos resultados da análise bactericida em saliva e solução salina realizado nesta pesquisa com esta concentração foi possível a morte de todas as cepas planctônicas (tópico 8.3.1.3). A relação da concentração usada como teste apresentou valores de 131,6 vezes a concentração inibitória mínima para *Staphylococcus aureus*, 106,4 vezes para o *Streptococcus pneumoniae*, e 42,4 vezes para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Como já apresentado, essa grande discrepância na concentração da clorexidina nas micropartículas entre a concentração inibitória mínima das cepas e a concentração usada nos experimentos de biofilme se refere a diferenças entre o crescimento bacteriano planctônico e em comunidade de biofilme. Ressaltando que a sensibilidade das células bacterianas aos agentes antimicrobianos é muito maior nas células cultivadas livres, ou planctônica, como é o caso do crescimento para a análise da concentração inibitória mínima, assim, fez-se necessário para a análise de biofilme uma concentração maior.

Ademais, a concentração a 1,2 mg/mL ou 0,12% se refere a concentração do padrão comercial usado como solução oral para o controle de crescimento microbiano na cavidade oral. A clorexidina em solução a 0,12% representa a forma farmacêutica mais utilizada com as indicações de prevenção da formação do biofilme dentário, e também como tratamento e prevenção de patologias orais, tendo efetividade e menores efeitos adversos quando comparada a concentrações mais altas (HORTENSE et al., 2010). Sendo ainda a clorexidina a 0,12% a mesma adotada nos protocolos para pacientes internos em UTIs para o controle de crescimento da microbiota da orofaringe, auxiliando na redução bacteriana na cavidade oral por bactérias patógeno respiratórias (AMES et al., 2011; RICHARDS, 2013; AMIB, 2014; HUA et al., 2016).

No aspecto do objetivo do presente estudo de avaliação da atividade das micropartículas com clorexidina sobre bactérias patógeno respiratórias da orofaringe, convém ressaltar que estas se desenvolvem em biofilmes da cavidade bucal de pacientes internos em UTIs. Em especial, em pacientes sob ventilação mecânica, com o uso do tubo endotraqueal, sob risco de desenvolvimento de pneumonia nosocomial pela colonização da cavidade bucal por essas bactérias (MUNRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; BARBOSA et al., 2010; SANDS et al., 2017).

Quanto à natureza dos corpos de provas utilizados para a formação dos biofilmes, considerando que os locais que permitem o crescimento bacteriano na cavidade oral são superfícies que não sofrem descamação celular, foi selecionado o inox que tem uma superfície lisa e polida, o qual representa locais de crescimento de biofilme como dentes, restaurações, próteses e aparelho ortodôntico. Segundo Boari et al. (2009), o inox ou aço inoxidável corresponde a uma liga composta por ferro e cromo, e a partir de um processo denominado de passivação, o cromo que tem afinidade por oxigênio interagem e formam uma camada de óxido de cromo, a qual permite resistência à corrosão e determina hidrofobicidade à superfície do inox. A hidrofobicidade da superfície do inox permite a adesão inicial principalmente por células bactérias hidrofóbicas como as Gram negativas, as quais apresentam vantagens competitivas sobre as Gram positivas no que diz respeito à adesão inicial para a formação do biofilme.

Em relação aos corpos de prova preparados de tubo endotraqueal, buscou-se simular a condição de crescimento de biofilme sobre a superfície de polietileno de baixa densidade com superfície ultrapolida, sendo a mesma utilizada como dispositivo médico para intubação de pacientes internos em UTI. O tubo endotraqueal permite ser colonizado por espécies bacterianas encontradas na cavidade oral, neste contexto Marino et al. (2017) avaliaram a composição bacteriana encontrada no biofilme formado sobre o tubo endotraqueal, e compararam com o biofilme formado na superfície do dente, e secreção de lavagem bronquial. As análises através do DNA das bactérias revelaram que não houve diferença significativa entre as espécies colonizadoras dos biofilmes entre os três sítios.

Existem diversos modelos de preparo de biofilme para análise microbiológica *in vitro*. O modelo de biofilme adotado para este estudo foi o biofilme estático uniespécie que utilizou dois tipos diferentes de corpos de prova submersos em meio de cultura BHI, com superfície de inox e de polietileno de baixa densidade, para simular as condições do objetivo do estudo com o crescimento em placas de cultura de 24 poços para o crescimento das espécies bacterianas. De forma semelhante, Guerreiro-Tonomaru et al. (2013), realizaram análise microbiológica a partir do crescimento de biofilme de *E. faecalis* utilizando diferentes corpos de prova, de acordo com o objetivo da análise, em placas de cultura de 24 poços com 1,8 mL de meio BHI e 0,2 mL de inóculo com as amostras mantidas submersas durante o período de incubação, com análise por viabilidade celular por fluorescência.

A análise da atividade antimicrobiana em biofilme das micropartículas com clorexidina e seus controles foi realizado por três metodologias diferentes no presente estudo: absorvância, fluorescência e contagem bacteriana. Com isso, cada metodologia avaliou um aspecto diferente de crescimento bacteriano, cujos resultados se complementaram no entendimento da atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina em relação aos seus controles sobre biofilme.

A utilização de leitura por espectrofotometria no ultravioleta visível permite a análise espectrofotométrica quantitativa por absorção que tem como princípio a relação direta existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Para a leitura em microbiologia a

relação é entre a quantidade de luz absorvida e a concentração de células microbianas.

Assim, a análise por absorbância das soluções de leitura da cinética de viabilidade celular após exposição aos meios das micropartículas com clorexidina, clorexidina livre e maltodextrina avaliou a presença de células bacterianas detectadas por espectrofotometria. A absorbância medida avaliou apenas a quantidade de colônias bacterianas no meio, não gerando informações quanto a presença de bactérias vivas ou mortas. Foi observado um perfil semelhante na cinética celular das micropartículas com clorexidina em relação à clorexidina livre em ambos os corpos de prova, mesmo com variações isoladas, para todas as cepas estudadas. Esses resultados demonstram a atividade antimicrobiana da clorexidina microparticulada em relação ao seu controle positivo. Enquanto o crescente aumento da absorbância na cinética celular para a maltodextrina confirmou a ausência de atividade antimicrobiana.

A técnica de análise por fluorescência permite determinar a presença de bactérias vivas e mortas, apresentando uma razão de bactérias vivas sobre bactérias mortas, a partir da exposição das amostras testadas em um meio líquido na presença de dois corantes, o SYTO 9 e o iodeto de propídio, que identificam a viabilidade de populações bacterianas em função da integridade da membrana celular. O corante verde SYTO 9 cora as bactérias de uma população com membranas intactas, enquanto o corante vermelho iodeto de propídio penetra nas bactérias com membranas danificadas.

O presente estudo realizou a análise do protocolo de fluorescência para viabilidade bacteriana através do método leitura de intensidade de fluorescência. Sob esta análise os perfis de cinética decrescente para as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre foram semelhantes, com razões maiores das bactérias mortas sobre vivas, confirmando a atividade antimicrobiana. Em oposição a maltodextrina teve um perfil oposto crescente, demonstrando uma proporção maior de bactérias vivas sobre mortas.

Nestuschil et al. (2014) discutiram o entendimento da viabilidade de crescimento bacteriano com a definição de células bacterianas vivas e mortas, uma

vez que a integridade da membrana da célula bacteriana dada pela coloração do método de fluorescência é entendida como vital, porém não significa que a mesma esteja viável para o crescimento. Segundo os autores, os resultados do kit de viabilidade dependem da concentração das áreas pigmentadas e da sua relação com o número de bactérias no teste, e ainda destacam que o sistema de coloração não é adequado para biofilmes multiespécies.

O método da contagem de unidades formadoras de colônias em microbiologia permite avaliar os microrganismos que foram capazes de se reproduzirem e formar colônias em um determinado meio de cultura (OSWOSKY; GAMBA, 2000). Assim, a análise por contagem bacteriana realizado neste estudo permitiu ratificar a viabilidade de crescimento bacteriano em função dos tempos de avaliação, uma vez que as soluções de leitura do biofilme foram preparadas em sucessivas diluições para cultivo em placas de Petri com meio de cultura e levadas para incubação. A viabilidade celular foi dada pelo crescimento bacteriano, ou não, pela ação das soluções teste e controles sobre o biofilme maduro nos mesmos tempos de análise da cinética que os métodos de análise por absorvância e fluorescência, sendo medida por unidades formadoras de colônias de cada uma das cepas estudadas.

Para todas as cepas as unidades formadoras de colônias foram no valor de 10^6 , buscando padronizar as análises, e assim, os resultados mais uma vez ratificaram o comportamento antimicrobiano semelhante entre as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre. Contudo, sob esta análise de contagem bacteriana vale destacar que os melhores resultados das micropartículas com clorexidina foram observados a partir da análise de 3 horas, assim como também observados nos resultados de absorvância, sendo este aspecto justificado pelo tempo de liberação da clorexidina das micropartículas com maltodextrina como excipiente em sistema de liberação lenta como proposto nesta pesquisa. Enquanto a clorexidina livre apresentou atividade a partir de 1 hora, representando a ação imediata da atividade antimicrobiana.

Este aspecto remete à solubilidade em água da maltodextrina, também apresentado por Pereira et al. (2018) que relacionou a solubilidade em água da maltodextrina com a eficiência como agente encapsulante. Neste estudo de biofilme, as micropartículas com clorexidina foram preparadas para os testes em solução, de

forma que a maltodextrina das micropartículas foi sendo dissolvida e permitiu a liberação da clorexidina para desempenhar o seu efeito antimicrobiano. Nos testes de liberação da clorexidina em solução aquosa a maltodextrina foi solubilizada ocorrendo a liberação da clorexidina em um período de 2 horas, conforme apresentado no capítulo III, tópico 6.2.4 deste trabalho.

Este resultado é importante para o objetivo de aplicação desta pesquisa em pacientes intubados em UTI, visto que a utilização de sistemas de liberação lenta da clorexidina pode representar um benefício adicional no controle de infecções pelo risco de contaminação bacteriana e formação de biofilmes na cavidade oral que possam servir como reservatório para patógenos respiratórios, quando o tempo de ação da solução de clorexidina ultrapassa 12 horas. No âmbito das micropartículas de maltodextrina e clorexidina avaliadas neste trabalho, a liberação lenta por mais 2 horas de liberação da clorexidina pode representar um ganho adicional do controle de crescimento bacteriano, como apresentado na contagem bacteriana sobre biofilme tendo um resultado melhor com as micropartículas com clorexidina a partir de 3 horas, caracterizando a liberação lenta.

A atividade da clorexidina como agente antimicrobiano já é conhecida quanto à sua eficácia e segurança de emprego (ZANATTA, RÖSING, 2007). O mecanismo da clorexidina contra biofilmes ocorre pela interferência na formação do biofilme pela alteração na adesão bacteriana que dificulta o processo inicial de formação do biofilme dentário, e também atua sobre o biofilme maduro pela alteração da parede celular das bactérias gerando a morte bacteriana (SNYDERS, KHONDOWE, 2011).

Frente as cepas estudadas, a clorexidina tem sido utilizada em protocolos clínicos de higiene oral de pacientes internos em UTI para o controle de crescimento de bactérias patógeno respiratórias, com isso busca-se reduzir o risco de desenvolvimento de pneumonia em pacientes intubados (BERALDO, ANDRADE, 2008; AMIB, 2014; AMES et al., 2011; HUA et al., 2016). Neste contexto, os resultados do presente estudo confirmam a efetividade da clorexidina livre, e também da clorexidina microparticulada sobre os biofilmes maduros das cepas estudadas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*.

A resposta da efetividade da micropartícula com clorexidina considerando o excipiente maltodextrina corrobora com Edgren et al. (1991) que patentearam uma micropartícula de maltodextrina envolvendo um medicamento que foi sendo liberado e manteve a sua integridade química e atividade terapêutica. Neste estudo a atividade da clorexidina frente aos biofilmes analisados se manteve após a sua liberação das micropartículas com maltodextrina, com desempenho antimicrobiano semelhante à clorexidina livre. Vale destacar também os achados de Parikh (2014) de que a maltodextrina fornece mais estabilidade ao fármaco, com solubilidade em água e sem atividade farmacológica. Estes aspectos também foram observados neste estudo em que a estabilidade ao fármaco foi vista com a atividade das micropartículas com clorexidina nos experimentos de biofilme realizado após 18 meses do preparo das micropartículas, sendo a eficiência terapêutica da clorexidina mantida neste período, e corrobora com a análise química por espectrofotometria de estabilidade das micropartículas durante 24 meses como descrito no capítulo III deste trabalho de tese.

A ausência de atividade farmacológica da maltodextrina no biofilme pôde ser confirmada, assim como nos outros testes microbiológicos *in vitro* com células planctônicas deste trabalho. Visto que nas soluções preparadas com maltodextrina os biofilmes continuaram em crescimento em todas as cepas testadas.

8.4 Conclusões

Diante dos resultados obtidos com os testes microbiológicos das micropartículas com clorexidina podemos concluir que:

- As micropartículas com clorexidina apresentaram valores baixos da Concentração Inibitória Mínima para todas as cepas testadas em diferentes concentrações, demonstrando atividade antimicrobiana pela susceptibilidade dos microrganismos;
- Para a Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima os resultados foram satisfatórios, sendo encontrados valores igual ou maior que a encontrada na Concentração Inibitória Mínima como esperado;

- Na análise bactericida e fungicida em saliva as micropartículas com clorexidina apresentaram resultados semelhantes aos observados com a clorexidina livre, demonstrando que a clorexidina é liberada das micropartículas e mantém as propriedades antimicrobianas, mesmo na presença de saliva;
- Na análise bactericida e fungicida em saliva ocorreu crescimento bacteriano com as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre a 0,06% para algumas cepas, com isso a concentração a 0,12% foi adotada para os demais testes microbiológicos e preparo da forma farmacêutica;
- Com as análises em biofilme maduro de todas as cepas estudadas, a atividade antimicrobiana foi semelhante entre as micropartículas com clorexidina e a clorexidina livre para todos os tempos de análise, em ambos os corpos de prova utilizados;
- Nas análises de absorbância e contagem bacteriana sobre biofilme foi observado que os melhores resultados das micropartículas ocorreram a partir de 3 horas, esse efeito pode estar relacionado com a liberação lenta da clorexidina das micropartículas;
- Diante da atividade antimicrobiana semelhante entre as micropartículas de maltodextrina com clorexidina e a clorexidina livre sobre os estudos microbiológicos realizados, podemos considerar a efetividade dessas micropartículas como produto intermediário para preparo de formas farmacêuticas para controle de crescimento de microrganismos.

