

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOEMULSÃO DE CLOREXIDINE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**NATALIA HORSTMANN RISSO**

Uruguaiiana, RS, Brasil

2018

**NATALIA HORSTMANN RISSO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOEMULSÃO DE  
CLOREXIDINE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação  
Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Diego Vilibaldo Beckmann

**Uruguiana  
2018**

**NATALIA HORSTMANN RISSO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOEMULSÃO DE  
CLOREXIDINE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação  
Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Cirurgia e Neurologia de  
Pequenos Animais

Dissertação defendida e aprovada em: 23 de Março de 2018.

---

Prof. Dr. Diego Vilibaldo Beckmann  
Orientador  
PPGCA - Unipampa

---

Prof. Dra. Irina Lubeck  
Unipampa

---

Prof. Dr. Alexandre Mazzanti  
PPGMV – UFSM

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, talentos concedidos e por ser meu sustento nas adversidades. Sei que muitas vezes fui ausente contigo, agradeço por ter me protegido e guiado nestes momentos. Por proporcionar sabedoria e perseverança para a realização deste trabalho. Obrigado por ter me permitido chegar até aqui.

A minha família (a melhor família do mundo) pelo apoio incondicional, torcida e compreensão, dos inevitáveis, momentos de ausência. Agradecer por serem minha base e onde sempre irei buscar refúgio. Obrigada, eu amo vocês.

Ao meu namorado Frederico Rott, pelo carinho, afeto, respeito e amor a mim devotados. Por me inspirar dia a dia, me ajudar a trilhar meu caminho de uma maneira mais leve e muito mais feliz. Agradeço por ter te encontrado, te amo!

Aos amigos que conquistei na Unipampa, que me ajudaram a vencer adversidades. Rochelle Gorckzak pela companhia no bloco cirúrgico, que equipe! Igor e Etiele, meus colegas da cirurgia. Minhas amigas Janice Vilela e Rafaela Prestes por me transmitirem tranquilidade, serenidade e paz. Minha amiga Karen Guzmán, uma colombiana de temperamento forte mas extremamente carinhosa e afetuosa com todos, tens um lugar especial no meu coração! Minha professora e amiga Mirela Noro obrigada pelas cervejas, risadas, por nos incentivar a buscar sempre mais. Agradecer a todos vocês pelas alegrias e dores compartilhadas; fizeram destes dois anos de mestrado um período de crescimento e mudanças para mim! Obrigada por fazerem o tempo passar voando!

Aos meus estagiários, meus braços esquerdo e direito. Natalia Lazzari uma menina dedicada, organizada, atenciosa. Edilson Kelmer, dono de uma paz e tranquilidade invejáveis, uma verdadeira força para continuar. Foram horas de laboratório, biotério e experimento... sem vocês a qualidade final deste trabalho não seria a mesma. Agradecer pelo empenho e ajuda de vocês para que este trabalho fosse concluído. Obrigada!

A querida professora Cheila Stopiglia e toda a equipe do laboratório, pelo carinho, atenção e preocupação em me lembrar a microbiologia. Obrigada pelas considerações, pelo auxílio e dedicação com este trabalho.

Ao meu orientador Diego Beckmann, por ter confiado e acreditado tanto em mim, pela paciência nos momentos difíceis. Será sempre um exemplo de profissional, obrigada por

reafirmar minhas escolhas para seguir na carreira acadêmica! Cresci, e muito, com toda tua orientação!

Por último, mas não menos importante, agradecer aos animais. Por serem fonte de inspiração, aqueles que alegram meus dias e me fazem buscar mais. O motivo principal de ter iniciado, e querer sempre continuar, esta caminhada. Por vocês: dar cada vez mais valor a vida, em todas as suas manifestações!

“De nuestros miedos nacen nuestros corajes.  
De nuestras dudas nacen nuestras certezas.  
Los sueños anuncian otra realidad posible y los delirios otra razón.  
En los extravíos nos esperan hallazgos...  
porque es preciso perderse para volver a encontrarse.”  
Eduardo Galeano

## RESUMO

Antissepsia é o processo que visa a redução dos micro-organismos presentes nos tecidos vivos a níveis seguros por meio da utilização de antissépticos. Os mais utilizados são aqueles que possuem na sua composição iodóforos, clorexidina e álcool. A clorexidina é amplamente utilizada e recomendada como antisséptico de uso tópico. Entretanto relatos de resistência a este antisséptico vem se tornando cada vez mais comuns, sendo necessárias estratégias para maximizar seu efeito ou desenvolvimento de novas formulações para reduzir a resistência adquirida das bactérias. Nanoformulações são uma alternativa as formulações convencionais de antissépticos já que é possível desenvolver formulações nanoestruturadas com efeito microbicida ou microstático. Por estas razões, buscou-se sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito antisséptico e residual de nanoemulsão de base aquosa de clorexidina a 0,25% (NM-CI). Foi testado o efeito antisséptico da NM-CI mediante ensaios *in vitro* e *in vivo*. A NM-CI apresentou características físico-químicas adequadas para uma nanoemulsão e no estudo pela técnica de microdiluição foi constatado o efeito antisséptico da formulação, apresentando o melhor efeito dentre as soluções testadas. Na *Kill Curve* houve uma ação mais lenta das nanoemulsões mas que foi mantida por mais tempo quando comparada a solução de clorexidina com a molécula livre. O grupo de quatro vezes a CIM NM-CI foi a formulação com efeito mais duradouro dentre as formulações testadas, apresentando o efeito residual mais intenso e que persistiu até o T6 frente as bactérias testadas. No estudo *in vivo* ambas as formulações apresentaram redução na contagem de UFC após a realização da antissepsia na pele dos ratos (T1) ( $p < 0,0001$ ) e como não foi verificada diferença de intensidade da ação entre as formulações durante os diferentes tempos, demonstramos o poder da nanoemulsão de clorexidina como antisséptico ( $p > 0,05$ ). A formulação de NM-CI apresentou resultados satisfatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com concentrações mais baixas de clorexidina que a do produto comercial recomendado para antissepsia pré-cirúrgica. Com isso, temos uma formulação nanoestruturada com características físico-químicas adequadas, efeito antisséptico e residual superiores *in vitro* e similares *in vivo*, evidenciando uma formulação alternativa a dos produtos comerciais. Devido a diferenças no mecanismo de ação, é uma formulação que pode evadir a resistência bacteriana à Clorexidina na formulação livre, sendo uma alternativa viável e potencialmente mais barata pois apresentou mesmo efeito em menor concentração.

Palavras-chave: antisséptico, antissepsia, nanoformulação.

## ABSTRACT

Antisepsis is the process that results in reduction of microorganisms present in tissues by the use of antiseptics, the more used are those which have iodophors, chlorexidine and alcohol. Chlorexidine is widely used and recommended as a topical antiseptic but resistance reports to these antiseptic are becoming common and strategies are needed either to maximize the effect or development of new formulations to follow the mechanisms of acquired resistance of bacteria. We have in the nanoparticles an alternative, since the development of formulations with microbicide or microstatic effect is an option to conventional formulations with free molecule. The aim of this study was the characterization of an 0,25% aqueous-based chlorhexidine nanoemulsion (NM-Cl) and to evaluate by *in-vitro* and *in vivo* study its antiseptic effect. The NM-Cl presented adequate physicochemical characteristics for a nanoemulsion and presented antiseptic effect in the microdilution study, having the best effect between the tested formulations. In the Kill curve study there was a slower effect of the nanoemulsions but that was maintained for longer time when compared to chlorhexidine with free molecule. The nanoemulsion groups four-fold of MIC were the formulations with the most durable effect of those tested, presenting residual effect until T6 for both bacteria tested. At the *in vivo* study both formulations had a reduction of the microorganisms in the skin of the rats ( $p < 0.0001$ ) and as no difference of action was detected between the formulations in the tested times, we demonstrated the effect of the NM-Cl as an antiseptic ( $p > 0,05$ ). NM-Cl presented satisfactory results at *in vitro* and *in vivo* tests despite being a formulation with lower concentration of chlorexidine than the commercial formulation that is recommended for pre-surgical antisepsis. With this results, we have a nanostructured formulation with adequate physicochemical characteristics, antiseptic effect and residual antiseptic effect that are even better than the formulation with free molecule in the *in vitro* study and similar *in vivo* assay. Due to different mechanism of action, the NM-Cl has potential to avoid the resistance mechanisms of bacteria, being an alternative for formulation with free molecule. The NM-Cl is a viable antiseptic and potentially cheaper formulation, because of the similar effect with lower concentration of chlorexidine.

Keywords: antiseptic, antisepsis, nanoformulation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação das soluções de SC-Cl e NM-Cl frente ao <i>Staphylococcus epidermidis</i> nas concentrações de quatro e duas vezes a CIM, nos diferentes tempos	34
Figura 2: Ação das soluções de SC-Cl e NM-Cl frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase nas concentrações de quatro e duas vezes a CIM, nos diferentes tempos	35
Figura 3: Ação <i>in vivo</i> das soluções de SC-Cl e NM-Cl na pele de ratos Wistar, nos diferentes tempos	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de diferentes cepas bacterianas frente a Nanoemulsão de clorexidina e Clorexidina®	32
Tabela 2 : Diâmetro médio e Span das formulações	42
Tabela 3 : Resultados das determinações de potencial zeta	43
Tabela 4 : Resultado das avaliações de pH	44

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b>	12
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1. Microbiota cutânea	14
2.2. Infecções em feridas cirúrgicas	15
2.3. Antissepsia	16
2.3.1. Antissépticos	17
2.3.1.1. Clorexidina	18
2.4. Resistência a antissépticos	19
2.5. Nanotecnologia e sua utilização na microbiologia	20
2.6. Testes microbiológicos para formulações	22
3. <b>OBJETIVOS</b>	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivo específico	24
4. <b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	25
5. <b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	42
5.1. Formulação e Caracterização Físico-química das Nanoemulsões	42
5.2. Teste <i>in vivo</i> para verificar ação antisséptica da NM sobre a microbiota cutânea de ratos Wistar	44
6. <b>CONCLUSÃO</b>	45
7. <b>REFERÊNCIAS</b>	46
<b>ANEXOS</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

A prática da antissepsia foi iniciada antes mesmo da comprovação da teoria microbiana. O conceito de antissepsia é: processo que visa a redução dos micro-organismos presentes nos tecidos vivos a níveis seguros por meio da utilização de agentes antimicrobianos. Agentes antimicrobianos são soluções químicas utilizadas para destruir ou inibir a reprodução de micro-organismos, reduzindo o número de micro-organismos viáveis. Aqueles que tem ação sobre tecidos vivos são conhecidos como antissépticos e são uma importante ferramenta na prevenção de infecções.

Devido a ausência de um produto que atenda a todas as características do antisséptico ideal, a escolha geralmente é baseada no conhecimento do profissional quanto à eficácia, custo e facilidade de uso do produto. Os antissépticos mais utilizados são aqueles que possuem na sua composição iodóforos, clorexidina e álcool.

A clorexidina foi desenvolvida no ano de 1954 e tem atividade antimicrobiana através da ligação às membranas celulares microbianas, ocasionando sua ruptura. Não é inativada na presença de matéria orgânica e tem amplo espectro de ação, sendo recomendada como antisséptico de uso tópico em procedimentos invasivos, como a inserção de dispositivos intravasculares e na preparação pré-operatória para cirurgias.

No entanto, relatos de casos de resistência à clorexidina vem se tornando cada vez mais comuns, sendo necessárias estratégias para maximizar seu efeito ou o desenvolvimento de novas formulações para acompanhar a resistência adquirida das bactérias.

As nanopartículas surgiram no mercado como uma alternativa para difusão de fármacos e vem sendo empregadas em diversas áreas da medicina veterinária, incluindo a microbiologia. O desenvolvimento de formulações com efeito microbicida ou microstático é uma opção a formulações convencionais, pois devido a eficácia na entrega da molécula ao sítio alvo há uma consequente redução da dose necessária e dos efeitos adversos.

Deste modo, o presente trabalho objetivou desenvolver uma formulação nanoestruturada de clorexidina como uma alternativa a formulação de clorexidina que é uma formulação consolidada mas vem apresentando relatos de resistência devido ao amplo uso. A Nanoemulsão de Clorexidina a 0,25% foi caracterizada e foi avaliado os efeitos antisséptico e antisséptico residual. Os resultados deste estudo trazem uma formulação viável e que pode ser uma alternativa de antisséptico a ser utilizada na rotina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. MICROBIOTA CUTÂNEA

O corpo é colonizado por uma série de micro-organismos que incluem bactérias, fungos e vírus (LI et al., 2012). Estes micro-organismos constituem a microbiota cutânea e, geralmente, vivem em simbiose com o hospedeiro (GRICE; SEGRE, 2011), sendo a existência necessária para o correto funcionamento da pele como barreira, pois auxilia na modulação da resposta imune inata e previne a colonização de micro-organismos potencialmente patogênicos (WANKE et al., 2011). Há variação em número e nas espécies bacterianas encontradas dependendo da região do corpo analisada (LI et al., 2012).

