

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

MARIA DAGMAR DA ROCHA GASPAR

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA COM APLICAÇÃO
POTENCIAL NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

PONTA GROSSA

2020

MARIA DAGMAR DA ROCHA GASPAR

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA COM APLICAÇÃO
POTENCIAL NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

G249 Gaspar, Maria Dagmar da Rocha
Desenvolvimento tecnológico e avaliação *in vitro* de nanocápsulas poliméricas contendo clorexidina com aplicação potencial na prevenção de infecções respiratórias / Maria Dagmar da Rocha Gaspar. Ponta Grossa, 2020. 85 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.
Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Mendes Nadal.

1. Prevenção & controle. 2. Clorexidina. 3. Fármacos antibacterianos. 4. Nanocápsulas. I. Farago, Paulo Vitor. II. Nadal, Jessica Mendes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

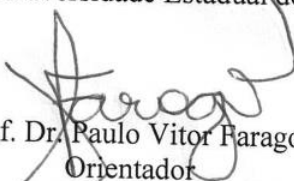
CDD: 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

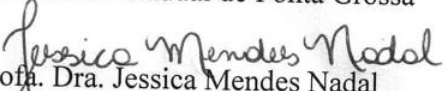
MARIA DAGMAR DA ROCHA GASPAR

Título: DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA COM APLICAÇÃO POTENCIAL NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

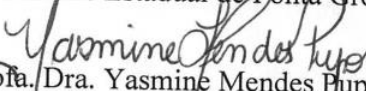
Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

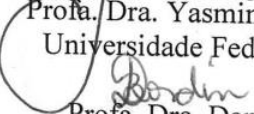

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Orientador

Universidade Estadual de Ponta Grossa

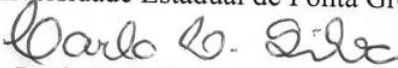

Prof. Dra. Jessica Mendes Nadal
Coorientadora

Universidade Estadual de Ponta Grossa

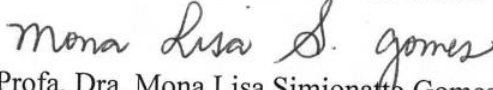

Prof. Dra. Yasmine Mendes Pupo
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dra. Danielle Bordin

Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dra. Carla Luiza da Silva

Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dra. Mona Lisa Simionatto Gomes
Centro Universitário Cesumar

Ponta Grossa, 17 de abril de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado aos meus tios, Manoel do Nascimento Rocha, Teresinha Maria da Rocha e Maria Dacruz de Carvalho, pela admirável colaboração em incentivar e patrocinar os meus estudos desde o ensino fundamental à graduação. Gratidão.

Ao meu filho, Guilherme Rocha Gaspar, aos meus irmãos, José, Domingos, Francisca, Manoel, Joana D'arc e Diomar e aos meus pais, Antônio e Francisca, por me apoiarem e me amarem de uma maneira tão sublime. Esta construção só foi possível com o apoio de vocês que possibilitaram o meu crescimento enquanto pessoa e profissional.

A Deus e à Nossa Senhora da Conceição Aparecida, (minha protetora), por todas as bênçãos derramadas sobre mim nos momentos mais conflitantes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pesquisador de mais alto nível, pela oportunidade concedida para a realização deste doutorado e, principalmente, pela confiança em mim depositada, desde o momento em que tive o interesse em adentrar no programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Você ensinou e me estimulou a seguir cada vez mais por caminhos que desconhecia, neste universo sem volta que é o conhecimento. O meu muito obrigada.

À minha coorientadora, Prof^ª. Dra Jessica Mendes Nadal, por dedicar incansavelmente grande parte do seu valioso tempo me ajudando para que as etapas dos experimentos fossem desenvolvidas e discutidas. As palavras não são capazes de expressar todo o meu sentimento de gratidão. Espero, um dia, poder retribuir ao menos um pouco por tudo o que me ensinou e fez por mim.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas. Estendo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Fábio André dos Santos e aos pós-graduandos de Odontologia da UEPG, Mariane Aparecida Savi Sanson, Daniele Huller, Leomar Emanuel Almeida Mecca e à graduanda Larissa Ranthum, pelo apoio, colaboração e ajuda nos ensaios de cultivo celular. Cada encontro com vocês foi uma oportunidade de aprender ainda mais sobre a vida e o viver como pesquisador. Obrigada de coração!

Meus mais sinceros agradecimentos à Enfemeira Leticia Waselcoski Moresco que, em 2016, como residente do Programa Saúde do Adulto e Idoso e estagiária no Serviço de Infecção do Hospital Regional Universitário dos Campos Gerais, auxiliou-me durante o processo de seleção do doutorado, você foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À Profa Carmen Sanches Ito, do Departamento de Análise Clínica e responsável técnica do Laboratório de Microbiologia Clínica da UEPG, pela realização dos ensaios microbiológicos de atividade antimicrobiana das nanocápsulas poliméricas contendo clorexidina.

Às pós-graduandas, Débora Maria Borsato e Mona Lisa Simionatto Gomes, pelo auxílio com os ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*. Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho, em especial, à Elizabete Munhoz, à Luzia Chaves Simão e à Luciane Mendes.

À pós-graduanda em Ciências Farmacêuticas, Amanda Lyra Martinéz, meus sinceros agradecimentos por contribuir e ajudar em uma das partes mais complexa da pesquisa que

correspondeu ao desenvolvimento e validação do método de UHPLC-PDA para a determinação da clorexidina nas nanocápsulas poliméricas.

As minhas queridas amigas e colegas do Departamento de Enfermagem e Saúde Pública da UEPG, Marlene Harger Zimmermann, Caroline Gonçalves Pustiglione Campos, Sandra Maria Bastos Pires, Elaine Cristina Antunes Rinaldi e ao meu colega e amigo-filho, Guilherme Arcaro, por me fazerem ver a grandeza do momento vivido no doutorado e ajudar com suas valiosas contribuições.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por todo apoio no desenvolvimento das análises de caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo clorexidina. À Universidade Estadual de Ponta Grossa, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por permitir esta oportunidade de crescimento técnico-científico. Aos ilustríssimos professores membros das bancas de qualificação e de defesa, por terem gentilmente aceitado o convite em participar destes momentos tão importantes e pelas valiosas contribuições prestadas.

Às Enfermeiras do Núcleo de Epidemiologia e Controle de Infecção do Hospital Regional Universitário dos Campos Gerais, Eveline Wille Bayer e Stellamaris Cordeiro Silvestre, pela ajuda na conclusão da tese.

Ao meu filho amado, Guilherme Rocha Gaspar, que me revela a cada encontro a força do amor que existe entre nós, força que não sou capaz de explicar, apenas sentir. Amo-te infinitamente! Estendo a minha gratidão à Thais de Fátima Borges, minha futura nora, pelos momentos de descontração que me proporcionou relaxar e retomar a escrita com a certeza de que seria capaz de realizar o meu sonho. Em especial, ao Laudemir Machado de Lima, por todo suporte emocional, compreensão, capacidade de expressar o amor e se dedicar carinhosamente durante os momentos de angústia e cansaço ao longo deste percurso.

.

“A porta do templo da sabedoria é o conhecimento de nossa própria ignorância”

Bejamim Franklin

RESUMO

Nos pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI), o uso do tubo orotraqueal garante a estabilidade hemodinâmica, entretanto facilita a adesão de microrganismos nos tecidos bucais, favorecendo o desenvolvimento de pneumonias. Para o controle da formação de biofilmes torna-se essencial a higienização bucal com o uso de antisséptico. Com o propósito de prevenir infecções respiratórias, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar suspensões de nanocápsulas contendo clorexidina, preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, a partir do polímero Eudragit® RS 100. O método analítico por cromatografia líquida de ultra alta performance foi desenvolvido e validado para a quantificação da clorexidina presente nas nanocápsulas. As formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação superiores a 99%. As nanocápsulas obtidas apresentaram valor de pH de 6,8, com tamanho médio de partículas inferior a 150 nm e potencial zeta de +22,4 mV. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelaram formato esférico e com superfície lisa. As análises efetuadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier demonstraram que não ocorreram reações químicas entre o fármaco e o polímero. Os resultados obtidos por difração de raios X e de calorimetria exploratória diferencial revelaram a ausência de cristalinidade do fármaco nas nanocápsulas carregadas, evidenciando sua característica amorfa, em comparação ao polímero e ao fármaco. As formulações apresentaram parâmetros de estabilidade aceitáveis após 60 dias de armazenamento. O sistema polimérico permitiu a liberação modificada da clorexidina. A atividade antimicrobiana das nanocápsulas com clorexidina foi avaliada frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (cepa sensível), *Klebsiella pneumoniae* (cepa resistente - produtora de beta-lactamase de espectro ampliado), *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Estes resultados demonstraram que a incorporação da clorexidina no sistema nanoestruturado mantém a sua atividade antibacteriana. O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* não revelou letalidade (CL50 de 1483,4 µg.mL⁻¹) o que indica ausência de toxicidade. Os estudos *in vitro* de cultivo celular utilizando linhagens 3T3, mostraram que, nas concentrações analisadas, as formulações desenvolvidas não apresentaram potencial citotóxico. Os resultados sugerem que o uso de nanopartículas de clorexidina pode ser uma estratégia promissora na prevenção de infecções do sistema respiratório no ambiente hospitalar, necessitando estudos pré-clínicos e clínicos complementares.

Palavras-chave: Fármacos antibacterianos. Nanocápsulas. Prevenção & controle. Clorexidina.

ABSTRACT

In patients admitted to the intensive care unit (ICU), the use of the orotracheal tube guarantees hemodynamic stability, however it facilitates the adhesion of microorganisms in oral tissues, favoring the development of pneumonia. To control the formation of biofilms, oral hygiene with the use of antiseptic is essential. In order to prevent respiratory infections, the aim of this study was to develop and to evaluate suspensions of nanocapsules containing chlorhexidine obtained by the interfacial deposition method of the preformed polymer using Eudragit® RS 100. The analytical method by high performance liquid chromatography (UHPLC) was developed and validated for the quantification of the chlorhexidine into the nanocapsules. The formulations presented encapsulation efficiency values higher than 99%. The obtained nanocapsules presented pH value of 6.8 with average particle size less than 150 nm and zeta potential of +22.4 mV. The images obtained by scanning electron microscopy revealed spherical, shape and smooth surface and homogeneity of the nanocapsules. Fourier transform infrared spectroscopy showed that there were no chemical reactions between the drug and the polymer. The results obtained by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry revealed the absence of drug crystallinity of the loaded nanocapsules, which confirmed its amorphous character, comparing to the polymer and the drug. The formulations presented acceptable stability parameters after 60 days of storage. The antimicrobial activity of chlorhexidine loaded nanocapsules was evaluated against: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (sensitive strain), *Klebsiella pneumoniae* (resistant strain -extended-spectrum *B*-lactamase-producing), *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and these results demonstrated that the chlorhexidine loaded nanosystem kept its antibacterial activity. The acute toxicity test using *Artemia salina* showed no lethality (LC₅₀ of 1483.4 µg/mL) which indicated no toxicity. *In vitro* cell culture studies using 3T3 lines showed that the analyzed concentrations, the formulations developed showed no cytotoxic potential. The results suggest that the use of chlorhexidine nanoparticles may be a promising strategy in the prevention of respiratory system infections in the hospital. However, more preclinical and clinical trials are required.

Keywords: Antibacterial drugs. Nanocapsules. Prevention & control. Chlorhexidine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática da formação do biofilme no tubo endotraqueal utilizado nos pacientes submetidos à ventilação mecânica.....	25
Figura 2	– Patogênese da pneumonia relacionada à assistência à saúde.....	29
Figura 3	– Estrutura química da clorexidina base.....	31
Figura 4	– Representação esquemática das nanocápsulas e das nanoesferas poliméricas.	37
Figura 5	– Estrutura química do poli (ácido metacrílico-co-metacrilato de metila).....	38
Figura 6	– Fluxograma da pesquisa.....	42
Figura 7	– Representação do método de obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	44
Figura 8	– Esquema de diluição seriada.....	53
Figura 9	– Esquema de inoculação.....	54
Figura 10	– Cromatograma da clorexidina base (CLX base) (20 µg.mL ⁻¹).....	56
Figura 11	– Cromatograma da formulação NANO_0.....	57
Figura 12	– Cromatograma da formulação NANO_CLX.....	57
Figura 13	– Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da CLX obtida em UHPLC ($\lambda = 258$ nm).....	58
Figura 14	– Aspectos morfológicos da clorexidina base pura (a) e do Eudragit® RS100 (b) por MEV-FEG, aumento de 5 kx e 1 kx, respectivamente.....	62
Figura 15	– Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas poliméricas NANO_0 (a) e NANO_CLX (b), em aumento de 4kx.....	63
Figura 16	– Espectro FTIR do polímero (EUD RS100), da clorexidina base pura (CLX), da mistura física (MF): CLX + EUD RS100 (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas NANO_CLX e NANO_0.....	64
Figura 17	– Difratomogramas da clorexidina base pura (a) e do polímero Eudragit® RS 100 (b).....	66
Figura 18	– Difratomogramas da CLX base pura, do polímero EUD RS 100, da mistura física (MF, CLX: EUD RS 100, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX).....	67
Figura 19	– Curvas de TGA: A) CLX base pura, do polímero EUD RS100 e da mistura física (MF, CLX: EUD RS100, 1:1 m/m) e B) da lactose e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX).....	68

Figura 20	– Termogramas obtidos por DSC da CLX base pura, do polímero EUD RS 100, da mistura física (MF, CLX: EUD RS100, 1:1 m/m), da lactose e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX).....	69
Figura 21	– Liberação in vitro da CLX base pura e da nanopartícula polimérica contendo clorexidina (CLX).....	70
Figura 22	– Viabilidade celular pelo método de redução do MTT avaliada para a clorexidina base pura (CLX pura) e para as formulações NANO_0 e NANO_CLX usando a linhagem celular de fibroblastos 3T3 após os períodos de incubação de: A) 24 horas B) 48 horas e C) 72 horas.....	72
Figura 23	– Viabilidade celular pelo método do vermelho neutro (VN), avaliada para a clorexidina base pura (CLX pura) e para as formulações NANO_0 e NANO_CLX, usando a linhagem celular de fibroblastos 3T3, após os períodos de incubação de: A) 24 horas B) 48 horas e C) 72 horas.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição de formulações das nanocápsulas poliméricas com e sem clorexidina, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado	43
Tabela 2	– Resultados obtidos por ANOVA para a linearidade do método analítico.....	58
Tabela 3	– Resultados obtidos para os ensaios de precisão do método analítico.....	59
Tabela 4	– Porcentagem de recuperação e DPR obtidos a partir da análise de exatidão (n= 3)	59
Tabela 5	– Teor de clorexidina encapsulada e eficiência de encapsulação (n = 3)	60
Tabela 6	– Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas sem o fármaco (NANO_0) e com o fármaco (NANO_CLX) (n=3) segundo pH, tamanho de partícula (nm) e potencial Zeta (mV)	61
Tabela 7	– Estabilidade das nanopartículas poliméricas sem o fármaco (NANO_0) e com o fármaco (NANO_CLX) (n=3) após 60 dias de armazenamento em relação ao pH, tamanho da partícula (nm) e potencial Zeta (mV)	71
Tabela 8	– Mortalidade média* de Artemia salina, de acordo com as concentrações de NANO_CLX testadas após 24 h de exposição	74
Tabela 9	– Distribuição das CIMs ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CBMs ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das formulações NANO-CLX, CLX e CLX comercial testadas contra cepas de referência ATCC	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CBM	Concentração bacteriana mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Concentração letal
CLX	Clorexidina base
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Centers for Disease Control and Institute
CO ₂	Gás carbônico ou dióxido de carbono
CV%	Coeficiente de variação percentual
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Análise por difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Etilcelulose

EE	Eficiência de encapsulação
EPS	Exopolissacarídes
ETT	Tubo Endotraqueal
EUD	Eudragit® RS 100
FDA	Food and Drug Administration
ISC	Infecção de sitio cirúrgico
IPD	Índice de polidispersão
IPCS	Infecção primária de corrente sanguínea
ITU	Infecção do trato urinário
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo
MF	Mistura física
$\overline{M_w}$	Massa molar numérica média
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico
NANO_0	Suspensões de nanocápsulas sem clorexidina
NANO_CLX	Suspensões de nanocápsulas de clorexidina
PAH	Pneumonia adquirida no hospital
PAV	Pneumonia associada à ventilação
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Poli (β -hidroxibutirato)

PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(D,L-ácido lático- <i>co</i> -ácido glicólico)
ppm	Partes por milhão
PICBA	Acetato de celulose, poli(isobutilcianoacrilato)
PIHCA	Poli(<i>iso</i> -hexilcianoacrilato)
PZ	Potencial zeta
QS	<i>Quorum Sensing</i>
<i>R</i>	Coeficiente de correlação
SFB	Soro fetal bovino
Span [®] 80	Monooleato de sorbitano
TGCM	Triglicerídeos de cadeia média
Tween [®] 80	Polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
λ	Comprimento de onda
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta performance
UFC/mL	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VN	Vermelho Neutro
v/v	Porcentagem volumétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 BIOFILMES E SUAS IMPLICAÇÕES NA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS.....	23
3.2 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS.....	26
3.3 CLOREXIDINA BASE.....	30
3.3.1 Propriedades da Clorexidina	31
3.3.1.1 Substantividade.....	31
3.3.1.2 Eficácia.....	32
3.3.1.3 Segurança.....	32
3.3.1.4 Espectro de ação.....	33
3.3.1.5 Indicações e posologia.....	33
3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	35
3.4.1 Poli (metacrilatos) Eudragit®	36
3.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO CLOREXIDINA.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 EQUIPAMENTOS	39
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	39
4.2.1 Fármaco	39
4.2.2 Polímeros	39
4.2.3 Água Purificada	40
4.2.4 Reagentes e Meios Usados no Cultivo Celular	40
4.2.5 Outros Reagentes e Solventes	40
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	40
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
4.4.1 Obtenção Das Suspensões de Nanocápsulas Contendo Clorexidina.....	42

4.4.1.1 Obtenção da mistura física.....	43
4.4.2 Determinação da CLX Incorporada às Nanocápsulas Poliméricas e Eficiência de Encapsulação.....	43
4.4.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por UHPLC.....	44
4.4.2.1.1 Equipamentos e condições cromatográficas.....	44
4.4.2.1.2 Validação do método para a quantificação da clorexidina incorporado às nanocápsulas.....	44
4.4.2.1.3 Análise estatística da validação do método analítico por UHPLC.....	45
4.4.3 Caracterização das Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas.....	45
4.4.3.1 Determinação do pH.....	45
4.4.3.2 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta	46
4.4.3.3 Análise morfológica e de superfície por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG)	46
4.4.3.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	46
4.4.3.5 Análise por difração de raios X (DRX)	46
4.4.3.6 Análise térmica	47
4.4.4 Estudo de liberação <i>in Vitro</i>	47
4.4.5 Estudo de Estabilidade.....	48
4.4.6 Ensaios <i>in Vitro</i> de Cultivo Celular.....	48
4.4.6.1 Fármacos, reagentes e solventes empregados nos ensaios de cultivo celular.....	48
4.4.6.2 Cultura da linhagem de fibroblastos 3T3.....	48
4.4.6.3 Estratégia experimental e tratamento das células	48
4.4.6.4 Determinação da citotoxicidade da clorexidina base e das nanopartículas desenvolvidas.....	49
4.4.6.4.1 Ensaio de redução Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT)	49
4.4.6.4.2 Ensaio do vermelho neutro (VN)	49
4.4.7 Ensaio de Toxicidade Aguda <i>in Vitro</i> Utilizando <i>Artemia Salina</i>	50
4.4.8 Estudo <i>in Vitro</i> da Atividade Antimicrobiana da Suspensão de Nanocápsulas Poliméricas Contendo Clorexidina.....	51
4.4.8.1 Solução de trabalho (ST) e diluição.....	51
4.4.8.2 Microrganismos e inóculo microbiano.....	52

4.4.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 OBTENÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DO POLÍMERO PRÉ-FORMADO, A PARTIR DO POLÍMERO (MET)ACRÍLICO EUDRAGIT® RS100	54
5.2 DETERMINAÇÃO DA CLOREXIDINA ENCAPSULADA NAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	54
5.2.1 Validação do Método Analítico para a Quantificação da Clorexidina Presente nas Nanocápsulas Poliméricas	55
5.2.1.1 Especificidade	55
5.2.1.2 Linearidade	56
5.2.1.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	57
5.2.1.4 Precisão	58
5.2.1.5 Exatidão	58
5.2.1.6 Robustez	59
5.2.2 Determinação do Teor De Clorexidina Incorporado nas Nanocápsulas e Eficiência de Encapsulação (EE)	59
5.3 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CLOREXIDINA	59
5.3.1 Determinação do pH, Tamanho das Partículas e Potencial Zeta	60
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão por Efeito de Campo (MEV-FEG)	60
5.3.3 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (IVTF).....	63
5.3.4 Análise por Difração de Raios X (DRX)	64
5.3.5 Análise Térmica.....	66
5.3.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)	66
5.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	67
5.3.6 Estudo de Liberação <i>in Vitro</i>	68
5.3.7 Estudo de Estabilidade das Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas.....	69
5.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CULTIVO CELULAR.....	70

5.5 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO ARTEMIA SALINA	72
5.6 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA.....	73
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal abriga um complexo nincho ecológico de microrganismos. Considera-se que de 700 a 1000 diferentes espécies formam a microbiota bucal residente, a qual é essencial na saúde de um indivíduo, por promover uma barreira imunológica e favorecer a homeostase (MUNRO, 2014; SCHOLZ et al., 2017). A colonização das superfícies dos dentes se inicia desde o momento da erupção do primeiro dente da criança. O número e as espécies de organismos permanecem relativamente constantes ao longo da vida dessa pessoa. Na cavidade bucal de indivíduos saudáveis predominam os *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Neisseria* spp., *Prevotella* spp e *Fusobacterium* spp (HASAN et al., 2014; WASHIO et al., 2014).

