

NANOCÁPSULAS DE CLOREXIDINE NA ANTISSEPSIA CIRÚRGICA

Edilson Kelmer ¹

Edilson Luiz Kelmer ²

Natalia Horstmann Risso ³

Diego Vilibaldo Beckmann ⁴

Marília Teresa de Oliveira ⁵

Sandra Elisa Haas ⁶

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia ⁷

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-Cl). Foi testado o efeito antisséptico da NM-Cl mediante ensaios in vitro e in vivo. A NM-Cl 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. No estudo in vivo ambas as formulações apresentaram redução na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após a realização da antissepsia na pele dos ratos. Como não foi verificada diferença de intensidade da ação entre as formulações durante os diferentes tempos da fase experimental, demonstramos o poder da nanoemulsão de clorexidina como antisséptico. A 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 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: Nanocápsulas, Clorexidine, Antissepsia cirúrgica

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

NANOCÁPSULAS DE CLOREXIDINE NA ANTISSEPSIA CIRÚRGICA

¹ Aluno de graduação. edilsonkermervet@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. edilsonkermervet@gmail.com. Apresentador

³ Mestra/residente. nataliarissoveto@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. diegobeckmann@unipampa.edu.br. Orientador

⁵ Docente. mariliaoliveira@unipampa.edu.br. Co-orientador

⁶ Docente. sandrahaas@unipampa.edu.br. Co-orientador

⁷ Docente. cheilastopiglia@unipampa.edu.br. Co-orientador



NANOCÁPSULAS DE CLOREXIDINE NA ANTISSEPSE CIRÚRGICA

INTRODUÇÃO

O corpo é colonizado por uma série de micro-organismos, os que estão na pele constituem a microbiota cutânea e geralmente vivem em simbiose com o hospedeiro (GRICE; SEGRE, 2011), as bactérias constituintes da microbiota cutânea são diferenciadas em residentes e transitórias (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 (FOSSUM, 2014). A microbiota transitória é composta por agentes adquiridos por contato, localizados em camadas superficiais da pele (GUZEL et al., 2009; ECHOLS et al., 2015) e são agentes com potencial patogênico (FOSSUM, 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% (FREEMAN et al., 2012). A antisepsia 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 (FOSSUM, 2014). Sua realização na pele é indicada sempre que forem realizados procedimentos transcutâneos invasivos (SIDHWA; ITANI, 2015). Tem como resultado a remoção da microbiota transitória e de grande parte das bactérias residentes, pois a remoção completa dos micro-organismos é impossível sem causar danos a função protetora da pele (FOSSUM, 2014; SCHULZ, 2014). Esta redução diminui a probabilidade de infecções causadas pela translocação de bactérias da microbiota cutânea (FOSSUM, 2014; SCHULZ, 2014; SIDHWA; ITANI, 2015).

Antissépticos são compostos que combatem a instalação de sepses pela inibição do crescimento bacteriano, não necessariamente apresentando efeito bactericida (FOSSUM, 2014). Os mais utilizados são aqueles que possuem na sua composição iodóforos, clorexidina e álcool (MACIAS, 2013; DUMVILLE et al., 2015). A clorexidina é um agente antisséptico de amplo espectro conhecido pela sua variedade de aplicações, eficiência e segurança no uso sendo utilizada na preparação pré-operatória para cirurgias e inserção de dispositivos intravasculares (BOCK; WAND; SUTTON, 2016). Possui efeito residual pela ligação da forma ativa com o estrato córneo da pele (LARSON et al., 1995), que funciona como reservatório do antisséptico, prolongando o tempo de ação e efeito (SOGAWA et al., 2010). Nanocarreadores podem ser definidos como partículas farmacologicamente ativas com capacidade de carrear fármacos (SOPPIMATH et al., 2001; CABAN et al., 2014).

As nanoemulsões são dispersões 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). Relatos de casos de resistência intrínseca (MCDONNELL; RUSSELL, 1999) e adaptativa a clorexidina vem se tornando comuns (ABUZOID; HAMOUDA; AMYES, 2012). Isto poderia ser justificado pelo uso rotineiro do antisséptico em hospitais, permitindo um nível residual do produto no ambiente facilitando o estabelecimento de resistências (BOCK;

WAND; SUTTON, 2016). Novas formulações de agentes biocidas e antibióticos são necessárias para acompanhar a resistência adquirida das bactérias aos produtos (SEIL, WEBSTER, 2012). Macias (2013) ressalta que ainda não está disponível um antisséptico que seja ideal, portanto formulações nanoestruturadas com efeito bactericida ou bacteriostático são uma alternativa viável aos antissépticos já consolidados (SEIL; WEBSTER, 2012; SAGAVE et al., 2015).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação nanoestruturada de clorexidina como alternativa a formulação de clorexidina, que vem apresentando relatos de resistência devido ao amplo uso. A Nanoemulsão de Clorexidina a 0,25% (NM-Cl) foi caracterizada e foi avaliado os efeitos antisséptico e antisséptico residual. Os resultados deste estudo trazem uma formulação viável e que poderia ser uma alternativa de antisséptico a ser utilizada na rotina.