As bactérias constituintes da microbiota cutânea são diferenciadas em residentes e transitórias (BIBI et al., 2015; ECHOLS et al., 2015). Bactérias residentes estão localizadas majoritariamente em camadas superficiais da epiderme e folículos pilosos (ECHOLS et al., 2015). Normalmente não são patogênicas aos hospedeiros. As bactérias residentes comumente encontradas na pele de cães são *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp. e *Pityosporum* spp. (FOSSUM, 2014); em humanos os estafilococos coagulase negativa, *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp. são os mais prevalentes (NETO et al., 2005).

A microbiota transitória é composta por agentes adquiridos por contato, localizados em camadas superficiais da pele (GUZEL et al., 2009; ECHOLS et al., 2015). Bactérias transitórias tem potencial patogênico (FOSSUM, 2014), entretanto, possuem baixa capacidade de aderência a pele e são geralmente removidas por ação mecânica (GUZEL et al., 2009; ECHOLS et al., 2015). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Enterobacter* spp. e *Clostridium* spp. são bactérias transitórias encontradas na pele de cães (FOSSUM, 2014). Já em humanos, geralmente são encontradas bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (NETO et al., 2005).

Devido a grande quantidade de micro-organismos presentes na superfície, a pele é tida como fonte primária de infecção (ALEXANDER; SOLOMKIN; EDWARDS, 2011). Com a realização da antissepsia há diminuição do número destas infecções, que são causadas pela translocação de micro-organismos da microbiota cutânea (OWENS; STOESSEL, 2008; HIDRON et al., 2011; SIDHWA; ITANI, 2015). O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias envolvidas em infecções que envolvem a translocação de microbiota cutânea (ECHOLS et al., 2015).

## 2.2. INFECÇÃO EM FERIDAS CIRÚRGICAS

Os procedimentos cirúrgicos causam diferentes graus de contaminação bacteriana (COCKSHUTT, 2007; WILLARD; SCHULZ, 2014), que pode ser oriunda de fontes exógenas ou endógenas (WILLARD; SCHULZ, 2014). Como fontes exógenas temos o ar ambiente, a equipe cirúrgica e os instrumentos cirúrgicos (COCKSHUTT, 2007). Micro-organismos endógenos são provenientes do paciente como a microbiota cutânea, do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital (COCKSHUTT, 2007; WILLARD; SCHULZ, 2014). Além disso, pode ocorrer transferência de bactérias da pele do paciente ou das mãos da equipe quando são realizados procedimentos transcutâneos invasivos, sendo uma fonte de contaminação (ECHOLS et al., 2015).

O desenvolvimento ou não da infecção depende de fatores do hospedeiro, do agente e do ambiente (COCKSHUTT, 2007; WILLARD; SCHULZ, 2014). São fatores: a virulência do agente, número de colônias bacterianas, imunocompetência do hospedeiro e fatores da ferida, como a presença de coágulos, tecido desvitalizado, acúmulo de líquido ou material estranho (COCKSHUTT, 2007; WILLARD; SCHULZ, 2014; VERWILGHEN; SINGH, 2015). Os fatores da ferida facilitam o estabelecimento da infecção por criarem um ambiente propício ao desenvolvimento das bactérias pela inibição de respostas normais do hospedeiro (WILLARD; SCHULZ, 2014).

Infecções em feridas cirúrgicas desempenham um importante papel nas complicações pós-operatórias da medicina veterinária, com frequência variável de 0,8% a 18,1%, conforme o procedimento realizado e, principalmente, o nível de contaminação da cirurgia (WEESE, 2008; FREEMAN et al., 2012). Constituem o tipo mais comum de infecções adquiridas em hospitais veterinários, tendo desenvolvimento em até 30 dias da cirurgia (COCKSHUTT, 2007; ALEXANDER; SOLOMKIN; EDWARDS, 2011).

A eliminação total dos micro-organismos da ferida cirúrgica e do campo estéril é impossível (SCHULZ, 2014; ECHOLS et al., 2015). Entretanto, a utilização de protocolos de assepsia reduz o aparecimento de infecções em feridas cirúrgicas (DAROUCHE et al., 2010). Assepsia é o conjunto de medidas adotadas que visam a redução dos micro-organismos patogênicos presentes em superfícies (SCHULZ, 2014), para prevenir o crescimento destes em local livre de contaminantes (COCKSHUTT, 2007; MORIYA; MÓDENA, 2008).

Contaminações decorrentes de fontes exógenas podem ser facilmente reduzidas com a rígida adesão a técnica cirúrgica asséptica e boa conduta na sala operatória (COCKSHUTT, 2007; ECHOLS et al., 2015), pois a técnica asséptica limita a exposição do paciente a um baixo número de micro-organismos (WILLARD; SCHULZ, 2014). A rígida adesão à técnica

cirúrgica asséptica e atraumática continua sendo aspecto determinante para a prevenção da instalação de infecções pós-operatórias (COCKSHUTT, 2007; SCHULZ, 2014).

### 2.3. ANTISSEPSIA

A prática da antissepsia já havia iniciado antes da comprovação da teoria microbiana (ECHOLS et al., 2015). Oliver Holmes, no século XIX, verificou que a febre puerperal era transmitida de uma paciente a outra pelas mãos dos médicos, e que com a utilização de produtos para a lavagem das mãos a taxa de transmissão era reduzida (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Também no mesmo século, Ignaz Semmelweis demonstrou o impacto clínico do uso de soluções cloradas para antissepsia das mãos (DA SILVA; MATTOS, 2015) e Joseph Lister demonstrou a eficácia de uma solução diluída de ácido carbólico como antisséptico na pele dos pacientes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

A antissepsia é parte do conceito de assepsia (SCHULZ, 2014) e pode ser conceituada como a prevenção da sepse por destruição ou inibição do crescimento de micro-organismos em tecidos ou fluidos corporais pela utilização de um produto antisséptico (FOSSUM, 2014). Sua realização na pele é indicada sempre que forem realizados procedimentos transcutâneos invasivos (SHMON, 2007; SIDHWA; ITANI, 2015). Tem como resultado a remoção da microbiota transitória (BIBI et al., 2015) e de grande parte das bactérias residentes (GUZEL et al., 2009), diminuindo o número de infecções causadas pela translocação de bactérias da microbiota cutânea (SIDHWA; ITANI, 2015).

Uma parcela das bactérias residentes não é eliminada, pois está em camadas muito profundas da pele onde a menor perfusão do antisséptico reduz sua eficácia, não sendo capaz de agir sobre estas bactérias (JENG; SEVERIN, 1998; SHMON, 2007; AMMIRATI, 2010; ECHOLS et al., 2015). Desta forma, a remoção completa dos micro-organismos da pele é impossível sem causar danos a sua função protetora, mas a antissepsia reduz o número de bactérias e a probabilidade de infecções (FOSSUM, 2014; SCHULZ, 2014).

Agentes antimicrobianos são soluções químicas utilizadas para destruir ou inibir a reprodução dos micro-organismos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997) consequentemente reduzindo o número viável destes (COCKSHUTT, 2007). Aqueles que apresentam ação sobre materiais inanimados são chamados de desinfetantes e os sobre tecidos vivos são conhecidos como antissépticos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Alguns antissépticos são formas diluídas de desinfetantes, onde a diluição visa diminuir o dano ao tecido vivo (COCKSHUTT, 2007).

### 2.3.1. ANTISSÉPTICOS

Antissépticos são compostos químicos inorgânicos que evitam a instalação de sepses pela inibição do crescimento bacteriano, não necessariamente apresentando efeito bactericida (FOSSUM, 2014). A variedade de soluções antissépticas comercializada é pequena, devido a episódios de contaminação e efeitos adversos de alguns produtos (VERNON, 2006).

O antisséptico ideal deve apresentar características de atoxicidade, ser hipoalergênico, não ocorrer absorção via percutânea e ter capacidade de eliminar bactérias, vírus, fungos, protozoários e esporos (MACIAS, 2013; DUMVILLE et al., 2015); são características desejáveis a rápida ação, atividade residual antimicrobiana, segurança e eficácia quando de uso contínuo (DUMVILLE et al., 2015). Para Larson (1995) e Moriya e Modena (2008) a ação persistente do antisséptico funciona para combater a proliferação de micro-organismos durante a cirurgia, já que o tempo cirúrgico é um fator de risco para o estabelecimento de infecções em feridas cirúrgicas, onde a cada 70 minutos de duração do procedimento cirúrgico o risco de infecção duplica (WILLARD; SCHULZ, 2014).

Ainda não está disponível um antisséptico que atenda a todas estas características (MACIAS, 2013). Geralmente, a escolha do antisséptico não é baseada em evidências, mas sim, no conhecimento do profissional quanto à eficácia, custo e facilidade de uso do agente (HEMANI; LEPOR, 2009). Os antissépticos mais utilizados são aqueles que possuem na sua composição iodóforos, clorexidina e álcool (MORIYA; MÓDENA, 2008; KAMEL et al., 2012; DUMVILLE et al., 2015; MACIAS, 2013).

O álcool tem amplo espectro e rápida ação, entretanto, não apresenta efeito residual e características como ser volátil e inflamável requerem a utilização de embalagens seladas para manter sua concentração nos parâmetros ideais (MANGRAM et al, 1999; SPIGELMAN; SWAN, 2005; MACIAS, 2013). O efeito germicida ocorre pela desnaturação e coagulação de proteínas dos micro-organismos (MORIYA; MODENA, 2008; DUMVILLE et al., 2015). Tem ação sobre formas vegetativas e não é eficaz contra esporos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). É rotineiramente associado a outros antissépticos (MORIYA; MODENA, 2008), principalmente pela ação imediata e remoção da matéria orgânica, aliada a persistência da ação antimicrobiana de outros antissépticos (SEAL; PAUL-CHEADLE, 2004).

O uso do iodo teve início em 1830, sendo primeiramente utilizada a formulação de tintura de iodo, que apresenta álcool na sua composição (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Reações alérgicas a esta formulação levaram ao desenvolvimento dos iodóforos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; BOYCE; PITTET, 2002; ALVAREZ et al., 2010). Larson (1995) conceitua iodóforo como uma solução onde uma molécula livre de iodo é conjugada a



substâncias que aumentam a solubilidade e também servem como reservatório. São soluções que devem permanecer em contato com a pele por, no mínimo, dois minutos para que ocorra a liberação da molécula de iodo (SHMON, 2007), tem espectro de ação considerável e apresentaram poucos casos de reações alérgicas quando comparados a tintura de iodo (WHO, 2009; ALVAREZ et al., 2010), sendo o antisséptico de eleição em muitos centros de saúde do mundo (MACIAS, 2013). O álcool aumenta a liberação de iodóforos, entretanto pode reduzir a ação persistente do composto (SHMON, 2007; MORIYA; MODENA, 2008). Os compostos a base de iodo são inativados pelo sangue ou proteínas do soro e podem ser tóxicos para recém-nascidos (BOYCE; PITTET, 2002; ALVAREZ et al., 2010).

### **2.3.1.1. CLOREXIDINA**

A clorexidina foi desenvolvida em 1954 na Inglaterra (SHMON, 2007) e teve seu uso difundido em 1970. É uma bisbiguanida catiônica que desencadeia atividade microbiana através da ligação e posterior ruptura das membranas celulares microbianas (MANGRAM et al., 1999; GILBERT; MOORE, 2005; SHMON, 2007). Não é inativada na presença de sangue ou proteínas do soro (MANGRAM et al., 1999; SHMON, 2007). É um agente antisséptico de amplo espectro utilizado para diferentes aplicações, entre elas o uso tópico no pré-operatório e inserção de dispositivos intravasculares (DAROUCHE, 2010; PRONOVOST et al., 2006; WEINSTEIN et al., 2008; O'GRADY et al., 2011; BOCK; WAND; SUTTON, 2016).

A variedade de aplicações deste fármaco é traduzida em diversas formulações comerciais com diferentes concentrações que variam de 0,02% a 4% e diferentes princípios ativos (BOCK; WAND; SUTTON, 2016). Está disponível, no Brasil, sob a fórmula de solução degermante (concentrações disponíveis de 2 ou 4%), alcoólica (concentração de 0,5%) e aquosa nas concentrações de 2%, 0,2% e 0,12% (EBSERH, 2017; MASUKAWA et al., 2016).