Entretanto, em pacientes internados, a microbiota bucal sofre desequilíbrio, associando-se a cáries, doença periodontal, alterações sistêmicas e, principalmente, infecções do trato respiratório (GLURICH et al., 2014). Nas unidades críticas, como Unidade de Terapia Intensiva (UTI), os pacientes gravemente enfermos são constantemente submetidos a procedimentos invasivos que por sua vez os expõem a diversos riscos. Uma das medidas terapêuticas mais utilizadas é a intubação endotraqueal, acompanhada da ventilação mecânica que garantem um aporte de oxigênio adequado e salvam vidas em várias condições clínicas. Contudo, são considerados como um importante fator de risco no desenvolvimento da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), especialmente por prejudicar as defesas do hospedeiro e permitir que partículas inaladas tenham acesso às vias aéreas inferiores, em geral a infecção desenvolve-se após 48 horas de intubação, associada ao início do uso do ventilador (KOLLEF et al., 2014; KALANURIA; ZIAI; MIRSKI, 2014; KHAN et al., 2017).

A PAV pode se desenvolver enquanto o paciente estiver sendo ventilado mecanicamente, com taxas entre 30 a 70%, sendo um número estimado de 8 a 33% de mortalidade por esta infecção (KHAN et al., 2016). Vários estudos demonstram que a incidência desta infecção aumenta com a duração da ventilação mecânica e apontam taxas de ataque de aproximadamente 3% por dia durante os primeiros cinco dias de ventilação e depois 2% para cada dia subsequente (KALANURIA; ZIAI; MIRSKI, 2014). O impacto da PAV traduz-se no prolongamento da hospitalização, em torno de 12 dias e no aumento de custos, em torno de 40.000 dólares por episódio (BURNS, 2013).

A boca dos pacientes admitidos em UTI pode servir como importante reservatório de patógenos respiratórios associados à pneumonia (KLOMPAS et al., 2016; VIDAL, 2017). A formação de biofilme na cavidade bucal pode piorar seu estado de saúde, pois cada milímetro cúbico de biofilme dental contém aproximadamente 100 milhões de microrganismos. Várias

pesquisas demonstraram que após 48 horas da admissão na referida unidade, todos os doentes apresentavam colonização na orofaringe. Estudos prévios relataram a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae* nos pacientes internados, diferindo da microbiota usual da boca (BARBOSA et al., 2010; DAMACENA et al., 2017; SANTOS et al., 2017).

Assim, o impacto da formação de biofilmes patogênicos é significativo, uma vez que as infecções causadas pelos mesmos aumentam os custos do tratamento e, ainda, aumentam o risco de morbidade e mortalidade (FERNÁNDEZ-BARAT; TORRES, 2016). Dessa forma, a prevenção da colonização de microrganismo na orofaringe é um componente chave para prevenir a PAV e a higienização dos tecidos bucais é uma das principais medidas preventivas (LARROW; KLICH-HEARTT, 2016; JANSSON, 2017). Agentes químicos são frequentemente utilizados, considerados antimicrobianos de baixo custo, fácil acesso à aquisição e bom rendimento. A clorexidina e o triclosan são os mais utilizados. Diversos estudos têm demonstrado a diminuição da PAV, quando a higiene oral é realizada com clorexidina 0,12%, em pequena esponja, evitando lesões da cavidade, três a quatro vezes ao dia (KHAN, 2016; KRAMER, 2016; BLUM, 2017).

No entanto, as formulações convencionais, muitas vezes, têm limitações quanto à liberação do fármaco e ao alcance no local específico de ação. Neste sentido, sistemas nanoparticulados têm sido considerados como alternativa para carrear a substância ativa ao local de ação, por diminuir a liberação imediata do fármaco, aumentar o tempo de ação e a substantividade do fármaco, reduzir efeitos adversos e aumentar a estabilidade química da substância ativa (PANDEY et al., 2010). A nanotecnologia farmacêutica é uma área direcionada ao desenvolvimento, à caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos em escala manométrica. (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Devido à sua eficácia e ao baixo custo, existe interesse crescente no desenvolvimento de estratégias de liberação controlada da clorexidina (GARNER et al., 2015). Uma revisão sistemática recente concluiu que a clorexidina é eficaz na redução do risco de PAV (EL-RABBANY et al., 2015). Portanto, a liberação prolongada deste antisséptico pode se traduzir em intervenções menos frequentes, relativos à higiene oral que a equipe de Enfermagem e Odontologia realiza, otimizando custo e tempo com o cuidado (SENEVIRATNE et al., 2014).

Assim, considerando o efeito deletério dos microrganismos responsáveis pela formação de biofilme bucal que coloniza o tubo endotraqueal de pacientes sob ventilação mecânica, torna-se essencial reduzir a carga microbiana nesta região. Frente ao exposto, o

propósito deste estudo foi desenvolver e avaliar um sistema polimérico de liberação modificada contendo clorexidina de base nanotecnológica, a fim de otimizar o trabalho da equipe hospitalar e garantir um efeito clínico antimicrobiano efetivo e prolongado ao paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar o efeito *in vitro* de nanocápsulas poliméricas para a liberação modificada de clorexidina com uso potencial na prevenção de infecções respiratórias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter nanocápsulas poliméricas contendo clorexidina pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado, a partir do polímero Eudragit® RS100;
2. Promover a caracterização físico-química e a avaliação morfológica, espectroscópica e térmica das nanocápsulas;
3. Proceder a determinação quantitativa da clorexidina base incorporada nas nanopartículas poliméricas, pelo método da cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC), avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
4. Realizar a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da suspensão de nanopartículas poliméricas contendo clorexidina;
5. Analisar a toxicidade aguda das nanocápsulas poliméricas, a partir do teste de *Artemia salina*;
6. Desenvolver estudos *in vitro* de cultivo celular, para a determinação da citotoxicidade das formulações de nanopartículas poliméricas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOFILMES E SUAS IMPLICAÇÕES NA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

Os biofilmes são comunidades compostas por microrganismos organizados em estruturas tridimensionais que desempenham interações altamente complexas entre si (COSTA et al., 2014). Podem ser constituídos pelos mais variados tipos de microrganismos, como fungos, algas, protozoários e, particularmente, por uma ou mais espécies bacterianas, os quais se organizam em várias camadas aderidos de modo irreversível (BARBOSA et al., 2010). A adesão ocorre por uma superfície biótica ou abiótica envolvida por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), cuja função é cooperar para sobreviver ao estresse ambiental, como a terapia antimicrobiana sistêmica e a defesa imune do hospedeiro (LAILA; SANTOS, 2016).

No que se referem à sua composição, os biofilmes são constituídos por proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, sais minerais e vitaminas envoltos em uma matriz. O maior componente do biofilme é a água, podendo variar entre 70 a 95%, sendo representado principalmente pela substância polimérica extracelular (EPS) (CASSANEGO et al., 2013). Assim, em um biofilme, existe a tendência que as bactérias formem agregados de várias espécies, as quais crescem aderidas a uma superfície e estão envolvidas por uma matriz extracelular (MANCL; KIRSNER, 2013).

A formação do biofilme é um processo complexo e caracterizado por várias etapas distintas, que vão desde a adesão inicial até a dispersão final, sendo fundamental o entendimento desta última fase, visto que a mesma promove a colonização de outras superfícies e reinicia o ciclo (HUYNH et al., 2012). Desta forma, o desenvolvimento de biofilmes envolve distintas etapas, incluindo: (a) adesão reversível da bactéria à superfície; (b) adesão irreversível a partir da produção de EPS; (c) origem de microcolônias e início da maturação do biofilme; (d) formação do biofilme maduro, constituído por canais em que circulam a água, nutrientes e produtos do metabolismo celular; (e) desprendimento e dispersão das células, com consequente formação de um novo biofilme (HENRIQUES; VASCONELLOS; CERCA, 2013; LAILA; SANTOS, 2016). Também, o *Quorum Sensing* (QS) é outro fator que intervém na produção de biofilmes, caracterizado por um sistema de comunicação que associa o crescimento populacional bacteriano com a liberação de moléculas sinalizadoras autoindutoras. Com isso, à medida que ocorre o aumento da densidade bacteriana, mais moléculas autoindutoras são produzidas, as quais induzem a expressão de genes específicos envolvidos na formação do

biofilme, na motilidade, virulência e na produção do EPS (TRENTIN; GIODARNI; MACEDO, 2013).

Entre 65 e 80% das infecções humanas está associados a biofilmes (LEBEAUX et al., 2013). Os principais dispositivos biomédicos nos quais os biofilmes se desenvolvem são os cateteres venosos centrais, dispositivos ventilatórios, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular, endoproteses coronarianas, implantes de estimulação neurológica, próteses articulares e dispositivos para fixação de fraturas (CRESPO; FERNÁNDEZ, 2014). Assim, o impacto da formação de biofilmes é significativo, uma vez que as infecções causadas pelos mesmos aumentam os custos do tratamento e elevam o risco de morbidade e mortalidade. Especialmente em infecções respiratórias, nas unidades de tratamentos críticos, os biofilmes se desenvolvem rapidamente, principalmente após a intubação endotraqueal e representam uma fonte de patógenos que estão associados ao desenvolvimento da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) no paciente gravemente doente (FERNÁNDEZ-BARAT; TORRES, 2016).

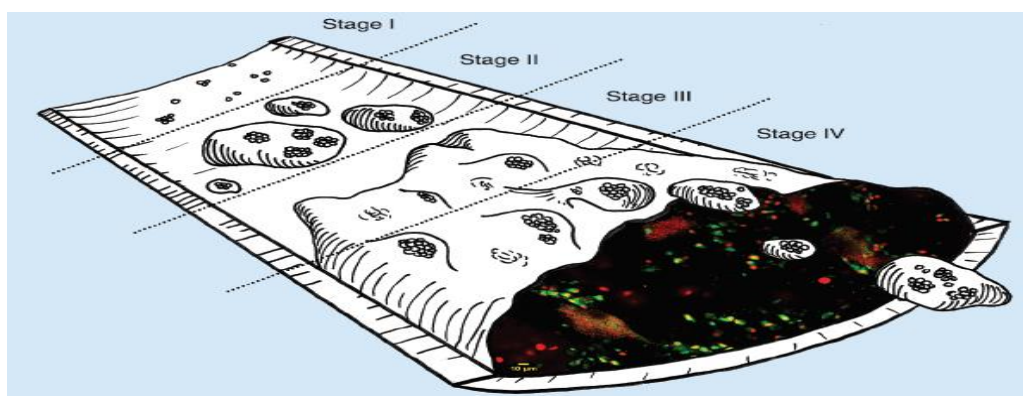
Mediante ao exposto, o mecanismo mais importante do desenvolvimento de infecções respiratórias é a aspiração de microrganismos da orofaringe para o trato respiratório inferior em pacientes entubados (LI et al., 2015). Estudo prévio verificou que o acúmulo intenso de biofilme no tubo endotraqueal (ETT) ocorre após 72 horas de internação e os principais agentes foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (CRUZ; MORAIS; TREVISANI, 2014; DAMACENA et al., 2017).

A Figura 1 ilustra os estágios da formação do biofilme em ETT, os quais são similares às mesmas fases já descritas anteriormente, porém adaptado por Wilson et al. (2012). De acordo com os autores, tem-se:

- Estágio I (fase de latência): o ciclo de vida do biofilme começa com a adesão do microrganismo na superfície do ETT. Alterações na expressão gênica ocorrem rapidamente entre as formas de bactérias, mas os microrganismos ainda estão isolados e não se dividem;
- Estágio II (fase log): Os microrganismos aderidos na superfície do ETT se multiplicam e produzem a matriz polimérica;
- Estágio III (fase estacionária): ocorre o desenvolvimento da arquitetura do biofilme. Gradientes químicos dentro do biofilme parecem criar microambientes de diferentes espécies ou de diferentes níveis de atividade;

- Estágio IV (fase de apoptose): a concentração de microrganismos é tão elevada que agregados de biofilme podem se desprender da matriz original e translocar para as vias aéreas pela força do fluxo de ar ou procedimentos invasivos (WILSON et al., 2012; FERNÁNDEZ-BARAT; TORRES, 2016).

Figura 1– Representação esquemática da formação do biofilme no tubo endotraqueal utilizado nos pacientes submetidos à ventilação mecânica



Fonte: Argemí & Fernández-Barat, 2016 reproduzida com a autorização prévia dos autores.

Em outro estudo, os resultados da análise molecular baseado em 16S rRNA PCR mostrou que o biofilme na superfície do ETT é composto por microrganismos comensais e patogênicos, que colonizam a orofaringe dos pacientes sob ventilação mecânica e desempenham um papel crucial na ocorrência de infecções respiratórias nos pacientes internados em UTI (LI et al., 2015). Por conseguinte, as infecções desencadeadas pelo biofilme são difíceis de tratar, pois as células estão unidas dentro da estrutura do biofilme. Os microrganismos são também frequentemente mais resistentes aos agentes antimicrobianos, os quais apresentam uma eficácia limitada (MUSZANSKA et al., 2012; SANDS et al., 2016). As bactérias presentes nos biofilmes são 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos em comparação às bactérias no estado isolados (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010; MENOITA; SANTOS; SANTOS, 2012).

Assim, as medidas preventivas são urgentemente necessárias, a fim de reduzir o risco de infecções relacionadas ao ETT (LEE et al., 2012). Sendo assim, as estratégias clínicas que contribuem para prevenir a formação de biofilme no ETT estão associadas ao número menor de dias de ventilação mecânica, prescrição de antimicrobiano guiado pelo perfil de sensibilidade e resistência microbiana e implementação sistemática de cuidados orais para pacientes graves (PALMER; SMALDONE, 2014; BLANCO et al., 2018). Isto posto, o conhecimento relativo ao estado de saúde geral e bucal dos pacientes internados em UTI é imprescindível para que a

equipe de saúde aumentem a compreensão da dinâmica: microbiota oral, contaminação do ETT e das vias aéreas inferiores durante a ventilação mecânica, com a finalidade de realizar cuidados eficazes aos pacientes e reduzir os riscos de PAV (DAMACENA et al., 2017; BLANCO et al., 2018).

3.2 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) afetam milhões de pacientes redor. O “*Center for Disease Control and Prevention*” (CDC), define-as como uma condição localizada ou sistêmica, resultante de uma reação adversa à presença de um agente infeccioso adquirido após a admissão do paciente (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2012; CDC/NHSN, 2015). Nos países desenvolvidos, afeta aproximadamente de 5 a 15% dos pacientes, enquanto que nos países de baixa renda, as taxas de prevalência são de 15 a 19%. No Brasil, estima-se que a prevalência em UTIs é de 61,6%, cerca de 5 a 10 vezes maior do que em outras unidades hospitalares, com a mortalidade estimada de 37,6% (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Nos estados Unidos ocorrem, anualmente, aproximadamente 75.000 mortes, o que representa a sétima principal causa de morte neste país (DHAR et al., 2014; PITETT et al., 2015).

Nas unidades críticas, os pacientes gravemente enfermos são constantemente submetidos a procedimentos invasivos que, por sua vez, os expõem a diversos riscos. Consequentemente, as principais topografias infecciosas, cuja aquisição está intrinsicamente ligada a um procedimento assistencial ou a internamento são as infecções do sítio cirúrgico (ISC), infecções do trato urinário associadas ou não à sonda vesical (ITU), infecções da corrente sanguínea associadas ao cateter venoso (IPCS) e as pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) (CDC/NHSN, 2015; SCOTT, 2016).

No âmbito das IRAS, a pneumonia é a segunda mais frequente e grave infecção em pacientes hospitalizados. Decorre da resposta inflamatória do parênquima pulmonar que acarreta sinais e sintomas respiratórios graves, resultantes da penetração e multiplicação descontrolada de agentes infecciosos, atribuída principalmente a microorganismos multidrogasresistentes (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; SCOTT, 2016).

Considerando as diferentes formas de severidade do quadro infeccioso, bem como o diagnóstico e o tratamento, a pneumonia relacionada à assistência tem sido listada nas Diretrizes da *Infectious Diseases Society of America* e da *American Thoracic Society*, 2016, as quais atualizaram as orientações de 2005, com as seguintes definições: 1) Pneumonia adquirida no hospital ou não-ventilada (PAH) e 2) Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), com o objetivo de evitar a subjetividade da definição. Quanto a terminologia, aplica-se aos

profissionais de saúde que cuidam de pacientes com risco de pneumonia, incluindo especialistas em doenças infecciosas, doenças pulmonares, cuidados intensivos, cirurgiões, anestesistas e quaisquer médicos e profissionais de saúde (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; KALIL et al., 2016).

A PAH é aquela que ocorre após 48 horas da admissão do paciente, geralmente tratada na unidade de internação, não se relacionando à ventilação mecânica. Em geral, é considerada menos severa do que as pneumonias associadas ao ventilador. Entretanto, complicações graves ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes, com taxas de mortalidade similar ao diagnosticados com PAV. As situações de maior gravidade, incluem a insuficiência respiratória, derrames pleurais, sepse, insuficiência renal e empiema (SANTI, 2016; SCOTT, 2016). Consequentemente, quando o paciente é encaminhado para internação na unidade de terapia intensiva (UTI), uma das medidas terapêuticas mais utilizadas é a intubação endotraqueal, sendo que a ventilação mecânica garante um aporte de oxigênio adequado e salvam vidas em várias condições clínicas. Entretanto, essas intervenções também são deletérias e a PAV é um dos eventos adversos mais frequentes (KOLLEF et al., 2014; KALANURIA; ZIAI; MIRSKI, 2014; KHAN et al., 2017).