CAPÍTULO VI

9. ESTUDOS DA POMADA ORABASE COM MICROPARTÍCULAS COM CLOREXIDINA

9.1 Preparo de pomada orabase com micropartículas com clorexidina

- **Materiais e métodos**

Foi preparada uma forma farmacêutica de pomada orabase para uso na cavidade oral com micropartículas com clorexidina na concentração 0,12%, a partir da incorporação de micropartículas de maltodextrina e clorexidina (MP:CLX:MT) para testes de eficácia antimicrobiana *in vitro* como proposta deste trabalho.

A fórmula farmacêutica da pomada orabase foi preparada com os componentes vaselina sólida como base; vaselina líquida ou óleo mineral para mistura dos componentes sólidos em base oleosa, agindo como agente de levigação para conseguir uma dispersão lisa e poder ser incorporada à base sólida; a carboximetilcelulose (CMC) como espessante para melhorar a consistência da pomada, o propilparabeno como preservante da forma farmacêutica evitando a contaminação da base farmacêutica por bactérias ou fungos; e o aminometil propanol (AMP), como agente de neutralização do pH, e a esta base da pomada orabase foi acrescentado as micropartículas com clorexidina.

A pomada orabase com incorporação de micropartículas com clorexidina e clorexidina livre trata-se de uma inovação tecnológica. Diante disso, as concentrações e volumes de todos os componentes utilizados no preparo das pomadas orabase foram registradas no INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, como patente de invenção, BRITO et al. (2018) sob o título “Pomada orabase com clorexidina antisséptico”, com o número de processo BR 10 2018 07733 0, registrada em 27/12/2018 (Anexo B).

Para o preparo da fórmula farmacêutica da pomada orabase com as micropartículas com clorexidina foi considerado o cálculo do padrão do microparticulado, para atingir a concentração de 0,12% com 1,2 mg/g de clorexidina,

representando 50 mg do microparticulado para cada grama da pomada, tendo o peso de acordo com a correção de massa definida a partir do doseamento.

Para os testes, também foram preparadas mais três fórmulas farmacêuticas também em pomada orabase como controle positivo e controles negativos. Para o controle positivo a pomada foi preparada incorporado o digluconato de clorexidina livre a 0,12% ou 1,2 mg/g, e para os controles negativos foi preparada uma pomada orabase com incorporação de maltodextrina no mesmo peso em miligrama (mg) adotado para o microparticulado, e outra apenas com a fórmula farmacêutica padrão da orabase em proporções corrigidas.

As pomadas orabase foram preparadas pela Farmácia de Manipulação Phormula&art, no endereço Av. Tabajaras, n. 1119 - Centro, João Pessoa - PB, CEP 58013-270, pela farmacêutica Risoneide Viana da Silva com registro no CRF-PB 2945. Após o preparo, as pomadas foram armazenadas em bisnagas de plástico branco opaco para a proteção da luminosidade, e mantidas em temperatura ambiente para a realização dos experimentos.

- **Resultados e discussão**

As pomadas orabase teste e controle foram preparadas com sucesso, obtendo uma coloração branco translúcido, consistência pastosa, com superfície brilhosa e com odor característico da base vaselina (Figura 57).

Figura 57 - Pomadas orabase preparadas para os testes microbiológicos *in vitro*.



Fonte: Autora.

A pomada é uma forma farmacêutica semi-sólida, para aplicação na pele ou em membranas mucosas, que consiste na solução ou dispersão de um ou mais princípios ativos em baixas proporções em uma base adequada usualmente não aquosa (Farmacopéia Brasileira, 2010). De acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos, as bases de preparação das pomadas podem ser bases hidrofóbicas, bases de absorção, bases removíveis por água e bases hidrossolúveis (ALLEN Jr, 2013).

O nosso objetivo foi preparar uma forma farmacêutica semi-sólida de pomada para uso na cavidade oral com aplicação sobre a mucosa bucal que pudesse liberar lentamente os seus componentes após a sua aplicação, e consequente liberação das micropartículas para o meio bucal. Diante do exposto, a base escolhida para o preparo da forma farmacêutica da pomada com micropartículas com clorexidina foi a base hidrofóbica com vaselina sólida branca. Allen Jr. (2013) discorre sobre as bases hidrofóbicas, também denominadas de bases de hidrocarbonetos, que quando aplicadas produzem um efeito emoliente, protegem contra a perda de umidade e agem como agentes oclusivos.

A forma farmacêutica mais comum de apresentação da clorexidina é a solução oral para bochecho, que após a sua administração ocorre a ação do fluxo salivar e do clearance salivar, diminuindo a sua concentração em um curto período de tempo (SNYDERS, KHONDOWE, 2011).

Com os resultados do presente trabalho de cinética de liberação da micropartícula de clorexidina e maltodextrina em que houve a liberação da clorexidina em aproximadamente 2 horas, sendo assim observado uma liberação controlada tardia da clorexidina a partir do microparticulado. Tendo em vista que o excipiente utilizado no preparo das micropartículas foi a maltodextrina, que tem por característica ser hidrossolúvel, e a necessidade de manter a característica de liberação lenta da clorexidina, optou-se por uma forma farmacêutica semi-sólida de pomada orabase permitindo a dissolução de seus componentes, seguido da liberação lenta e gradativa da clorexidina das micropartículas após aplicação na mucosa bucal, o que poderá ser analisado em estudos futuros *in vitro* e *in vivo*.

Kluk et al. (2016) destacam que além da superfície do dente, a molécula de clorexidina também possui propriedade de retentividade à gengiva e à mucosa bucal

por afinidade à membrana celular das células epiteliais das mucosas, com isso há uma conservação do seu efeito, retardando o seu tempo de ação em relação ao fluxo salivar. Segundo Boyce e Pittet (2002), o N-clorinato derivado da clorexidina se liga covalentemente a proteínas da pele e da mucosa, resultando em um efeito antimicrobiano persistente com absorção sistêmica limitada, mesmo após uma ingestão oral. Diante do exposto, a propriedade da clorexidina de se ligar à mucosa bucal, o qual retarda a sua liberação, associada ao tempo de liberação mais lenta dada pelas micropartículas no sistema de liberação controlada, e ainda a liberação gradativa destas pela pomada orabase apresenta-se como característica favorável quando se pretende a ação da clorexidina durante um período maior de tempo na cavidade oral.

Como proposto neste trabalho, uma outra indicação para a apresentação farmacêutica de pomada orabase foi com o objetivo liberar a clorexidina das micropartículas a partir da pomada aplicada na mucosa jugal, sendo a mucosa que reveste as paredes laterais da cavidade oral, mantendo a clorexidina na boca sem o efeito difuso do bochecho, o qual se precipita sobre mucosas, língua e dentes. A partir do objetivo de pesquisas futuras, pode ser que seja observado a diminuição dos efeitos adversos da clorexidina com a forma farmacêutica de pomada orabase em relação à forma de solução oral para bochechos, e ainda se mantenha a atividade antimicrobiana por um maior tempo na cavidade oral.

Ademais as pomadas orabase apresentam fácil aplicação, e tem efeito emoliente que reduz o desconforto em lesões bucais. Isso vem a ser uma característica favorável tendo em vista que o objetivo inicial de indicação proposto neste estudo é para pacientes internos em UTI que dependem da aplicação a ser realizada por um enfermeiro ou cirurgião-dentista, e apresentam lesões bucais como um quadro clínico frequente.

9.2 Avaliações microbiológicas das pomadas orabase *in vitro*

As cepas de bactérias e fungo utilizadas nesta etapa da pesquisa foram as mesmas dos estudos microbiológicos das micropartículas com clorexidina de

bactérias da orofaringe *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com período de crescimento de 24 horas em condições respiratórias de aerofilia, *Streptococcus pneumoniae* com crescimento de 48 horas sob condições facultativas de oxigênio, e o fungo *Candida albicans* com crescimento de 48 horas em condições respiratórias de aerofilia.

Assim como os experimentos dos estudos microbiológicos das micropartículas com clorexidina, os experimentos desta etapa foram realizados com as mesmas condições de trabalho, preparo e padronização dos inóculos descritos no Capítulo V, tópico 8.2.

9.2.1 Análise por difusão em ágar

- **Materiais e métodos**

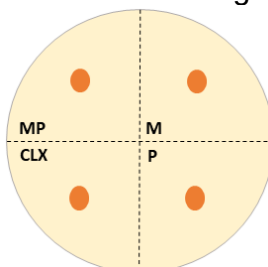
Este experimento teve o objetivo de analisar a atividade sobre bactérias e fungo da pomada orabase preparada com micropartículas de clorexidina a 0,12%. A técnica utilizada foi a análise por difusão em ágar a partir da medição do halo de inibição do crescimento das bactérias e fungo em placa de Petri cultivadas, comparadas com as pomadas orabase com o controle positivo da clorexidina a 0,12%, e os controles negativos da maltodextrina a 0,12% e a pomada padrão apenas com os excipientes farmacêuticos.

Para o experimento foram preparadas placas de Petri com volume aproximado de 15 mL de meio de cultura BHI ágar para as cepas bacterianas, e placas com Sabouraud ágar para o fungo *Candida albicans*.

As placas de Petri foram cultivadas por imersão, seguindo a mesma técnica para todas as cepas estudadas. O protocolo seguido foi: após os inóculos padronizados, um volume de 1 mL da cepa padronizada foi colocado e distribuído em toda a superfície do meio de cultura da placa e esperado a secagem por aproximadamente 10 minutos; após a secagem, foi realizado o preparo dos nichos em orifícios de 7 mm de diâmetro no ágar, com auxílio da base da ponteira de 200 µL estéril, seguido da inserção das pomadas nos nichos preparados com auxílio de

ponteira de 200 μ L, tendo como referência o limite do nicho preparado no ágar, conforme apresentado na Figura 58.

Figura 58 - Desenho esquemático do preparo da placa Petri marcada para análise por difusão em ágar.

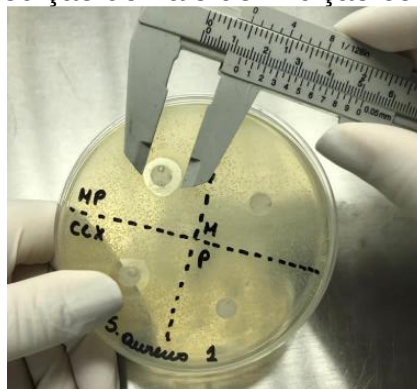


MP (Pomada com micropartículas com clorexidina a 0,12%), M (Pomada com maltodextrina a 0,12%), CLX (Pomada com clorexidina livre a 0,12%) e P (Fórmula padrão da pomada orabase).

Fonte: Autora.

Para cada cepa estudada foram preparadas seis placas. As placas preparadas foram incubadas em estufa a 37°C seguindo o tempo de incubação para cada cepa. Após período de incubação, a avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar com a pomada orabase com micropartículas de clorexidina e maltodextrina a 0,12% foi realizada pela medição do halo de inibição em milímetros (mm) com auxílio de paquímetro, e comparada com os controles positivo da clorexidina livre a 0,12%, e controles negativos da maltodextrina a 0,12% e padrão da pomada orabase (Figura 59). O halo de inibição foi medido no maior diâmetro encontrado em torno do nicho preparado para inserção da pomada orabase, considerando que 7mm representa o diâmetro do nicho.

Figura 59 - Medição do halo de inibição com paquímetro.



Fonte: Autora.

• Resultados e discussão

Os nichos com as pomadas orabase com as micropartículas de clorexidina e maltodextrina a 0,12%, e com a clorexidina livre a 0,12% apresentaram halo de inibição mostrando atividade antimicrobiana, enquanto a pomada orabase com maltodextrina a 0,12% e a pomada orabase padrão não apresentaram atividade por não terem formado halo de inibição em torno do nicho na região do ágar semeada com as cepas nas placas. Os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Medidas do halo de inibição, com média, desvio padrão (DP) e mediana para as cepas estudadas.

Microrganismos										
Amostra	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>C. albicans</i>	
	Halo de inibição (mm)									
	MP 0,12%	CLX 0,12%	MP 0,12%	CLX 0,12%	MP 0,12%	CLX 0,12%	MP 0,12%	CLX 0,12%	MP 0,12%	CLX 0,12%
1	12,2	12	12,7	12,9	13,6	13,5	11,6	11,5	12,2	11,8
2	12,7	12,2	11	11,2	12,7	13	11,7	11,6	12	12,1
3	12,7	12,8	11	12,2	12,3	13,1	11,2	12,2	12,6	11,6
4	12,2	12,6	12,7	12,8	12	13,6	12,1	12,2	12,6	11,6
5	12,6	12,2	12	12,7	12,1	12,3	11,2	12,7	12,2	11,6
6	12,2	13	12,2	12,2	11,5	12,2	12,2	12,7	12,2	11,5
Média	12,43	12,47	11,93	12,33	12,37	12,95	11,67	12,15	12,3	11,7
DP	0,258	0,393	0,774	0,631	0,72	0,589	0,427	0,517	0,245	0,219
Mediana	12.4	12.4	12.1	12.45	12.2	13.05	11.65	12.2	12.2	11.6

MP 0,12% (Pomada com micropartículas com clorexidina 0,12%) e CLX 0,12% (Pomada com clorexidina livre a 0,12%)

Fonte: Autora.