A solução de clorexidina a 0,5% de base alcoólica é recomendada como antisséptico tópico na antisepsia complementar do campo cirúrgico e em procedimentos transcutâneos invasivos como a colocação de cateter venoso central (EBSERH, 2017), mas também pode ser usada de forma isolada como antisséptico pré-cirúrgico para preparação do campo operatório (MASUKAWA et al., 2016). As soluções aquosas são recomendadas para as mucosas, quando houver recomendação de não usar formulações com base alcoólica (EBSERH, 2017) e também como antissépticos para a pele (MASUKAWA et al., 2016). A solução degermante a 4% é utilizada na degermação da pele e mucosas (MASUKAWA et al., 2016) e a 2% é

recomendada para antissepsia pré-operatória da equipe cirúrgica e do paciente (MASUKAWA et al., 2016; EBSEH, 2017).

O efeito residual da clorexidina na pele consiste na ligação da forma ativa com o estrato córneo (LARSON; MAYUR; LAUGHON, 1989; LARSON et al., 1995), servindo como reservatório do antisséptico, prolongando seu tempo de ação e efeito bactericida (BOYCE; PITTE, 2002; SOGAWA et al., 2010). O uso diário prolongado, como quando utilizado na antissepsia da equipe cirúrgica da rotina de hospitais, resulta em efeitos residuais prolongados e diminui as contagens bacterianas com o passar do tempo (SHMON, 2007). Esta característica poderia determinar a superioridade deste agente frente aos outros. Entretanto, os estudos que avaliaram esta ação apresentam limitações metodológicas e podem não refletir a realidade (FAOAGALI et al., 1995; SOGAWA et al., 2010).

Para Jarral et al. (2011) a clorexidina apresenta efeito mais profundo e duradouro entretanto reduções na contagem de bactérias são similares quando comparamos compostos a base de clorexidina e iodóforos. No estudo de Faoagali et al. (1995) que avaliou diversos produtos durante o período de três horas, somente a clorexidina apresentou efeito residual.

#### **2.4. RESISTÊNCIA AOS ANTISSEPTICOS**

A resistência aos antimicrobianos é um dos grandes desafios na área da saúde (RUBIN; PITOUT, 2014; GUARDABASSI; PRECOTT, 2015). A adequada concentração do produto antimicrobiano no local da infecção é necessária para que ocorra destruição ou supressão das bactérias existentes e falhas no tratamento podem ocasionar resistência (WILLARD; SHULZ, 2014). Estas falhas podem ser decorrentes do tempo inadequado de tratamento, dose ou escolha equivocada do fármaco (WILLARD; SHULZ, 2014; GUARDABASSI; PRECOTT, 2015).

Se uma parcela da população sobreviver ao tratamento, há estabelecimento de um mecanismo de resistência ao antimicrobiano, que é difundido pelos mecanismos de reprodução das bactérias (SEIL, WEBSTER, 2012). Como são micro-organismos com rápida reprodução, as resistências são facilmente difundidas e sua ocorrência vem aumentando nos últimos anos (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; RUBIN; PITOUT, 2014; GUARDABASSI; PRECOTT, 2015). Papich (2013) verificou que algumas bactérias encontradas na rotina estão apresentando multiresistência a antimicrobianos e Vali e colaboradores (2015) que a resistência a agentes biocidas e antibióticos é geralmente mediada pelo mesmo gene.

A clorexidina é um agente conhecido tanto pela sua eficiência como pela segurança no uso (BOCK; WAND; SUTTON, 2016). Entretanto, relatos de casos de resistência tanto

intrínseca, onde as bactérias Gram negativas são mais resistentes que Gram positivas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999), quanto adaptativa vem se tornando mais comuns (ABUZAID; HAMOUDA; AMYES, 2012). Por se tratar de um antisséptico amplamente utilizado, seu uso rotineiro permite níveis residuais do produto em hospitais e facilita o estabelecimento de resistências (BOCK; WAND; SUTTON, 2016).

Os mecanismos de resistência a clorexidina são as bombas de efluxo (KAMPF, 2016), a inativação do princípio ativo e as mudanças na parede celular bacteriana (POOLE, 2007). As bombas de efluxo podem ser encontradas em grande parte das bactérias (KAMPF, 2016) e são codificadas por genes que podem ser encontrados tanto nos plasmídeos quanto nos cromossomos (PIDDOCK, 2006; POOLE, 2007). Agem bombeando, de forma ativa, antibióticos e agentes biocidas como a clorexidina para fora da célula do micro-organismo (ABUZAID; HAMOUDA; AMYES, 2012; JOHNSON et al., 2015; KAMPF, 2016).

A *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é um grupo de bactérias que possuem uma série de mecanismos de resistência aos antissépticos e baixo tempo de contato e baixos níveis de concentração de algumas formulações facilitam ainda mais o estabelecimento de resistência devido a ineficácia no poder bactericida (WAND et al., 2015). Demarco et al. (2007) avaliaram um total de 147 cepas de *Staphylococcus aureus*, destas 147 33 cepas não apresentavam bomba de efluxo e 114 eram cepas conhecidas por apresentarem. Das 33 sem bomba de efluxo que foram analisadas 42% delas tiveram a capacidade de bombear o produto, mesmo sem a presença da bomba de efluxo, evidenciando outros possíveis mecanismos de resistência desta bactéria Gram positiva.

A indução da resistência se dá pela redução na concentração intracelular, resultando em níveis abaixo dos inibitórios e levando a necessidade de concentrações mais altas do produto para que ocorra atividade antimicrobiana (DEMARCO et al., 2007). Novas formulações de agentes biocidas e antibióticos são necessárias para acompanhar a resistência adquirida das bactérias aos produtos (SEIL, WEBSTER, 2012).

## **2.5. NANOTECNOLOGIA NA MICROBIOLOGIA**

A nanotecnologia vem sendo empregada em diversas áreas na medicina veterinária, incluindo a microbiologia (SAGAVE et al., 2015). Devido aos relatos de resistência microbiana a alguns produtos, o desenvolvimento de novas formulações com nanocarreadores (SAGAVE et al., 2015) que apresentem efeito bactericida e bacteriostático é campo de pesquisa (SEIL; WEBSTER, 2012).

Estudos de Sellem et al. (2009) que associaram a estreptomicina e doxiciclina a nanocarreadores e demonstrou atividade *in vivo* frente a *Brucella melitensis*, Troncarelli et al. (2013) que desenvolveram formulação de própolis com nanocarreadores para tratamento da mastite bovina e Flores et al. (2013) e Sagave et al. (2015) que desenvolveram formulações nanoparticuladas de *Melaleuca alternifolia* e testaram frente a *Trichophyton rubrum* e *Rhodococcus equi*, respectivamente, e onde as formulações nanoestruturadas demonstraram melhor ação quando comparadas as com molécula livre.

A utilização de nanomateriais com dimensões entre 1-1000 nm é conhecida como nanotecnologia (SOPPIMATH et al, 2001). A nanotecnologia pertence a uma ciência multidisciplinar com várias aplicabilidades e sua utilização como dispositivos de entrega de medicamentos é um mercado em expansão (MELO; PIMENTA, 2010).

Nanocarreadores são formulações de nanomateriais utilizadas pela indústria farmacêutica (SOPPIMATH et al, 2001; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010) com diâmetro na faixa de 10 nm a 1000nm (CABAN et al., 2014). Podem ser definidos como partículas farmacologicamente ativas com capacidade de carrear fármacos (SOPPIMATH et al, 2001; CABAN et al., 2014). São formulações de nanocarreadores: as nanocápsulas, nanoesferas e as nanoemulsões (SOPPIMATH et al, 2001; SHAKEEL et al., 2012). Nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o fármaco está em uma cavidade envolta por um invólucro polimérico (SOPPIMATH et al, 2001; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008); Nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco é fisicamente e uniformemente distribuído (SOPPIMATH et al, 2001) e nanoemulsões são nanodispersões heterogêneas nas quais um líquido (fase interna) é disperso em outro (fase externa) na forma de gotículas, estabilizadas por um filme interfacial de surfactante usualmente em combinação com moléculas cosurfactantes (SHAKEEL et al., 2012).

Formulações com nanocarreadores tendem a ser mais eficazes na entrega da molécula ao sítio alvo, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e diminuindo a dose necessária, com consequente redução dos efeitos adversos (SOPPIMATH et al, 2001; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Ainda não estão elucidados completamente os mecanismos de ação destas formulações, mas acredita-se que devido ao pequeno tamanho, nanoestruturas podem depositar mais partículas sobre a superfície sendo capazes de disponibilizar uma maior quantidade do fármaco (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). Zhou et al. (2010) e Donsi et al. (2014) demonstraram que em nanoemulsões quando o tamanho médio da gotícula é reduzido há um aumento significativo da difusão do fármaco, pois há maior

facilidade da fusão das gotículas com a parede celular do micro-organismo (BURANASUKSOMBAT et al., 2011; DONSI et al., 2014).

A escolha do tensoativo utilizado em nanoemulsões com propriedades antimicrobianas é extremamente importante (DONSI et al., 2012; DONSI et al., 2014). A alta afinidade dos tensoativos pela fase oleosa leva a altas concentrações do princípio ativo na fase aquosa e a solução tem efeito bactericida, tensoativos que apresentem afinidade intermediária liberam uma quantidade pequena de princípio ativo na fase aquosa de maneira contínua em um período de tempo longo tendo ação bacteriostática e alguns tensoativos como proteínas devem ser evitados, pois podem servir de nutrientes aos micro-organismos (DONSI et al., 2012).

## 2.6. TESTES MICROBIOLÓGICOS PARA FORMULAÇÕES

A determinação da efetividade de uma formulação com nanopartículas como um agente antimicrobiano necessita de ensaios que avaliem a viabilidade bacteriana após a exposição ao agente, e são necessárias combinações de mais de um tipo de estudo para verificar a atividade antimicrobiana das formulações com nanoestruturas, devido a possíveis respostas variáveis dos micro-organismos (SEIL; WEBSTER, 2012).

A menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um organismo é conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM), é determinada mediante a realização de diluições seriadas, que permitem testar diferentes concentrações de um fármaco e sua ação sobre o micro-organismo (que está em uma alíquota padronizada) sob as mesmas condições experimentais (QUAYUMI, 2007). Devido a possíveis variações nas condições experimentais como tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, tempo de incubação, temperatura ou pH, a reprodutibilidade do teste pode não ser a mesma sendo aceitas variações de até dois poços entre testes (TURNIDGE; FARRARO; JORGENSEN, 2003). Pode ser realizada por métodos de macrodiluição ou microdiluição (QAIYUMI, 2007)

Estudos kill curves são utilizados para avaliar a eficácia de um agente antimicrobiano frente a isolados bacterianos e sinergismo ou antagonismo entre dois fármacos (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996). Um inóculo padronizado da bactéria é incubado na presença e ausência do agente e alíquotas da solução são retiradas nos diferentes tempos para contagem das células viáveis mediante diluições seriadas (VERMA, 2007). Os resultados são expressos em gráficos onde o eixo X são os tempos e o eixo Y o número de bactérias em log<sub>10</sub> (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996).

Modelos animais são parte integrante da análise de novos antimicrobianos porque estabelecem uma conexão entre os testes *in vitro*, a atividade *in vivo* e estudos em outras

espécies (DAI et al., 2011). Todos os estudos com modelos animais devem ser conduzidos com controles dos antimicrobianos a serem testados e podem ser utilizados para verificar a toxicidade ou comportamento farmacocinético da formulação (WEEB; PAINTER, 2007).

## **OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito antisséptico e residual de nanoemulsão de clorexidina.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Desenvolver e caracterizar físicoquimicamente a nanoemulsão de clorexidina;

Avaliar o efeito antisséptico e estabelecer a Concentração Inibitória Mínima para verificar a ação da nanoemulsão de base aquosa de clorexidina a 0,25% sobre diferentes cepas bacterianas;

Avaliar o efeito antisséptico residual da nanoemulsão de base aquosa de clorexidina a 0,25% num período de 24h;

Avaliar a ação antisséptica da nanoemulsão de base aquosa de clorexidina a 0,25% sobre a pele de ratos Wistar.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que perfazem esta dissertação estão apresentados sob forma de artigo científico. As seções referentes a Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito será submetido ao periódico Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia – Qualis A2, portanto sua apresentação está no formato que será submetido ao periódico.