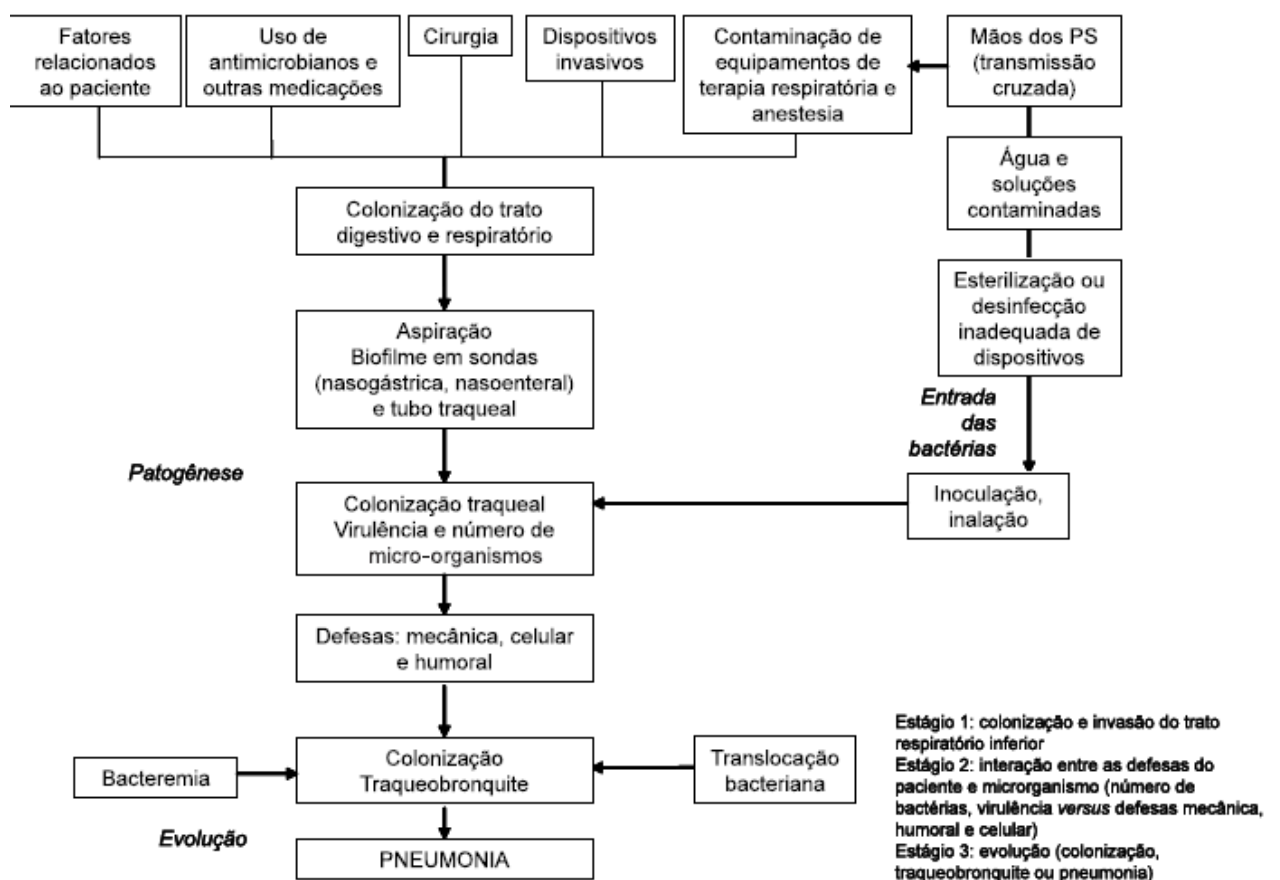
A PAV tem alta prevalência, representando uma das principais complicações infecciosas no doente grave e está associada a elevadas taxas de mortalidade (WALTRICK et al., 2015). Estima-se que sua incidência aumenta com o número de dias de ventilação mecânica, com taxas entre 3 a 70%, com mortalidade de 8 a 33% . Dois estudos recentes confirmam que a PAV prolonga o tempo de ventilação mecânica de 7,6 para 11,5 dias e retarda a hospitalização em 11,5 a 13,1 dias, bem como, o aumento de custos, atingindo 40.000 dólares por episódio (MUSCEDERE; DAY; HEYLAND, 2010; KALIL et al., 2016; KHAN et al., 2017).

Os pacientes intubados perdem a proteção natural entre a orofaringe e a traqueia e, em consequência, cessam o mecanismo normal de controle das vias aéreas, reduzindo o reflexo da tosse e o clearance mucociliar, promovendo o acúmulo de secreções contaminadas acima do *cuff*, o que acarreta maior colonização da estrutura traqueobrônquica. Por consequência, a PAV é, geralmente, de origem aspirativa, sendo as principais fontes, as secreções contaminadas das vias áreas superiores ou da microbiota bucal, seguida pela inoculação exógena de material contaminado ou pelo refluxo do trato gastrointestinal que se deslocam pelo tubo endotraqueal (VILELA et al., 2015; CANZI; COLACITE, 2016; SANTOS et al., 2017).

Assim, a PAV é decorrente da supressão do equilíbrio entre os mecanismos de defesa do indivíduo e o agente microbiano, devido ao risco ocasionado pela inoculação em grandes

quantidade ou pela virulência do microorganismo, gerando uma resposta inflamatória local. Em suma, a defesa pulmonar é constituída pelos macrófagos alveolares que fagocitam as partículas inaladas e as eliminam por meio do movimento mucociliar ou pelo tecido linfoide, o que amplifica a resposta inflamatória e recruta neutrófilos, monócitos e linfócitos para os alvéolos (CRAVEN; CRAVEN; DUCAN, 2007; ARANHA et al., 2013). As bactérias e seus produtos, como os lipopolissacarídeos, desencadeiam a liberação de citocinas. Algumas destas, promovem a ação inflamatória contra os patógenos e outras, evitam a agressão tecidual excessiva. O volume do inóculo, a virulência do agente e a resposta do hospedeiro podem favorecer diferentes resultados, como a eliminação do microorganismo decorrente de uma resposta local adequada ou até mesmo, a dificuldade em controlar a infecção em virtude de intensa resposta imune, como a falta de controle do processo infeccioso pela resposta imune deficiente do paciente (ARANHA et al., 2013; KALIL et al., 2016). A Figura 2 sumariza o mecanismo de interação entre patógenos, fatores de riscos e hospedeiro, os quais contribuem para a ocorrência da pneumonia.

Figura 2 – Patogênese da pneumonia relacionada à assistência à saúde



Adaptado de Craven et al., 2007 e ANVISA 2013.

Desta forma, o risco de ter as vias aéreas inoculadas com elevada quantidade de material contaminado exerce um papel central na fisiopatologia da pneumonia adquirida no hospital ou não ventilada (PAH) e da pneumonia associada ao ventilador (PAV). Outras condições clínicas subjacentes podem alterar a resposta dos elementos celulares que compreendem o sistema imune inato. A fase imunossupressora prolongada após a resposta hiperinflamatória, diminui a capacidade do hospedeiro frente às defesas orgânicas (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013; KALIL et al., 2016).

Além das condições do hospedeiro, tais como, extremos de idade, desnutrição, doenças de base, imunossupressão, os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da PAV estão relacionados com a presença do tubo endotraqueal e o uso prolongado de ventilação mecânica, por impossibilitar o paciente de aquecer, umedecer e purificar o ar inalado (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; IMRAN; AMJAD; HAIDRI, 2016). Outro aspecto relevante é a exposição prévia a antibióticos intravenosos, identificados como uma condição predisponente para o desenvolvimento de patógenos multirresistentes aos fármacos. Os microorganismos prevalentes, relatados em vários estudos como causadores de pneumonias em UTIs são *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (também conhecido como MRSA), a *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella spp* principalmente a *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase (KPC) (IMRAN; AMJAD; HAIDRI, 2016; KALIL et al., 2016).

Mediante a gravidade da morbimortalidade por infecções respiratórias, torna-se essencial que ocorra a higienização dos tecidos bucais, como uma das medidas de prevenção da colonização de microrganismo da orofaringe, considerado o componente chave para reduzir as pneumonias (LARROW, KLICH-HEARTT, 2016). Estudos têm demonstrado diminuição das PAVs quando a higiene oral é realizada com clorexidina 0,12%, com uma pequena esponja, evitando lesões da cavidade, três a quatro vezes ao dia (JOONG, 2014; ARAÚJO, et al, 2015; KHAN, 2016).

Um estudo de coorte retrospectivo avaliou quatro elementos dos componentes do *bundle* de prevenção da PAV, envolvendo todos os pacientes adultos sob ventilação mecânica, e verificou que o cuidado bucal com clorexidina foi relacionado com a redução de eventos associados à ventilação (razão de risco (RR), 0.44; 95% intervalo de confiança (SS), 0.26–0.77) (O'HORO, et al., 2016). Uma metanálise demonstrou a consistência do benefício cuidado bucal com clorexidina em 17 ensaios clínicos randomizados, sendo que 14 avaliaram o efeito da clorexidina e 3 investigaram o efeito da iodopovidona. A higiene bucal com o antissépticos

reduziu significativamente a prevalência de PAV (RR = 0,72, IC 95%: 0,57, 0,92; P = 0,008) (LI, et al, 2015). Em pacientes intubados, uma metaanálise realizada por Shi et al (2013) demonstrou que a clorexidina é um importante produto para higiene bucal (na forma de colutório ou de gel), reduzindo em 40% o desenvolvimento de PAV. Os mesmos autores realizaram estudo de revisão evidenciando que tanto a solução bucal, quanto o gel, reduzem o risco de PAV de 24% para cerca de 18% e evitam o desenvolvimento da pneumonia em um paciente a cada 17 intubados (SHI et al., 2017).

Neste sentido, as atuais diretrizes do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), voltadas para o controle de infecção respiratória, recomendam a implantação de um programa que inclua a higiene bucal para pacientes em UTI. Além disso, a Lei nº 2.776/2008, aprovada no Senado Federal, estabelece a obrigatoriedade da presença de profissionais da Odontologia nas unidades críticas. Outro aspecto relevante é que até 2011, no Brasil, não existia nenhum protocolo. A partir deste ano os Departamentos de Odontologia e de Enfermagem da Associação de Medicina Intensiva (AMIB) criaram um protocolo de higiene bucal, por reconhecer que uma abordagem multidisciplinar é essencial para controlar o biofilme e reduzir os riscos de infecções respiratórias, além de proporcionar conforto ao paciente (TOLEDO; CRUZ, 2009; LOBÃO, 2016; LIMA, 2017; AMARAL, 2018).

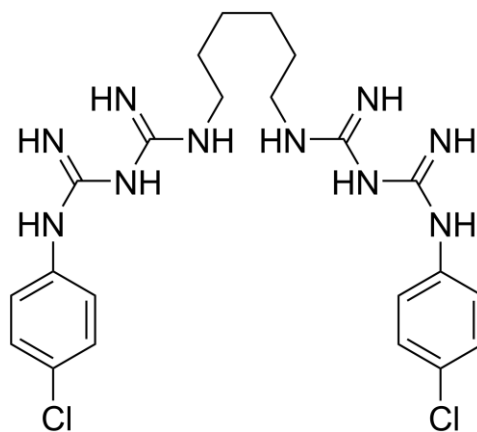
3.3 CLOREXIDINA BASE

A clorexidina é um potente antimicrobiano de amplo espectro empregado como princípio ativo em diversos antissépticos e desinfetantes, em diferentes concentrações. É um agente antisséptico de amplo espectro de atividade antimicrobiana, o qual se liga a parede celular bacteriana, permitindo que as moléculas de clorexidina adentrem ao citoplasma, rompam a membrana celular e promovam extravasamento de suas estruturas (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007; ARAÚJO, et al., 2015). Tem ação nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e *Enterococcus* sp resistente à vancomicina e, também, em fungos filamentosos e leveduras. Este fármaco pode permanecer quimicamente ativo nos tecidos por até 6 horas (VILELA et al., 2015).

A clorexidina base (CLX) é representada pela fórmula molecular de $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com massa molar de 505,447 g.mol⁻¹. É composta estruturalmente por dois anéis clorofenólicos nas extremidades, ligados a um grupamento biguanida de cada lado, conectados por uma cadeia central de hexametileno (Figura 3) (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007). Considerando as propriedades físico-químicas da CLX, o ponto de fusão é de 134 °C, a

solubilidade aquosa é de $0,026 \text{ g.L}^{-1}$, o valor de pK_a é de 10,52 e o $\log P$ igual a 3,0 (HUMAN METABOLOME DATABASE, 2017).

Figura 3— Estrutura química da clorexidina base



Fonte: Autor (2020).

Esta biguanida catiônica é uma base, mais estável na forma de sal, sendo praticamente insolúvel em água. Os sais originalmente produzidos foram o acetato de clorexidina e o cloridrato de clorexidina, mas devido à baixa solubilidade em água, de $26,1 \text{ mg.L}^{-1}$ a 20°C , foram substituídos, com o passar do tempo, pelo sal atualmente usado, o digluconato de clorexidina que apresenta maior solubilidade em água e em pH fisiológico, dissociando-se e liberando o fármaco ativo (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007; HUMAN METABOLOME DATABASE, 2017).

3.3.1 Propriedades da Clorexidina

3.3.1.1 Substantividade

É a capacidade da substância ativa de permanecer retida no local de ação, sendo liberada lentamente, evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar, pois a região catiônica da molécula une-se à hidroxiapatita do esmalte dental e à mucina salivar, formando uma película orgânica na superfície dos dentes e nas proteínas salivares, que apresenta carga negativa. A outra região catiônica permanece livre para interagir com bactérias que buscam colonizar a cavidade bucal. Desta forma, exercerá uma ação bactericida imediatamente. Após o uso, desempenha com uma ação bacteriostática prolongada sobre os microrganismos (HORTENSE et al., 2010; SOUZA et al., 2012).

Os mecanismos de adsorção e liberação gradual foram testados *in vitro* e *in vivo* com clorexidina marcada radioativamente, sendo que moléculas de clorexidina aderidas às proteínas

salivares são liberadas sob a forma ativa quando a sua concentração no meio reduz, o que pode ocorrer por 8 a 12 horas após a absorção inicial. Depois das 24 horas, concentrações reduzidas podem ainda ser detectadas, prevenindo assim a colonização bacteriana e o efeito inibidor residual da formação do biofilme dental (CARRILHO et al., 2010).

Estudo realizado por Sinnes et al. (1997) constataram que em cada bochecho feito, 3 % da clorexidina é deglutida, 67% é expectorada e 30% fica retida ou adsorvida à película adquirida, às proteínas salivares e à mucosa bucal. Após o bochecho, a quantidade retida na cavidade bucal é constantemente deslocada dos seus sítios de ligação pelos íons Ca^{++} presentes na saliva. O pH bucal parece também exercer uma importante influência sobre a retenção do fármaco. As soluções aquosas de clorexidina são mais estáveis em valores de pH de 5 a 8. Acima deste valor, ocorre precipitação da clorexidina, enquanto que, em pH ácido, há redução da sua atividade, devido à perda da estabilidade da solução. Em pH fisiológico, exerce excelente atividade antimicrobiana, proporcionada pela liberação das moléculas catiônicas (VITALIS, 2012). Cabe salientar que algumas substâncias químicas, como o cálcio, detergentes aniônicos e flúor, podem influenciar as ligações da clorexidina, reduzindo sua retenção, efetividade clínica e atividade antimicrobiana (BASCONES et al., 2005; JAYAPRAKASH; VEERESMA; HIRAMATH, 2007; GUPTA et al., 2012).

3.3.1.2 Eficácia

A clorexidina tem se mostrado um efetivo agente antimicrobiano no tratamento de gengivite, desestruturante do biofilme já formado e inibidor da recolonização dental. Essas ações podem ser atribuídas a uma redução do número de bactérias na saliva, evitando-se o desenvolvimento do quadro inflamatório da gengivite (GUPTA et al., 2012). Um risco potencial com o uso regular de um agente antimicrobiano local é a possibilidade dos microrganismos adquirirem resistência ou ocorrer uma pressão seletiva na microbiota bucal, resultante da distribuição dos que foram menos sensíveis à clorexidina, porém, Løe (1970) revisou vários trabalhos com o uso prolongado da clorexidina (7 semanas, meio ano, 2 anos), mostrando que foram mínimas as alterações de suscetibilidade dos microrganismos bucais (LÖE; SCHIOTT, 1973; HORTENSE et al., 2010).

3.3.1.3 Segurança

A FDA (*Food and Drug Administration*) e a ADA (*American Dental Association*) autorizaram o uso da clorexidina, devida sua efetividade na redução do biofilme dental e na gengivite frente aos demais agentes químicos, podendo ser utilizada com segurança

(ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007). A CLX, até o momento, apresentou baixa evidência de toxicidade sistêmica em seres humanos, além de não produzir qualquer resistência apreciável dos microrganismos da boca; também não tem sido associada a quaisquer alterações teratogênicas (HORTENSE et al., 2010). Diversos testes toxicológicos mostraram que a molécula de clorexidina é altamente estável (SINNES et al., 1997). Quando ingerida, a quase totalidade é eliminada pelas fezes, quantidades mínimas são absorvidas pelo trato intestinal e eliminadas pelos trajetos normais (rins e fígado). Não há evidência de formação de *para-cloroanilina*, perigosa substância cancerígena. Efeitos teratológicos e carcinogenicidade ou mutagenicidade não foram observados.

3.3.1.4 Espectro de ação

O efeito antimicrobiano da clorexidina ocorre pela atração e adsorção das suas moléculas catiônicas à superfície celular dos microrganismos, que é carregada negativamente. Esta interação promove a alteração da permeabilidade da membrana celular, resultando na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico celular (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007; ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015). A ação da clorexidina depende da suscetibilidade dos microrganismos, sendo que os Gram-positivos apresentam alta suscetibilidade em relação aos gram-negativos. Certas espécies de estreptococos parecem reter uma quantidade adicional de clorexidina em suas cápsulas polissacarídicas extracelulares. Isso pode estar relacionado à alta sensibilidade dos estreptococos orais à clorexidina (VARONI et al., 2012; VITALIS, 2012).

3.3.1.5 Indicações e posologia

A clorexidina tem sido utilizada em diversas áreas da medicina, como, por exemplo, em ginecologia, urologia, oftalmologia, em queimaduras e na desinfecção decoto umbilical e da pele. Na literatura, encontram variedades de regimes de tratamento com clorexidina, incluindo as concentrações: 0,12%, 0,2% e 2% (SCANNAPIECO et al., 2009; ÖZÇAKA et al., 2012; VILELA, 2015). Do mesmo modo, na Odontologia, a clorexidina tem sua ação clínica amplamente difundida. Reduz consideravelmente as contagens de *Streptococcus mutans* em indivíduos que são propensos à cárie e, após cirurgias da cavidade bucal, tem ação na fase de cicatrização, melhorando a dor e o inchaço, assim como, na redução do índice de placa e gengival. Também, em pacientes com ulcerações orais recorrentes têm sido demonstrado que a clorexidina diminui a incidência, severidade e duração (HORTENSE et al., 2010; PAPAS et al., 2012; GUPTA et al., 2012).

Dentre as formas farmacêuticas mais usadas deste antisséptico, estão as líquidas (colutórios) e as semi-sólidas (géis). Estes produtos são amplamente empregados pela sua facilidade na administração na mucosa bucal de pacientes intubados (MEINBERG, 2012). A boca dos pacientes internados em UTI pode servir como importante reservatório para patógenos. Em uma revisão integrativa da literatura, constatou-se que em sete estudos (87,5%), a higiene bucal com clorexidina reduziu a colonização da orofaringe e, em quatro (50%), houve a redução de PAV (JOONG et al., 2014; KLOMPAS et al., 2016). Similarmente, Chlebicki e Safdar (2007) avaliaram especificamente a eficácia da clorexidina tópica aplicada à orofaringe *versus* placebo e verificaram que em 7 ensaios clínicos randomizados, reduziu significativamente a PAV ($p = 0,02$), com maior benefício em pacientes de cirurgia cardíaca (GRAP, 2011).

No entanto, apesar de ser frequentemente utilizada na odontologia e nos pacientes internados em UTI, a clorexidina apresenta gosto amargo e provoca efeitos adversos que concorrem normalmente pelo seu uso prolongado e concentração elevada ou pelo volume utilizado (PEGORARO et al., 2014). A alteração de cor dos elementos dentários e da língua é o efeito mais comum, devido à interação do antisséptico com a estrutura do esmalte dental ou epitélio lingual. Também pode gerar descamação em mucosa, lesões de ulceração, hábito residual amargo e aumento na deposição de cálculo dental (PEGORARO et al., 2014). Ainda que indicada por algumas instituições de saúde para a prevenção e o controle de mucosite, a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* e a *International Society of Oral Oncology* não recomendam seu uso em pacientes oncológicos por provocar ardência bucal, disgeusia, xerostomia e lesões de ulcerações por queimaduras (GUPTA et al., 2012; SHI et al., 2017). Na tentativa de diminuir ou eliminar os efeitos colaterais como a coloração marrom - amarelada dos dentes, a descoloração dos dentes e língua, o aumento da formação de cálculo, a perda da sensação do paladar e a descamação da mucosa bucal, tem-se diminuído a porcentagem do agente ativo nas formulações (HORTENSE et al., 2010).