A análise estatística entre as medianas dos halos de inibição (mm) da pomada com micropartículas com clorexidina e da pomada com clorexidina livre foi realizada para cada cepa estudada, com a aplicação do teste não-paramétrico U-Mann-Whitney. Sendo o resultado considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,01$.

Para *Staphylococcus aureus* a mediana do halo de inibição para a pomada com as micropartículas e para a pomada com clorexidina livre foi o mesmo valor de 12,4, com p -valor 1. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou as medianas do halo de inibição para a pomada com micropartículas e clorexidina livre, respectivamente, 12,1 e 12,45, e p -valor 0,2223. *Klebsiella pneumoniae* teve a mediana do halo de inibição para a

pomada com clorexidina 12,2, e 13,05 para a pomada com clorexidina livre, e p -valor 0,1720. Para *Streptococcus pneumoniae* a média do halo de inibição para a pomada com micropartículas foi 11,65, e 12,2 para a pomada com clorexidina livre, com p -valor 0,1445.

Assim, como todos os resultados estatísticos para estas cepas bacterianas apresentaram $p > 0,01$, o resultado do halo de inibição maior da pomada com clorexidina livre em relação a pomada com as micropartículas não foi estatisticamente significativo. Este resultado sugere que a pomada com as micropartículas com clorexidina teve uma atividade antimicrobiana semelhante à pomada com a clorexidina livre para as cepas bacterianas estudadas.

Para o fungo *Candida albicans* o resultado foi de uma atividade antimicrobiana ligeiramente melhor da pomada com as micropartículas com mediana do halo de inibição de 12,2, enquanto para o halo de inibição da pomada com a clorexidina livre foi 11,6, e com p -valor 0,0073. Considerando estatisticamente significativo quando $p < 0,01$, a atividade da pomada com as micropartículas teve uma atividade antifúngica melhor estatisticamente significativa em relação à pomada com a clorexidina livre.

Os agentes antifúngicos atuam como mecanismo de ação sobre a membrana plasmática ou parede celular do fungo, sendo os grupos de antifúngicos mais utilizados a anfotericina B, as drogas azólicas e as equinocandinas. A anfotericina B e a nistatina atuam como fungicida ligando-se ao ergosterol, um esteróide presente na membrana dos fungos, a alteração do ergosterol interfere na permeabilidade da membrana plasmática causando a perda de constituintes citoplasmáticos. As drogas azólicas atuam sobre enzimas dos fungos que bloqueiam a síntese de ergosterol, também interferindo na integridade da membrana plasmática (MARTINEZ, 2006; PIGATTO et al., 2009).

As equinocandinas são outro grupo de fungicidas que têm como alvo a parede celular do fungo, inibindo a enzima ligada à síntese de β -(1,3)-D-glucana, que é um dos principais componentes da parede celular fúngica, resultando em desequilíbrio osmótico que prejudica a viabilidade do microrganismo. As equinocandinas agem *in vitro* sobre diversas leveduras e fungos filamentosos, porém em infecções

experimentais tem uma atividade relevante sobre espécies de *Candida* e de *Aspergillus* (MARTINEZ, 2006; PIGATTO et al., 2009).

Os principais componentes da parede celular dos fungos são a quitina, o β -(1,3)-glucana para as espécies de *Candida*, e o β -(1,6)-glucana para *Aspergillus*, e glicoproteínas. O β -(1,3)-glucana e o β -(1,6)-glucana são polímeros de unidades de glicose unidas por ligações β -(1,3) e β -(1,6) glicosídicas, e constituem os componentes mais abundantes da parede celular dos fungos (FUKUDA et al., 2009)

De acordo com Kumar (2017), o mecanismo de ação da clorexidina para fungos é semelhante ao das bactérias. A molécula da clorexidina é absorvida pelo fungo e prejudica a integridade da sua parede celular e membrana plasmática, resultando no extravazamento do conteúdo celular. Enquanto a maltodextrina, usada como excipiente para o preparo das micropartículas, é um polímero sacarídeo com unidades D-glicose ligadas por cadeias α 1-4, resultante da hidrólise do amido (CANO-HIGUITA et al., 2015). Diante do resultado apresentado neste experimento, há uma suposição de que a maltodextrina, por ser um polissacarídeo de unidades de glicose, pode ter alguma relação com o mecanismo de atividade antifúngica da parede celular dos fungos, e pode estar potencializando o efeito da clorexidina na forma de micropartículas estudadas neste trabalho. Esta suposição deve ser avaliada em estudos futuros com análises em técnicas microbiológicas diferentes.

Nos resultados com *Candida albicans* da solução com as micropartículas com clorexidina a CIM e a CFM foi baixa, apresentando o mesmo valor para ambas de 18,70 μ g/mL de clorexidina e 0,78 mg/mL do microparticulado. E no teste de atividade fungicida com as soluções de clorexidina a 0,06% e 0,12% em saliva e solução salina ocorreu a morte da totalidade dos fungos, conforme apresentado no capítulo V.

Há que se destacar que os testes microbiológicos por difusão em ágar podem apresentar influência de diversos fatores, levando a uma maior probabilidade de erros como composição do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, temperatura e tempo de incubação inadequado, erros na medida do halo de inibição ou taxa de difusão do agente antimicrobiano (ALVES et al., 2008). Neste contexto, o presente teste de fusão em ágar foi realizado em sextuplicata para ter um número maior de amostras para uma melhor análise

estatística. E além disso, os estudos microbiológicos com as pomadas foram complementados com os testes da atividade antimicrobiana das pomadas sobre biofilme uniespécie, como apresentado a seguir.

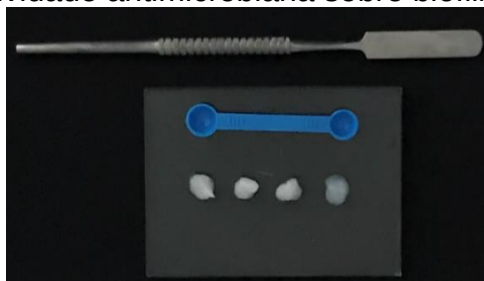
9.2.2 Análise da atividade antimicrobiana sobre biofilme em saliva

- **Materiais e métodos**

Neste experimento buscou-se avaliar a atividade antimicrobiana da pomada orabase preparada com a micropartículas com clorexidina a 0,12% em meio de cultura com saliva e comparar com meio com solução salina, em biofilme uniespécie formado sobre a superfície das pomadas e as paredes dos poços da placa de cultura. Assim, foi possível avaliar a formação de biofilme sobre as pomadas, e o efeito da clorexidina liberada sobre o mesmo, e comparar a atividade com as pomadas orabase preparadas com o controle positivo da clorexidina livre a 0,12%, e os controles negativos da maltodextrina a 0,12% e a pomada orabase padrão, em ambos os meios.

As placas de 24 poços foram preparadas com as pastas orabase distribuídas na parede de fundo de cada poço, em quantidades iguais de aproximadamente 200 mg. O volume das pomadas foi medido com auxílio de dosador de material odontológico (Dentsply®) previamente desinfetado por álcool 70% e espátula odontológica estéril (Figura 60).

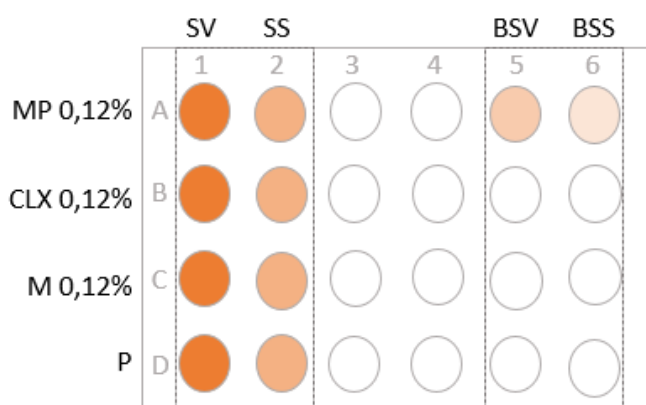
Figura 60 - Medidas das pomadas orabase com dosador e espátula para o teste da atividade antimicrobiana sobre biofilme.



Fonte: Autora.

Foi preparado uma placa para cada cepa, de forma que dois poços foram preparados com a pomada orabase teste com as micropartículas com clorexidina a 0,12%, dois com orabase com a clorexidina livre a 0,12%, dois com orabase com a maltodextrina, e dois com orabase padrão, sendo um de cada poço com meio de cultura mais saliva e outro com meio de cultura mais solução salina. E ainda foram preparados mais dois poços sem a interferência da pomada orabase apenas com meio de cultura com saliva e outro meio de cultura com solução salina, denominados respectivamente de BSV e BSS, para leitura como branco durante a absorbância, conforme pode ser observado na Figura 61.

Figura 61 - Desenho esquemático das placas de cultura para avaliação da atividade antimicrobiana sobre biofilme.



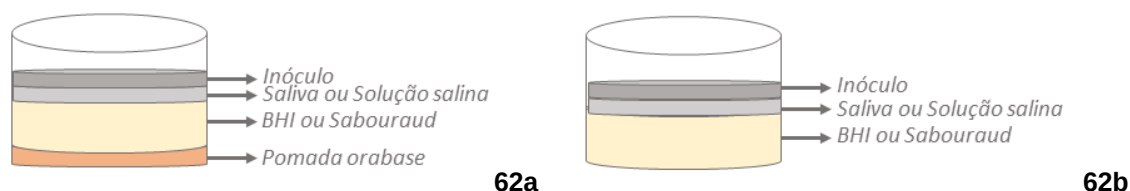
SV (Meio com saliva), SS (Meio com solução salina), MP 0,12% (Pomada com micropartículas com clorexidina a 0,12%), CLX 0,12% (Pomada com clorexidina livre a 0,12%), M 0,12% (Pomada com maltodextrina a 0,12%), P (Pomada padrão), BSV (Branco com saliva) e BSS (Branco com solução salina). Fonte: Autora.

A saliva humana fresca foi coletada da própria pesquisadora após estímulo mastigatório com hiperbolóide por 1 minuto, e coletada em funil e tubo de vidro previamente esterilizados. Posteriormente a saliva foi transferida para um tubo falcon de 15 mL estéril e centrifugada por 10 minutos, sendo o sobrenadante imediatamente utilizado para o experimento.

O volume final de cada poço foi de 2 mL, sendo 1,6 mL de meio de cultura BHI ou Sabouraud, 200 µL de saliva ou solução salina, e 200 µL de inóculo, conforme representado na Figura 62. A solução de cada poço foi homogenizado com aspiração

e eliminação do conteúdo por ponteira estéril, sendo o movimento repetido por três vezes, sem tocar na pasta orabase no fundo de cada poço. Em seguida, foi levado para a estufa para incubação a 37°C por 24 ou 48 horas a depender da cepa estudada.

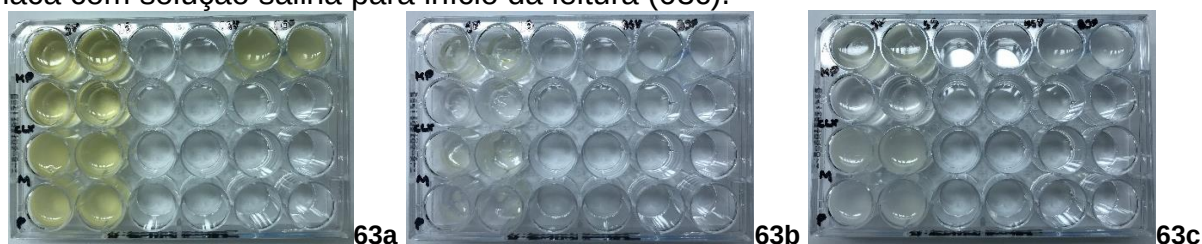
Figura 62 - Desenho esquemático dos poços preparados para o experimento. Poço com pomada orabase (62a) e Poço branco sem pomada orabase (62b).



Fonte: Autora.

Após o período de incubação de 24 ou 48 horas, o conteúdo de todos os poços foi descartado, sendo o objeto de análise o biofilme aderido formado sobre as pomadas orabase e as paredes dos poços. Em seguida foi colocado 2 mL de solução salina em cada poço, e a placa foi levada para uma agitação constante de 1 rpm por 30 minutos em uma mesa agitadora orbital (Tecnal®, TE-141), com isso ocorreu a liberação das bactérias obtendo a solução para leitura 10^0 (Figura 63).

Figura 63 - Preparo da placa com pomada orabase para leitura - Placa após o período de incubação (63a), Placa após destarte das soluções com biofilme aderido (63b), e Placa com solução salina para início da leitura (63c).



Fonte: Autora.

A leitura por absorbância foi realizada removendo-se 100 μ L de cada solução 10^0 , e levado a um poço da placa de 96 poços de fundo chato. A realização da leitura foi por espectrofotometria em aparelho OPTIMA®, sob o programa Optima Data analysis® para absorbância com comprimento de onda de 640 nm.

Para as leituras por contagem bacteriana foi realizada a diluição das soluções, de forma que foi removido 100 µL dos poços de cada solução 10^0 , e imediatamente colocado em um microtubo de 2 mL com 900 µL de solução salina a 0,9%, obtendo-se a concentração de 10^{-1} . O conteúdo do microtubo 10^{-1} foi agitado em vórtex, e em seguida 100 µL da solução foi retirada para as sucessivas diluições com agitação nas concentrações 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

As placas de Petri com ágar BHI ou sabouraud para leitura por contagem bacteriana foram preparadas com as soluções nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , com 10 µL de cada uma das soluções nas diferentes concentrações, a partir da técnica do gotejamento em que uma gota foi colocada e deixada escorrer em local marcado de cada placa. Foi adotado a mesma técnica de preparo das placas da contagem bacteriana em biofilme (Capítulo V, tópico 8.3.2.3). Após o tempo de secagem, as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas, para posteriormente serem lidas quanto a quantidade de unidades formadoras de colônias.

• Resultados e discussão

A medida da absorbância das soluções de leitura permitiu analisar a presença de células de bactérias e fungos por espectrofotometria dentro de um comprimento de onda de 640 nm, com exposição às pomadas preparadas, e sem a exposição às pomadas considerado como branco, sendo todas as análises com saliva e com solução salina, conforme apresentado na Tabela 24.