1 **AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOEMULSÃO DE CLOREXIDINA**  
2 ***IN VITRO* AND *IN VIVO* EVALUATION OF CHLORHEXIDINE**  
3 **NANOEMULSION**

4  
5 **Natalia Horstmann Risso<sup>1\*</sup>, Diego Vilibaldo Beckmann<sup>1</sup>**

6 <sup>1</sup>Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). BR 472 - Km 585, Campus  
7 UNIPAMPA-Uruguaiiana, Uruguaiiana, RS, Brasil. CEP: 97501-970. E-mail:  
8 nataliarissovvet@gmail.com. \*Autor para correspondência.  
9

10  
11 **RESUMO**

12 Antissepsia é o processo que visa a redução dos micro-organismos presentes nos  
13 tecidos vivos a níveis seguros por meio da utilização de antissépticos. Os mais  
14 utilizados são aqueles que possuem na sua composição iodóforos, clorexidina e álcool.  
15 A clorexidina é amplamente utilizada e recomendada como antisséptico de uso tópico.  
16 Entretanto, relatos de resistência a este antisséptico vem se tornando cada vez mais  
17 comuns, sendo necessárias estratégias para maximizar seu efeito ou desenvolvimento de  
18 novas formulações para reduzir a resistência adquirida das bactérias. Nanoformulações  
19 são uma alternativa as formulações convencionais de antissépticos já que é possível  
20 desenvolver formulações nanoestruturadas com efeito microbicida ou microstático. Por  
21 estas razões, buscou-se sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito antisséptico e residual  
22 de nanoemulsão de base aquosa de clorexidina a 0,25% (NM-CI). Foi testado o efeito  
23 antisséptico da NM-CI mediante ensaios *in vitro* e *in vivo*. A NM-CI apresentou  
24 características físico-químicas adequadas para uma nanoemulsão e no estudo pela  
25 técnica de microdiluição foi constatado o efeito antisséptico da formulação,  
26 apresentando melhor efeito dentre as soluções testadas. Na *Kill Curve* houve uma ação  
27 mais lenta das nanoemulsões mas que foi mantida por mais tempo quando comparada a  
28 solução de clorexidina com a molécula livre. Os grupos de quatro vezes a CIM NM-CI  
29 foram as formulações com efeito mais duradouro dentre as testadas, apresentando o  
30 efeito residual mais intenso e que persistiu até o T6 frente a ambas as bactérias testadas.  
31 No estudo *in vivo* ambas as formulações apresentaram redução na contagem de UFC  
32 após a realização da antissepsia na pele dos ratos (T1) ( $p < 0,0001$ ) e como não foi  
33 verificada diferença de intensidade da ação entre as formulações durante os diferentes

34 tempos, demonstramos o efeito da nanoemulsão de clorexidina como antisséptico ( $p >$   
35  $0,05$ ). A formulação de NM-Cl apresentou resultados satisfatórios tanto *in vitro* quanto  
36 *in vivo*, com concentrações mais baixas de clorexidina que a do produto comercial  
37 recomendado para antissepsia pré-cirúrgica. Com isso, temos uma formulação  
38 nanoestruturada com características físico-químicas adequadas, efeito antisséptico e  
39 residual superiores *in vitro* e similares *in vivo*, evidenciando uma formulação alternativa  
40 a dos produtos comerciais. Devido a diferenças no mecanismo de ação, é uma  
41 formulação alternativa que pode evadir a resistência bacteriana a Clorexidina na  
42 formulação livre, sendo uma alternativa viável e potencialmente mais barata pois  
43 apresentou mesmo efeito em menor concentração.

44 Palavras-chave: antisséptico, antissepsia, nanoformulação.

45

#### 46 **ABSTRACT**

47 Antisepsis is the process that results in reduction of microorganisms present in  
48 tissues by the use of antiseptics, the more used are those which have iodophors,  
49 chlorexidine and alcohol. Chlorexidine is widely used and recommended as a topical  
50 antiseptic but resistance reports to these antiseptic are becoming common and strategies  
51 are needed either to maximize the effect or development of new formulations to follow  
52 the mechanisms of acquired resistance of bacteria. We have in the nanoparticles an  
53 alternative, since the development of formulations with microbicide or microstatic  
54 effect is an option to conventional formulations with free molecule. The aim of this  
55 study was the characterization of an 0,25% aqueous-based chlorhexidine nanoemulsion  
56 (NM-Cl) and to evaluate by *in-vitro* and *in vivo* study its antiseptic effect. The NM-Cl  
57 presented adequate physicochemical characteristics for a nanoemulsion and presented  
58 antiseptic effect in the microdilution study, having the best effect between the tested  
59 formulations. In the Kill curve study there was a slower effect of the nanoemulsions but  
60 that was maintained for longer time when compared to chlorhexidine with free  
61 molecule. The nanoemulsion groups four-fold of MIC were the formulations with the  
62 most durable effect of those tested, presenting residual effect until T6 for both bacteria  
63 tested. At the *in vivo* study both formulations had a reduction of the microorganisms in  
64 the skin of the rats ( $p < 0.0001$ ) and as no difference of action was detected between the  
65 formulations in the tested times, we demonstrated the effect of the NM-Cl as an

66 antiseptic ( $p > 0,05$ ). NM-Cl presented satisfactory results at *in vitro* and *in vivo* tests  
67 despite being a formulation with lower concentration of chlorexidine than the  
68 commercial formulation that is recommended for pre-surgical antiseptis. With this  
69 results, we have a nanostructured formulation with adequate physicochemical  
70 characteristics, antiseptic effect and residual antiseptic effect that are even better than  
71 the formulation with free molecule in the *in vitro* study and similar *in vivo* assay. Due to  
72 different mechanism of action, the NM-Cl has potential to avoid the resistance  
73 mechanisms of bacteria, being an alternative for formulation with free molecule. The  
74 NM-Cl is a viable antiseptic and potentially cheaper formulation, because of the similar  
75 effect with lower concentration of chlorexidine.

76 Keywords: antiseptic, antiseptis, nanoformulation.

77

## 78 **INTRODUÇÃO**

79 O corpo é colonizado por uma série de micro-organismos, os que estão na pele  
80 constituem a microbiota cutânea e geralmente vivem em simbiose com o hospedeiro  
81 (GRICE; SEGRE, 2011), as bactérias constituintes da microbiota cutânea são  
82 diferenciadas em residentes e transitórias (ECHOLS et al., 2015). Bactérias residentes  
83 estão localizadas majoritariamente em camadas superficiais da epiderme e folículos  
84 pilosos (ECHOLS et al., 2015), normalmente não são patogênicas aos hospedeiros  
85 (FOSSUM, 2014). A microbiota transitória é composta por agentes adquiridos por  
86 contato, localizados em camadas superficiais da pele (GUZEL et al., 2009; ECHOLS et  
87 al., 2015) e são agentes com potencial patogênico (FOSSUM, 2014).

88 Infecções em feridas cirúrgicas desempenham um importante papel nas  
89 complicações pós-operatórias da medicina veterinária com frequência variável de 0,8%  
90 a 18,1% (FREEMAN et al., 2012). A antisepsia é parte do conceito de assepsia  
91 (SCHULZ, 2014) e pode ser conceituada como a prevenção da sepse por destruição ou  
92 inibição do crescimento de micro-organismos em tecidos ou fluidos corporais  
93 (FOSSUM, 2014). Sua realização na pele é indicada sempre que forem realizados  
94 procedimentos transcutâneos invasivos (SIDHWA; ITANI, 2015). Tem como resultado  
95 a remoção da microbiota transitória e de grande parte das bactérias residentes, pois a  
96 remoção completa dos micro-organismos é impossível sem causar danos a função  
97 protetora da pele (FOSSUM, 2014; SCHULZ, 2014). Esta redução diminui a

98 probabilidade de infecções causadas pela translocação de bactérias da microbiota  
99 cutânea (FOSSUM, 2014; SCHULZ, 2014; SIDHWA; ITANI, 2015).

100 Antissépticos são compostos que combatem a instalação de sepses pela inibição  
101 do crescimento bacteriano, não necessariamente apresentando efeito bactericida  
102 (FOSSUM, 2014). Os mais utilizados são aqueles que possuem na sua composição  
103 iodóforos, clorexidina e álcool (MACIAS, 2013; DUMVILLE et al., 2015). A  
104 clorexidina é um agente antisséptico de amplo espectro conhecido pela sua variedade de  
105 aplicações, eficiência e segurança no uso sendo utilizada na preparação pré-operatória  
106 para cirurgias e inserção de dispositivos intravasculares (BOCK; WAND; SUTTON,  
107 2016). Possui efeito residual pela ligação da forma ativa com o estrato córneo da pele  
108 (LARSON et al., 1995), que funciona como reservatório do antisséptico, prolongando o  
109 tempo de ação e efeito (SOGAWA et al., 2010).

110 Nanocarreadores podem ser definidos como partículas farmacologicamente  
111 ativas com capacidade de carrear fármacos (SOPPIMATH et al, 2001; CABAN et al.,  
112 2014). As nanoemulsões são dispersões heterogêneas nas quais um líquido (fase  
113 interna) é disperso em outro (fase externa) na forma de gotículas, estabilizadas por um  
114 filme interfacial de surfactante usualmente em combinação com moléculas  
115 cosurfactantes (SHAKEEL et al., 2012).

116 Relatos de casos de resistência intrínseca (MCDONNELL; RUSSELL, 1999) e  
117 adaptativa a clorexidina vem se tornando comuns (ABUZOID; HAMOUDA; AMYES,  
118 2012). Isto poderia ser justificado pelo uso rotineiro do antisséptico em hospitais,  
119 permitindo um nível residual do produto no ambiente facilitando o estabelecimento de  
120 resistências (BOCK; WAND; SUTTON, 2016). Novas formulações de agentes biocidas  
121 e antibióticos são necessárias para acompanhar a resistência adquirida das bactérias aos  
122 produtos (SEIL, WEBSTER, 2012). Macias (2013) ressalta que ainda não está  
123 disponível um antisséptico que seja ideal, portanto formulações nanoestruturadas com  
124 efeito bactericida ou bacteriostático são uma alternativa viável aos antissépticos já  
125 consolidados (SEIL; WEBSTER, 2012; SAGAVE et al., 2015).

126 O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação  
127 nanoestruturada de clorexidina como alternativa a formulação de clorexidina, que vem  
128 apresentando relatos de resistência devido ao amplo uso. A Nanoemulsão de  
129 Clorexidina a 0,25% (NM-Cl) foi caracterizada e foi avaliado os efeitos antisséptico e

130 antisséptico residual. Os resultados deste estudo trazem uma formulação viável e que  
131 poderia ser uma alternativa de antisséptico a ser utilizada na rotina.

132

### 133 **MATERIAIS E MÉTODOS**

134 O gluconato de Clorexidina<sup>®</sup>, utilizado para sintetizar a NM-Cl, foi adquirido do  
135 laboratório Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil. A solução de Clorexidina<sup>®</sup> - Riohex 0,5%  
136 base alcoólica 0,5% (SC-Cl) foi adquirida do laboratório Rioquímica, São Paulo, Brasil.  
137 Todos os meios de cultura utilizados no estudo foram provenientes do Himedia<sup>®</sup>  
138 Laboratories e o sangue de carneiro desfibrinado utilizado para o agar sangue foi  
139 proveniente do laboratório Newprov, Paraná, Brasil.

140 Os animais utilizados no estudo *in vivo* eram provenientes do Biotério Central da  
141 UFSM. Foram utilizados 20 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da  
142 linhagem *Wistar*. Os animais foram ambientados e mantidos no Biotério da Unipampa  
143 até a realização do estudo. Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de  
144 Animais da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), protocolo nº 44/2017.

145 A NM-Cl 0,25% (2,5mg/mL) e a nanoemulsão branca (mesma composição que  
146 a NM-Cl sem a presença da clorexidina) foram preparadas pelo métodos de  
147 emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004). As formulações foram  
148 caracterizadas quanto as suas propriedades físico-químicas imediatamente após o  
149 preparo. Foi determinado o diâmetro médio da gotícula mediante técnica de difração a  
150 laser utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern<sup>®</sup>). O potencial zeta pela  
151 técnica de migração eletroforética através do equipamento Nanobrook 90PlusPals  
152 (Brookhaven<sup>®</sup>). O pH foi obtido utilizando um potenciômetro (HANNA<sup>®</sup>)  
153 previamente calibrado. A quantificação e doseamento da clorexidina por cromatografia  
154 líquida de alta eficiência (CLAE) conforme metodologia descrita por Lboutounne e  
155 colaboradores (2002) e taxa de encapsulação das nanoemulsões foi obtido pelo HPLC  
156 utilizando a técnica de ultrafiltração-centrifugação descrita por Guterres e colaboradores  
157 (1995). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

158 O perfil de susceptibilidade das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC6531p,  
159 *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228, *Escherichia coli* ATC10536 e *Klebsiella*  
160 *pneumoniae* carbapenemase (Isolado clínico) frente às formulações de clorexidina foi  
161 avaliado pelo método de microdiluição em caldo, segundo o protocolo M100-S25 do

162 CLSI (CLSI, 2015). Foram avaliadas diluições seriadas das formulações de clorexidina  
163 com a molécula livre na faixa de concentração de 0,0005 µg/mL a 250 µg/mL e  
164 nanoemulsão de clorexidina (de 0,00025 µg/mL a 125 µg/mL). Todos os testes foram  
165 realizados em triplicata incluindo os controles positivo e negativo. A Concentração  
166 Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração capaz de inibir  
167 100% do crescimento microbiano.