Entretanto, nos colutórios e géis bucais comercializados, a concentração de clorexidina normalmente é 0,12%, considerada baixa, o que demonstra seu poder bacteriostático, necessitando de se realizar a higiene bucal quatro vezes ao dia (ARAÚJO; SOUSA; LIMA, 2015). Um estudo recente demonstrou que os efeitos da clorexidina podem diminuir com o tempo e sua substantividade só persistiu por 6 a 10 h após o enxágue e, consequentemente as bactérias salivares e o biofilme gradualmente obtiveram viabilidade com o tempo (COUSIDO et al., 2010; TOMÁS et al., 2013).

Mediante a estas limitações, destaca-se a necessidade de se desenvolver novos veículos de liberação modificada e relativamente alta penetração da clorexidina, com maior eficácia contra biofilme bucal para melhor uso clínico (SENERIVATNE, 2014). Neste sentido, sistemas nanoparticulados têm sido considerados como alternativas para carrear esta substância ativa ao local de ação, por diminuir a liberação abrupta do fármaco, aumentar a especificidade de ação e a penetração celular do fármaco, reduzir efeitos adversos e aumentar a estabilidade química da molécula ativa (PANDEY et al., 2010).

3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

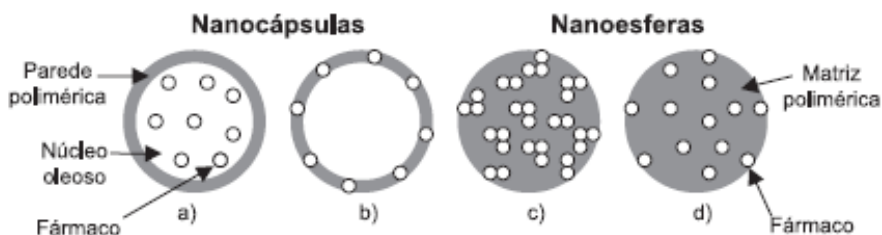
Na atualidade, com o advento da nanotecnologia e da nanociência, novos materiais têm sido desenvolvidos e modificados em suas estruturas, gerando modernas tecnologias para o uso da sociedade (SENEVIRATINE et al., 2014; DILLARI; MENDES; MARTINS, 2016). A nanotecnologia se refere à produção controlada de estruturas e sistemas na escala de nanômetros, ou seja, em um bilionésimo do metro (10^{-9} m), a partir da utilização de moléculas e materiais das mais diversas origens. Abrange diversas áreas de atuação, como a química, farmácia, biologia, física, medicina, engenharias, informática, fotografia, monitoramento ambiental, agricultura, ciência dos materiais, ciências forenses e indústrias, como a automobilística, a eletrônica e a têxtil (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

A nanotecnologia farmacêutica compreende a investigação de diferentes sistemas nanoestruturados, como: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanocristais, nanoemulsões, nanotubos, dentímeros, nanopartículas magnéticas e, mais recentemente, as nanopartículas de géis. A versatilidade, a flexibilidade e a adaptabilidade dos sistemas de liberação nanoestruturados são algumas das vantagens dessa tecnologia, que têm provado seus benefícios na área médica e farmacêutica, principalmente no aumento da adesão farmacológica pelos pacientes (LU; ZHANG; YANG, 2004; CHEN et al., 2011).

Entretanto, as nanopartículas poliméricas são as partículas mais estudadas para o carregamento de diversos tipos de moléculas terapêuticas, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de não tóxicas e não imunogênicas (VIEIRA; AMARRA, 2016). As tecnologias de liberação de fármacos têm oferecido diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, mantendo sua capacidade original no desenvolvimento de novos produtos à saúde (RESTANI et al., 2010). O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e

organização estrutural (Figura 4). As nanocápsulas apresentam um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso, onde o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou aderido à superfície da partícula na parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas são destituídas de óleo em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco pode estar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; KUMARI et al., 2010).

Figura 4 – Representação esquemática das nanocápsulas e das nanoesferas poliméricas



A: fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; B: fármaco adsorvido na parede polimérica da nanocápsula; C: fármaco aderido na superfície polimérica da nanoesfera; D: fármaco disperso na matriz polimérica da nanoesfera

Existem diferentes materiais poliméricos com pequena ou nenhuma toxicidade usados na formulação das nanopartículas, nas quais a substância farmacológica ativa encontra-se dispersa ou dissolvida (OLIVEIRA; LIMA, 2006). Podem ser de origem natural, como: albumina, gelatina, quitosana e colágeno; ou sintéticos, como: poliácido lático (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polietilenoglicol (PEG), etilcelulose (EC), *poli* β -hidroxibutirato (PHB), acetato de celulose, poli(isobutilcianoacrilato) (PICBA), poli(iso-hexilcianoacrilato) (PIHCA), *polin*butilcianoacrilato (PBCA), poli(acrilato) e poli(metacrilato), sendo estes últimos conhecidos comercialmente como Eudragit[®] (EUD) (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2008).

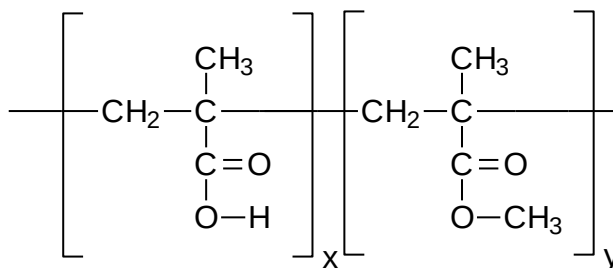
3.4.1 Poli (metacrilatos) Eudragit[®]

São polímeros metacrílicos amplamente utilizados no desenvolvimento de substâncias farmacêuticas encapsuladas. Estes materiais são comercialmente conhecidos como Eudragit[®], pertencentes às séries E, L, S, RL, RS e NE30D, possuindo diferentes estruturas químicas com variadas características de solubilidade (KIBBE, 2008).

De acordo com a composição química, o Eudragit[®] L100 é solúvel em pH superior a 6,0, enquanto que o Eudragit[®] S100 apresenta solubilidade em valores de pH superiores a 7,0, condições nas quais formam sais com substâncias alcalinas. Esses polímeros (Figura 5) são obtidos da copolimerização por adição do ácido metacrílico e do metacrilato de metila, sendo

que a proporção molar de grupos carboxila livre em relação ao grupamento éster é de aproximadamente 1:1 no Eudragit® L100 e 1:2 no Eudragit® S100 (RAFFIN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ZHANG et al., 2011).

Figura 5 – Estrutura química do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila)



Fonte: Autor (2020).

Inúmeros estudos sobre a liberação modificada de fármacos contemplam o uso de poli (metacrilatos), devido a diferentes vantagens (CRUZ et al., 2010; ALHNAN; BASIT, 2011). Estes polímeros têm custo mais reduzido, comparados com os poliésteres biodegradáveis mais usuais (PLA, PLGA e PCL), além de terem alta estabilidade e solubilidade em solventes mais polares e menos tóxicos. Em especial, o polímero Eudragit® RS 100 apresenta características catiônicas, com substantividade às mucosas (SANTOS et al., 2013), o que o torna interessante para o uso em infecções respiratórias, como a PAV.

3.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO CLOREXIDINA

A clorexidina (CLX) é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em várias formulações na odontologia e uso clínico, como unidades intensivista, principalmente na higiene bucal de paciente intubados (FAN et al., 2016; LARROW; KLICH-HEARTT, 2016). O cuidado oral abrangente, usando enxaguatório bucal com clorexidina, simultaneamente com a prevenção da microaspiração de secreções na orofaringe, podem reduzir o risco do desenvolvimento de PAV (JANSSON, 2017). Em contrapartida, estudos também mostraram a limitação das formulações da CLX, devido à sua incapacidade de penetrar eficazmente no biofilme dental e sua baixa substantividade, o que justifica a necessidade desenvolver novos sistemas de liberação lenta e relativamente alta penetração da CLX, com maior eficácia contra o biofilme bucal (ZHU, 2014; SENEVIRATINE et al., 2014).

Estudos prévios avaliaram a liberação da CLX por meio de nanopartículas, na tentativa de manter a inibição bacteriana no interior de canais radiculares (TELLES; PRADO; SIMÃO, 2017). Outra pesquisa referente à obtenção de caracterização de novas nanopartículas contendo

clorexidina, a liberação foi eficaz por até 21 dias com uma alta liberação inicial, que pode ser atribuído a CLX incorporada na superfície das nanopartículas e, subsequentemente, controlada por mecanismos de difusão e de degradação. A liberação da CLX melhorou a biodisponibilidade e direcionou a liberação do fármaco para os túbulos dentinários, o que permitiu a inibição prolongada de bactérias, evitando a formação de biofilme (HASEEB et al., 2016).

Outro estudo considerado pioneiro demonstrou os efeitos antibacterianos das nanopartículas de CLX em biofilmes da cavidade bucal. Os pesquisadores desenvolveram novas nanopartículas e avaliaram seus efeitos antibacterianos no modo planctônico e de biofilme, contra representantes de bactérias patogênicas orais, como, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*, *F.nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, considerados agentes etiológicos, significativamente envolvidos em doenças orais comuns, como acárie dental, infecções pulpares e a doença periodontal. Os resultados demonstraram efeitos antibacterianos potentes contra biofilmes bucais, podendo ser empregados como um novo e promissor agente antibiofilme para uso clínico (SENEVIRATNE et al., 2014). Frente ao sinteticamente relatado, cada vez mais pesquisadores têm estudado e dado ênfase ao desenvolvimento de formas de farmacêuticas contendo clorexidina, incorporando a nanotecnologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico (QUIMIS, modelo 235, Diadema, Brasil);
- Balança analítica de prato único (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Banho-maria (LOGEN SCIENTIFIC, modelo São Paulo, Brasil);
- Cabine de fluxo unidirecional (Laminar) (VECOFLOW, modelo Campinas, Brasil);
- Centrífuga para tubos (BIO ENG, modelo BE-4004, São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de ultra pressão dotado de detector de ultravioleta (SHIMADZU, modelo Shimadzu Nexera X2, Quioto, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q-136M4, Diadema, Brasil);
- Leitor de microplacas (BIO-TEK INSTRUMENTS, modelo Synergy H1, Winooski, VT, EUA);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópico eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550 Superscan, Quioto, Japão);
- Microscópio invertido (QUIMIS, modelo Q7-301, Diadema, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (QUIMIS, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (SHIMADZU, modelo DSC-60, Quioto, Japão).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Clorexidina base (CLX, 99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

4.2.2 Polímeros

- Eudragit[®] RS100 (M_w 150.000 g.mol⁻¹, RöhmPharma Polymers, Darmstadt, Alemanha).

O fármaco e os polímeros foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

4.2.3 Água Purificada

Para o desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas foi utilizada água purificada pelo processo de osmose reversa no equipamento TE-4007-10 (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

4.2.4 Reagentes e Meios Usados no Cultivo Celular

- Azul de Tripan (Sigma, St. Louis, EUA);
- Bicarbonato de sódio P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- L-glutamina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Vitrocell, Campinas, Brasil);
- Penicilina/Estreptomicina (Vitrocell, Brasil);
- Piruvato sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil);
- Tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, EUA)

4.2.5 Outros Reagentes e Solventes

- Acetona P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (EMD Chemicals, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido acético glacial P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween[®] 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Span 80[®] (Monooleato de sorbitano, Deg, São Paulo, Brasil);
- Trietilamina 98,5% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média (TGCM, Alpha Química, Porto Alegre, Brasil).

Os solventes orgânicos apresentaram grau analítico ou grau cromatografia espectroscópica e foram usados sem tratamento prévio.

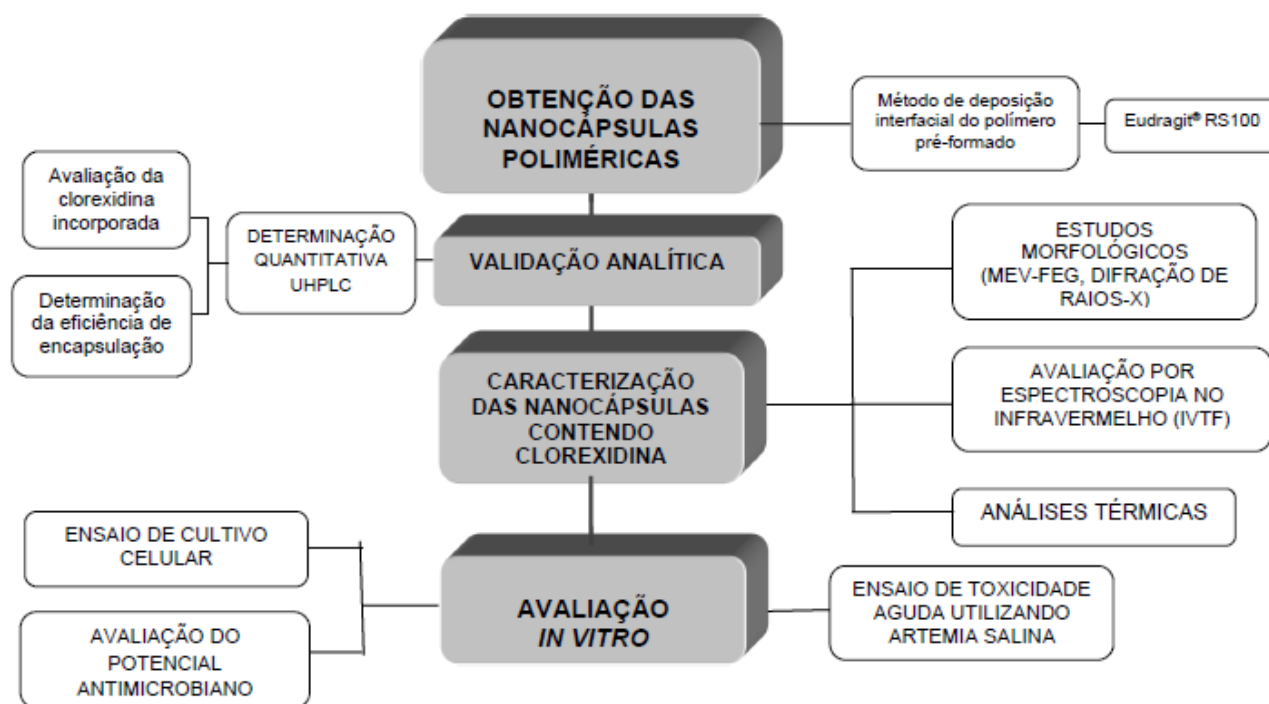
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa iniciou com a obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas. Para a determinação quantitativa da CLX incorporada nas nanopartículas poliméricas foi utilizado o método de cromatografia líquida de ultra pressão (UHPLC), previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco. As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. A estabilidade das nanopartículas poliméricas foi investigada por meio de características físico-químicas.

As formulações de nanopartículas contendo CLX foram submetidas a estudos *in vitro* frente à linhagem celular 3T3, para a determinação da citotoxicidade. O efeito antibacteriano e antifúngico foi comprovado frente as cepas usuais da cavidade bucal. A avaliação biológica das formulações das nanocápsulas foi conduzido empregando o modelo *in vitro* de toxicidade frente aos náuplios de artemia.

As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma da pesquisa



Fonte: Autor (2020).

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das Suspensões de Nanocápsulas Contendo Clorexidina

As nanopartículas poliméricas foram preparadas por meio da deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1988), consideradas das formulações indicadas na Tabela 1.

De forma sintética, o Eudragit[®] RS100 (0,100 g) foi solvatado em acetona (27 mL) na presença de Span80[®] (0,0770 g), clorexidina base (0,0240 g) e triglicerídeos de cadeia média (TGCM) (0,300 g) por 60 minutos, sob agitação mecânica de 3.500 rev.min⁻¹ a 40° C, em equipamento Fisaton, modelo 713 (São Paulo, Brasil). Em seguida, a fase orgânica foi gotejada sobre a fase aquosa (53 mL), contendo Tween80[®] (0,0770 g), sendo a mistura mantida sob agitação mecânica de 3.500 rev.min⁻¹ em 40° C, durante 10 minutos. Após, procedeu-se à evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida em rotaevaporador (Quimis, São Paulo, Brasil) até o volume final de 10 mL para obter a formulação NANO_CLX (2,4 mg.mL⁻¹) (Figura 7).

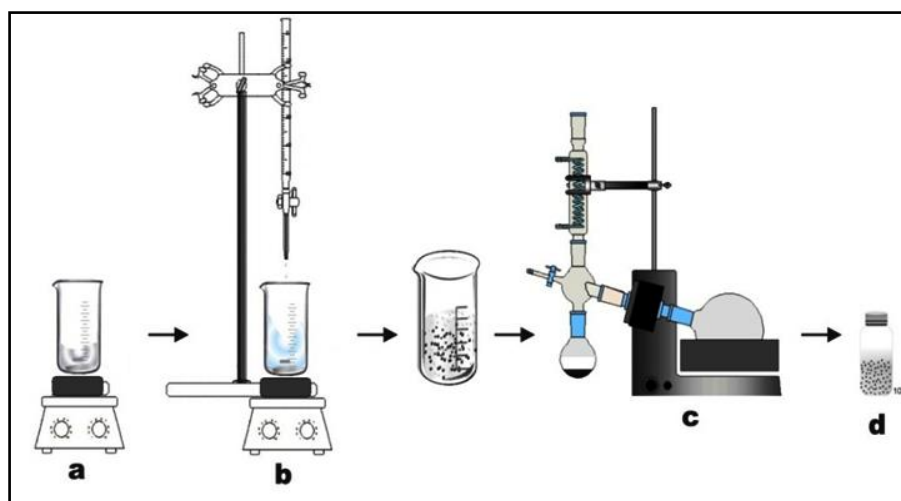
O experimento foi realizado em quintuplicata. Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NANO_0) como controle negativo.

Tabela 1 – Composição de formulações das nanocápsulas poliméricas com e sem clorexidina, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

Composição	Formulação	
	NANO_0 (0%)	NANO_CLX
Fase aquosa		
Tween 80 [®] (g)	0,077	0,077
Água ultrapura (mL)	53,0	53,0
Fase orgânica		
Clorexidina base (CLX) (g)	–	0,024
Span 80 [®] (g)	0,077	0,077
TGCM* (g)	0,300	0,300
Eudragit [®] RS100 (g)	0,100	0,100
Acetona (mL)	27,0	27,0

*TGCM: triglicerídeos de cadeia média

Figura 7 – Representação do método de obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas



- a) Preparo da fase orgânica; b) método: gotejamento fase orgânica sobre a fase aquosa; c) rotaevaporação; d) suspensão de nanocápsulas poliméricas

Fonte: Autor (2020).

4.4.1.1 Obtenção da mistura física

A mistura física (MF) entre o polímero Eudragit® RS 100 e a CLX foi preparada para fins de caracterização comparativa com as formulações desenvolvidas. Esta mistura física foi obtida na proporção, em massa, de 1:1 (CLX: polímero) (50% m/m).

4.4.2 Determinação da CLX Incorporada às Nanocápsulas Poliméricas e da Eficiência de Encapsulação

A quantificação da CLX encapsulada nas nanopartículas foi realizada pelo método indireto, o qual determina a concentração de fármaco não associado ao sistema carreador no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas poliméricas, após o procedimento de ultrafiltração/centrifugação (HITACHI, Himac CR21GII), a 2200 $\times g$ durante 30 minutos, em dispositivo Amicon® (10.000, MILLIPORE). As amostras foram analisadas por UHPLC, em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada a partir da Equação 1:

$$EE\% = \frac{CLX_{inicial} - CLX_{livre}}{CLX_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, $CLX_{inicial}$ corresponde à concentração do fármaco adicionada inicialmente à formulação e, CLX_{livre} , à concentração de CLX não incorporado às nanocápsulas, quantificadas por UHPLC. Os valores de EE% foram expressos como média $\pm$ DP.