Tabela 24 - Medidas de absorbância para as cepas estudadas com as pomadas.

Tabela 2.1 – Medidas de absorvância para as cepas estudadas com as pomadas.										
Testes	Microrganismos									
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>C. albicans</i>	
	Absorbância (640 nm)									
	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina
Branco	0,271	0,237	0,278	0,193	0,195	0,138	0,261	0,127	0,059	0,051
MP	0,023	0,029	0,001	0,015	0,004	0,003	0,008	0,033	0	0
CLX	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0,005
M	0,248	0,282	0,230	0,183	0,218	0,208	0,294	0,135	0,087	0,054
P	0,235	0,245	0,209	0,247	0,172	0,184	0,218	0,109	0,052	0,053

MP (Pomada com micropartículas com clorexidina a 0,12%), CLX (Pomada com clorexidina livre a 0,12%), M (Pomada com maltodextrina a 0,12%), P (Pomada padrão), Branco com saliva e Branco com solução salina.

Fonte: Autora.

Os valores de absorvância foram altos para as soluções branco sem pomada para todas as cepas estudadas, confirmando o crescimento destas no experimento. Para os poços preparados com as pomadas com maltodextrina e com a pomada padrão os valores de absorvância também foram altos, demonstrando a ausência de atividade antimicrobiana nessas pomadas.

Na análise da atividade antimicrobiana da pomada com as micropartículas com clorexidina para as cepas bacterianas foram observados valores baixos de absorvância, mostrando atividade antimicrobiana sobre a capacidade de formação de biofilme sobre as pomadas e paredes do poço. Os valores de absorvância em relação às soluções com saliva e solução salina foram próximos, como valores respectivos para *Staphylococcus aureus* 0,023 e 0,029, *Pseudomonas aeruginosa* 0,001 e 0,015, *Klebsiella pneumoniae* 0,004 e 0,003, e *Streptococcus pneumoniae* 0,008 e 0,033, não demonstrando diferenças relevantes na atividade antimicrobiana entre os meios. Enquanto isso, para todas as cepas bacterianas os valores de absorvância com a pomada com clorexidina livre foi zero, demonstrando a ausência de formação de biofilme sobre a pomada e sobre as paredes dos poços, o que sugere uma atividade antibacteriana total.

Para *Candida albicans*, o resultado foi melhor para a pomada com as micropartículas com clorexidina que para a pomada com a clorexidina livre. Foi observado a ausência de formação de biofilme do fungo sobre a pomada com micropartículas com clorexidina e sobre as paredes do poço, tanto em saliva como em solução salina. Enquanto nas pomadas com clorexidina livre foram observados valores de absorvância 0,002 para saliva e 0,005 para solução salina.

A análise por absorvância permitiu avaliar a quantidade de colônias bacterianas da solução 10^0 após o biofilme formado sobre as pomadas e as paredes dos poços, não gerando informações sobre a viabilidade das células para crescimento.

Com a contagem a partir de unidades formadoras de colônias, foi possível avaliar a viabilidade celular para a capacidade de crescimento de UFC/mL em placa após diluição das bactérias e fungo presente nas soluções de leitura, com exposição sob as mesmas condições de testes da análise por absorvância (Tabela 25).

Tabela 25 - Medidas de unidades formadoras de colônias para as cepas estudadas com as pomadas.

Testes		Microrganismos									
		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>C. albicans</i>	
		UFC/mL									
		Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina	Saliva	Solução Salina
Branco	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	
MP	62.10 ⁶	38.10 ⁶	24.10 ⁶	13.10 ⁶	0	3.10 ⁴	4.10 ⁴	8.10 ⁴	4.10 ⁴	3.10 ⁴	
CLX	30.10 ⁶	23.10 ⁶	0	0	0	0	1.10 ⁴	3.10 ⁴	2.10 ⁴	3.10 ⁴	
M	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	
P	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	

MP (Pomada com micropartículas com clorexidina a 0,12%), CLX (Pomada com clorexidina livre a 0,12%), M (Pomada com maltodextrina a 0,12%), P (Pomada padrão), Branco com saliva e Branco com solução salina. *(Inc) Incontável.

Fonte: Autora.

O crescimento das bactérias e fungos no experimento foram confirmadas pelo número incontável de unidades formadoras de colônias para as soluções branco sem pomada para todas as cepas estudadas. Para os poços preparados com as pomadas com maltodextrina e com a pomada padrão os de unidades formadoras de colônias também foram incontáveis, o que representou a ausência de atividade antimicrobiana nessas pomadas.

Na avaliação das unidades formadoras de colônias para *Staphylococcus aureus* foram contadas da pomada com as micropartículas com clorexidina 62.10⁶ no meio com saliva e 38.10⁶ com solução salina, enquanto para a pomada com clorexidina livre foram contadas 30.10⁶ no meio com saliva e 23.10⁶ com solução salina. Para *Pseudomonas aeruginosa* nas pomadas com as micropartículas foram contadas 24.10⁶ no meio com saliva e 13.10⁶ com solução salina, e ausência de colônias com a pomada com clorexidina livre. Para *Klebsiella pneumoniae* só foi observado crescimento bacteriano com a pomada com as micropartículas em solução salina com 3.10⁴ e ausência de crescimento em saliva, e ausência de UFC com a pomada com clorexidina livre nos dois meios. Na contagem para *Streptococcus pneumoniae* foram observadas com a pomada com as micropartículas com clorexidina 4.10⁴ no meio com saliva e 8.10⁴ com solução salina, enquanto para a pomada com clorexidina livre foram contadas 1.10⁴ no meio com saliva e 3.10⁴ com solução salina.

Assim como na avaliação por absorbância não houve diferenças relevantes na atividade antimicrobiana entre os meios de saliva e solução salina. Em relação a atividade das pomadas, as pomadas com clorexidina livre apresentaram um resultado melhor em relação às pomadas com as micropartículas com clorexidina. Estes resultados podem sugerir uma liberação lenta da clorexidina nas pomadas com as micropartículas, que pode representar um resultado favorável para testes futuros de liberação *in vitro* e em estudos clínicos *in vivo*.

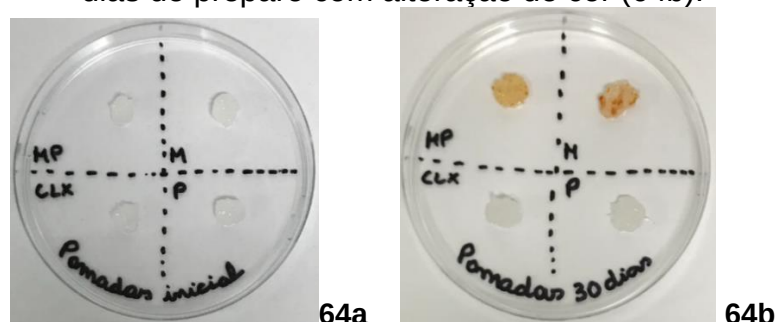
Nos resultados para *Candida albicans* foram observadas com a pomada com as micropartículas com clorexidina 4.10^4 no meio com saliva e 3.10^4 com solução salina, enquanto para a pomada com clorexidina livre foram contadas 2.10^4 no meio com saliva e 3.10^4 com solução salina. Estes resultados da contagem de unidades formadoras de colônias não seguiram a tendência de melhor desempenho da pomada com as micropartículas com clorexidina em relação a pomada com a clorexidina livre como observado nos valores de absorbância deste experimento, assim como também no teste de difusão em ágar (tópico 9.2.1).

Neste contexto, para confirmação dos resultados é importante realizar experimentos com outras metodologias para avaliação da atividade antimicrobiana das pomadas com micropartículas com clorexidina em relação à pomada com clorexidina livre, adotando ainda outras cepas de bactérias e fungos como objeto de análise.

9.3 Testes de estabilidade da pomada orabase

Após a realização dos experimentos microbiológicos com as pomadas foi observado, em um período após 30 dias, uma alteração de cor das pomadas preparadas com as micropartículas de maltodextrina e clorexidina (MP:CLX:MT) e da pomada com maltodextrina, conforme observado na Figura 64 a seguir:

Figura 64 - Pomadas orabase logo após o preparo (64a), Pomadas orabase após 30 dias de preparo com alteração de cor (64b).



Fonte: Autora.

Enquanto isso, as pomadas com a clorexidina livre e a pomada padrão, apenas com os excipientes da fórmula farmacêutica, não apresentaram alteração de cor. Dessa forma, foi atribuída a essa mudança de coloração das pomadas com as micropartículas de maltodextrina e clorexidina, e com maltodextrina pura e uma possível reação entre a maltodextrina e algum excipiente presente na fórmula farmacêutica, tendo em vista que a maltodextrina é comum apenas a essas duas pomadas.

O Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (2012) expõe sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos, e define estabilidade como o tempo no qual um produto mantém, dentro dos limites especificados e em todo o seu período de utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento em que foi obtido. A estabilidade depende de fatores relacionados ao próprio produto, chamados de fatores intrínsecos, como a composição da forma farmacêutica, as propriedades físico-químicas dos princípios ativos e excipientes, o pH, as impurezas presentes, o tipo e as propriedades dos materiais de embalagem e do processo empregado na sua obtenção. Dentre os tipos de estabilidade, a estabilidade física nos produtos farmacêuticos mantém suas propriedades físicas especificadas, incluindo aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução e suspensibilidade. Sendo considerado que mesmo o fármaco tendo uma boa estabilidade química ou microbiológica, as alterações físicas podem reduzir o tempo de uso do medicamento.

9.3.1 Avaliação da estabilidade da atividade antimicrobiana

• Materiais e métodos

Este experimento teve o objetivo de analisar a estabilidade da atividade antimicrobiana sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* com as pomadas orabase que sofreram oxidação, e comparar com os resultados do experimento de análise por difusão em ágar obtidos com as mesmas pomadas logo após o preparo.

O teste foi realizado apenas com a cepa de *Staphylococcus aureus* a título de comprovação e comparação, mesmo sabendo que a oxidação das pomadas, que caracteriza a perda da estabilidade física do produto, inviabiliza a sua utilização tendo em vista os aspectos de estabilidade de produtos farmacêuticos como preconiza o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (2012).

Para a realização deste experimento, foi seguido a mesma metodologia do teste de difusão em ágar descrito no tópico 9.2.1 deste capítulo.

• Resultados e discussão

O resultado obtido com a repetição do teste de difusão em ágar para *Staphylococcus aureus* mostrou uma redução da atividade antibacteriana da pomada com as micropartículas com clorexidina que sofreu oxidação (Tabela 26).

Tabela 26 - Medidas do halo de inibição (mm), com média, desvio padrão (DP) e mediana para o *Staphylococcus aureus* das pomadas inicial e oxidada após 30 dias.

Amostra	Inicial		30 dias	
	MP 0,12%	CLX 0,12%	MP 0,12%	CLX 0,12%
1	12,2	12	10	13
2	12,7	12,2	9,4	12,2
3	12,7	12,8	11,1	13,3
4	12,2	12,6	10	12,2
5	12,6	12,2	9,9	13,3
6	12,2	13	9	12
Média	12,43	12,47	9,90	12,67
DP	0,258	0,393	0,710	0,599
Mediana	12,4	12,4	9,45	12,4

MP 0,12% (Pomada com micropartículas com clorexidina 0,12%) e CLX 0,12% (Pomada com clorexidina livre a 0,12%). Fonte: Autora.

Comparando os resultados com a pomada inicial e a pomada oxidada foi realizada a análise estatística, com a aplicação do teste não-paramétrico U-Mann-Whitney, entre as medianas dos halos de inibição (mm) da pomada com micropartículas com clorexidina e da pomada com clorexidina livre nos dois momentos. O resultado foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,01$.

Na análise inicial os valores das medianas foram iguais entre as pomadas com as micropartículas com clorexidina e com a clorexidina livre mostrando uma atividade antimicrobiana semelhante entre as pomadas para *Staphylococcus aureus*, com p -valor 1. Contudo, com a pomada oxidada após 30 dias a mediana do halo de inibição foi 9,45, enquanto com a pomada com clorexidina livre manteve o resultado igual à análise inicial com mediana 12,4, com p -valor 0,0048, confirmando uma diferença estatisticamente significativa. Com isso, foi comprovado a perda da atividade antimicrobiana da pomada com micropartículas com clorexidina oxidada.

9.3.2 Avaliação da compatibilidade entre os componentes da pomada e da estabilidade sob variação de temperatura

• Materiais e métodos

Com o objetivo de avaliar compatibilidade da maltodextrina com os componentes da pomada foram preparadas quatro pomadas apenas com a base vaselina sólida, a vaselina líquida e a maltodextrina a 0,12% associado aos outros excipientes da fórmula farmacêutica em proporções semelhantes a utilizada no preparo da pomada orabase que sofreu oxidação, conforme apresentado no Quadro 2 abaixo:

Quadro 2 - Composição das pomadas preparadas para os testes de compatibilidade e estabilidade.

Pomadas	Base	Testes
1	Vaselina sólida (75%) + Vaselina líquida (19,5%) + Maltodextrina (5%)	+ Carboximetilcelulose – CMC (0,5%)
2		+ Aminometil propanol – AMP (0,5%)
3		+ Propilparabeno – (0,15%)
4		Sem outro excipiente

Fonte: Autora.

Foram preparadas três embalagens para cada tipo de pomada para permitir a análise quanto a variação sob diferentes temperaturas de armazenamento, e relacionar com a compatibilidade entre os excipientes a partir da interação físico-química. As três pomadas preparadas de cada fórmula foram mantidas em três condições diferentes de temperatura: temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, temperatura de 40°C $\pm$ 2°C sob aquecimento em estufa, e temperatura de 2°C a 8°C sob refrigeração.