168 O efeito residual das formulações foi avaliado em 24 horas frente ao  
169 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC1228) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
170 (Isolado clínico) pelo método de *kill curve*. Foram testadas as concentrações de duas e  
171 quatro vezes a CIM obtida para cada micro-organismo. As amostras foram coletadas  
172 nos seguintes tempos: T1 - logo após a inoculação da formulação; T2 - duas horas após  
173 a inoculação da formulação; T3- quatro horas após a inoculação da formulação; T4 -  
174 seis horas após a inoculação da formulação; T5 - oito horas após a inoculação da  
175 formulação; T6 - 12 horas após a inoculação da formulação; T7 - 24 horas após a  
176 inoculação da formulação. O ensaio foi realizado conforme o protocolo de Verma  
177 (2007).

178 Para realização das coletas os animais foram mantidos sob plano anestésico  
179 mediante anestesia inalatória com isoflurano em ambiente hospitalar durante os tempos  
180 de coleta e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle e grupo  
181 clorexidina. Aqueles que pertenciam ao grupo controle foram submetidos a avaliação da  
182 ausência da antisepsia (**G1**: controle negativo) e da Nanoemulsão branca (**G2**: controle  
183 negativo - nanocápsulas) nos antímeros esquerdo e direito, respectivamente. Os animais  
184 do grupo clorexidina foram submetidos à avaliação da solução comercial de clorexidina  
185 a 0,5% (**G3**: controle positivo) e da nanoemulsão com clorexidina (**G4**: formulação  
186 teste), nos antímeros esquerdo e direito, respectivamente.

187 Foi realizada tricotomia ampla no dorso dos animais, com o uso de tricótomo  
188 com lâmina 40, tendo como limite superior a borda das escápulas, inferior a  
189 tuberosidade isquiática e lateral os limites dorsais do animal.

190 A antisepsia foi realizada de maneira padronizada no sentido cranial-caudal em  
191 um único movimento tendo cuidado de não encostar no pelo do animal. Foram  
192 utilizadas duas gazes embebidas em 3,5mL (cada) da solução a ser testada. A  
193 antisepsia foi padronizada de forma que gaze possuísse dois lados e que cada lado da

194 gaze fosse utilizado uma única vez, o lado da gaze tinha o mesmo tamanho do antímero  
 195 do animal onde era feita a antissepsia e eram passados os dois lados no antímero  
 196 totalizando quatro movimentos. Logo após a antissepsia e nos diferentes tempos era  
 197 avaliada de maneira visual a presença ou não de irritação cutânea após a aplicação do  
 198 antisséptico por meio de verificação ou não da presença de eritema.

199 As coletas de material biológico foram realizadas em cinco tempos, sendo eles:  
 200 T0 - antes da realização da antissepsia; T1 - logo após a realização da antissepsia; T2 -  
 201 60 minutos após; T3- 120 minutos após e T4 - 180 minutos após. Foi realizada coleta  
 202 padronizada com *swab* embebido em solução fisiológica 0,9% da pele dos animais. Os  
 203 swabs foram semeados em placas contendo ágar sangue e incubadas em estufas  
 204 bacteriológicas a 37°C por 24 horas em aerobiose. A contagem manual das Unidades  
 205 Formadoras de Colônia (UFC) foi realizada conforme metodologia utilizada por Davids  
 206 et al. (2015), que utilizou como limite máximo para contagem o valor de 300 UFC.

207 A análise estatística utilizada para verificar a diferença de ação antisséptica  
 208 intergrupo e intragrupo, nos diferentes tempos, foi o teste de Kruskal-Wallis. Quando  
 209 detectada diferença foi utilizado o teste de Mann Whitney, pareando os tempos dos  
 210 grupos quando fosse detectada diferença na análise entre grupos e quando houvesse  
 211 diferença dentro do próprio grupo eram testados os tempos.

212

## 213 RESULTADOS E DISCUSSÃO

214 Os valores resultantes da suscetibilidade *in vitro* das quatro cepas analisadas são  
 215 demonstrados na Tab. 1.

216

217 TABELA 1 - Suscetibilidade *in vitro* de diferentes cepas bacterianas frente a  
 218 Nanoemulsão de clorexidina e Clorexidina®.

		Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)	
		SC – Cl	NM – Cl
Bactérias Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,004
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,015	0,002
	Média geométrica	0,021	0,003
Bactérias Gram negativas	<i>Escherichia coli</i>	0,12	0,002
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase	0,5	0,015
	Média geométrica	0,24	0,005

219

SC-Cl= Solução comercial de Clorexidina. NM-Cl= Nanoemulsão de Clorexidina. Clorexidina®= Riohex 0,5% Solução alcóolica

220

221 O uso de nanoestruturas contendo clorexidina, em comparação a clorexidina  
222 comercial apresentou atividade inibitória maior quando comparamos a média  
223 geométrica para as bactérias Gram positivas e Gram negativas ( $P < 0.05$ ). As CIM das  
224 bactérias foram inferiores frente a formulação com a NM-CI, evidenciando uma melhor  
225 ação da nanoformulação e as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as  
226 Gram negativas frente as duas formulações. Para Fossum (2014), a clorexidina tem  
227 melhor ação sobre bactérias Gram positivas, já que bactérias Gram negativas possuem  
228 mecanismos intrínsecos de resistência como a presença de membrana externa agem  
229 limitando a entrada de fármacos (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Os resultados  
230 encontrados corroboram com os achados de Fossum (2014), pois ambas as formulações  
231 tiveram maior eficácia sobre bactérias Gram positivas.

232 Dentre as bactérias Gram negativas, a *Escherichia coli* apresentou maior  
233 sensibilidade que a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). Os resultados  
234 encontrados para as bactérias Gram negativas na nanoformulação são explicados pelo  
235 estudo de McDonnell e Russell (1999) onde a *Escherichia coli* é tão suscetível a  
236 clorexidina como as bactérias Gram positivas. Quando testada frente a formulação  
237 convencional foi a bactéria Gram negativa mais sensível, entretanto sua CIM foi maior  
238 que a das bactérias Gram positivas. A KPC foi a bactéria mais resistente frente as  
239 formulações, isto pode ser justificado por mecanismos de resistência descritos por  
240 Abuzaid, Hamouda e Amyes (2012).

241 A maior sensibilidade das bactérias Gram positivas a clorexidina era esperada  
242 (FOSSUM, 2014), entretanto o *Staphylococcus aureus* foi a bactéria Gram positiva com  
243 maior CIM frente as formulações testadas e quando testada frente a formulação  
244 nanoestruturada apresentou maior resistência que a *Escherichia coli* que é uma bactéria  
245 Gram negativa. O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias envolvidas na  
246 instalação de processos infecciosos no pós-operatório (ECHOLS et al., 2015) e tem  
247 capacidade de bombear para o meio externo a molécula da clorexidina (DEMARCO et  
248 al., 2007). Este mecanismo de resistência descrito por Demarco et al. (2007) poderia  
249 justificar os resultados encontrados no presente estudo.

250 Lboutounne e colaboradores (2002) já haviam encontrado melhor ação de uma  
251 formulação de clorexidina em nanocápsulas sobre o *Staphylococcus epidermidis* quando

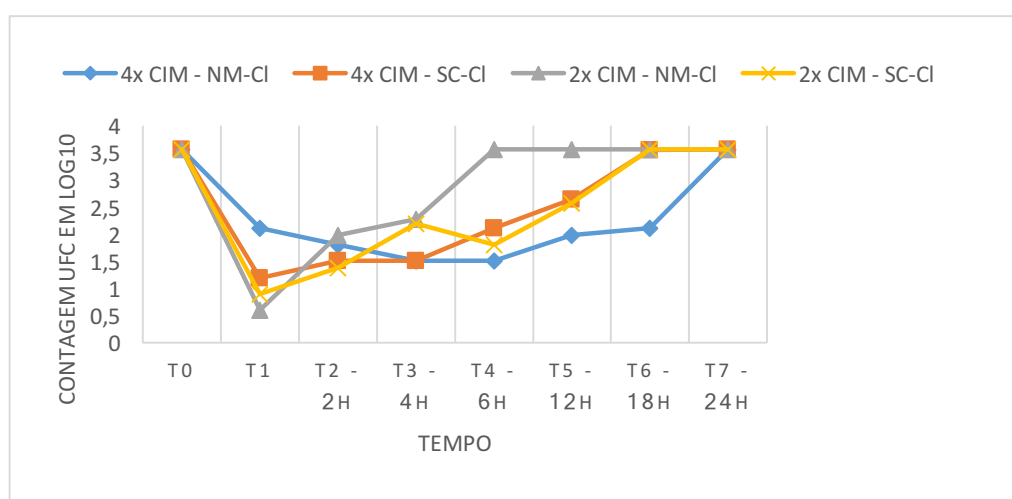


252 comparado a solução comercial. O presente estudo teve como achado que a  
 253 nanoemulsão teve melhor efeito que a formulação com a molécula livre frente a  
 254 bactérias Gram positivas e corrobora com o estudo supracitado, mesmo se tratando de  
 255 formulações diferentes. Lboutounne e colaboradores (2002) não avaliaram a ação da  
 256 formulação nanoestruturada frente a bactérias Gram negativas e Seil e Webster (2012)  
 257 ressaltam possíveis diferenças na resposta de micro-organismos Gram positivos e Gram  
 258 negativos a nanoestruturas, devendo sempre ser incluído no estudo bactérias Gram  
 259 positivas e Gram negativas, objetivo contemplado no estudo.

260 A melhor ação das formulações nanoestruturadas contendo clorexidina, quando  
 261 em comparação ao fármaco livre, pode ser justificada pela diferença nas características  
 262 físicoquímicas deste tipo de formulação (DONSI et al., 2012). A redução no tamanho da  
 263 molécula pode potencializar mecanismos de absorção celular passiva (SOPPIMATH et  
 264 al, 2001; DONSI et al., 2012), com isso, o fármaco tem maior facilidade de entrar na  
 265 célula do micro-organismo, resultando em um aumento da atividade antimicrobiana e  
 266 melhor índice terapêutico (SOPPIMATH et al, 2001; DONSI et al., 2012). Este  
 267 mecanismo de ação poderia justificar a melhor ação da NM-Cl no ensaio *in vitro*,  
 268 apresentando CIM menores que as da SC-Cl e portanto efeito bacteriostático em  
 269 menores concentrações.

270 Os resultados da *kill curve* estão esquematizados na Fig. 1 para o *Staphylococcus*  
 271 *epidermidis* e Fig. 2 para a KPC:

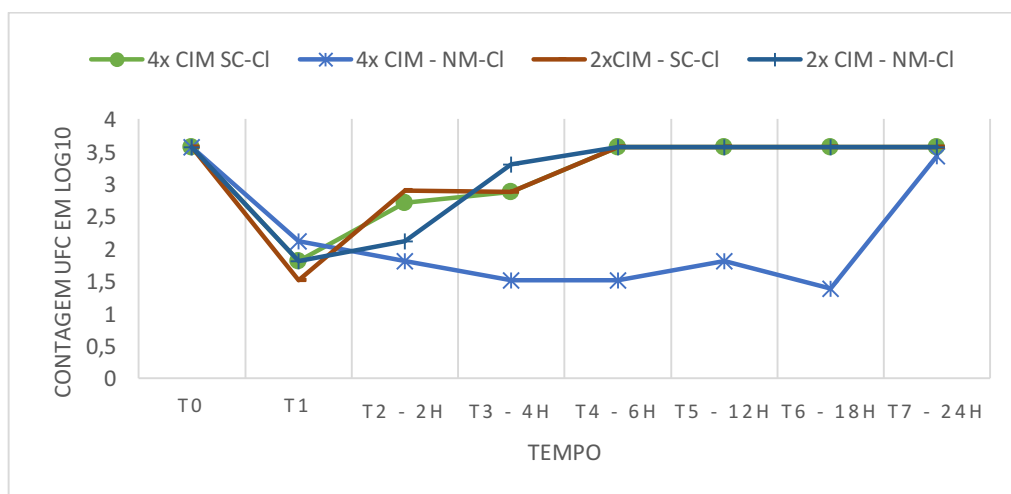
272



273

274 Figura 1: Ação das soluções de SC-Cl e NM-Cl frente ao *Staphylococcus epidermidis*  
 275 nas concentrações de quatro e duas vezes a CIM, nos diferentes tempos.