4.4.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por UHPLC

O método analítico por UHPLC foi desenvolvido e validado para quantificar a CLX incorporada nas nanocápsulas. Foi utilizado para a determinação do teor do fármaco encapsulado e avaliação da eficiência de encapsulação das formulações.

4.4.2.1.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises por cromatografia líquida de ultra pressão (UHPLC) foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU (Nexera X2), equipado com detector de arranjo de fotodiodos-DAD (SPD-M20A), bomba LC-30AD, degaseificador (DGU-20A5RA), forno (CTO-20A) e injetor/amostrador automático (SIL-30AC, volume de injeção: 5 μ L), comunicador (CBM-20A), controlado por software Labsolutions versão 5.73.

Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C8XBridge™ (Waters, 75 mm x 4.6 mm, 2.5 μ m) e uma pré-coluna XBridge™, mantidas à temperatura de 40 °C.

A eluição foi realizada de modo isocrático, fase móvel constituída de acetonitrila: água acidificada com ácido acético até pH 3,0 mais 1,5% de trietilamina (34:66 v/v), volume de injeção 5 μ L, na temperatura de 40 °C e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 2 minutos e a detecção ocorreu em 258 nm.

4.4.2.1.2 Validação do método para a quantificação da clorexidina incorporada às nanocápsulas

A validação do método analítico por UHPLC foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas obtidos para as suspensões de nanocápsulas sem CLX (NANO_0, controle negativo) e para as suspensões contendo o fármaco, com o objetivo de confirmar se os outros componentes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 40,0 μ g mL⁻¹ de CLX, em uma mistura de acetonitrila:água acidificada com ácido acético até pH 3,0 mais 1,5% de trietilamina (34:66 v/v). A equação da

reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados com base no cálculo de regressão linear de mínimos quadrados.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados pelas equações 2 e 3, respectivamente (ICH, 2005):

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e S, o coeficiente angular.

A precisão foi comprovada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada a partir da análise de seis amostras independentes, na concentração de $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para a avaliação da precisão intermediária as amostras contendo $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram analisadas em dois dias consecutivos, em triplicata. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) intra-dia e inter-dia.

A exatidão foi determinada calculando a porcentagem de recuperação da CLX em três níveis de concentração, baixo, intermediário e alto ($13,0$; $20,0$ e $27,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata. O valor da concentração média obtida foi comparado com o valor teórico, considerado 100%.

Para a avaliação da robustez, o fluxo foi modificado de 1 mL.min^{-1} para $0,995$ e $1,005 \text{ mL.min}^{-1}$ e a proporção da fase móvel de 34:66 de acetonitrila: água acidificada com ácido acético até pH 3,0 mais 1,5% de trietilamina foi variada para 33:67 e 35:65.

Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão, em triplicata.

4.4.2.1.3 *Análise estatística da validação do método analítico por UHPLC*

A análise estatística foi realizada por Análise de variância (ANOVA), teste t-student e análise de resíduos, utilizando software Statistica 8.0 (Statsoft, Inc.).

4.4.3 Caracterização das Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas

4.4.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, imediatamente o preparo. Os resultados representaram a média de três amostras diferentes.

4.4.3.2 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos ($n = 3$) por espectroscopia de correlação de fótons após a diluição de uma alíquota de suspensão de nanocápsulas em água ultrapurificada (1:500 v/v). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

No mesmo equipamento, o potencial zeta foi determinado por meio da técnica de mobilidade eletroforética, com o mesmo preparo de amostra utilizado para a análise do tamanho de partícula.

4.4.3.3 Análise morfológica e de superfície por microscopia eletrônica de varredura com emissão por efeito de campo (MEV-FEG)

A avaliação morfológica e de superfície dos materiais de partida e das nanocápsulas poliméricas preparadas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão com efeito de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado software específico (Electron Optical Design).

4.4.3.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo CLX foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quioto, Japão), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das amostras preparadas foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, do polímero e da mistura física (MF).

4.4.3.5 Análise por difração de raiosX (DRX)

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram depositadas sobre lamínula de vidro e secas em temperatura ambiente. A CLX, o polímero puro e a mistura física não receberam tratamento prévio à análise. Na sequência, as amostras foram examinadas em difratômetro de raiosX (RIGAKU, modelo Ultima IV), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5°C a 80°C , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.3.6 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas de TGA, obtidas na faixa de temperatura entre 25°C e 600°C . Para isso, foi empregada uma termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu), sob razão dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), empregando uma razão de aquecimento de $10^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em microcadinho cilíndrico de alumina contendo aproximadamente $5 \pm 0,1 \text{ mg}$ da amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas para a CLX, para o polímero Eudragit® RS 100, para a mistura física (MF) e para as nanopartículas preparadas, após liofilização, na faixa de temperatura entre 25°C e 500°C . Foi utilizada uma célula calorimétrica DSC-60 (Shimadzu), em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de $10^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, sendo que a amostra ($2,5 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$) foi acondicionada em cápsula de alumínio fechada. O equipamento foi previamente calibrado com índio (m.p. = $429,6 \text{ K}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$) e zinco (m.p. = $692,6 \text{ K}$).

4.4.4 Estudo de Liberação *in Vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* da clorexidina foi realizado pela técnica de difusão do saco de diálise. A formulação NANO_CLX e a solução metanólica de clorexidina ($0,24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram colocadas em diálise (MWCO 10.000, Spectra Por 7), e esse sistema foi imerso em 250 mL de saliva artificial (pH 6,0) com 30% de etanol. O meio de dissolução foi mantido a $37^\circ \text{C} \pm 0,5^\circ \text{C}$, sob agitação magnética de 50 rpm, por um período total de 24 h. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1 mL foram coletadas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume. A porcentagem de fármaco liberado foi determinada usando as condições de UHPLC mencionadas anteriormente. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

4.4.5 Estudo de Estabilidade

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C) e protegidas da luz em frascos âmbar, sendo monitoradas durante dois meses de armazenamento a partir das determinações de pH, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta. Os resultados obtidos após 60 dias foram comparados aos valores encontrados imediatamente e após a preparação.

4.4.6 Ensaios *in Vitro* de Cultivo Celular

4.4.6.1 Fármacos, reagentes e solventes empregados nos ensaios de cultivo celular

Os principais fármacos, reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram: meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (Vitrocel), L-glutamina (Vetec), piruvato sódico (Sigma-Aldrich), penicilina (Vitrocel), estreptomicina (Vitrocel), bicarbonato sódico (Vetec), azul de tetrazólio, MTT (Sigma-Aldrich), azul de tripan, tripsina (Sigma-Aldrich), clorexidina base (Sigma-Aldrich).

4.4.6.2 Cultura da linhagem de fibroblastos 3T3

Os fibroblastos 3T3 número CRL-1658, provenientes do banco de células do Rio de Janeiro, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fábio André dos Santos (UEPG).

As células 3T3 são consideradas uma linhagem de fibroblastos padrão, com características de célula normal, ou seja, não tumoral, que originalmente foram obtidas de tecido de embrião de rato albino suíço (ATCC, 2015).

Os fibroblastos 3T3 foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em garrafas de cultura mantidas em estufa umidificada a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5%.

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Os espécimes celulares apresentavam tempo de dobramento de 2 dias. Após a monocamada celular atingir confluência, as células foram lavadas com solução de tampão fosfato estéril (PBS). Para o desprendimento dos fibroblastos, a garrafa foi incubada por 5 minutos com 3 mL de tripsina 0,25%. Após as células desaderirem do fundo da garrafa foi adicionado igual volume de DMEM contendo 10% de SFB (SANSON, 2016). Ao início de cada experimento foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para a determinação da quantidade de células por poço.

4.4.6.3 Estratégia experimental e tratamento das células

Para avaliar o efeito das nanocápsulas contendo CLX, as células 3T3 (1×10^4 células.poço⁻¹) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h com meio completo, para reestabelecimento das condições adequadas como, por exemplo, a completa adesão celular. Para a avaliação da citotoxicidade, por meio de ensaios de viabilidade celular, a linhagem 3T3 foi incubada com concentrações diferentes do fármaco (CLX: 12,5; 25; 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), em sua forma livre e encapsulada nas nanopartículas, pelo período de 72 horas.

4.4.6.4 Determinação da citotoxicidade da clorexidina e das nanocápsulas desenvolvidas

A determinação da citotoxicidade foi realizada após 24, 48 e 72 h de incubação com os tratamentos, em experimentos isolados, avaliando-se a viabilidade celular de fibroblastos 3T3 por meio de dois procedimentos distintos:

4.4.6.4.1 Ensaio redução de Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT)

As células nas condições de cultivo descritas acima, foram tratadas com a clorexidina base, com as nanocápsulas contendo CLX e com as nanocápsulas sem CLX pelo período de 72 h, sendo o metabolismo celular avaliado pela redução do reagente MTT (MOSMANN et al., 1983). Resumidamente, após o período de tratamento, o meio de cultivo foi retirado e desprezado, 200 μL de uma solução de azul de tetrazólio (MTT) a 0,5 mg.mL^{-1} foi adicionada nos poços que continham as células. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37 °C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazano. Após este período, foi retirado o sobrenadante (solução de MTT) e na sequência, os cristais formados foram solubilizados em 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (Biotek, μQuant).

4.4.6.4.2 Ensaio do vermelho neutro (VN)

O perfil citotóxico da CLX pura e das nanosuspensões de CLX (NANO_0 e NANO_CLX) foi avaliado também por meio do ensaio do vermelho neutro (VN) nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

O ensaio de incorporação de vermelho neutro proporciona uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em cultura, sendo um dos testes de citotoxicidade mais utilizados.

O teste é fundamentado na capacidade de células viáveis incorporar e se ligar ao corante. Trata-se de um corante catiônico fraco que penetra as membranas celulares por difusão passiva não-iônica, concentrando-se nos lisossomos, onde se deposita por ligações eletrostáticas hidrofóbicas a grupos aniônicos ou fosfato na matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; SANSON, 2016).

Os fibroblastos 3T3 foram plaqueados na proporção de 1×10^4 células.poço⁻¹ em placas de 96 poços com DMEM, contendo 1% de SFB. Após incubação das placas por 24h em incubadora a 5% de CO₂ e 37 °C, o meio foi removido e adicionado DMEM a 1% SFB com as nanosuspensões de CLX nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo cada concentração adicionada em triplicata. Poços que receberam apenas DMEM contendo 1% SFB sem tratamento foram utilizados como controle. Os testes de citotoxicidade foram realizados após 24, 48 e 72 h de tratamento das células com as nanosuspensões de CLX. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado, o sobrenadante foi descartado e foram pipetados 200 μL de solução de vermelho neutro a 0,5%. As células foram incubadas com o corante por 3 horas. Após o tempo de internalização do corante, o sobrenadante foi descartado, os poços lavados com solução de formaldeído e cloreto de cálcio e pipetado 200 μL de solução de ácido acético e etanol. As placas foram então levadas ao agitador de placas por 10 minutos, até a completa dissolução do corante. Então, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm.

Para ambos os procedimentos empregados, os experimentos foram realizados três vezes. Após obter os valores de absorbância nos ensaios do MTT e VN, foi calculada a porcentagem viabilidade celular dos fibroblastos que receberam os diferentes tratamentos, em comparação com o controle. Os poços controle que receberam apenas DMEM contendo a 1% de SFB foram considerados como 100% de viabilidade celular.

4.4.7 Ensaio de Toxicidade Aguda *in Vitro* Utilizando *Artemia Salina*

O ensaio de toxicidade aguda sobre *Artemia salina* L. (Artemiidae) foi realizado por meio da adaptação do método de Meyer et al. (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g.L⁻¹. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de uma solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Esta solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25 °C. Cerca de 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo a solução salina e a amostra de NANO_CLX, a partir de diluições seriadas

nas concentrações de 6000, 3000, 1500, 750, 375, 187,5, 93,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O ensaio foi realizado em sextuplicata, sendo a contagem dos mortos realizada após 24 horas. Aos dados de porcentagem de *Artemia salina* mortas, em relação ao aumento da concentração de NANO_CLX, foi ajustado a uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de NANO_CLX responsável por matar 50% das artemias, valor representativo da CL50. Utilizou-se o método gráfico de análise para obtenção da CL50 (concentração letal para 50% da população). O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com salina.

4.4.8 Estudo *in Vitro* da Atividade Antimicrobiana da Suspensão de Nanocápsulas Poliméricas Contendo Clorexidina

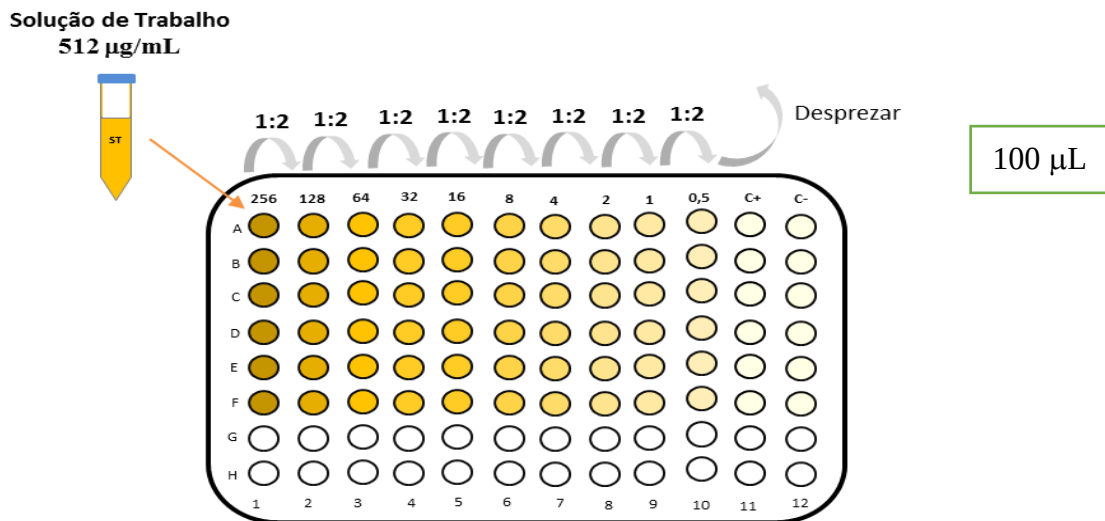
Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A atividade antimicrobiana da NANO-CLX (nanopartícula-cloroexidina); CLX (clorexidina pura a 0,12%); CLX-c a 0,12% (clorexidina comercial) foram avaliadaa por meio da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2015). Amicacina (AMI) foi utilizada como controle positivo. A concentração variou de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas substâncias testadas.

4.4.8.1 Solução de trabalho (ST) e diluição

A ST das substâncias em teste foi preparada na concentração de 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e esterilizadas por filtração (membrana milipore 0,22 μm - TPP, Trasadingen, Suíça). A CLX foi dissolvida em acetona e diluída em caldo Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi realizada diluição seriada em caldo Mueller-Hinton diretamente em microplacas esteréis de 96 poços com fundo chato, conforme o esquema da Figura 8. Foram realizados os seguintes procedimentos:

- i. Foi pipetado 100 μL de caldo Mueller-Hinton (CMH) em todas as colunas até a linha F;
- ii. Na sequência, pipetou-se 100 μL da SE em cada poço da coluna 1 até a linha F (pipetador automático de 8 canais);
- iii. Após homogeneização, 100 μL foram transferidos da coluna 1 para a coluna 2. O procedimento foi repetido até a coluna 10 e os últimos 100 μL foram descartados;
- iv. As colunas 11 e 12 continham somente caldo Mueller-Hinton para o controle de viabilidade microbiana (C+) e o Controle de esterilidade (C-).

Figura 8 - Esquema de diluição seriada



C+: Controle de viabilidade microbiana; C-: Controle de esterilidade.

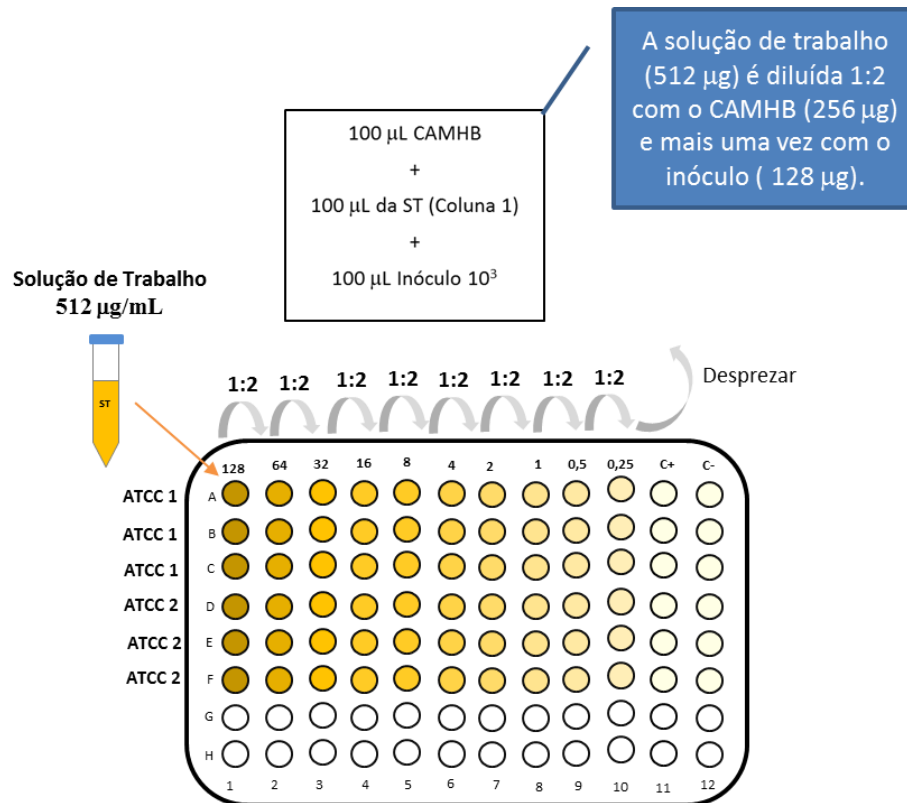
4.4.8.2 Microrganismos e inóculo microbiano

Os microrganismos utilizados foram as cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (cepa sensível), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (cepa resistente - produtora de beta-lactamase de espectro ampliado), *Staphylococcus aureus* BA976, *Candida albicans* ATCC 14053.

As cepas bacterianas foram repicadas em ágar TSA (*Trypticase soy agar*) e *C. albicans* em ágar batata. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C. As suspensões microbianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. Em seguida, foram diluídas até a concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ em CMH. Foram pipetados 100 µL do inóculo microbiano nos poços com as diferentes soluções a serem testadas, levando a uma concentração final de 10^4 UFC.mL⁻¹.

Os testes foram realizados em triplicata conforme o esquema da Figura 09:

Figura 9 - Esquema de inoculação



C+: Controle de viabilidade microbiana; C-: Controle de esterilidade.

Os testes foram repetidos em três dias diferentes. Para o controle de qualidade da microdiluição em caldo, foi utilizado amicacina nas mesmas concentrações das soluções avaliadas (CLSI, 2015). O controle da atividade inibitória da nanopartícula também foi avaliada.