O desenho experimental da análise da estabilidade das pomadas sob diferentes temperaturas de armazenamento teve como base a resolução RE nº 1/2005 da ANVISA de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos. Foi realizado um estudo de estabilidade acelerada adaptado, visto que a frequência dos testes na resolução para o estudo de estabilidade acelerado deve ser de 0, 3 e 6 meses, enquanto no presente estudo foi realizado análises nos intervalos de dias 0 (inicial), 5, 7, 10, 15, 21, 25, 30, 40, 50, 60 e 90 dias. Quanto as especificações da técnica para estudos de estabilidade com forma farmacêutica semi-sólida, na resolução é proposta a condição de armazenamento na temperatura de 15°C a 30°C para o controle, e para o estudo acelerado a temperatura de 40°C $\pm$ 2°C, sendo acrescentado no presente estudo a temperatura refrigerada de 2°C a 8°C. E quanto ao armazenamento da forma farmacêutica semi-sólida, as pomadas foram armazenadas em embalagem impermeável conforme a resolução.

A cada dia determinado as pomadas foram retiradas das diferentes condições de armazenamento, e imediatamente foram removidas uma porção de aproximadamente 200 mg de cada pomada, com auxílio de espátula de inox, e colocadas em placa de vidro para análise visual e registro fotográfico. As fotografias foram realizadas pela mesma câmera e pelo mesmo operador, visando a observação de variação da cor das pomadas.

A avaliação visual das pomadas foi realizada em intervalos curtos nos primeiros 30 dias para observar a interação entre os excipientes isoladamente com a maltodextrina, sob as diferentes condições de armazenamento em relação à temperatura, caracterizando o teste de compatibilidade entre os excipientes da fórmula farmacêutica. E depois foi dada continuidade ao experimento em intervalos

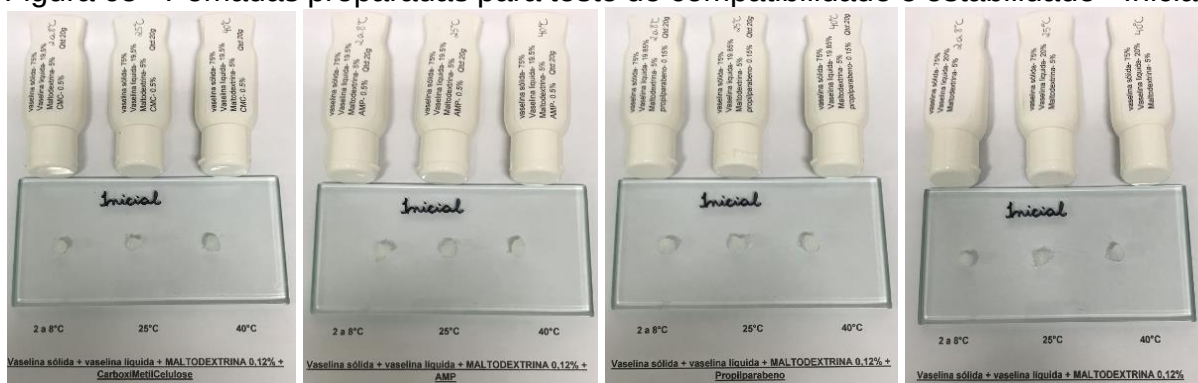
de tempos de 10 dias até completar 60 dias ou 2 meses, e depois 90 dias ou 3 meses para observar a estabilidade das pomadas sob as mesmas condições do teste de compatibilidade.

• Resultados e discussão

Os resultados estão apresentados a seguir por imagens fotográficas, das Figuras 65 a 69, de acordo com o dia de análise.

No registro inicial, todas as pomadas apresentaram o aspecto igual, com as mesmas características de cor, consistência, textura e brilho (Figura 65).

Figura 65 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade - Inicial.



Fonte: Autora.

Na análise de 10 dias foi observada a mudança de cor na pomada preparada com o aminometil propanol (AMP) na temperatura de armazenamento de 40°C, comprovando que a oxidação pela interação entre os excipientes maltodextrina e o AMP (Figura 66). O evento ocorrido inicialmente na temperatura de 40°C é justificado pela influência do aquecimento sobre a aceleração da reação química entre os excipientes.

Figura 66 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 10.



Fonte: Autora.

Segundo o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (2012), a velocidade de uma reação química aumenta exponencialmente a cada aumento de 10°C na temperatura, sendo observado em quase todas as reações de hidrólise de fármacos e algumas reações de oxidação. O fator real de aumento de velocidade depende da energia de ativação de cada reação, e a energia de ativação é uma função da reatividade específica vinculada à cada formulação. Por outro lado, baixas temperaturas podem causar danos como extrema viscosidade em alguns fármacos líquidos e causar supersaturação.

Neste mesmo período, também foi observado que todas as pomadas armazenadas sob refrigeração na temperatura de 2 a 8°C apresentou mudança na consistência e aspecto inicial, tornando-se mais firme e opaca respectivamente. Com isso, também se considera a perda da estabilidade física, como já destacado anteriormente que a estabilidade se relaciona com a manutenção do produto com as mesmas propriedades e características que possuía no momento em que foi obtido.

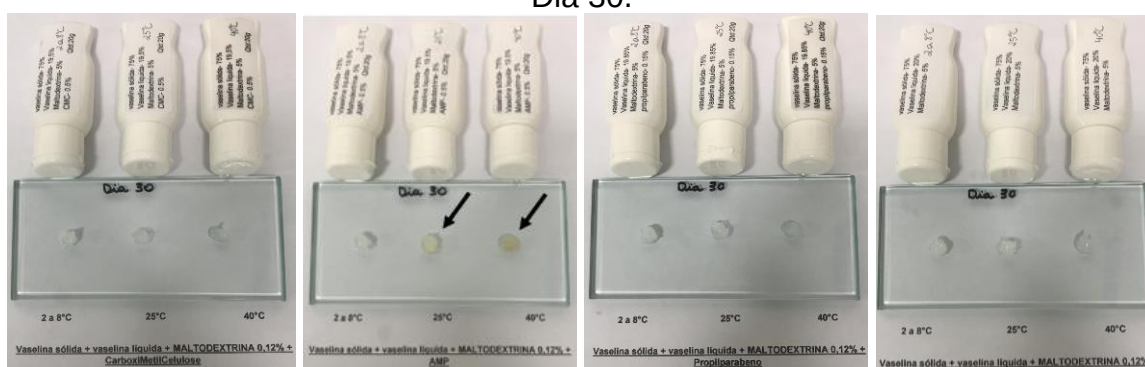
O estudo observacional foi mantido para a análise do tempo de oxidação da pomada pela interação entre a maltodextrina e o AMP com a pomada em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Foi observado que nos períodos de observação de 15 e 21 dias o aspecto da pomada com maltodextrina e AMP se manteve estável, quanto à oxidação, com a temperatura ambiente de 25°C.

A partir do período de 21 dias foi evidenciado uma reação de hidrólise em todas as pomadas armazenadas na temperatura de 40°C, de forma que a consistência de

pomada perdeu a sua característica de viscosidade, e passou a apresentar maior brilho e liquefação a essa temperatura.

A pomada com maltodextrina e AMP armazenado na temperatura a 25°C apresentou uma discreta alteração na coloração a partir de 25 dias de observação. E com 30 dias foi observado a alteração de coloração compatível com a oxidação da pomada pela interação entre a maltodextrina e o AMP em temperatura ambiente (Figura 67).

Figura 67 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 30.

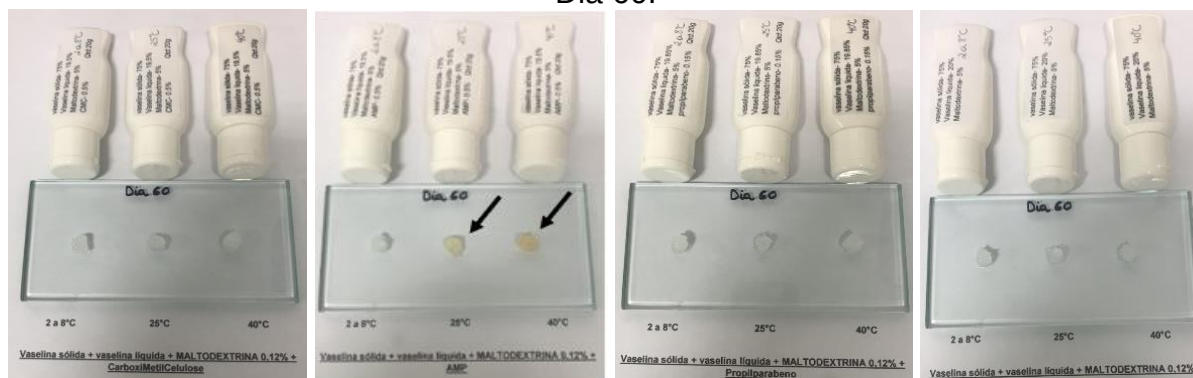


Fonte: Autora.

O estudo observacional de estabilidade foi mantido para avaliar o tempo de oxidação da pomada com maltodextrina e AMP armazenada sob refrigeração na temperatura entre 2 a 8°C. Sabendo-se que a temperatura mais baixa reduz a velocidade de reações químicas, retardando o processo de interação entre a maltodextrina e o AMP que promove a alteração de cor da pomada.

No período observacional de 60 dias a estabilidade da pomada com maltodextrina e AMP armazenada sob refrigeração na temperatura entre 2 a 8°C foi mantida, não havendo alteração da cor perceptível pela análise visual (Figura 68). Sendo o mesmo resultado observado até o período de 90 dias, tendo a cor das pomadas oxidadas uma alteração de cor mais intensa, conforme apresentado na Figura 69.

Figura 68 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 60.



Fonte: Autora.

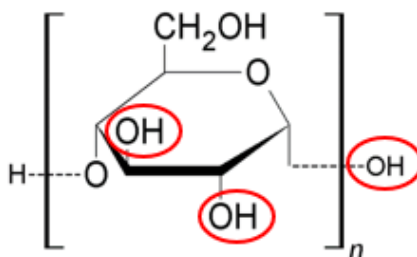
Figura 69 - Pomadas preparadas para teste de compatibilidade e estabilidade – Dia 90.



Fonte: Autora.

Entre as principais reações de decomposição dos medicamentos está a oxidação dos grupos hidroxila, que são as estruturas moleculares mais suscetíveis à essa reação. Os produtos de oxidação em geral não têm atividade, e podem ou não ser visíveis, sendo a oxidação favorecida pelo pH, quando esse é mais alto, pela presença de íons de metal pesado polivalente, e exposição ao oxigênio e à radiação ultra-violeta (Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira, 2012). Sob o aspecto da susceptibilidade à oxidação, a estrutura molecular da maltodextrina possui grupos hidroxilas (Figura 70), podendo ter sofrido influência do meio ou de reação químico-física com o aminimetil propanol (AMP) da fórmula farmacêutica da pomada orabase que levou à oxidação das pomadas apresentadas pela mudança de cor visível.

Figura 70 - Molécula de maltodextrina com marcação dos grupos hidroxila. Adaptado de imagem da molécula desenhado no programa ChemSketch 2.0.



Fonte: Autora.

O aminometil propanol (AMP) é um agente de neutralização para formulações farmacêuticas e cosméticas, cuja natureza química é a mistura de álcoois e amins, com fórmula química $C_4H_{11}NO$ e peso molecular 89,14 g/mol. Tem bom poder de neutralização, devido ao baixo peso molecular. Permite uma melhor neutralização de moléculas ácido funcionais, resultando em uma melhor estabilidade de viscosidade e melhor solubilidade do material (MAPRIC®). O aminometil propanol e o aminometil propanodiol são álcoois alifáticos e classificados como amins primárias que funcionam como neutralizadores de pH frequentemente usado em produtos em produtos cosméticos de uso tópico, e apresenta segurança quanto à toxicidade na concentração máxima de 2% (BURNETT et al., 2009).

Na preparação da fórmula farmacêutica da pomada orabase a concentração do AMP usada foi de aproximadamente 0,5%, apresentado valor quatro vezes inferior a concentração adotada para produtos cosméticos. Assim, entende-se que a concentração usada no preparo da pomada não está relacionada com a oxidação, sendo este fenômeno atribuído à incompatibilidade por possível interação química entre o aminometil propanol e a maltodextrina, que resultou na perda da estabilidade física da pomada.

A estabilidade é um parâmetro de validação necessária para assegurar a qualidade do produto, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade. Os estudos de estabilidade contribuem para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento, fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações, estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua

confirmação, auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, e assim gerar informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (ISAAC et al., 2008).

Segundo o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (2012) a estabilidade física nos produtos farmacêuticos mantém suas propriedades de aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução e suspensibilidade. E considera que mesmo o fármaco tendo uma boa estabilidade química ou microbiológica, as alterações físicas podem reduzir o tempo de uso do medicamento. Dessa forma, a alteração da aparência da cor da pomada com as micropartículas com maltodextrina e clorexidina, resultado da oxidação, inviabiliza a sua utilização como fórmula farmacêutica. E ainda, mesmo a pomada mantida refrigerada não tendo sofrido oxidação, esta apresentou alteração de consistência e brilho, caracterizando também perda da estabilidade física.

Com o teste de atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* por análise comparativa entre as pomadas com as micropartículas após o preparo e com oxidação (tópico 9.3.2), também pode ser comprovado a perda da estabilidade microbiológica. Com isso, foi reforçado a necessidade de ajustes na fórmula farmacêutica inicialmente proposta nesta pesquisa.

9.3.3 Avaliação do pH das pomadas orabase

• Materiais e métodos

Com o objetivo de avaliar se há relação entre o pH e a compatibilidade e estabilidade das pomadas orabase, foi medido o pH dos componentes da pomada isolados: vaselina sólida, vaselina líquida, solução de carboximetilcelulose, solução de aminometil propanol e solução de propilparabeno, todas as soluções preparadas na concentração de 1%.

Também foi avaliado o pH das pomadas logo após o preparo, após 90 dias de preparo, tendo estas pomadas com as micropartículas com clorexidina e com maltodextrina sofrido oxidação, e das pomadas preparadas para os testes de

compatibilidade e estabilidade. E ainda, uma nova pomada orabase com micropartículas com clorexidina sem o aminometil propanol foi preparada para a análise do pH.