276

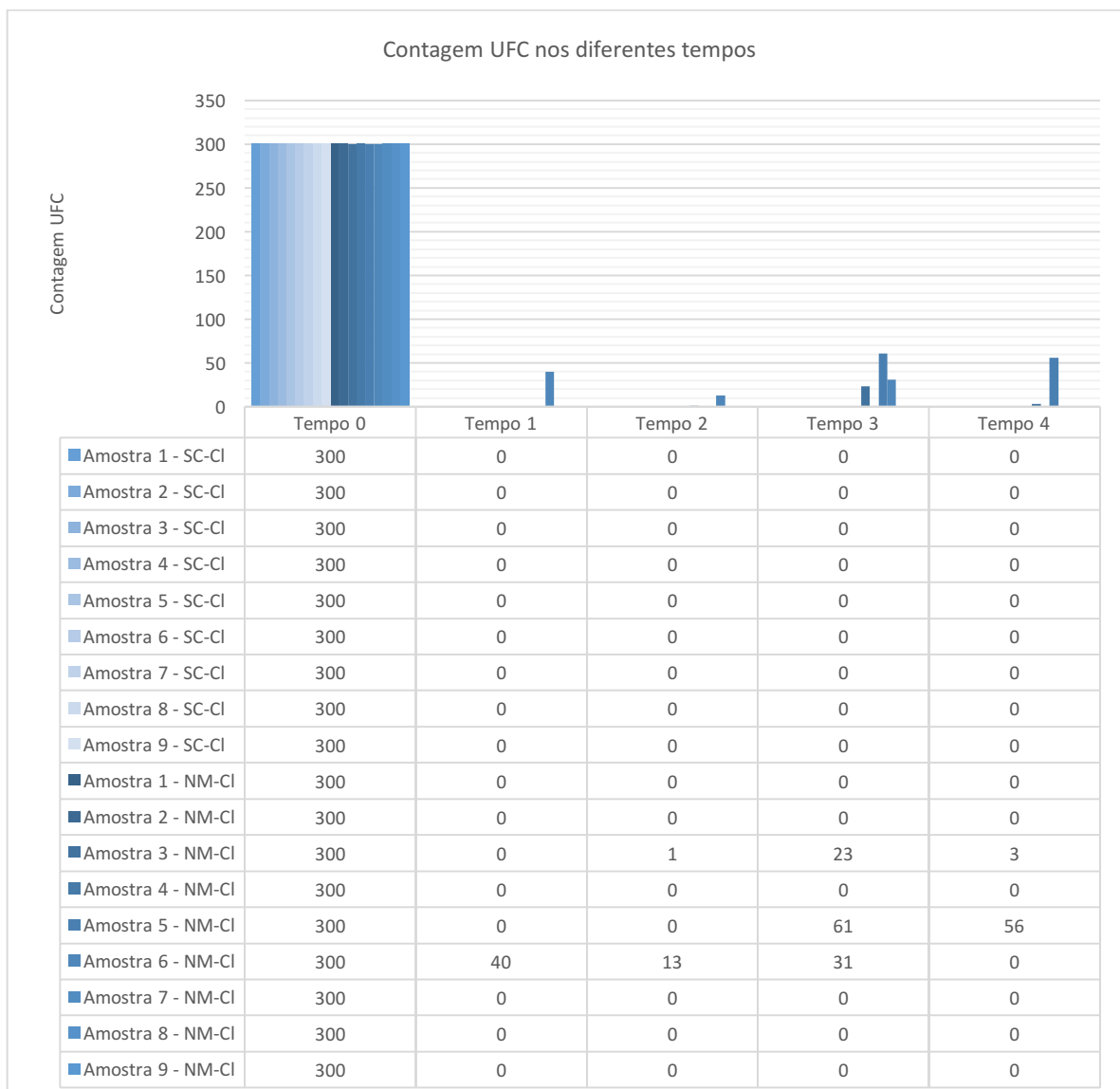


277  
 278 Figura 2: Ação das soluções de SC-Cl e NM-Cl frente a *Klebsiella pneumoniae*  
 279 carbapenemase nas concentrações de quatro e duas vezes a CIM, nos diferentes tempos.  
 280

281 No estudo de *kill curve* para as cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella*  
 282 *pneumoniae* Carbapenemase para ambas as bactérias houve uma ação mais lenta das  
 283 nanoemulsões e que foi mantida por mais tempo quando comparada a solução de  
 284 clorexidina com a molécula livre, o que pode ser explicada por Zhou et al. (2010) que  
 285 justifica a demora no início da ação das nanoemulsões por uma ligação das gotículas da  
 286 nanoemulsão na pele, formando um filme denso onde esta película permanece na pele  
 287 por um tempo maior tendo uma ação prolongada. As concentrações de quatro vezes a  
 288 CIM foram mais efetivas quando se avaliou a manutenção do efeito no tempo,  
 289 entretanto, as concentrações de duas vezes a CIM foram mais efetivas em reduzir o  
 290 número de UFC no primeiro tempo. O grupo de quatro vezes a CIM NM-Cl foi a  
 291 formulação com efeito mais duradouro dentre as formulações testadas, apresentando o  
 292 efeito residual mais intenso e que persistiu até o T6 frente a ambas as bactérias testadas.

293 Não foi verificada presença de eritema após a utilização das formulações  
 294 testadas durante todo o ensaio *in vivo*. Foi necessário retirar um animal do estudo pois  
 295 houve quebra da antisepsia, resultando em contaminação dos antímeros. Houve  
 296 crescimento em ambos os antímeros dos animais do grupo controle e não houve  
 297 diferença entre eles. Os resultados encontrados para a contagem de UFC dos nove  
 298 animais avaliados no grupo Clorexidine estão dispostos na Figura 3.

299



300  
 301 Figura 3: Avaliação da ação *in vivo* das soluções de SC-CI e NM-CI na pele de ratos  
 302 Wistar, nos diferentes tempos mediante contagem manual de UFC.  
 303

304 Ambas as formulações apresentaram redução na contagem de UFC após a  
 305 realização da antissepsia na pele dos ratos (T1) ( $p < 0,0001$ ) e como não foi verificada  
 306 diferença de intensidade da ação entre as formulações durante os diferentes tempos,  
 307 demonstramos o poder da nanoemulsão de clorexidina como antisséptico ( $p > 0,05$ ).

308 Como a NM-CI foi capaz de reduzir a contagem bacteriana após a antissepsia da  
 309 mesma forma que a SC-CI, podemos inferir que a ação da formulação a base de  
 310 nanoestruturas é similar a da SC-CI. A clorexidina é um produto antisséptico  
 311 recomendado para uso tópico, sendo utilizado na preparação pré-operatória para  
 312 cirurgias e na inserção de dispositivos intravasculares (BOCK; WAND; SUTTON,

313 2016). Desta forma, a NM-Cl é um produto com efeito antisséptico *in vivo* sobre a pele  
314 de ratos e a recomendação de uso poderia ser a mesma que a da SC-Cl já que não houve  
315 diferença de ação entre as formulações testadas.

316 Uma das possíveis vantagens da utilização de nanoestruturas é a diminuição da  
317 concentração da formulação com efeito igual ou maior ao da formulação usual como  
318 demonstrado por Lboutone (2002) na utilização de nanocápsulas de clorexidina e  
319 Sagave et al. (2015) na utilização de nanoestruturas a base de óleo vegetal. Desta forma  
320 optou-se por testar uma formulação nanoestruturada em concentração menor a da  
321 formulação já consolidada. Os achados do presente estudo corroboram com os de  
322 Lboutone (2002) e Sagave et al. (2015), pois nos ensaios *in vitro* já havia sido  
323 demonstrado o potencial antisséptico da NM-Cl, onde esta formulação apresentou efeito  
324 superior em concentrações mais baixas que a SC-Cl; também evidenciado no ensaio *in*  
325 *vivo* onde não houve diferença entre as formulações testadas sendo a NM-Cl uma  
326 solução com menor concentração. Com isso, demonstramos o efeito antisséptico de uma  
327 formulação com menor concentração que teve efeito similar a de uma já consolidada e  
328 utilizada mundialmente.

329 Optou-se por testar o efeito da NM-Cl de maneira comparativa a SC-Cl pois a  
330 solução de clorexidina a 0,5% de base alcoólica é usada tanto para antissepsia pré-  
331 cirúrgica complementar (EBSERH, 2017) quanto utilizada de forma isolada como  
332 antisséptico pré-cirúrgico para preparação do campo operatório (MASUKAWA et al.,  
333 2016). Sendo de base alcoólica, o álcool estava presente em associação a clorexidina na  
334 formulação SC-Cl e sua associação a outros antissépticos também é usual (MACIAS,  
335 2013). Esta associação é devida ao amplo espectro e rápida ação do álcool (MACIAS,  
336 2013; FOSSUM, 2014). Nas nanoemulsões não há presença do álcool na composição,  
337 pois são compostas por uma fase aquosa e outra oleosa (SHAKEEL et al., 2012). Uma  
338 alternativa para comparação poderia ser a solução aquosa de clorexidine, entretanto sua  
339 recomendação principal é o uso em para mucosas (EBSERH, 2017) e eventualmente  
340 como antissépticos pré-cirúrgico para a pele de maneira complementar (MASUKAWA  
341 et al., 2016). Desta forma o produto com base alcoólica é mais utilizado para antissepsia  
342 da pele que o base aquosa. No presente estudo, a presença do álcool na SC-Cl conforme  
343 Davids e colaboradores (2015) poderia ter potencializado o efeito antisséptico da

344 solução, entretanto esta potencialização não foi verificada e o uso da SC-Cl não  
345 apresentou vantagem frente a utilização da NM-Cl.

346 A resistência antimicrobiana a clorexidina (ABUZAID; HAMOUDA; AMYES,  
347 2012; KAMPF, 2016) que é um dos produtos antissépticos mais utilizados (BOCK;  
348 WAND; SUTTON, 2016) justificam estudos que avaliem a ação antisséptica de outras  
349 formulações para estabelecimento de alternativas a formulações já conceituadas e que  
350 venham apresentando problemas (ECHOLS et al., 2015) com indução de resistência  
351 pelo uso indiscriminado devido ao amplo uso (KAMPF, 2016). Considerando a recente  
352 problemática de resistências a clorexidina e de posse dos resultados obtidos,  
353 salientamos o potencial uso da NM-Cl como antisséptico, pois apresentou efeito nos  
354 ensaios *in vitro* e *in vivo*. Kampf (2016) recomenda a utilização de antissépticos que  
355 possuam mecanismos de ação diferentes para evadir a resistência adquirida das  
356 bactérias. As nanoformulações possuem mecanismos de ação diferentes pela presença  
357 de nanoestruturas (SOPPIMATH et al, 2001; DONSI et al., 2012).

358

## 359 **CONCLUSÕES**

360 A nova formulação de NM-Cl apresentou resultados satisfatórios tanto *in vitro*  
361 quanto *in vivo*, com concentrações mais baixas de clorexidina que a do produto  
362 comercial recomendado para antissepsia pré-cirúrgica. Com isso, temos uma  
363 formulação nanoestruturada com características físico-químicas adequadas, efeito  
364 antisséptico e residual superiores *in vitro* e similares *in vivo*, evidenciando uma  
365 formulação alternativa a dos produtos comerciais. Devido a diferenças no mecanismo  
366 de ação, é uma formulação alternativa que pode evadir a resistência bacteriana a  
367 Clorexidina na formulação livre, sendo uma alternativa viável e potencialmente mais  
368 barata pois apresentou mesmo efeito em menor concentração. Estudos farmacológicos  
369 futuros avaliando diferentes concentrações de clorexidina em diferentes formulações  
370 nanoestruturadas, avaliando mecanismos de penetração e potenciais de toxicidade das  
371 formulações em células cutâneas quando do uso tópico deverão ser conduzidos.