METODOLOGIA

Para a realização do projeto foram utilizados gluconato de clorexidina sintetizada em nanoemulsão 0,25% (2,5mg/mL), solução alcoólica de clorexidina 0,5%, meios de cultura e sangue de carneiro desfibrinado utilizado para o agar sangue. O estudo em vivo foi realizado em 20 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar. Os animais foram mantidos no biotério da Unipampa até a realização do estudo. Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), protocolo nº 44/2017. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram testadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* frente às formulações de clorexidina para avaliar o perfil de susceptibilidade. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo, segundo o protocolo M100-S25 do CLSI (CLSI, 2015). Os testes foram realizados através de diluição seriada das formulações de clorexidina com molécula livre e nanoemulsão de clorexidina. Foi realizada triplicata de todos os testes incluindo os controles positivo e negativo. A Concentração Inibitória Mínima foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento microbiano (CIM). O efeito residual das formulações foi avaliado em 24 horas para *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella pneumoniae*. Foram testadas as concentrações de duas a quatro vezes a CIM obtida para cada micro-organismo. Os animais foram distribuídos em dois grupos aleatoriamente. O grupo controle constituído pelos subgrupos G1, ausência de antissepsia e G2, nanoemulsão sem clorexidina; e o grupo Clorexidina constituído pelos subgrupos G3, clorexidina solução comercial, e G4 nanoemulsão com clorexidina (formulação testada). Em ambiente hospitalar os animais foram submetidos à anestesia inalatória para a realização das coletas. Foi feita tricotomia ampla na região dorsal dos animais. A antissepsia foi realizada de forma padronizada em sentido cranial-caudal com gazes embebidas em 3,5mL (cada) da solução a ser testada. A coleta foi realizada nos antímeros esquerdo e direito respectivamente com swab embebido em solução fisiológica 0,9%. Foram estipulados cinco tempos de coleta de amostras, sendo T0 - antes da realização da antissepsia; T1 - logo após a realização da antissepsia; T2 - 60 minutos após; T3- 120 minutos após e T4 - 180 minutos após. Os swabs foram semeados em placas contendo ágar sangue e incubados em estufas bacteriológicas a 37°C por 24 horas em aerobiose. As unidades formadoras de colônia foram realizadas de forma manual conforme a metodologia utilizada por DAVIDS et al. (2005). Foi feita análise analítica para verificar a diferença de ação antisséptica entre os subgrupos G1, G2, G3 e G4 dos grupos controle e clorexidina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de nanoestruturas contendo clorexidina, em comparação a clorexidina comercial apresentou atividade inibitória maior quando comparamos a média geométrica para as bactérias Gram positivas e Gram negativas ($P < 0.05$). As CIM das bactérias foram inferiores frente a formulação com a NM-Cl, evidenciando uma melhor ação da nanoformulação e as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as Gram negativas frente as duas formulações. Dentre as bactérias Gram negativas, a *Escherichia coli* apresentou maior sensibilidade que a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). Quando testada frente à formulação convencional foi a bactéria Gram negativa mais sensível, entretanto sua CIM foi maior que a das bactérias Gram positivas. A KPC foi a bactéria mais resistente frente às formulações, entretanto o *Staphylococcus aureus* foi a bactéria Gram positiva com maior CIM frente as formulações testadas e quando testada frente a formulação nanoestruturada apresentou maior resistência que a *Escherichia coli* que é uma bactéria Gram negativa. O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias envolvidas na instalação de processos infecciosos no pós-operatório. O presente estudo teve como achado que a nanoemulsão teve melhor efeito que a formulação com a molécula livre frente a bactérias Gram positivas e corrobora com o estudo supracitado, mesmo se tratando de formulações diferentes. Ambas as formulações apresentaram redução na contagem de UFC após a realização da antisepsia 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 ($p > 0,05$). Como a NM-Cl foi capaz de reduzir a contagem bacteriana após a antisepsia da mesma forma que a SC-Cl, podemos inferir que a ação da formulação a base de nanoestruturas é similar a da SC-Cl. Com isso, demonstramos o efeito antisséptico de uma formulação com menor concentração que teve efeito similar a de uma já consolidada e utilizada mundialmente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 antisepsia 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

ABUZAIID, 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.

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.

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

CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility Testing; Twenty-Fifth Information Supplement. Pennsylvania, 2015. 240p.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.