Para a realização do experimento, uma porção de aproximadamente 200 mg de cada pomada foi colocada em um dosador de material odontológico Dentsply®, para medição no eletrodo do aparelho medidor de pH (Orion 290A+, Thermo electron Corporation®). E para a análise das soluções, estas foram colocadas em tubos de ensaio para a análise no eletrodo.

• Resultados e discussão

Os componentes utilizados no preparo das pomadas apresentaram valores de pH variados, com as vaselinas sólida e líquida apresentando característica ácida com pH 3,9 e 3,7, respectivamente. A carboximetilcelulose apresentou um pH neutro de 6,7, enquanto o aminometil propanol e o propilparabeno um pH alcalino de 12,7 e 9,7, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 27.

Tabela 27 - Valores de pH dos componentes da pomada.

Análises	pH
Vaselina sólida	3,9
Vaselina líquida	3,7
Carboximetilcelulose	6,7
Aminometil propanol	12,7
Propilparabeno	9,7

Fonte: Autora.

Os valores do pH das pomadas logo após o preparo e das pomadas oxidadas com 90 dias de preparo apresentaram variações do pH, com valores respectivos para as pomadas com as micropartículas 8,6 e 8,0, com clorexidina 10,5 e 10,9, com maltodextrina 9,9 e 9,2, e padrão 10,9 e 10,0, conforme apresentado na Tabela 28.

A redução do pH foi observada nas pomadas oxidadas com as micropartículas e com a maltodextrina, mas a redução do pH também foi visto na pomada padrão que não sofreu oxidação. Com isso, a redução o pH entre as pomadas inicial e oxidadas pode não estar diretamente relacionadas com a oxidação sofrida por elas, devendo

estudos de metodologias físico-química ser realizados para o esclarecimento dessa oxidação, assim como relacionar com a estabilidade da pomada.

Tabela 28 - Valores de pH das pomadas preparadas.

Análises	pH
Pomada logo após preparo	
MP:CLX:MT	8,6
CLX	10,5
MT	9,9
P	10,9
Pomada após 90 dias de preparo	
MP:CLX:MT (oxidada)	8,0
CLX	10,9
MT (oxidada)	9,2
P	10,0
Pomada teste de compatibilidade e estabilidade	
Vaselinas + MT	4,8
Vaselinas + MT + Carboximetilcelulose	5,5
Vaselinas + MT + Aminometil propanol	10,7
Vaselinas + MT + Propilparabeno	7,4
Pomada nova composição	
MP:CLX:MT sem Aminometil propanol	4,8

Pomada micropartículas com clorexidina (MP:CLX:MT), pomada com clorexidina livre (CLX), pomada com maltodextrina (MT), pomada padrão (P).

Fonte: Autora.

Os medicamentos semi-sólidos devem ser testados quanto ao pH no momento da liberação do lote, e com o tempo para o monitoramento da estabilidade. A maioria das formas de dosagem semi-sólidas contém quantidades muito limitadas de água ou fase aquosa, e a medida de pH é importante como avaliação de controle de qualidade (UEDA et al., 2009).

Nas pomadas do teste de compatibilidade e estabilidade, o pH mais baixo de 4,8, com característica ácida, foi observada na pomada com apenas as vaselinas e a maltodextrina. A pomada com a carboximetilcelulose também apresentou uma característica ácida com pH 5,5, já a pomada com o componente propilparabeno teve um pH neutro de 7,4, enquanto a pomada com o aminometil propanol (AMP) apresentou uma característica alcalina com pH 10,7 (Tabela 28). Estes resultados estão compatíveis com os resultados de análise de pH dos componentes isolados,

como apresentado na Tabela 27, sendo observado que a natureza ácida das vaselinas diminui o pH das pomadas quando associada aos demais componentes.

As pomadas com as micropartículas logo após o preparo e 90 dias após o preparo, que sofreu oxidação, apresentaram uma característica de alcalinidade, com pH de 8,6 e 8,0, respectivamente.

De acordo com o Formulário nacional da Farmacopéia Brasileira (2012), nas formulações com digluconato de clorexixina o pH deve ser ajustado para 7,0. Sendo esclarecido que a ação do digliconato de clorexidina diminui em pH alcalino, na presença de materiais orgânicos, detergentes aniônicos e taninos, enquanto aumenta em temperatura elevada, pH neutro, presença de detergentes não iônicos e sais de amônio quaternário.

Como a presença do AMP eleva muito o pH da pomada, o preparo de uma fórmula sem esse componente buscou avaliar o comportamento do pH na sua ausência, sendo também o mesmo responsável pela incompatibilidade com a maltodextrina. O pH observado foi ácido com o valor de 4,8 (Tabela 28), comprovando a importância do neutralizador de pH na fórmula farmacêutica. Assim, para seguir com os estudos de pomada orabase com micropartículas com clorexidina como sistema de liberação lenta será necessário a substituição do aminimetil propanol por outro agente de neutralização do pH na fórmula farmacêutica, com ajustes do pH para uma característica de neutralidade.

9.4 Conclusões

Diante dos resultados obtidos com os estudos da pomada orabase com micropartículas com clorexidina podemos concluir que:

- As pomadas orabase teste e controles foram preparadas com sucesso, apresentando características farmacológicas de coloração branco translúcido, consistência pastosa, superfície brilhosa e odor característico da base vaselina;

- No teste microbiológico de difusão em ágar para as cepas bacterianas estudadas foi observado halo de inibição maior da pomada com clorexidina livre em relação a pomada com as micropartículas, porém não foi estatisticamente significativo;
- Para o teste microbiológico de difusão em ágar com o fungo *Candida albicans* foi observado halo de inibição maior, com diferença estatisticamente significativa da pomada as micropartículas em relação a pomada com clorexidina livre. Estudos adicionais devem ser realizados para confirmar este resultado, adotando o desenvolvimento de outras metodologias de análise microbiológicas, tendo em vista as limitações do teste de difusão em ágar;
- Na análise da atividade antimicrobiana sobre biofilme em saliva e solução salina as pomadas com clorexidina livre apresentaram um resultado melhor em relação às pomadas com as micropartículas com clorexidina em ambos os meios. Este resultado pode estar relacionado com uma liberação lenta da clorexidina nas pomadas com as micropartículas, que pode representar um resultado favorável a ser pesquisado em testes futuros;
- Para o teste em biofilme com *Candida albicans* a atividade antifúngica foi melhor com a pomada com as micropartículas com clorexidina em relação a pomada com a clorexidina livre na leitura por absorbância, e o mesmo não aconteceu com a leitura por contagem. Este resultado reforça a necessidade de estudos adicionais da pomada com micropartículas com clorexidina e maltodextrina para fungos;
- Foi observado a oxidação da pomada com micropartículas com clorexidina e da pomada controle com maltodextrina após período de preparo de 30 dias. Como a maltodextrina é comum a estas duas pomadas, a oxidação foi atribuída a uma relação entre a maltodextrina e algum componente da fórmula farmacêutica;
- O teste de estabilidade microbiológica da pomada com micropartículas oxidada comprovou perda estatisticamente significativa da atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*;
- O teste de compatibilidade entre a maltodextrina e os componentes da fórmula farmacêutica comprovou a incompatibilidade entre a maltodextrina e o agente de

neutralização de pH aminometil propanol, com oxidação sob aquecimento a partir de 10 dias e em temperatura ambiente a partir de 25 dias;

- No teste de estabilidade física de 90 dias a pomada com maltodextrina e aminometil propanol se manteve sem oxidação sob refrigeração, entretanto houve alteração da estabilidade quanto à consistência e brilho da pomada;
- Na avaliação do pH das pomadas a redução foi observada nas pomadas oxidadas com as micropartículas e com a maltodextrina, e na pomada padrão que não sofreu oxidação. Assim, entendeu-se que a redução o pH entre as pomadas inicial e oxidadas pode não estar diretamente relacionadas com a oxidação sofrida por elas, devendo estudos de metodologias físico-química ser realizados para o esclarecimento dessa oxidação;
- A característica ácida da base vaselina determina a necessidade de um agente neutralizador de pH, comprovado com o preparo da pomada sem o aminometil propanol que apresentou acidez. Entretanto o aminometil propanol deve ser substituído, devido à sua incompatibilidade com a maltodextrina, buscando um pH neutro para melhor atividade da clorexidina e uso seguro na cavidade bucal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As micropartículas com clorexidina como produto intermediário apresentou características favoráveis para o desenvolvimento de formas farmacêuticas como sistema de liberação controlada. As micropartículas (MP:CLX:MT) apresentaram tamanho, porosidade e forma irregular, em análises de microscopia, compatível com o processo de preparo por liofilização. A presença de clorexidina nas micropartículas foi confirmada por diversas técnicas como microscopia com espectroscopia por energia dispersiva, análise térmica por DSC e análise por infravermelho. Em adição, observou-se uniformidade da massa, estabilidade química em 24 meses, estabilidade quanto à absorção de água em 12 meses por análise térmica por TG. Todas essas características contribuíram para estabilidade das micropartículas e o efeito de liberação da clorexidina em perfil de liberação lenta por um tempo aproximado de 2 horas.

A atividade antimicrobiana das micropartículas com clorexidina foi observada com resultados semelhantes aos observados com a clorexidina livre. Vale ressaltar que tais resultados foram válidos para técnicas com células planctônicas e em biofilmes tipo uniespécie. Dessa forma, consideramos que a clorexidina liberada das micropartículas se apresentaram estáveis e com manutenção das propriedades antimicrobianas.

Diante dos resultados favoráveis, foi proposta a forma farmacêutica de pomada orabase com micropartículas com clorexidina de base hidrofóbica, devido a alta solubilidade da maltodextrina. A atividade antimicrobiana dessa forma farmacêutica foi observada como esperado, considerando os efeitos da liberação lenta da clorexidina. Do ponto de vista clínico, a liberação lenta da clorexidina em orabase pode apresentar vantagens a exemplo de minimizar os riscos de doses elevadas e por consequência possibilidade de redução dos efeitos adversos dessa molécula, facilidade de aplicação sobre a área desejada na cavidade bucal e potencial aumento de substantividade.

Como a fórmula farmacêutica proposta apresentou incompatibilidade entre a maltodextrina e o agente de neutralização de pH aminometil propanol, sugere-se a substituição do mesmo. Assim, os futuros testes não-clínicos e clínicos devem considerar um melhoramento dessa formulação. Essa estratégia é particularmente importante para os protocolos de controle de crescimento de microrganismos na orofaringe de pacientes hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva, conforme proposta inicial deste trabalho.

Como perspectiva futura, as micropartículas com clorexidina também podem ser testadas como produto intermediário para incorporação em outras formas farmacêuticas, desde que a base da formulação não permita a solubilização imediata da maltodextrina, buscando manter a característica de liberação controlada da clorexidina das micropartículas.

E ainda, deve-se considerar que a pomada orabase com clorexidina livre é também uma inovação tecnológica como forma farmacêutica do digluconato de clorexidina, devendo ser testada em futuros testes não clínicos e clínicos, com possibilidade de comercialização. Destacando as vantagens de permitir uma ação local da clorexidina na área de necessidade de efeito antimicrobiano, associado à possibilidade de menores efeitos adversos em relação às formas farmacêuticas atualmente existentes. Também havendo a probabilidade de associar na pomada orabase o digluconato de clorexidina com atividade antimicrobiana a outro princípio ativo de atividade antimicrobiana sinérgica, ou mesmo outro princípio ativo de atividade combinada anti-inflamatória para uso na cavidade bucal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S. et al. Antimicrobial activity and pH of calcium hydroxide and zinc oxide nanoparticles intracanal medication and association with chlorhexidine. **The journal of contemporary dental practice**, v. 16, n. 8, p. 624-629, 2015.

ALLEN Jr., L. V. et al. Pomadas, cremes e géis. Seção IV – Formas farmacêuticas semissólidas e sistemas transdérmicos. In: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 9º ed. Artmed, São Paulo, 2013.

ALVAREZ, C. et al. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Braz J Infect Disease**, v. 14, Suppl 2, p. 107-118, 2010.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008

AMES, N. J. et al. Effects of systematic oral care in critically ill patients: A multicenter study. **American Journal of Critical Care**, v. 20, n. 5, p. 103-113, 2011.

AMIB. Associação de Medicina Intensiva Brasileira. **Procedimento Operacional Padrão de Higiene Oral**, 2014.

AMORAS, L. da S. **Uso da Clorexidina na medicina**: Revisão da Literatura. Monografia (Especialização em Endodontia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba – SP, 2013.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.48, Suppl. S1, 5–16, 2001.

ANVISA. RDC Nº 01, de 29 de julho de 2005. Publicada no DOU nº146, de 01 de agosto de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil.

ANVISA. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Publicada no DOU nº141, de 25 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil.

ANVISA. **Infecções do trato respiratório. Orientações para prevenção de infecções relacionadas à assistência a saúde.** Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, out. 2009.

ANVISA. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.** Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, 2017.

ARAÚJO, R. J. G.; VINAGRE, N. P. L.; SAMPAIO, J. M. S. Avaliação sobre a participação de cirurgiões-dentistas em equipes de assistência ao paciente. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 31, n. 2, p. 153-157, 2009.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Determination of melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brasiliian jornal of pharmaceutical sciences**, v. 46, n. 1, 2010.

ARYA, A. et al. Fast Dissolving Oral Films: An Innovative Drug Delivery System and Dosage Form. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 1, 2010.

BABISH, H. et al. An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 11, p. 79-88, 1995.

BADIEE, P.; ALBORZI, A.; JOUKAR, M. Molecular assay to detect nosocomial fungal infections intensive care units. **European Journal of Internal Medicine**, v. 22, p. 611-615, 2011.

BALLESTEROS, L. F. et al. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v.237, n.15, p. 623-631, 2017.

BAMBACE, A. M. J. et al. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Rev. Biociência**, v.9, n.2, p.73-81, 2003.

BARBOSA, J. C. S et al. Perfil de pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 4, p. 201-206, 2010.