4.4.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida, segundo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), como a menor concentração que inibe o crescimento microbiano visível e a concentração bactericida mínima (CBM), como a menor concentração onde não houve desenvolvimento de colônia (CLSI, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

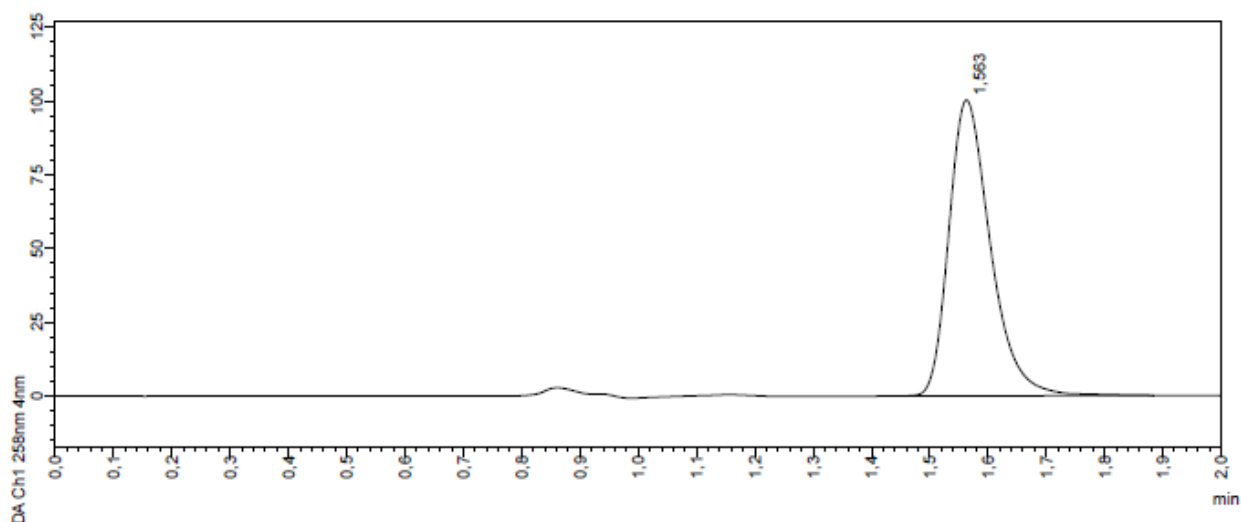
5.1 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DO POLÍMERO PRÉ-FORMADO, A PARTIR DO POLÍMERO (MET)ACRÍLICO EUDRAGIT® RS 100

Depois da preparação, a suspensão de nanopartículas revelou um aspecto de líquidoleitoso e opalescente, com reflexo azulado, o qual está relacionado com o movimento browniano das nanopartículas poliméricas (efeito Tyndall), como descrito previamente na literatura (GUPTA et al., 2012). Por outro lado, é importante mencionar que nenhuma das formulações mostrou precipitação visível, caracterizando, visivelmente um sistema estável.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CLOREXIDINA ENCAPSULADA NAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Durante o desenvolvimento e a validação do método analítico por UHPLC para a quantificação da CLX presente nas nanocápsulas, foram testadas diferentes fases móveis empregando metanol e água e acetonitrila e água, com base nos métodos descritos na literatura (HAVLÍKOVÁ et al., 2007; CHIAPETTA et al., 2008; BOGDANOVSKA et al., 2014), além de colunas C₁₈. Diversos sistemas de gradiente e tempos de análise foram testados, como também, várias proporções no modo isocrático. O melhor resultado foi obtido com a fase móvel de acetonitrila: água acidificada com ácido acético até pH 3,0 com 1,5% de trietilamina (para diminuir o *tailling*) (34:66 v/v) e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 2 minutos e o tempo de retenção de 1,56 minutos (Figura 10).

Figura 10 – Cromatograma da clorexidina base (CLX) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$)



Fonte: Autor (2020).

5.2.1 Validação do Método Analítico para a Quantificação da Clorexidina Presente nas Nanocápsulas Poliméricas

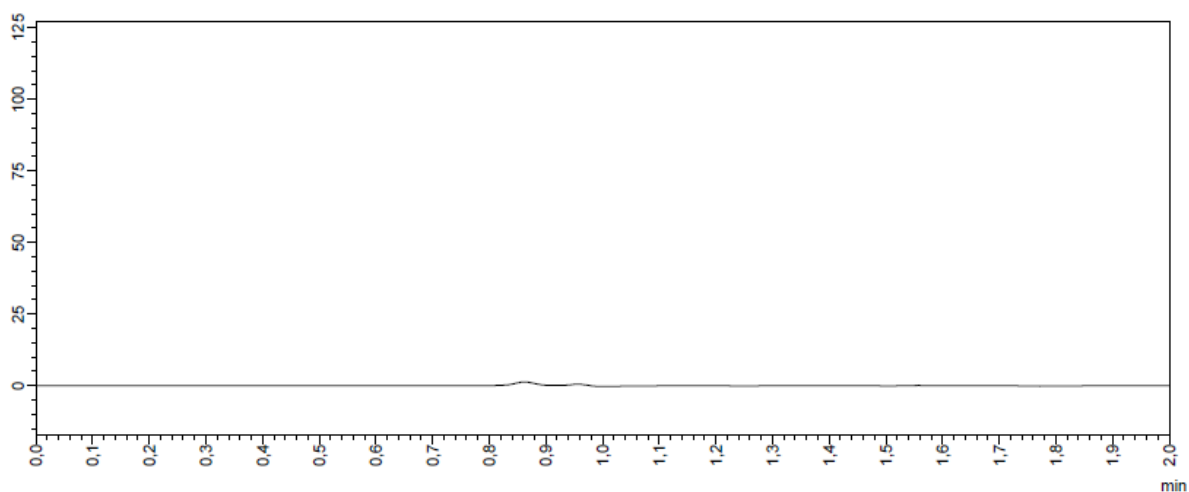
Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominado validação, que garante a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

5.2.1.1 Especificidade

A especificidade avalia o grau de interferência de outras substâncias, como outros fármacos, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Garante que o tempo de retenção seja exclusivamente do analito de interesse, de modo a não comprometer a linearidade, a precisão e a exatidão (RIBANI et al., 2004).

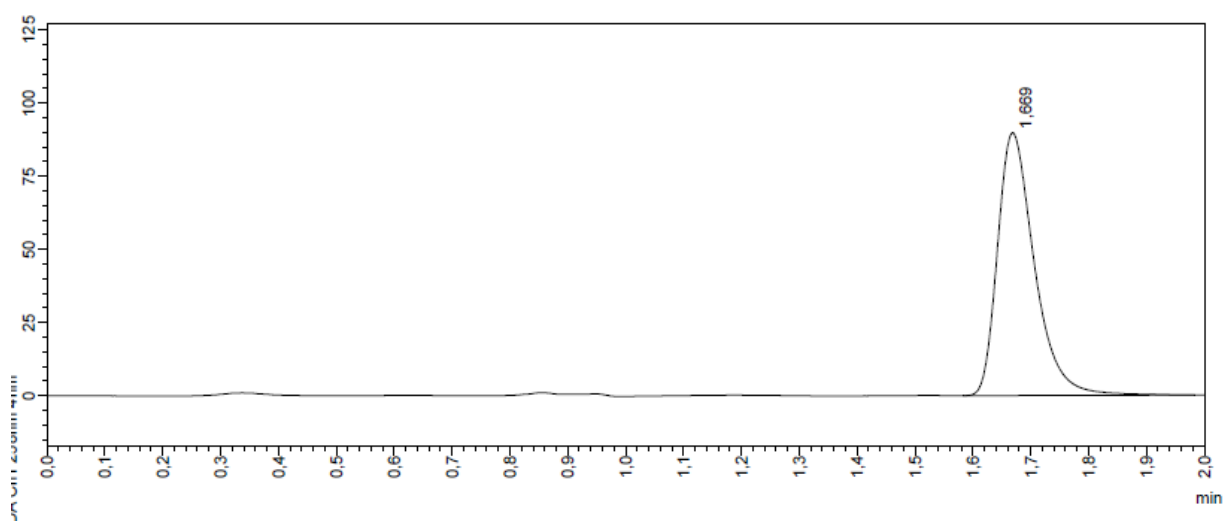
Foi avaliada por meio de análises comparativas entre os cromatogramas da suspensão de nanocápsulas poliméricas sem CLX (NANO_0) e das nanocápsulas com CLX (NANO_CLX), como ilustrado nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11– Cromatograma da formulação NANO_0



Fonte: Autor (2020).

Figura 12– Cromatograma da formulação NANO_CLX



Fonte: Autor (2020).

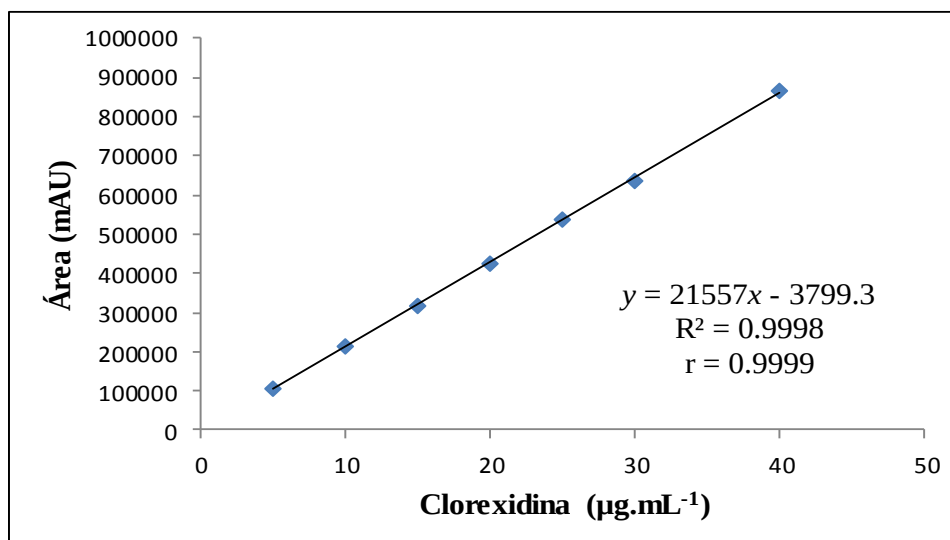
Comparando os cromatogramas obtidos (Figuras 11 e 12), demonstrou-se a especificidade do método, sem apresentar interferentes no tempo de retenção do analito, em concordância com as especificações oficiais (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

5.2.1.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2017).

As curvas analíticas foram lineares no intervalo de 5 a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação da reta representativa da linearidade foi $y = 21557x + 3799,3$ ($n = 3$, $r = 0,9999$) (Figura 13).

Figura 13– Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da CLX obtida em UHPLC ($\lambda = 258 \text{ nm}$)



Fonte: O autor (2020).

De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de correlação próximo a 1,00 não é, necessariamente, o resultado de uma relação linear e, em consequência, o teste para a falta de ajuste que avalia a variação dos valores residuais deve ser aplicado. A análise de variância (ANOVA) para a linearidade do método está apresentada na Tabela 2. O valor de F para a falta de ajuste foi menor que o valor de F tabelado para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Dessa forma, a regressão linear não mostrou falta de ajuste.

Tabela 2 – Resultados obtidos por ANOVA para a linearidade do método analítico

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	1.214860E+12	1	1.214860E+12	16782.44	4,381
Resíduo	1.375387E+09	19	7.238881E+07	Linear	
Falta de ajuste	251220679	5	50244136	0.625724	2,958
Erro puro	1.124167E+09	14	80297616	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado

5.2.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Já o LQ representa a menor quantidade presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

Os valores obtidos para o LD e LQ, empregando as Equações 2 e 3, foram 0,014569 e 0,044149 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, indicando uma adequada sensibilidade do método para a determinação do CLX.

5.2.1.4 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) estão demonstrados na Tabela 3. O desvio padrão relativo (DPR) para a repetibilidade foi de 1,17% e para a precisão intermediária foi de 1,76%, indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas.

Tabela 3 – Resultados obtidos para os ensaios de precisão do método analítico

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	DPR (%)
Repetibilidade (n = 6)	20,0	19,79 $\pm$ 0,23	1,17
Precisão intermediária			
Dia 1 (n = 3)	20,0	19,79 $\pm$ 0,24	1,20
Dia 2 (n = 3)	20,0	19,79 $\pm$ 0,32	1,60
Segundo analista (n = 3)	20,0	20,06 $\pm$ 0,50	2,47

DP: desvio padrão e DPR: desvio padrão relativo

5.2.1.5 Exatidão

A exatidão foi verificada como porcentagem de recuperação e DPR da concentração média do analito em três diferentes concentrações (13,0; 27,0; e 35,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados obtidos (Tabela 4) foram satisfatórios, pois as porcentagens de recuperação ficaram entre 96,68 e 100,36%, estando em conformidade com os limites estabelecidos pelas normas do ICH (2017), que é de até + ou – 5%.

Tabela 4 – Porcentagem de recuperação e DPR obtidos a partir da análise de exatidão ($n = 3$)

Solução padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (% $\pm$ DP)	DPR (%)
13,0	98,32 $\pm$ 0,54	0,55
27,0	96,68 $\pm$ 0,62	0,64
35,0	100,35 $\pm$ 1,48	1,48

DP: desvio padrão e DPR: desvio padrão relativo

5.2.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico indica a confiabilidade do método frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na área sob a curva e no tempo de retenção da CLX quando a vazão variou para 0,995 e 1,005 mL.min^{-1} (DPR = 0,23 e 0,35%, respectivamente) e a proporção da fase móvel para 33:67 e 35:65 (DPR = 0,80 e 0,17%, respectivamente). Desse modo, o método demonstrou-se robusto para a substância analisada sob as condições avaliadas.

5.2.2 Determinação do Teor de Clorexidina Incorporado nas Nanocápsulas e Eficiência de Encapsulação (EE)

Os resultados da concentração do fármaco incorporado às nanocápsulas (mg.mL^{-1}) e da eficiência de encapsulação (%) para a formulação NANO_CLX estão resumidos na Tabela 5. Considerando o conteúdo do fármaco as nanosuspensões desenvolvidas apresentaram concentrações com valores muito próximos aos teóricos, indicando que praticamente não houve perda durante sua preparação. Além disso, a formulação apresentou valor de EE superior a 99%, o que está relacionado à baixa solubilidade aquosa da CLX (0,026 g.L^{-1} a 20 °C, *The Human Metabolome Database*), que acarretou a presença alta da concentração do fármaco no interior da nanocápsula.

Tabela 5 – Teor de clorexidina encapsulada e eficiência de encapsulação ($n = 3$)

Amostras	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CLX encapsulado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	EE (%)*
NANO_CLX	240,0	239,85 ($\pm$ 0,05)	99,94 ($\pm$ 0,54)

*média $\pm$ desvio padrão

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE

5.3.1 Determinação Do pH, Tamanho de Partículas e Potencial Zeta

Os resultados da caracterização físico-química das formulações desenvolvidas no presente trabalho podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6 – Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas sem o fármaco (NANO_0) e com o fármaco (NANO_CLX) (n=3) segundo pH, tamanho de partícula (nm) e potencial Zeta (mV)

Amostras	pH*	Tamanho de partícula (nm)*	Potencial Zeta (mV)*
NANO_0	5,50 ± 0,156	158,20 ± 30,024	26,5 ± 2,605
NANO_CLX	6,84 ± 0,094	142,67 ± 12,015	22,4 ± 2,532

*média ± desvio padrão

Considerando-se a determinação do pH, as formulações sem o fármaco (NANO_0) apresentaram valores próximos de 5,50, o que está em conformidade com outras suspensões de nanopartículas preparadas com Eudragit® RS 100 (SCHAFFAZICK et al., 2006). Em contrapartida, as nanosuspensões contendo CLX apresentaram um valor médio de pH próximo de neutro (6,84), sendo um valor ideal, tendo em vista que, a CLX tem um pH de estabilidade entre 5,0 a 8,0 (VITALIS, 2012).

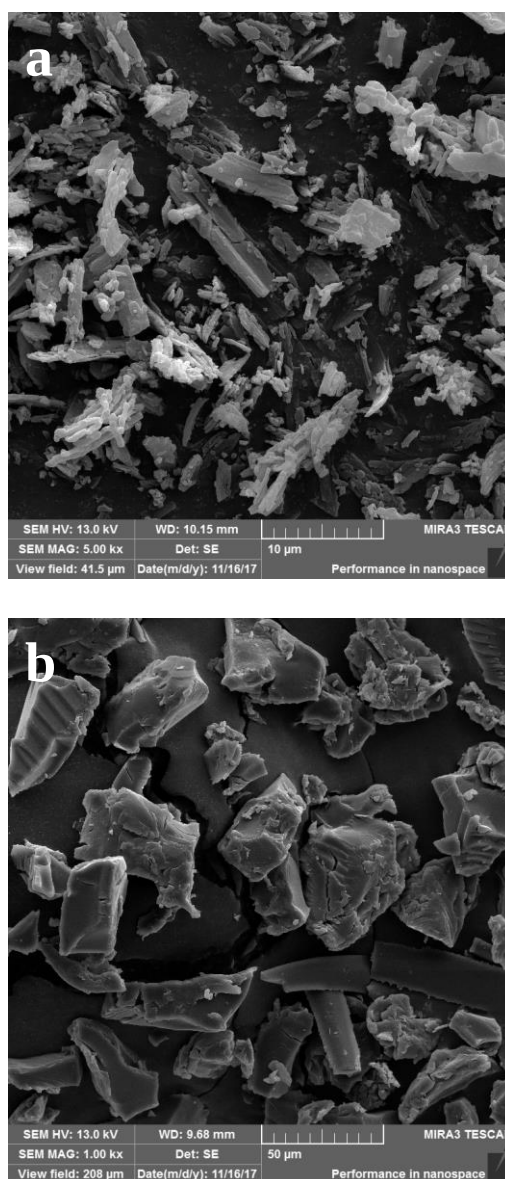
Quanto ao tamanho das partículas, o diâmetro médio das nanopartículas poliméricas das formulações apresentou-se na faixa de 158,2 ± 30,024 nm para a NANO_0 e 142,67 ± 12,015 nm para a NANO_CLX, sendo que a presença do fármaco não influenciou significativamente os diâmetros das partículas.

No que diz respeito à avaliação do potencial zeta, as suspensões apresentaram valor do potencial zeta positivo 26,5 ± 2,605 mV e 22,4 ± 2,532 mV (NANO_0 e NANO_CLX, respectivamente). As nanopartículas mostraram valores positivos, devido a carga positiva dos grupamentos amônio quaternários do polímero (Eudragit® RS 100), que possui natureza catiônica (ADIBKIA et al., 2011). A adição da clorexidina base não alterou de forma expressiva o valor do potencial zeta, além disso valores acima de 15 mV do potencial zeta indicam uma proteção aos processos de floculação e aglomeração, o que caracteriza as formulações como estáveis.

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão por Efeito de Campo (MEV-FEG)

Os resultados obtidos por MEV-FEG para a CLX base e para o polímero Eudragit® RS100 estão indicados na Figura 14, sendo que as micrografias foram obtidas em aumento de 5000 e 1000 vezes, respectivamente. Foi observado que o fármaco (Figura 12, a) apresentou uma morfologia cristalina. O Eudragit® RS 100 (Figura 12, b) revelou, antes da preparação das nanopartículas, aglomerados em blocos, com uma superfície levemente irregular.

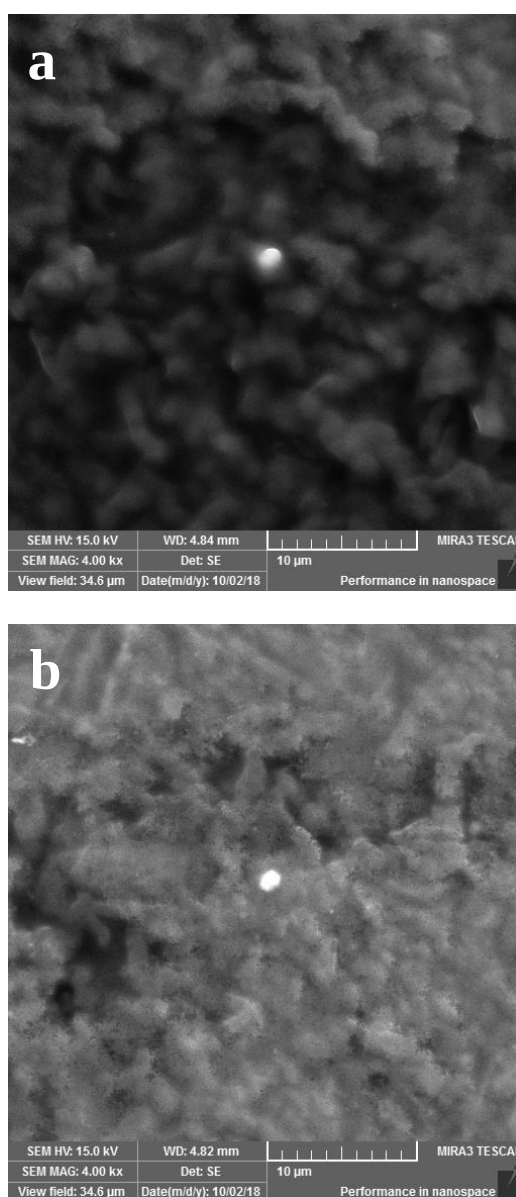
Figura 14 – Aspectos morfológicos da clorexidina pura (a) e do Eudragit® RS 100 (b) por MEV-FEG, aumento de 5 kx e 1 kx, respectivamente



Fonte: Autor (2020).