372

## 373 **REFERÊNCIAS:**

- 374 ABUZOID, A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S.G. Klebsiella pneumoniae susceptibility  
375 to biocides and its association with cepA, qacDeltaE and qacE efflux pump genes and  
376 antibiotic resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 2, p. 87-91, 2012.
- 377 BOCK, L. J.; WAND, M. E.; SUTTON, J. M. Varying activity of chlorhexidine-based  
378 disinfectants against Klebsiella pneumoniae clinical isolates and adapted  
379 strains. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 1, p. 42-48, 2016.
- 380 BOUCHEMAL, Kawthar et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous  
381 emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of**  
382 **pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.
- 383 CABAN, S. et al. Nanosystems for drug delivery. **Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 2, 2014.
- 384 CLSI. **Performace Standarts for antimicrobial susceptibility Testing**; Twenty-  
385 Fifthin formation Supplement. Pennsylvania, 2015. 240p.
- 386 DAVIDS, Benjamin I. et al. Efficacy of Mechanical versus Non-Mechanical Sterile  
387 Preoperative Skin Preparation With Chlorhexidine Gluconate 4% Solution. **Veterinary**  
388 **Surgery**, v. 44, n. 5, p. 648-652, 2015.
- 389 DEMARCO, Carmen E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and  
390 biocides in bloodstream isolates of Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and**  
391 **chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235-3239, 2007.
- 392 DONSI, Francesco et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural  
393 antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-  
394 350, 2012.
- 395 DUMVILLE, Jo C. et al. Preoperative skin antiseptics for preventing surgical wound  
396 infections after clean surgery. **The Cochrane Library**, 2015.
- 397 EBSEH. Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares. **Protocolo/Antissépticos**  
398 **Padronizados** – Unidade de Vigilância em Saúde e Qualidade Hospitalar/Setor de  
399 Vigilância em Saúde e Segurança do Paciente do HC-UFTM, Uberaba, 2017. 15p.
- 400 ECHOLS, Kathryn et al. Role of antiseptics in the prevention of surgical site  
401 infections. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 6, p. 667-676, 2015.
- 402 FOSSUM, T.W. Preparação do campo pré-operatório. In: **Cirurgia de pequenos**  
403 **animais**. FOSSUM, T.W. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2014. p. 156-172.

- 404 FREEMAN, K. D. et al. Post-operative infection, pyrexia and perioperative  
405 antimicrobial drug use in surgical colic patients. **Equine veterinary journal**, v. 44, n. 4,  
406 p. 476-481, 2012.
- 407 GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9,  
408 n. 4, p. 244, 2011.
- 409 GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I.  
410 Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1,  
411 p. 57-63, 1995.
- 412 KAMPF, G. Acquired resistance to chlorhexidine—is it time to establish an ‘antiseptic  
413 stewardship’ initiative?. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 213-227, 2016.
- 414 LARSON, Elaine L. et al. APIC guidelines for handwashing and hand antisepsis in  
415 health care settings. **American journal of infection control**, v. 23, n. 4, p. 251-269,  
416 1995.
- 417 LBOUTOUNNE, Hassan et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of  
418 chlorhexidine in poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a  
419 digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2, p. 319-334, 2002.
- 420 MACIAS, Juan H. et al. Chlorhexidine is a better antiseptic than povidone iodine and  
421 sodium hypochlorite because of its substantive effect. **American journal of infection  
422 control**, v. 41, n. 7, p. 634-637, 2013.
- 423 MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and  
424 resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.
- 425 SCHULZ, K.S. Princípios de assepsia cirúrgica. In: **Cirurgia de pequenos animais**.  
426 FOSSUM, T.W. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2014. p. 1-7.
- 427 SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de Melaleuca alternifolia e terpinen-  
428 4-ol em isolados de Rhodococcus equi. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e  
429 Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.
- 430 SEIL, J.T.; WEBSTER, T.J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods  
431 and literature. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2767, 2012.
- 432 SHAKEEL, Faiyaz et al. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and  
433 dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. **Expert opinion on drug  
434 delivery**, v. 9, n. 8, p. 953-974, 2012.

- 435 SIDHWA, F.; ITANI, K.M.F. Skin preparation before surgery: options and  
436 evidence. **Surgical infections**, v. 16, n. 1, p. 14-23, 2015.
- 437 SOGAWA, Yoshiro et al. Comparison of residual antimicrobial activity of  
438 chlorhexidine-containing antiseptics: an express report. **J Healthc Infect**, v. 3, n. 2, p.  
439 74-78, 2010.
- 440 SOPPIMATH, Kumaresh S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug  
441 delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.
- 442 VERMA, P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial  
443 interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In:  
444 SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. **Antimicrobial**  
445 **susceptibility testing protocols**, Florida: CRC Press, 2007 p. 285-290.
- 446 ZHOU, Huafeng et al. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a  
447 topical delivery system. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 1, p. 224, 2010.
- 448
- 449



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química das formulações e outros resultados que não serão enviados a publicação estão abaixo esquematizados.

### 4.1. Formulação e Caracterização Físico-química das Nanoemulsões:

Os diâmetros médios das gotículas e os valores de Span (índice de polidispersão) obtidos para as nanoemulsões preparadas neste estudo estão descritos na Tab. 2:

**Tabela 2.** Diâmetro médio e Span das formulações.

	NM – BR	NM – Clorex
	165	342
<b>Diâmetro (nm)</b>	164	345
	166	343
<b>Média (nm)</b>	<b>165</b>	<b>343</b>
<b>Desvio padrão</b>	1	1,527525
	1,317	1,351
<b>SPAN</b>	1,315	1,356
	1,313	1,352
<b>Média</b>	<b>1,315</b>	<b>1,353</b>
<b>Desvio padrão</b>	0,002	0,002643

Ambas as formulações apresentaram as gotículas dentro dos valores desejados de 10 a 1000 nm conforme Soppimath et al. (2001) e para Driscoll (2006) gotículas de nanoemulsões que apresentem o diâmetro médio entre 200 e 500 nm tendem a ser fisicamente mais estáveis, diâmetro observado nas gotículas da nanoemulsão de clorexidina.

O tamanho médio de gotícula da nanoemulsão com clorexidina foi maior que a da nanoemulsão controle porque o diâmetro é influenciado pela composição qualitativa e quantitativa, onde a incorporação de um fármaco na fase oleosa pode modificar o diâmetro significativamente (BRUXEL et al., 2012). A composição da interface e quantidades de tensoativos e cotensoativos também poderia interferir no diâmetro da gotícula (MARTINI et al., 2011; BRUXEL et al., 2012) mas como as composições das nanoemulsões são iguais à excessão da clorexidina esta afirmação pode ser descartada.

Os valores de Span obtidos para as nanoemulsões produzidas foram considerados adequados e refletem estreita distribuição no tamanho das partículas, tendo em vista que permaneceram inferiores a 2 para ambas as formulações (GOMES et al., 2018).

Os valores do potencial zeta apresentaram-se positivos para NM-Cl ( $15,57 \pm 1,73$  mV) e negativo para NM-Br ( $-23,8 \pm 0,6$  mV), estão apresentados na Tab. 3.

**Tabela 3.** Resultados das determinações de potencial zeta.

	NM- Br	NM-Clorex
	-24,43	13,76
(mV)	-23,87	19,93
	-23,1	13,93
<b>Média (mV)</b>	-23,8	15,57
<b>DP</b>	0,6677574	1,73

O potencial zeta é a análise do potencial elétrico de superfície, desempenha papel importante para a estabilização de nanoemulsões pois reflete o potencial superficial das gotículas (BRUXEL et al., 2012). Para Guterres et al. (2007) sua avaliação é importante tanto para determinar a estabilidade física da suspensão como para determinar a eficácia do revestimento de superfície ou adsorção dos fármacos nos sistemas.

Para Shaffazick et al. (2003) quanto mais distante de zero for o potencial zeta mais estável é a formulação, desta forma poderíamos pressupor que ambas as formulações estão distantes de zero e seriam estáveis.

O potencial elétrico é influenciado pelas características de superfície das nanopartículas e varia conforme a utilização de diversos componentes como polímeros, tensoativos (SHAFFAZICK et al., 2003) grau de ionização do agente emulsificante e é pH dependente (BRUXEL et al., 2012). Variações conforme a utilização de diferentes tensoativos e o grau de ionização do agente emulsificante não justificam a diferença no potencial zeta de ambas as formulações, pois a composição delas é a mesma a exceção do fármaco Clorexidina. A ocorrência de potencial zeta positivo quando da inclusão da clorexidina em sistemas nanoparticulados já foi previamente descrita na literatura, como nos estudos de Lbouttone et al. (2002) e (2004), que justificaram esta diferença devido a carga da molécula da clorexidina.

A análise do potencial zeta também pode ser utilizada para estudar e avaliar a ativação, aglutinação e adesão celular, sendo diretamente relacionadas com propriedades de carga de superfície (ZHANG et al., 2008). Para Durán-Lobato et al. (2014) potencial zeta positivo poderia facilitar a interação com a membrana celular pela diferença de cargas, possibilitando

maior afinidade entre a partícula-membrana e conseqüentemente maior interação com o fármaco. Desta forma, o potencial zeta positivo da nanoemulsão poderia ser uma questão que facilitaria sua ação.

O potencial zeta é dependente do pH e reduções no potencial zeta resultam em diminuição da carga de superfície e taxa de floculação mais rápida (BRUXEL et al., 2012; SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014). O pH das formulações está descrito na Tab. 4.

**Tabela 4.** Resultados das avaliações de pH

	NM- Br	NM-Clorex
<b>pH</b>	6,8	7,5
	6,8	7,3
	6,7	7,6
<b>Média</b>	6,76667	7,46667
<b>DP</b>	0,05774	0,15275

Houve diferença entre os pH das formulações e esta variação também poderia justificar a diferença no potencial zeta entre ambas as formulações conforme Bruxel et al. (2012).

O doseamento da clorexidina nas NMs foi próximo de 80% e a taxa de encapsulação foi de 70% valores próximos aos encontrados no estudo de Gomes et al. (2018).

#### **4.2. Teste *in vivo* para verificar ação antisséptica da NM sobre a microbiota cutânea de ratos Wistar:**

A maior difusão tecidual é uma característica desejada em um antisséptico já que uma parte da microbiota cutânea é encontrada nas camadas mais profundas da pele (AMMIRATI, 2010; ECHOLS et al., 2015) e o fármaco em formulação livre não tem alta eficácia neste local (ECHOLS et al., 2015) permanecendo uma parcela de bactérias viáveis (AMMIRATI, 2010). Clares (2014) testou diversos sistemas nanométricos e encontrou que as nanoemulsões são os que possuem capacidade de penetrar mais na pele quando do uso tópico, sendo uma boa alternativa a formulação com a molécula livre. Entretanto não foi avaliada a capacidade de penetração da nanoemulsão de clorexidina.

## CONCLUSÃO

A nova formulação de NM-Cl apresentou resultados satisfatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com concentrações mais baixas de clorexidina que a do produto comercial recomendado para antissepsia pré-cirúrgica. Com isso, temos uma formulação nanoestruturada com características físico-químicas adequadas, efeito antisséptico e residual superiores *in vitro* e similares *in vivo*, evidenciando uma formulação alternativa a dos produtos comerciais. Devido a diferenças no mecanismo de ação, é uma formulação alternativa que pode evadir a resistência bacteriana a Clorexidina na formulação livre, sendo uma alternativa viável e potencialmente mais barata pois apresentou mesmo efeito em menor concentração. Estudos farmacológicos futuros avaliando diferentes concentrações de clorexidina em diferentes formulações nanoestruturadas, avaliando mecanismos de penetração e potenciais de toxicidade das formulações em células cutâneas quando do uso tópico deverão ser conduzidos.

## REFERÊNCIAS

- ABUZOID, A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S.G. Klebsiella pneumoniae susceptibility to biocides and its association with cepA, qacDeltaE and qacE efflux pump genes and antibiotic resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 2, p. 87-91, 2012.
- ALEXANDER, J. W.; SOLOMKIN, J.S.; EDWARDS, M.J. Updated recommendations for control of surgical site infections. **Annals of surgery**, v. 253, n. 6, p. 1082-1093, 2011.
- ALLEGIANZI, Benedetta et al. Religion and culture: potential undercurrents influencing hand hygiene promotion in health care. **American journal of infection control**, v. 37, n. 1, p. 28-34, 2009.
- ALVAREZ, Jose A. et al. Povidone-iodine against sodium hypochlorite as skin antiseptics in volunteers. **American journal of infection control**, v. 38, n. 10, p. 822-825, 2010.
- AMMIRATI CT, Aseptic technique. In: Robinson JK, Hanke CW, Siegel DM, Fratila A, editors. Surgery of the skin: procedural dermatology (2nd ed). **St. Louis, MO: Elsevier**, 2010; pp. 29–41.
- ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- ASTM Standard D5465, 2012, “Standard Practice for Determining Microbial Colony counts from Waters Analyzed by Plating Methods,” ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012, 10.1520/D5465-93R12, www.astm.org
- BIBI, Safia et al. Is chlorhexidine-gluconate superior than Povidone-Iodine in preventing surgical site infections? A multicenter study. **JPMA**, v. 65, p. 1197, 2015.
- BOCK, L. J.; WAND, M. E.; SUTTON, J. M. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against Klebsiella pneumoniae clinical isolates and adapted strains. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 1, p. 42-48, 2016.
- BOUCHEMAL, Kawthar et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.
- BOYCE, J.M.; PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. **American journal of infection control**, v. 30, n. 8, p. S1-S46, 2002.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Adaptive resistance to biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 73-78, 2004.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BURANASUKSOMBAT, Umaporn et al. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 793-800, 2011.