BARBOZA, A. C. R. N. **Liberação sustentada do antisséptico clorexidina em micropartículas de quitosana e alginato**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências), UNICAMP, Campinas, 2013.

BATRA, R. et al. Efficacy and Limitation of a Chlorhexidine-Based Decolonization Strategy in Preventing Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 210-217, 2010.

BEAUDOUIN, E. et al. Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. **European Annls of Allergy and Clinical Immunology**, v. 36, n. 4, 2004.

BERALDO, C. C.; ANDRADE, D. Higiene bucal com clorexidina na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 9, p. 707-714, 2008.

BERGMANS D. C.; BONTEN, M. J.; GRAILLARD, C. A. et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral contamination. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **An. J. Respir. Crit. Med.**; v.164, 382-388, 2001.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n.2, p. 1-12, 2016.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF. 2012.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BONE, E. **Our microbiomes**. In: MICROBIA. 1ª edição. Editora Rodale, Nova Iorque, USA, 2018.

BONESVOLL, P. et al. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Archives of oral biology**, v. 19, n. 11, 1974.

BONESVOLL, P. Oral pharmacology of chlorhexidine. **J Clin Periodontol**, v. 4, n. 5, p. 49-65, 1977.

BOPP, M. et al. Effects of Daily Oral Care with 0.12% Chlorhexidine Gluconate and a Standard Oral Care Protocol on the Development of Nosocomial Pneumonia in Intubated Patients: A Pilot Study. **Journal of Dental Hygiene**, v. 80, n. 3, 2006.

BOYCE, J. M., PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care setting. Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. **Am J Infect control**, v. 30, p. 1-46, 2002.

BRITTO, M. A. F. O. et al. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Quim. Nova**, n. 27, 2004.

BURNETT, C. L. et al. Final amended report on safety assessment on aminomethyl propanol and aminomethyl propanediol. **Int J Toxicol**, v. 28, n. 6 (Suppl), 2009.

CALLENS, C.; REMON, J. P. Evaluation of starch–maltodextrin–Carbopol®974 P mixtures for the nasal delivery of insulin in rabbits. **Journal of controlled release**, v. 66, n. 15, 2000.

CANO-HIGUITA, et al. Microcapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. **Cienc. Agrotec**, v. 39, n. 2, 2015.

CARRIER, R. L. et al. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **J Control Release**, v. 123, n. 2, 2007.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an update review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329 – E357, 2005.

CHANDRA, A.; SHARMA, P. K. Proniosome based drug delivery system of piroxicam. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 9, 2008.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 67, n.3, 2010.

DeRISO, A. J. et al. Chlorhexidine gluconate 0,12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. **Chest.**, v. 109, n. 6, p. 1556-61, 1996.

DEFRES, S. et al. MRSA as a cause of lung infection including airway infection, communityacquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. **European Respiratory Journal**, v. 34, p. 1470–1476, 2009.

DODWAD, V. et al. Local drug delivery in periodontics: A strategic intervention. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, 2012.

EDGREN, D. E. et al. Dosage form comprising drug and maltodextrin. United States Patent, Patent n. 5.057.321, oct/15, 1991.

EL-SOLH, A. A. et al. A reservoir of respiratory pathogens for hospital-Acquired pneumonia in institutionalized elders. **Chest Journal**. v. 126, n. 5, p. 1575-1582, 2004.

ERCAN, E. et al. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. V. 102, n. 2, p. 27-31, 2006.

ERIKSEN, H. M. et al. Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms. **J Clin Periodontol**, v. 12, n.5, 1985.

FARIA, G. et al. Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. **Journal of endodontics**, v. 33, n. 6, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5º ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FDA. Chlorhexidine Official FDA information, side effects and uses. Drug information Online. Drugs.com. Revised 06/2018. Disponível em: www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html. Acesso em: 06 Mar. 2019.

FILOCHE, S. K. et al. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 20, n. 4, 2005.

FORMULÁRIO NACIONAL DA FARMACOPEIA BRASILEIRA / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012.

FOURRIER, F. et al. Colonization of dental plaque: A source of nosocomial infections in intensive care unit patients. **Crit Care Med**, v. 26, n. 2, p. 301- 308, 1998.

FUKUDA, E. K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. **Química Nova.**, 2009.

GENT, J. F. et al. Taste confusions following chlorhexidine treatment. **Chem Senses**, v. 27, n. 1, 2002.

GIGLIO, M. et al. Oral nystatin prophylaxis in surgical/trauma ICU patients: a randomized clinical trial. **Critical care**, v. 16, p. 2-9, 2012.

GIULIANA, G. et al. In vitro activities of antimicrobial agentes against Candida species. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 87, n. 1, p. 44-49, 1999.

GIUNCHEDI, P. et al. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 233-239, 2002.

GUERREIRO-TONOMARU, J. M. et al. Comparative Analysis of Enterococcus faecalis Biofilm Formation on Different Substrates. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 3, p. 346-350, 2013.

HELMS, J. A. et al. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch Oral Biol.**, 40, n. 10, 1995.

HENRIQUES, A. et al. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais. **Arquivos de medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**. V. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.

HOSSEINI, M, K; ROOHI, B, N. Effect of Glutamine and Maltodextrin Acute Supplementation on Anaerobic Power. **Asian Journal of Sports Medicine**, v. 4, n. 2, p. 131-136, 2010.

HOUSTON, S. et al. Effectiveness of 0,12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. **American journal of critical care**, v. 11, n. 6, 2002.

HUA, F. et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 25; p. 10: CD008367, 2016.

ISHIGAMI, S. et al. Intravenous chlorhexidine gluconate causing acute respiratory distress syndrome. **J. Toxicol Clin Toxicol**, v. 39, p. 77-80, 2001.

ISAAC, V. L. B. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JI, Q. X. et al. A novel injectable chlorhexidine thermosensitive hydrogel for periodontal application: preparation, antibacterial activity and toxicity evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 8, 2010.

KAPLAN, M. D, BAUM, B. J. The functions of saliva. **Dysphagia**, v. 8, p. 225-229, 1993.

KLOMPAS, M. et al. Reappraisal of Routine Oral Care With Chlorhexidine Gluconate for Patients Receiving Mechanical Ventilation: Systematic Review and Meta-Analysis. **JAMA Intern Med.**, v. 175, n. 5, p. 751-761, 2014.

KLUK, E. et al. Uma abordagem sobre a clorexidina: Ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n. 1, p. 07-13, 2016.

KUMAR, S. B. Chlorhexidine Mouthwash- A Review. **J. Pharm. Sci. & Res.**, v. 9, n. 9, 2017.

KUNTE, S., TANDALE, P. Fast dissolving strips: A novel approach for the delivery of verapamil. **J Pharm Biolied Sci.**, 2, n. 4, 2010.

LABEAU, S.O. et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia with oral antiseptics: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 39, n. 4, p. 347-358, 2011.

LAUERMA, A. I. Simultaneous immediate and delayed hypersensitivity to chlorhexidine digluconate. **Contact dermatites**, v. 44, p. 34-60, 2001.

LAZA-KNOERR, A. L. et al. Cyclodextrins for drug delivery. **J Drug Target**, v. 18, n. 9, 2010.

LESSA, F. C. R. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 1, p. 50-58, 2010.

LIMA, F. L. M. **Avaliação clínica e microbiológica de dispositivo de liberação lenta de clorexidina em pacientes com periodontite crônica**. 2002. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru - SP, 2002.

LIM, K. S.; KAM, P. C. A. Chlorhexidine – pharmacology and clinical applications. **Anaesth Intensive Care**, v. 36, p. 502-512, 2008.

LINDAU, S. et al. Antifungal pulmonar *Candida* spp. colonization may have no benefecial effects. **Journal of Intensive Care**, v. 3, n. 31, p. 2-9, 2015.

LINS, C. E. C. **Estudo in vitro da liberação controlada de clorexidina, incorporada em filme de quitosana, para potencial aplicação na cavidade oral.** 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LIOTOP. O que é liofilização?, 2014. Disponível em: <http://www.liotop.com.br>. Acesso em: 04 Mar. 2019.

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br>. Acesso em: 03 Ago. 2019.

LUO, D. et al. Gold Nanorod Mediated Chlorhexidine Microparticle Formation and Near-Infrared Light Induced Release. **Langmuir**, v. 33, n.32, p.7982–7993, 2017.

MACEDO, R. A. P. et al. Uso da clorexidina no tratamento da mucosite oral em pacientes com leucemia aguda: revisão sistemática. **Rev. Dor**, v.16, n. 3, p. 221-226, 2015.

MAH, T-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agentes. **Trends in microbiology**, v. 9, n.1, p. 34-39, 2001.

MANGANELLI, D. K. et al. Determinação de teor e uniformidade de doses de capsulas de bensilato de anlodipino manipuladas em farmácias de Venâncio Aires-RS. **Revista destaques acadêmicos**, v. 8, n. 3, 2016.

MANTHUR, S. et al. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. **National jornal of physiology, pharmacy e pharmacology**, v. 1, n.2, p. 45-50, 2011.

MAPRIC. AMP 95. Boletim informativo do produto. Disponível em: www.Mapric.com.br/pdf/Boletim684_02122011-12h06.pdf. Acesso em 05 de outubro de 2019.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery system. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, p. 1-14, 2008.

MARINO, P. J. et al. Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. **Journal of critical care**, v. 39, p. 149-155, 2017.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia bucal**. 4ª edição. Editora Santos, São Paulo, 2005.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINS, R. S. et al. Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentifrícios: uma revisão da literatura entre 1989 e 2011. **J. Health Sci. Inst.**, v. 30, n. 3, p. 287-91, 2012.

MATTÉ, G. M., DA ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de polímeros**, v. 14, n. 5, 2013.

MERCK & CO. INC. Chlorhexidine. The Merck Index Online. All rights reserved, 2019. Disponível em: <https://www.rsc.org/merck-index>. Acesso em: 06 mar. 2019.

MORAIS, T. M. N. et al. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 4, 2006.

MORAIS, W. A. Propriedades físico-químicas e antibacterianas da incorporação de micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina em cimento de ionômero de vidro. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Ceará, 2015.

MORAIS, A. R. V. et al. Freezedrying of emulsified systems: A review. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 503, p. 102-114, 2016.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2010.

MUNIZ, F. W. et al. Efficacy of an unwaxed dental floss impregnated with 2% chlorhexidine on control of supragingival biofilm: A randomized, clinical trial. **J Invest Clin Dent.**, v. 9, 2018.

MUNRO, C. L. et al. Oral health status and development of ventilator- associated pneumoniae: A descriptive study. **Am J Crit Care**, n. 15, p. 453-460, 2006.

NETUSCHIL, L. et al. Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable?. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 2, 2014.

NOJOSA, J. S. **Caracterização de selantes resinosos contendo micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal do Ceará, 2014.

NEOBRAx. Relatório técnico da clorexidina. Disponível em www.neobrax.com.br/download/Relatorio-Tecnico-da-Clorexidina. Acesso em: 06 mar. 2019.

NOGUEIRA, M. B. et al. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agente. **Food Science and technology**, v. 37, p. 1-4, 2017.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e Streptococcus mutans**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2004.

OLIVEIRA, L. S. C. ***Streptococcus pneumoniae* isolados simultaneamente de líquido, sangue e nasofaringe de crianças com meningites pneumocócicas: suscetibilidade, sorotipos e tipagem da PspA**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.

OLIVEIRA, L. C. B. S. et al. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. **RBTI**, v. 19, n. 4, 428-443, 2007.

OLIVEIRA, M. A. et al. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

ONE, G. M. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de digluconato de clorexidina microencapsulado. **Tese de Doutorado** – UFPB/RENORBIO, 2014.

ONE, G. M. C. et al. Produto farmacêutico, liofilizado, antimicrobiano, microencapsulado consistindo de digluconato de clorexidina e maltodextrina. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 101214112413, título: “Produto farmacêutico, liofilizado, antimicrobiano, microencapsulado consistindo de digluconato de clorexidina e maltodextrina”, Instituição de registro: INPI- Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

OSWOSKY, J.; GAMBA, H. R. **Sistema Automático para Contagem de Colônias em Placas de Petri**. Anais do CBEB - Processamento de Imagens, 2000.

PARIKH, A. et al. A review on applications of maltodextrin in pharmaceutical industry. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 67-74, 2014.

PASETTI, L. A. et al. Odontologia Hospitalar. A importância do cirurgião dentista na Unidade de Terapia Intensiva. **Rev. Odontologia (ATO)**, Bauru, SP, v. 13, n. 4, p. 211-226, abr. 2013.

PAULINO, A. T et al. **Hidrogel de maltodextrina modificada para uso como biomaterial magnético**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009.

PESSAN, J. P. et al. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentrice preceded by a calcium lactate rinse. **European jornal of oral sciences**. 114, 6, p. 489-493, 2006.

PEREIRA, K. C. et al. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian jornal of food technology**, v. 21, 2018.

PERETZ, S. et al. Microparticles obtained by biopolymer-surfactant interaction: Influence of pressure. **Rev. Roum. Chim.**, v. 57, p. 443-447, 2012.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n. 4, 2007.

PRIYADARSHINI, B. M. et al. Characterization of chlorhexidine-loaded calcium-hydroxide microparticles as a potencial dental pulp-capping material. **Bioengineering**, v. 4, p.59, 2017.

PUCHER, J. J.; DANIEL, J. C. The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro. **J. Periodontol.**, v.62, p. 526-532, 1993.

RABELO, G. D. R. et al. Atendimento odontológico ao paciente em unidade de terapia intensiva. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 67-70, 2010.

RAGHAVENDRAM, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: The contribution of dental biofilm and periodontal inflammation. **Periodontol 2000**, v. 44, p. 164-177, 2007.

RICCI, M. **Incidência de Pneumonia Nosocomial em um Unidade de Terapia Intensiva Geral de Cascavel.** [Monografia do Curso de Fisioterapia de Unioste]. Paraná, Cascavel, 2005.