Os resultados obtidos por MEV-FEG para as nanopartículas poliméricas estão indicados na Figura 16. Foi observado que as nanopartículas denominadas NANO_0 elaboradas na ausência do fármaco (Figura 16,a) e NANO_CLX com o fármaco (Figura 15,b), mostraram formato esférico, superfície lisa e com relativa homogeneidade de tamanho.

Figura 15 – Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas poliméricas NANO_0 (a) e NANO_CLX (b), em aumento de 4kx



Fonte: Autor (2020).

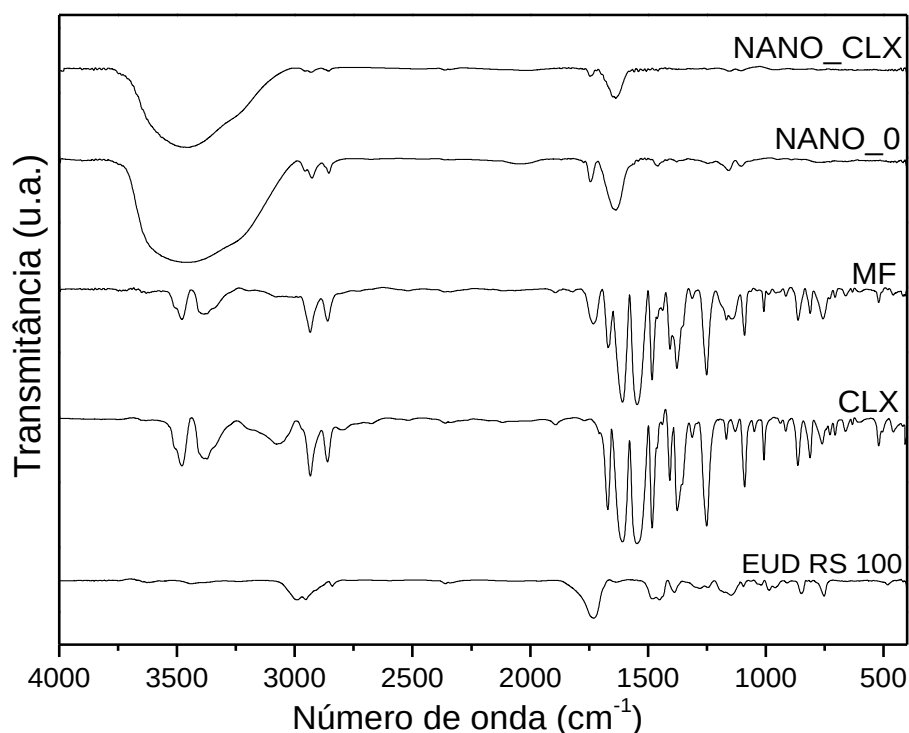
Por meio da microscopia eletrônica de varredura, pode-se comprovar as dimensões nanométricas de ambas as formulações desenvolvidas, apresentando aproximadamente 150 nm, o que condiz com os resultados obtidos pelo equipamento Zeta-sizer Nano Series.

As fotomicrografias obtidas não demonstraram a formação de cristais. Cristais podem ocorrer quando o composto a ser nanoencapsulado está presente em excesso no meio de dispersão ou devido a uma grande distribuição do tamanho das nanopartículas obtidas.

5.3.3 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR da clorexidina base, do Eudragit® RS 100, da mistura física (CLX + EUD RS100) e das nanopartículas poliméricas com o fármaco (NANO_CLX) e sem o fármaco (NANO_0) estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Espectro FTIR do polímero (EUD RS 100), da clorexidina base pura (CLX), da mistura física (MF): CLX + EUD RS100 (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas NANO_CLX e NANO_0



Fonte: Autor (2020).

O espectro de FTIR da CLX base demonstrou assinalamentos típicos. A vibração N-H de estiramento do grupo imina $C = N-H$ ocorreu em 3371 cm^{-1} , o C-H alifático teve a vibração

de estiramento atribuída em 2933 cm^{-1} . A vibração C = N de estiramento do grupo imina N=C-H foi verificada em 1670 cm^{-1} . A vibração característica de estiramento para as guanidinas = N-C = N foi registrada em 1609 cm^{-1} e as vibrações de estiramento das bandas aromáticas C = C foram observadas em 1539 e 1478 cm^{-1} , e a vibração de estiramento C-Cl foi detectado em 752 cm^{-1} (MUSIAL; KOKOL; VONCINA, 2011).

O espectro de FTIR do Eudragit[®] RS 100 exibiu uma banda forte em 1730 cm^{-1} devido a vibração de estiramentos do grupo éster C = O. O C-H alifático também apresentou vibração de estiramento na faixa de $2900\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (ADIBKIA et al., 2011).

O espectro da mistura física (CLX base + EUD RS 100), como esperado, revelou a sobreposição das bandas características para o fármaco e para o polímero puro. O espectro de FTIR obtido para o NANO_0 apresentou apenas as bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para o polímero.

O espectro de FTIR obtido para a NANO_CLX mostrou bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para a MF. Portanto, é possível afirmar que nenhuma ligação química entre o fármaco e o polímero foi formada durante o processo de nanoencapsulação.

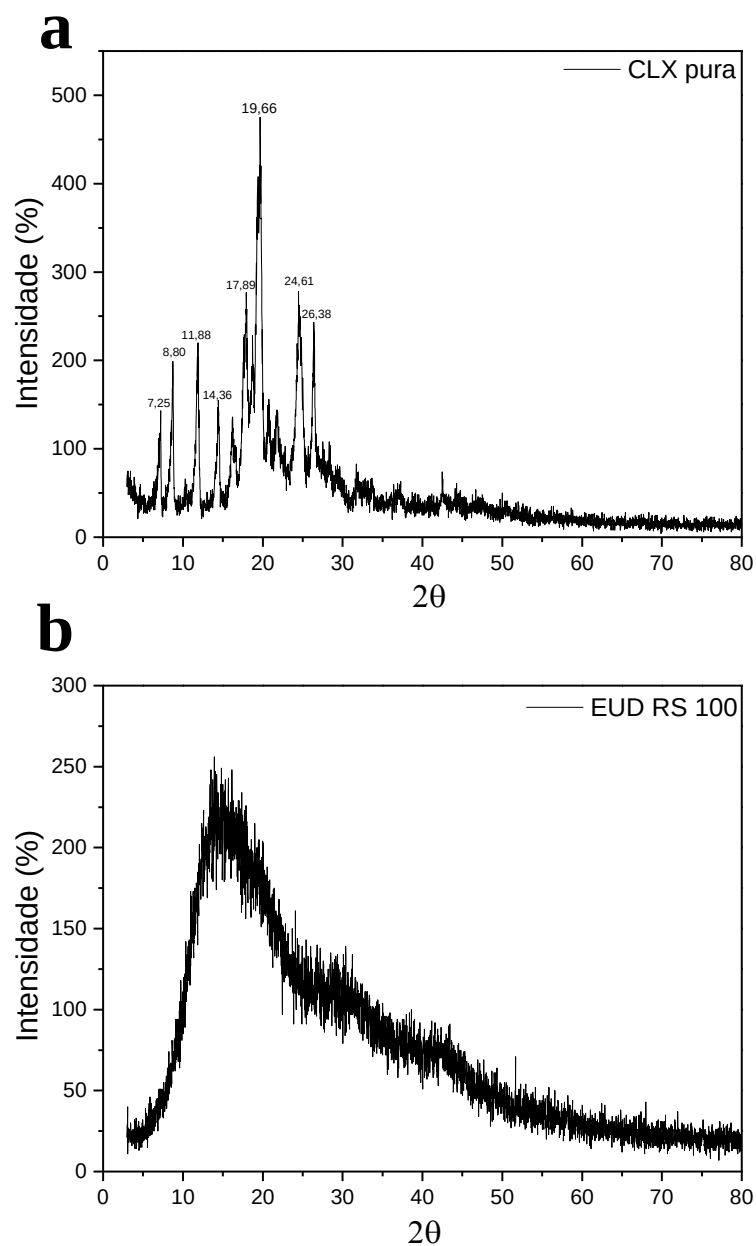
5.3.4 Análise por Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X demonstra a característica do fármaco quanto à cristalinidade ou amorfismo, o que é de extrema importância quanto ao potencial de solubilidade e a velocidade de dissolução do fármaco. Substâncias cristalinas possuem picos bem definidos em relação às substâncias amorfas. Entretanto, sólidos amorfos são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de pouca energia para separá-los (RIEKES et al., 2011).

A Figura 17 apresenta os difratogramas para o fármaco puro (a) e para o polímero Eudragit[®] RS 100 (b) utilizados na obtenção das suspensões de nanocápsulas.

A análise de difração de raios X para a CLX base pura demonstrou picos bem característicos em aproximadamente $2\theta = 7,25^\circ, 8,80^\circ, 11,88^\circ, 14,36^\circ, 17,89^\circ, 19,66^\circ, 24,61^\circ$ e $26,38^\circ$, além de outros de menores intensidades. Esses resultados são compatíveis com os estudos de Schoeffel (2016). Para o polímero Eudragit[®] RS 100 foi obtido apenas um halo amorfo, sem picos característicos de cristalinidade.

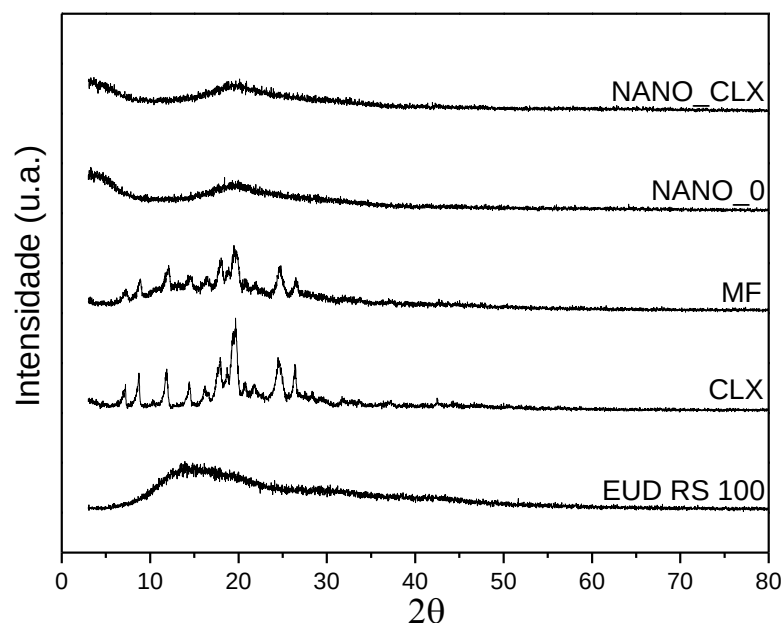
Figura 17 – Difratoogramas da clorexidina base pura (a) e do polímero Eudragit® RS 100 (b)



FONTE: Autor (2020).

A Figura 18 apresenta os difratogramas comparativos entre o fármaco puro (CLX), o polímero de partida (EUD RS 100), a mistura física (MF) e as suspensões de nanocápsulas preparadas (NANO_0 e NANO_CLX).

Figura 18 – Difratomogramas da CLX base pura, do polímero EUD RS100, da mistura física (MF, CLX: EUD RS 100, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX)



FONTE: Autor (2020).

A MF preparada com a adição de EUD RS100 e CLX (1:1) evidenciada a cristalinidade de ambos os compostos, porém em menor intensidade. Já as formulações NANO_0 e NANO_CLX não demonstraram qualquer pico de cristalinidade, revelando a característica amorfa das amostras após o processo de nanoencapsulação.

A análise por difração de raios X detecta picos indicativos de cristalinidade correlacionados às estruturas cristalinas de sólidos. Portanto, a presença de halos amorfs em baixas intensidades confirma a ausência de cristalinidade e é condizente com a estrutura de nanocápsulas.

Os resultados obtidos sugerem à dispersão molecular da CLX, resultando em nanopartículas de caráter amorfo, para as quais se espera melhores características de solubilidade em relação ao fármaco puro. O controle da liberação passa a depender do envoltório polímero.

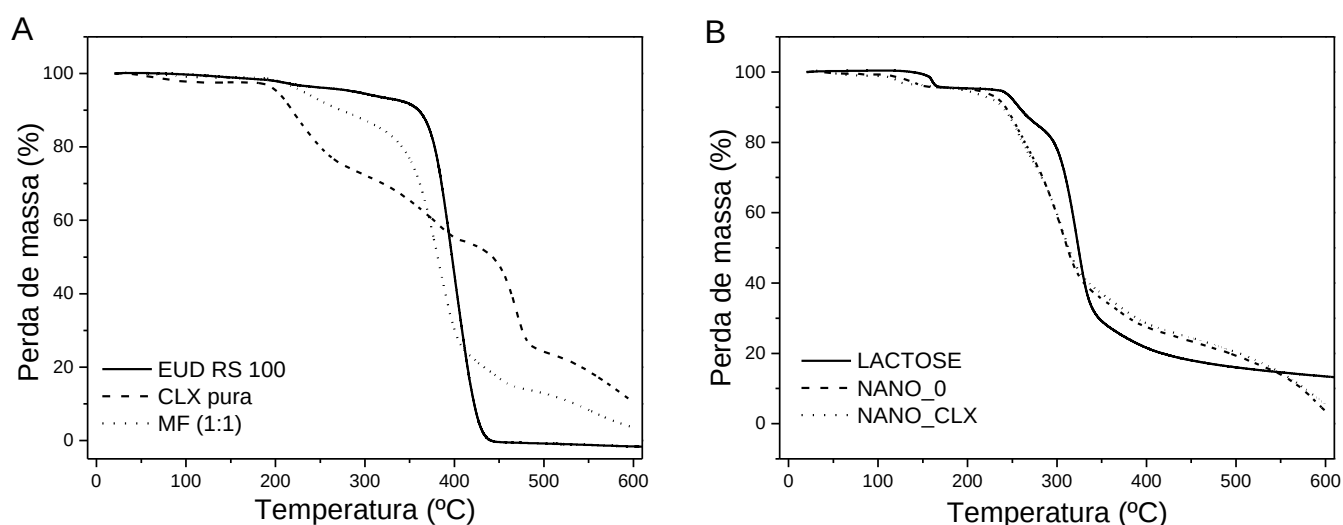
5.3.5 Análise Térmica

5.3.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA obtidas para a CLX pura, para o polímero EUD RS100, a mistura física (MF, CLX: EUD RS 100, 1:1 m/m), a lactose e as suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX) estão representadas na Figura 20 A, B.

As formulações de nanocápsulas exibiram três eventos de decomposição térmica. A primeira fase de perda de massa foi associada à perda de água. A segunda e a terceira fase foram atribuídas a uma combinação da degradação da cadeia polimérica e do fármaco e da volatilização dos seus produtos de decomposição, respectivamente. Além disso, os termogramas indicaram que a temperatura de início de decomposição térmica das nanocápsulas foi acima de 200 °C (NANO_0 = 215,8 °C e NANO_CLX = 206,2 °C) sob fluxo de N₂, o que indica que as nanosuspensões apresentaram uma estabilidade térmica adequada.

Figura 19 – Curvas de TGA: A) CLX base pura, do polímero EUD RS 100 e da mistura física (MF, CLX: EUD RS100, 1:1 m/m) e B) da lactose e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX)



FONTE: Autor (2020).

5.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

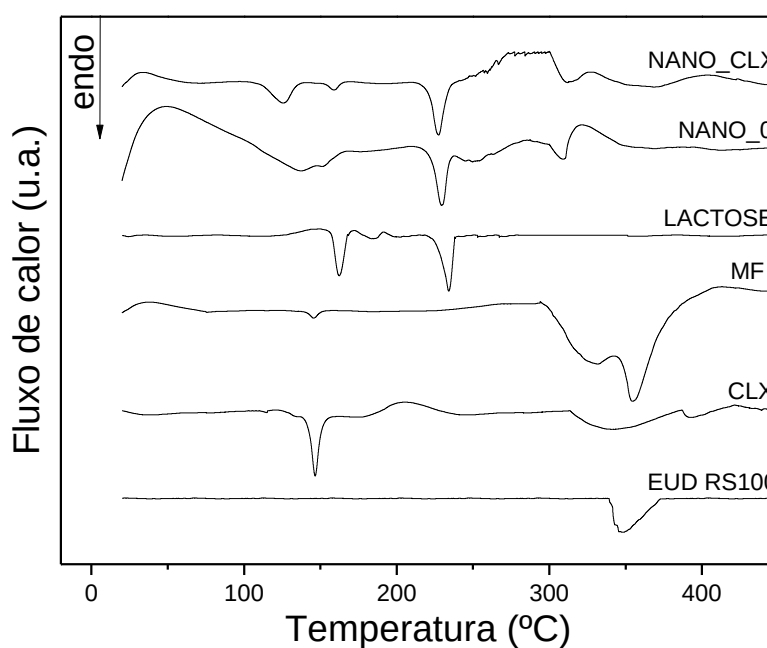
Os termogramas do Eudragit® RS 100, da CLX base, da mistura física (1:1), da lactose e das nanosuspensões liofilizadas (NANO_0 e NANO_CLX), avaliados por DSC, estão mostrados na Figura 20.

Para a CLX base, foi observado um único evento térmico em 133,5 °C, resultado condizente com o especificado na literatura para esse fármaco, que corresponde à sua

temperatura de fusão (HUMAN METABOLOME DATABASE, 2017). O Eudragit® RS 100 demonstrou a temperatura de degradação a 348,8°C como relatado anteriormente (AMIN et al., 2012). A lactose mono-hidratada revelou dois eventos endotérmicos em 162,6 e 234,2 °C. Como esperado, a MF apresentou os eventos térmicos atribuídos ao polímero e a CLX.

O evento de fusão típico da CLX não foi observado na curva de DSC da NANO_CLX liofilizada. Este comportamento térmico sugere que ocorreu uma amorfização do fármaco. O resultado foi confirmado pelos padrões de difração de raios X, nos quais foi constatada a ausência dos picos de cristalinidade do fármaco nas nanopartículas obtidas.

Figura 20 – Termogramas obtidos por DSC da CLX base pura, do polímero EUD RS 100, da mistura física (MF, CLX: EUD RS 100, 1:1 m/m), da lactose e das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NANO_0 e NANO_CLX)



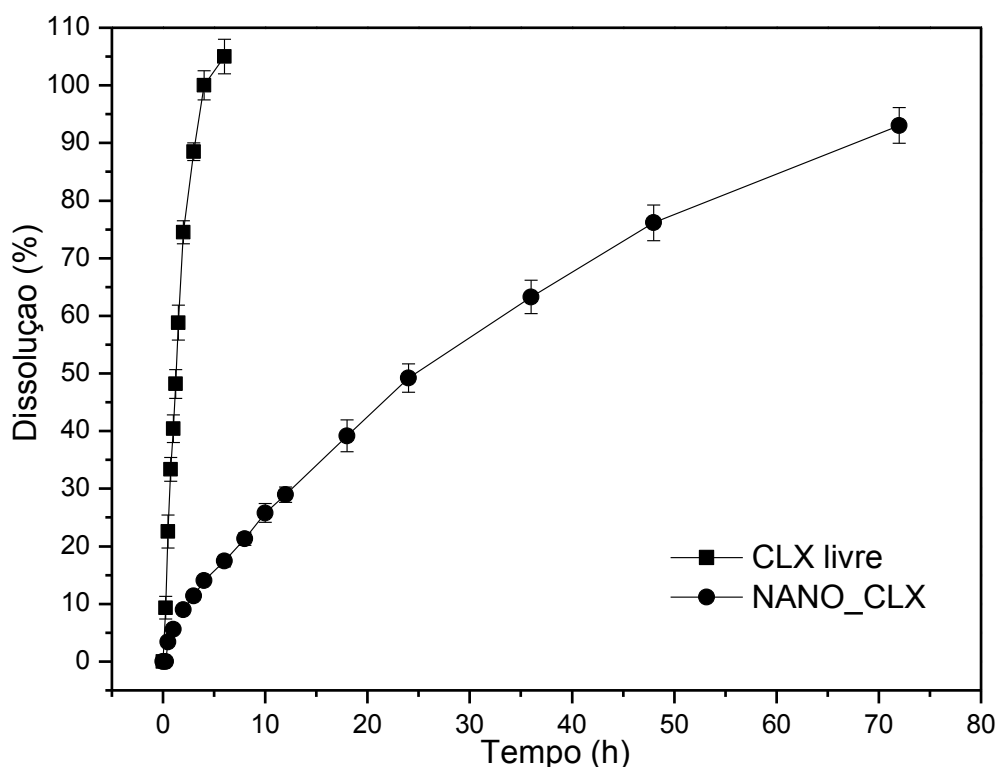
Fonte: Autor (2020).