CABAN, S. et al. Nanosystems for drug delivery. **Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 2, 2014.

CHATTOPADHYAY, Debrasad et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: Mallotus peltatus leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2-3, p. 229-237, 2002.

CLARES, Beatriz et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. **International journal of pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p. 591-598, 2014.

CLSI. **Performace Standarts for antimicrobial susceptibillity Testing**; Twenty-Fifthin formation Supplement. Pennsylvania, 2015. 240p.

COCKSHUTT, J. Princípios de assepsia cirúrgica. In: **Manual de cirurgia de pequenos animais**. SLATTER, D.H. 1. ed. São Paulo: Manole. cap.10, 2007. p 149-151. 1 v.

DAI, Tianhong et al. Animal models of external traumatic wound infections. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 296-315, 2011.

DA SILVA, M. R.; MATTOS, A.D.M. Ignaz Semmelweis e a febre puerperal: algumas razões para a não aceitação de sua hipótese. **Filosofia e História da Biologia**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 85-98, 2015.

DAROUICHE, Rabih O. et al. Chlorhexidine–alcohol versus povidone–iodine for surgical-site antisepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 1, p. 18-26, 2010.

DAVIDS, Benjamin I. et al. Efficacy of Mechanical versus Non-Mechanical Sterile Preoperative Skin Preparation With Chlorhexidine Gluconate 4% Solution. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 5, p. 648-652, 2015.

DEMARCO, Carmen E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235-3239, 2007.

DE MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 09-22, 2010.

DONSI, Francesco et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

DONSI, Francesco et al. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 212-220, 2014.

DURÁN-LOBATO, Matilde et al. Enhanced cellular uptake and biodistribution of a synthetic cannabinoid loaded in surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1068-1079, 2014.

DRISCOLL, David F. Lipid injectable emulsions: pharmacopeial and safety issues. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 9, p. 1959, 2006.

DUMVILLE, Jo C. et al. Preoperative skin antiseptics for preventing surgical wound infections after clean surgery. **The Cochrane Library**, 2015.

EBSERH. Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares. **Protocolo/Antissépticos Padronizados** – Unidade de Vigilância em Saúde e Qualidade Hospitalar/Setor de Vigilância em Saúde e Segurança do Paciente do HC-UFTM, Uberaba, 2017. 15p. Disponível em: <<http://www.ebserh.gov.br/documents/147715/0/antissepticos+padronizados+4.pdf/21ee21c1-fddf-4edf-9de4-194f3e1ccec6>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

ECHOLS, Kathryn et al. Role of antiseptics in the prevention of surgical site infections. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 6, p. 667-676, 2015.

ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial combinations, in **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Lorain, V., Ed., Williams Wilkins Co., Baltimore, 1996, pp. 330–396.

FAOAGALI, Joan et al. Comparison of the immediate, residual, and cumulative antibacterial effects of Novaderm R, Novascrub R, Betadine Surgical Scrub, Hibiclens, and liquid soap. **American journal of infection control**, v. 23, n. 6, p. 337-343, 1995.

FLORES, F. C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281-286, 2013.

FREEMAN, K. D. et al. Post-operative infection, pyrexia and perioperative antimicrobial drug use in surgical colic patients. **Equine veterinary journal**, v. 44, n. 4, p. 476-481, 2012.

FOSSUM, T.W. Preparação do campo pré-operatório. In: **Cirurgia de pequenos animais**. FOSSUM, T.W. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2014. p. 156-172.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 4, p. 703-715, 2005.

GOMES, Graziela Scheuer et al. Optimization of curcuma oil/quinine-loaded nanocapsules for malaria treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 551-564, 2018.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244, 2011.

GUARDABASSI, L.; PRESCOTT, J.F. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 2, p. 361-376, 2015.

GUTERRES, Sílvia S.; ALVES, Marta P.; POHLMANN, Adriana R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug target insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

GUZEL, Aslan et al. Evaluation of the skin flora after chlorhexidine and povidone-iodine preparation in neurosurgical practice. **Surgical neurology**, v. 71, n. 2, p. 207-210, 2009.

HANIGAN, W.C.; RAGEN, W.; LUDGERA, S.M. Neurological Surgery in the Nineteenth Century The Principles and Techniques of Ernst von Bergmann. **Neurosurgery**, v. 30, n. 5, p. 750-757, 1992.

HEMANI, M.L.; LEPOR, H. Skin preparation for the prevention of surgical site infection: which agent is best. **Rev Urol**, v. 11, n. 4, p. 190-195, 2009.

HIDRON, Alicia et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

JARRAL, Omar A. et al. Should surgeons scrub with chlorhexidine or iodine prior to surgery?. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 12, n. 6, p. 1017-1021, 2011.

JENG, D.K.; SEVERIN, J.E. Povidone iodine gel alcohol: a 30-second, onetime application preoperative skin preparation. **American journal of infection control**, v. 26, n. 5, p. 488-494, 1998.

JOHNSON, Ryan C. et al. Recurrent methicillin-resistant Staphylococcus aureus cutaneous abscesses and selection of reduced chlorhexidine susceptibility during chlorhexidine use. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3677-3682, 2015.

KAMPF, G. Acquired resistance to chlorhexidine—is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative?. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 213-227, 2016.

KAMPF, G.; KRAMER, A. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 863-893, 2004.

KAMEL, Chris et al. Preoperative skin antiseptic preparations for preventing surgical site infections: a systematic review. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 06, p. 608-617, 2012.



KOLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, n. 2, p. 106-113, 2002.

LARSON, Elaine L. et al. APIC guidelines for handwashing and hand antisepsis in health care settings. **American journal of infection control**, v. 23, n. 4, p. 251-269, 1995.

LARSON, E.; MAYUR, K.; LAUGHON, B.A. Influence of two handwashing frequencies on reduction in colonizing flora with three handwashing products used by health care personnel. **American Journal of Infection Control**, v. 17, n. 2, p. 83-88, 1989.

LBOUTOUNNE, Hassan et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2, p. 319-334, 2002.

LBOUTOUNNE, Hassan et al. Characterization of transport of chlorhexidine-loaded nanocapsules through hairless and wistar rat skin. **Skin pharmacology and physiology**, v. 17, n. 4, p. 176-182, 2004.

LI, Kelvin et al. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e32118, 2012.

LONGTIN, Yves et al. Hand hygiene. **N Engl J Med**, v. 364, n. 13, p. e24, 2011.

MACIAS, Juan H. et al. Chlorhexidine is a better antiseptic than povidone iodine and sodium hypochlorite because of its substantive effect. **American journal of infection control**, v. 41, n. 7, p. 634-637, 2013.

MANGRAM, Alicia J. et al. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. **American journal of infection control**, v. 27, n. 2, p. 97-134, 1999.

MARTINI, Érico et al. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 280-286, 2008.

MASUKAWA, Ivete et al. Produtos para antissepsia de pele e mucosas. POP nº 14- SCIH/HU Disponível em: <<http://www.hu.ufsc.br/setores/ccih/wpcontent/uploads/sites/16/2016/05/POP-14-produtos-OFICIAL.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MISHRA, B. B. T. S.; PATEL, Bhavesh B.; TIWARI, Sanjay. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010.

MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 41, n. 3, p. 265-273, 2008..

NETO, José Antônio et al. Anti-sépticos e técnicas de anti-sepsia: atualização. **HU rev**, v. 31, n. 1/2, p. 28-33, 2005.

O'GRADY, Naomi P. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. e162-e193, 2011.

OWENS, C. D.; STOESSEL, K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, p. 3-10, 2008.

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles-an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v.9, n. 035004, p.1- 7, 2008.

PAPICH, M.G. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p. 1091-1107, 2013.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Descobrimos o mundo microbiano IN: **Microbiologia: conceitos e aplicações** v. 1. 2. ed. PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. p. 1-11.

PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629, 2006.

PRONOVOST, Peter et al. An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2725-2732, 2006.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of medicine**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

QAIYUMI, S. Macro- and Microdilution Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing . In: SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. In: **Antimicrobial susceptibility testing protocols**, Florida: CRC Press, 2007 p. 75-80.

RAMYADEVI, Jeyaraman et al. Copper nanoparticles synthesized by polyol process used to control hematophagous parasites. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1403-1415, 2011.

RUBIN, J.E.; PITOUT, J.D.D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Veterinary microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 10-18, 2014.

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de Melaleuca alternifolia e terpinen-4-ol em isolados de Rhodococcus equi. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737, 2003.**

SCHUH, R.S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H.F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1193-1198, 2014

SCHULZ, K.S. Princípios de assepsia cirúrgica. In: **Cirurgia de pequenos animais**. FOSSUM, T.W. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2014. p. 1-7.

SEAL, L.A.; PAUL-CHEADLE, D. A systems approach to preoperative surgical patient skin preparation. **American journal of infection control**, v. 32, n. 2, p. 57-62, 2004.

SEIL, J.T.; WEBSTER, T.J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2767, 2012.

SELEEM, Mohamed N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 24-31, 2009.

SHAKEEL, Faiyaz et al. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, n. 8, p. 953-974, 2012.

SHEPARD, Martin J. et al. Immunogenicity of bovine parainfluenza type 3 virus proteins encapsulated in nanoparticle vaccines, following intranasal administration to mice. **Research in veterinary science**, v. 74, n. 2, p. 187-190, 2003.

SHMON, C. Avaliação e preparação do paciente e da equipe cirúrgica. In: **Manual de cirurgia de pequenos animais**. SLATTER, D.H. São Paulo: Manole, 2007. p.169. v 1.

SIDHWA, F.; ITANI, K.M.F. Skin preparation before surgery: options and evidence. **Surgical infections**, v. 16, n. 1, p. 14-23, 2015.

SOGAWA, Yoshiro et al. Comparison of residual antimicrobial activity of chlorhexidine-containing antiseptics: an express report. **J Healthc Infect**, v. 3, n. 2, p. 74-78, 2010.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of colloid and interface science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SOPPIMATH, Kumares S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SPIGELMAN, A.D.; SWAN, J.R. Skin antiseptics and the risk of operating theatre fires. **ANZ journal of surgery**, v. 75, n. 7, p. 556-558, 2005.

TRONCARELLI, Marcella Zampoli et al. Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 124-136, 2013.

TURNIDGE, J.D., FARRARO, M. J. AND JORGENSEN, J.H. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 2003, 1102-

1107.

VALI, Leila et al. *Klebsiella oxytoca* with reduced sensitivity to chlorhexidine isolated from a diabetic foot ulcer. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 34, p. 112-116, 2015.

VERMA, P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In: SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**, Florida: CRC Press, 2007 p. 285-290.

VERNON, Michael O. et al. Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit: the effectiveness of source control to reduce the bioburden of vancomycin-resistant enterococci. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 3, p. 306-312, 2006.

VERWILGHEN, D.; SINGH, A. Fighting surgical site infections in small animals: are we getting anywhere?. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 2, p. 243-276, 2015.

WAND, Matthew E. et al. Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3966-3972, 2015.

WANKE, Ines et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 382-390, 2011.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; SICKBERT-BENNETT, E.E. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4217-4224, 2007.

WEEB, C.D.; PAINTER, B.G. Clinical Microbiology in the Development of New Antimicrobial Agents In: **Antimicrobial susceptibility testing protocols**, Florida: CRC Press, 2007 p. 388-389.

WEESE, J. S. A review of post-operative infections in veterinary orthopaedic surgery. **Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology**, v. 21, n. 02, p. 99-105, 2008.

WEINSTEIN, Robert A. et al. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 274-281, 2008.

WILLARD, M.D.; SCHULZ, K.S. Infecções cirúrgicas. In: **Cirurgia de pequenos animais**. FOSSUM, T.W. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2014. p. 269-270.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge. Clean care is safer care**. World Health Organization, 2009.

ZHANG, Hong Yao et al. A lipid microsphere vehicle for vinorelbine: Stability, safety and pharmacokinetics. **International journal of pharmaceutics**, v. 348, n. 1-2, p. 70-79, 2008.

ZHANG, Zijie et al. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food chemistry**, v. 150, p. 307-312, 2014.

ZHOU, Huafeng et al. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 1, p. 224, 2010.