RICHARDS, D. Oral hygiene regimes for mechanically ventilated patients that use chlorhexidine reduce ventilator-associated pneumonia. **Evid Based Dent**, v.14, n.3, 2013.

RICHARDS, D. Chlorhexidine mouthwash plaque levels and gingival health. **Evid Based Dent.**, v. 18, n. 2, 2017.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

SAATMAN, R. A. et al. A wound healing study of chlorhexidine digluconate in guinea pigs. **Fundamental and applied toxicology**, v.6, n.1, 1986.

SANDS, K. M. et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. **Journal of critical care**, v. 37, p. 30-37, 2017.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D. F. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial.** 2007. Dissertação (Mestrado Em Ciências ambientais e saúde), Universidade Católica de Goiás, Goiania – GO, 2007.

SANTOS, G. O. et al. Chlorhexidine with or without alcohol against biofilm formation: efficacy, adverse events and taste preference. **Braz. oral res.**, v. 31, 2017.

SANTOS, C. R. et al. Fatores de risco que favorecem a pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev enferm UFPE on line**, v.12, p. 3401-15, 2018.

SCANNAPIECO, F. A., STEWART E. M., MYLOTTE, J. M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. **Crit Care Med**, v. 20, p. 740-745, 1992.

SCANNAPIECO, F. A.; MYLOTTE, J. M. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. **J. Periodontol**. v. 67, p. 1114-1122, 1996.

SCANNAPIECO, F. A. **Relação entre doenças periodontais e doenças respiratórias**. In: MEADLEY, R.; COHEN, G. Medicina Periodontal, cap. 6, p. 83-97, ed.Santos, São Paulo, 2002.

SCANNAPIECO, F. A. et al. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. **Ann periodontol**, n. 8, n. 1, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas de polímeros nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, 2003.

SEMENOFF, T. A. D. V. et al. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Odonto Ciencia**. v. 23, n. 4, p. 351-354, 2008.

SIGMA. Chlorhexidine digluconate. Product information. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c9394pis.pdf. Acesso em 09 de junho de 2019.

SHAMA, N.; BALDI, A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. **Drug Deliv**, v. 23, n. 3, 2016.

SHRESTHA, A. et al. In vitro antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. **Journal of dental sciences**, v. 6, p. 1-5, 2011.

STEGUES, C. G. **Efeito da maltodextrina e da sua associação com a sacarose na acidogenicidade e crescimento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei in vitro***. Faculdade de Odontologia (TCC), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SNYDERS, O.; KHONDOWE, O. Oral chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill adults in the ICU: A systematic review. **SAJCC**, v. 27, n. 2, 2011.

STRAMANDINOLI, R. T. et al. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **RSBO**, v. 7, n. 1, p. 66-71, 2010.

TEIXEIRA, K.I.R. **Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura**. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2008.

UEDA, C. T et al. Topical and Transdermal Drug Products. **Pharmacoepial Forum**, v. 35, n. 3, 2009.

VIVA NUTRIÇÃO. Petição para inclusão da dextrina/Maltodextrina resistente como constituinte na categorização de nutrientes à ANVISA. 2018. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/36106/7338188_218117.pdf. Acesso em: 20 Ago. 2018.

WELSH, A. I. B; RHODES, D. G. Maltodextrin-based proniosomes. **The AAPS Journal**, v. 3, n. 1, 2001.

XUE, Y. et al. Acute pulmonary toxic effects of chlorhexidine (CHX) following an intratracheal instillation in rats. **Human & Experimental toxicology**, v. 21, 2011.

YOSHIKAWA, Y. et al.. Assessment of the safety of hydrogenated resistant maltodextrin: reverse mutation assay, acute and 90-day subchronic repeated oral toxicity in rats, and acute no-effect level for diarrhea in humans. **The journal of toxicological sciences**, v. 38, n. 3, 2013.

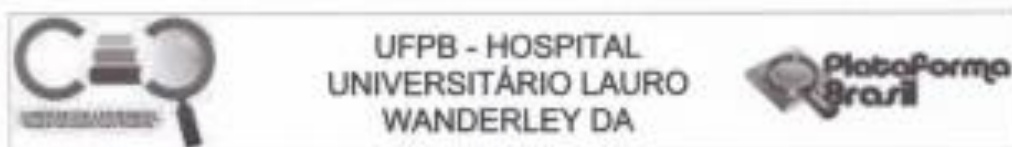
YU, Z. et al. Preparation and characterization of microparticles containing peptide produced by a novel process: spray freezing into liquid. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 54, n.2, p. 221-228, 2002.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, p. 35-43, 2007.

ZANATTA, F. B. et al. Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 5, 2010.

ZAND, F. et al. The effects of oral rinse with 0.2% and 2% chlorexidine on oropharyngeal colonization and ventilator associated pneumonia in adults intensive care units. **Journal of critical care**, v. 40, p.318-322, 2017.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA HULW/ UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE DA CLOREXIDINA MICROENCAPSULADA SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS DA OROFARINJE DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM UTI

Pesquisador: Micheline Cavalcanti Toscano de Brito

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56416616.8.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.894.075

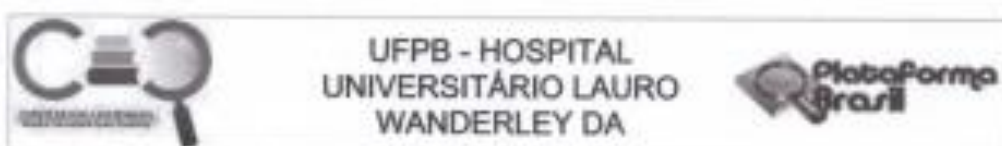
Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação de Emenda (primeira) de um projeto de pesquisa de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM), da aluna Micheline Cavalcanti Toscano de Brito, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

Justificativa da Emenda:

Ao Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, Venho por meio deste solicitar ao colegiado do Comitê de Ética em pesquisa do HULW a avaliação do projeto de pesquisa para atualização do mesmo sob Parecer Consubstanciado do CEP, n. 1.860.297, aprovado em 03 de agosto de 2016. Em concordância com o orientador da pesquisa Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, e sob as diretrizes do PPGDITM - Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, o projeto de pesquisa original sofreu modificações na sua metodologia e cronograma de execução. A metodologia original era composta pelas fases de preparo e caracterização do microencapsulado, a avaliação microbiológica IN VITRO, a etapa pré-clínica EX VIVO, e a etapa clínica, sendo esta última excluída do projeto. No cronograma de execução da pesquisa, a caracterização do microencapsulado e a avaliação microbiológica IN VITRO estão em fase de conclusão, enquanto a execução da etapa pré-clínica EX VIVO da secreção traqueal de pacientes da UTI colhida para análise no laboratório de microbiologia do HULW, que depende da aprovação do CEP/HULW, tem previsão para início em setembro de 2018. Diante do

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.055-000
 UF: PB Município: JOÃO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7904 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw0518@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.854/075

exposto, solicito a apreciação do presente pedido em conjunto com a análise do projeto atualizado e documentos em anexo. Atenciosamente, Michelline Cavalcanti Toscano de Brito

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar e comparar a atividade in vitro e ex vivo da eficácia da clorexidina microencapsulada sobre bactérias e fungo da orofaringe para utilização como formulação farmacêutica em protocolo de higiene bucal para pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva.

Objetivo Secundário: • Testar in vitro, com cepas do ATCC, a eficácia da clorexidina microencapsulada contra bactérias patógeno-respiratórias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias periodonto-patogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e fungo *Candida albicans*; • Identificar as bactérias e fungos da coleta da secreção traqueal de pacientes da Unidade de Terapia Intensiva de adulto do Hospital Universitário Lauro Wanderley; • Comparar se as bactérias e fungos da secreção traqueal colhida dos pacientes coincidem com as espécies de bactérias e fungos relatados na literatura para este grupo de pacientes; • Testar a eficácia da clorexidina microencapsulada contra as espécies bacterianas e fungos encontradas na secreção da traqueia dos pacientes hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva do HULW-UFPB; • Desenvolver uma forma farmacêutica a partir de clorexidina microencapsulada com maltodextrina para ser aplicada futuramente em testes clínicos, como um novo protocolo de higiene oral para utilização em pacientes hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Conforme recomenda a Associação de Medicina Intensiva Brasileira, no Protocolo de Procedimento Operacional Padrão de Higiene Oral (2014), a solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12% é o antisséptico de escolha para utilização em pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva, sendo sua aplicação indicada com uma frequência de 12/12 horas durante a realização de higiene oral. Entretanto, o uso contínuo de digluconato de clorexidina apresenta como riscos a possibilidade de aparecimento de efeitos adversos como alteração no paladar e manchamento nos dentes, e irritação aos tecidos, tendo em concentrações iguais ou inferiores a 0,25% um efeito menos agressivo. Diante do exposto, a depender do tempo de internação do paciente na UTI, pode haver o risco de aparecimento de efeitos adversos, porém em baixa.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.050-900
 UF: PB Município: JOÃO PESSOA
 Telefone: (83)3210-7964 Fax: (83)3210-7522 E-mail: comitadefitos.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação de Parecer: 2.894.873

intensidade visto que a concentração do digluconato de cloroxidina a ser utilizado será de 0,12%.

Benefícios: A aplicação da cloroxidina microencapsulada com maltodextrina como característica de inovação tecnológica em sistema de liberação lenta melhora a sua farmacocinética, mantendo a dose-efeito. Com isso, a microencapsulação da cloroxidina pode se apresentar como uma alternativa mais eficaz de controle microbiano, cujas características ampliam a indicação para pacientes em Unidades de Terapia Intensiva. Os riscos e benefícios foram devidamente apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta relevância, uma vez que originará contribuições científicas e acadêmicas para a sua área de conhecimento. Além disso, os resultados obtidos permitirão investigar novos protocolos contra bactérias e fungos da orofaringe de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. Não há inadequações metodológicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

A pesquisadora responsável e demais colaboradores, MANTENHAM A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos aspectos ético-metodológicos referentes à Emenda ao protocolo de pesquisa emitida pelo pesquisador responsável, considera-se as alterações solicitadas viáveis e em consonância com as diretrizes da Resolução CNS 466/2012, do MS, estando, portanto, sem pendências e/ou inadequações a declarar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO da EMENDA ao protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 11 de setembro de 2018.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES

O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.089-800
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7584 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 2.884.373

O protocolo de pesquisa, segundo cronograma apresentado pelo pesquisador responsável, terá vigência até

Ao término do estudo, o pesquisador deverá apresentar, online via Plataforma Brasil, através de Notificação, o Relatório parcial ou final ao CEPHULW para apreciação e emissão da Certidão Definitiva por este CEP. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_121347_6_E1.pdf	03/09/2018 13:18:35		Aceito
Outros	Documentosassinados.pdf	03/09/2018 13:17:02	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_atualizado.doc	03/09/2018 11:31:21	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
Cronograma	Cronograma_atualizado.doc	03/09/2018 11:31:01	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
Outros	Controle_de_emenda.PDF	03/09/2018 11:27:43	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
Outros	Projeto_de_pesquisa_atualizado_para_CEPHULW.doc	03/09/2018 11:27:03	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_clonodina.doc	21/07/2016 00:14:34	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/05/2016 09:09:51	Micheline Cavalcanti Toscano de Brito	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7064 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2010@gmail.com

Página 02 de 02



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 2.884.075

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

JOAO PESSOA, 13 de Setembro de 2016

Assinado por:
Callandra Maria Bezerra Luna Lima
(Coordenador)

ANEXO B – DEPÓSITO DE PATENTE REFERENTE A POMADA ORABASE



27/12/2018

870180168415

17:57



29409161812185137

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 077333 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180168415

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): POMADA ORABASE COM CLOREXIDINA ANTISSEPTICO

Resumo: A presente invenção trata de uma pomada orabase com adição de micropartículas digluconato de clorexidina com maltodextrina na concentração de 0,12%. Testes realizados em laboratório comprovaram que a referida pomada apresenta importante redução dos patógenos *Staphylococcus aureus* (ATCC 15656), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), e o fungo *Candida albicans* (ATCC 26845). Além da atividade antimicrobiana, a referida pomada também apresenta ação cicatrizante e analgésica com o intuito de tratar infecções, auxiliar na mitigação dos efeitos inflamatórios e facilitar o processo de cicatrização oral.

Figura a publicar: 2

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180168415.

Dados do Inventor (72)**Inventor 1 de 7****Nome:** MICHELLINE CAVALCANTI TOSCANO DE BRITO**CPF:** 00182282406**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Ficta:** Professor do ensino superior**Endereço:** Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 961220**Fax:****Email:** michellinesperio@gmail.com**Inventor 2 de 7****Nome:** FÁBIO CORREIA SAMPAIO**CPF:** 52697096434**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Ficta:** Professor do ensino superior**Endereço:** Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 821111**Fax:****Email:** fcsampa@gmail.com.br**Inventor 3 de 7****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180169415

Nome: FÁBIO SANTOS DE SOUZA

CPF: 92771300400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiel: Professor do ensino superior

Endereço: Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 134706

Fax:

Email: souzafas1974@gmail.com

Inventor 4 de 7

Nome: LILIAN VAN DER LINDEN

CPF: 07668211454

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiel: Estudante de Graduação

Endereço: Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 986 003615

Fax:

Email: lilialinden@gmail.com

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180168415

Nome: TAYNARA BATISTA LINS MELO

CPF: 07715047481

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiel: Mastrando

Endereço: Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 410421

Fax:

Email: taynarablins@gmail.com

Inventor 6 de 7

Nome: GISELLE MEDEIROS DA COSTA ONE

CPF: 02870007450

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiel: Pesquisador

Endereço: Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 940901

Fax:

Email: giselemedeirosco@gmail.com

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180168415

Nome: RAIMUNDO APRÍGIO DE MENEZES JÚNIOR

CPF: 56922760387

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Profissional: Professor do ensino superior

Endereço: Cidade Universitária, Campus I, Prédio da INOVA-UFPB.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 297668

Fax:

Email: jmeneses@cear.utpb.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenhos.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2018 às 17:57, Petição 870180168415