5.3.6 Estudo de Liberação *in Vitro*

Os perfis de liberação do fármaco puro e da CLX proveniente da formulação NANO_CLX estão resumidos na Figura 19, considerando os ensaios de diálise realizados. A CLX livre apresentou um perfil de liberação do fármaco com rápida difusão ao meio de saliva artificial contendo 30% de metanol. A CLX livre atingiu um valor médio de liberação de 80% aos 175 minutos de experimento. A formulação NANO_CLX liberou 80% de CLX aos 3240 minutos (54 h). Portanto, as nanocápsulas contendo CLX demonstraram perfis de liberação

prolongada sem efeito *burst*, em comparação ao fármaco puro. No presente estudo, uma estrutura típica do núcleo oleoso-envoltório polimérico foi estrategicamente planejada para evitar a liberação imediata da CLX e obter uma liberação prolongada, evitando assim, a administração de múltiplas doses por dia ao paciente.

Figura 21 - Liberação *in vitro* da CLX base livre e da nanopartícula polimérica contendo clorexidina (NANO_CLX)



Fonte: Autor (2020).

5.3.7 Estudo de Estabilidade das Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas

O pH, tamanho de partículas e potencial zeta são parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões poliméricas.

Após 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente e proteção da luz, as nanopartículas poliméricas apresentavam a mesma aparência, sem precipitação ou alterações de cor. Os valores referentes ao pH, tamanho da partícula (nm) e potencial zeta (mV) estão demonstrados na Tabela 7.

Com relação aos valores de pH da NANO_CLX, após dois meses de armazenamento, não houve alteração significativa no valor de pH ($7,45 \pm 0,056$) em relação aos valores iniciais ($6,84 \pm 0,094$). Comportamento semelhante foi verificado para as nanopartículas poliméricas

sem fármaco (NANO_0), sendo o valor de pH inicial $5,50 \pm 0,156$ e, após 60 dias, $5,86 \pm 0,078$.

Quanto ao tamanho das cápsulas poliméricas, para a NANO_CLX, após dois meses de armazenamento, não foi observada alteração significativa do tamanho das partículas ($142,67 \pm 12,015$ nm para $163,86 \pm 23,589$ nm). No caso da NANO_0, após o mesmo período, também não foi observada alteração significativa do tamanho das partículas ($158,2 \pm 30,024$ nm para $147,93 \pm 33,587$ nm).

Os valores iniciais medidos na avaliação do potencial zeta foram de $22,4 \pm 2,532$ mV e $26,50 \pm 2,606$ mV para as nanosuspensões NANO_CLX e NANO_0, respectivamente. Após os 60 dias de acompanhamento os valores medidos foram de $18,5 \pm 6,075$ mV para a NANO_CLX e $22,96 \pm 3,697$ mV para a NANO_0. Portanto, ambas as formulações permaneceram com potencial zeta elevado, apresentando boa estabilidade coloidal.

Assim, foi possível constatar que as amostras de nanopartículas poliméricas sem o fármaco (NANO_0) e com o fármaco (NANO_CLX) demonstraram manutenção de suas características, no período de monitoramento, além de uniformidade entre os parâmetros analisados.

Tabela 7 – Estabilidade das nanopartículas poliméricas sem o fármaco (NANO_0) e com o fármaco (NANO_CLX) (n=3) após 60 dias de armazenamento em relação ao pH, tamanho da partícula (nm) e potencial Zeta (mV)

Amostras	pH*	Tamanho de partícula (nm)*	Potencial Zeta (mV)*
NANO_0	$5,86 \pm 0,078$	$147,93 \pm 33,587$	$22,96 \pm 3,697$
NANO_CLX	$7,45 \pm 0,056$	$163,86 \pm 23,589$	$18,50 \pm 6,075$

*média $\pm$ desvio padrão

Fonte: Autor(2020).

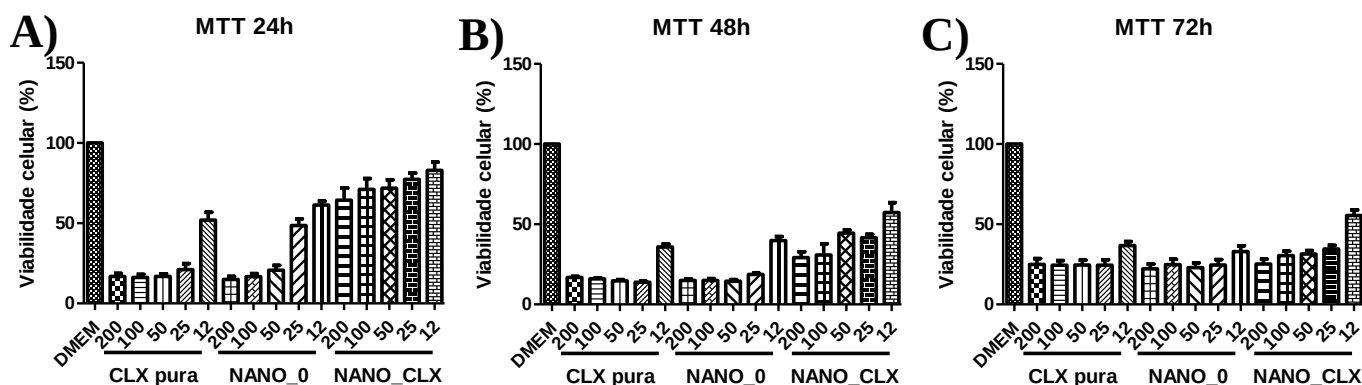
5.4 ENSAIOS *IN VITRO* DE CULTIVO CELULAR

Os efeitos citotóxicos de nanomateriais devem ser considerados por dois aspectos: toxicidade em relação a natureza do fármaco utilizado (no caso, a CLX), e efeitos tóxicos relacionados a forma nanoparticulada (materiais poliméricos) (ALANEZI et al., 2010).

Embora existam poucos estudos relativos à avaliação da eficácia dos nanoencapsulados contendo CLX, foi demonstrado que fármacos nanoencapsulados podem melhorar a eficácia biológica por meio de rápida penetração e biodisponibilidade, reduzindo o potencial de citotoxicidade, a dosagem do fármaco e os custos de produção (ZHU, 2014; SENEVIRATNE et al., 2014).

Inicialmente, foi avaliado o potencial de citotoxicidade com concentrações diferentes do fármaco (CLX:12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{mol}, \text{L}^{-1}$ em 24, 48 e 72 h em fibroblastos 3T3 por meio dos ensaios de (MTT) e (VN). Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22– Viabilidade celular pelo método de redução do MTT avaliada para a clorexidina pura (CLX pura) e para as formulações NANO_0 e NANO_CLX usando a linhagem celular de fibroblastos 3T3 após os períodos de incubação de: A) 24 horas B) 48 horas e C) 72 horas

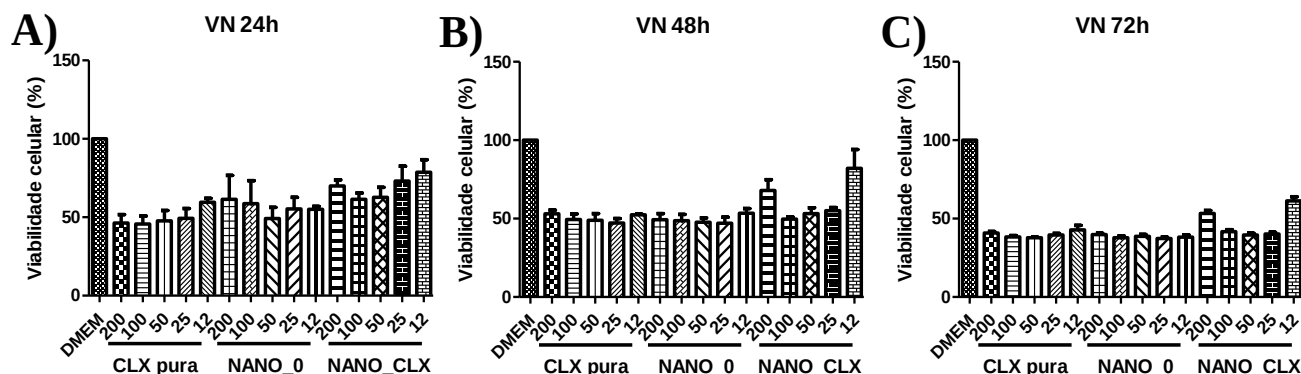


FONTE: O autor (2020).

Quando se avalia os resultados dos testes de viabilidade pela metodologia do MTT após 24 h, é possível verificar que a CLX e a NANO_0 apresentaram uma redução drástica da viabilidade celular, sobretudo nas concentrações mais elevadas. Em contrapartida, o resultado mais importante deste ensaio foi verificado para a NANO_CLX, a qual apresentou um melhor desempenho, mantendo uma maior viabilidade das células 3T3, mesmo em concentrações elevadas do produto, 100 e 200 $\mu\text{mol}, \text{L}^{-1}$. No tempo de 48 h, a NANO_CLX manteve uma melhor resposta, embora não expressiva, em relação à CLX e à NANO_0. Em 72 h, a viabilidade celular foi intensamente reduzida, mesmo para a formulação em estudo, NANO_CLX.

O ensaio do MTT é um teste de citotoxicidade que mede a atividade mitocondrial de células vivas pelas reações químicas de desidrogenase mitocondrial das células viáveis (VERMA et al, 2018). De acordo com a análise dos resultados, nas 48 e 72 h do teste de viabilidade celular, as três formulações se mantiveram tóxicas aos fibroblastos 3T3. A CLX diminuiu consideravelmente a viabilidade dos fibroblastos, o que confirma seu poder citotóxico já constatado na literatura, mesmo em menores concentrações e com outras linhagens celulares usando o ensaio de MTT (SOUZA, et al, 2007; TU, et al, 2015).

Figura 23 - Viabilidade celular pelo método do vermelho neutro (VN), avaliada para a clorexidina pura (CLX pura) e para as formulações NANO_0 e NANO_CLX, usando a linhagem celular de fibroblastos 3T3, após os períodos de incubação de: A) 24 horas B) 48 horas e C) 72 horas.



FONTE: Autor (2020).

Com relação ao ensaio empregando o vermelho neutro, CLX, NANO_0 e NANO_CLX revelaram uma manutenção nos perfis de viabilidade das células 3T3 semelhantes para os três períodos de tempo, ocorrendo uma redução expressiva apenas no período de 72 h. Esses resultados podem ser justificados porque o ensaio de vermelho neutro é baseado na capacidade das células viáveis se incorporar e se ligar ao corante que penetra nas membranas celulares por difusão passiva não-iônica, concentrando-se nos lisossomos, o que ocorre por ligações eletrostáticas hidrofóbicas a grupos aniônicos ou fosfato na matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; SANSON, 2016). Em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade da célula ou a perda da permeabilidade da membrana inibe a incorporação deste corante (HOU et al, 2013).

O resultado mais curioso é que as NANO_CLX apresentaram para os tempos de 24, 48 e 72 h um perfil de viabilidade celular em U considerando as diferentes concentrações testadas, o que pode indicar que a proliferação celular se manteve constante, em resposta a um agente tóxico de baixa intensidade. Os ensaios de MTT e VN revelaram que todas as soluções, em ambas as linhas celulares, tiveram um efeito na viabilidade celular de maneira dependente da dose, assim quanto maior a dose, maior a citotoxicidade.

5.5 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA *IN VITRO* UTILIZANDO ARTEMIA SALINA

Os náuplios de *Artemia salina* foram utilizados no teste de toxicidade aguda, devido à praticidade de manuseio, ao fácil cultivo e ser um método rápido e baixo custo (CARVALHO et al., 2009). A letalidade deste organismo tem sido utilizada para a identificação de repostas

biológicas, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982; CARVALHO et al., 2008). Na avaliação da toxicidade de compostos ativos frente a *Artemia salina*, um valor de CL50 inferior a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ permite considerar o composto como tóxico (MEYER et al., 1982).

Os resultados relacionados à toxicidade da NANO_CLX estão apresentados na Tabela 9. No presente trabalho, a formulação revelou CL50 de 1483,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que indica ausência de toxicidade. Estes dados toxicológicos, segundo Parra et al. (2001), podem ser correlacionados com testes de toxicidade aguda oral em animais.

Tabela 8 – Mortalidade média* de *Artemia salina*, de acordo com as concentrações de NANO_CLX testadas após 24 h de exposição.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média de nauplios mortos $\pm$ DP
6000	9,4 $\pm$ 0,55
3000	7,8 $\pm$ 1,30
1500	6,4 $\pm$ 0,55
750	5,4 $\pm$ 1,52
375	3,4 $\pm$ 0,55
187,5	2,8 $\pm$ 0,84
93,75	1,6 $\pm$ 1,14

*Ensaio realizado em sextuplicata, n = 10

Fonte: Autor (2020).

Alguns estudos relataram o efeito de toxicidade de nanomateriais em *Artemia salina*. Rajabi et al (2015) avaliaram a citotoxicidade de 16 nanopartículas usando o teste da *Artemia* em comparação com o ensaio de MTT. Os resultados obtidos nos dois testes não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Os achados sugerem que o teste de *Artemia salina* pode ser considerada uma alternativa nos experimentos de toxicidade aguda e otimização do tempo de experimentação.

5.6 ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CLOREXIDINA

O uso dos agentes químicos na higiene bucal tornou-se essencial, principalmente pelo comprometimento sistêmico dos pacientes em relação aos microrganismos associados as alterações bucais. Os microrganismos investigados nesta pesquisa foram determinados correlacionando-os com as infecções do trato respiratório que mais acometem o paciente intubado. A Tabela 8 resume a avaliação antimicrobiana das nanocápsulas poliméricas de clorexidina, frente aos controles. A formulação NANO-CLX revelou inibido o crescimento microbiano contra as cepas (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (cepa sensível), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (cepa resistente - produtora de beta-lactamase de espectro ampliado), *Staphylococcus aureus* BA976 e *Candida albicans* ATCC 14053.

Tabela 9 – Distribuição das CIMs ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CBMs ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das formulações NANO_CLX, CLX e CLX comercial testadas contra cepas de referência ATCC

CEPA DE REFERÊNCIA	NANO_CLX		CLX		CLX-c	
	CIMCBM		CIMCBM		CIMCBM	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2	8	2	8	1	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25	2	0,25	1	0,5	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,5	1	0,25	1	0,5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	8	8	8	16	16	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	16	32	16	32	32	64
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	8	8	8	8	8	8

CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; NANO_CLX (nanopartícula contendo clorexidina); CLX (clorexidina pura a 0,12%); CLX-c a 0,12% (clorexidina comercial).

Fonte: Autor (2020).

A formulação NANO_CLX demonstrou atividade semelhante à da CLX pura e da CLX-c, após 24 h de incubação. Em particular as cepas de *K. pneumoniae* (ATCC 13883 e

ATCC 700603) e para *C. albicans* as CIMs ficaram entre 8 e 32 µg/ml. As CBM variaram de 1 a 3 vezes as CIMs. Os resultados da amicacina ficaram dentro do esperado, entre 0,5-4 µg.mL⁻¹ para *E. coli* ATCC 25922; 1-4 µg.mL⁻¹ para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 e 64-256 µg.mL⁻¹ para *E. faecalis* ATCC 29212. Esses microrganismos são prevalentes no desenvolvimento das infecções respiratórias, em especial, as PAVs.

De modo geral, após 24 h de incubação as formulações mostraram um potencial antimicrobiano semelhantes em relação ao controle positivo. Neste sentido o processo de encapsulação usando o polímero metacrílico não prejudicou o desempenho antimicrobiano da clorexidina. Em relação a análise destes resultados a formulação de nanocapsula contendo clorexidina (NANO_CLX), o efeito antimicrobiano apresentou semelhanças aos estudos de Dos Santos, (2018) e Reinke (2014), o qual demonstrou eficácia na inibição do crescimento bacteriano.

O efeito antimicrobiano comprovado neste trabalho tem elevado importância clínica, uma vez que estes microrganismos são prevalentes no desenvolvimento das infecções respiratórias, em especial, a PAV.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que as nanocápsulas poliméricas contendo CLX podem ser preparadas a partir do Eudragit® RS 100 pela técnica de deposição interfacial do polímero. O método analítico desenvolvido e validado por UHPLC mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto para a quantificação da CLX em nanocápsulas poliméricas. Valores superiores a 99% de eficiência de encapsulação foram obtidos para as nanocápsulas desenvolvidas com o fármaco. As características físico-químicas das formulações foram investigadas e os resultados obtidos foram adequados. As nanocápsulas de CLX revelaram tamanho nanométrico, índice de polidispersão reduzido e o potencial zeta positivo.

Os ensaios efetuados por difração de raios X e de calorimetria exploratória diferencial constatarem a ausência de cristalinidade do fármaco das nanocápsulas, evidenciando que o processo de nanoencapsulação conduziu a uma amorfização da CLX. A liberação prolongada do fármaco das nanocápsulas foram demonstrados nos ensaios de dissolução por um período próximo a 72 h. As formulações de nanocápsulas desenvolvidas apresentaram resultados satisfatórios com relação aos parâmetros de estabilidade após 60 dias de armazenamento.

A suspensão de nanopartículas poliméricas de CLX possui atividade antimicrobiana contra as cepas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (cepa sensível), *Klebsiella pneumoniae* (cepa resistente - produtora de beta-lactamase de espectro ampliado), *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* realizado para a NANO_CLX não apresentou letalidade (CL50 de 1483,4 µg/mL), o que indica ausência de toxicidade.

Os estudos *in vitro* de cultivo celular utilizando linhagens 3T3, mostraram que nas concentrações analisadas, as formulações desenvolvidas não apresentaram potencial citotóxico.

Assim, é possível sugerir que as nanocápsulas poliméricas elaboradas com o polímero Eudragit® RS 100 apresentam as condições adequadas para o controle da liberação da clorexidina, sendo uma potencial formulação para utilização na prevenção de infecções do sistema respiratório no ambiente hospitalar, entretanto são necessários estudos pré-clínicos e clínicos adicionais.

REFERÊNCIAS

- ADIBKIA, K. et al. Naproxen-eudragit RS100 nanoparticles: preparation and physicochemical characterization. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 83, n.1, p. 155-9, 2011.
- ALANEZI, A. Z.; et al. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. **Oral Surg. Oral Med. Oral Phatol Oral Radiol**, 109, 3, 122-5, 2010.
- ALHNAN, M. A.; BASIT, A.W. Engineering polymer blend microparticles: an investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. **Eur J Pharm Sci**, v.42, n. (1-2), p. 30-6, 2011.
- AMARAL, C. O. F. The importance of hospital dentistry: oral health status in hospitalized patients. RGO, **Rev Gaúch Odontol.**, v. 66, n. (1), p. 35-41, 2018.
- AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1116-1124, 2009.
- AMIN, S.; M.IR, S.R.; KOHLI, K.; ALI, A. Novel Polymeric Matrix Films for Transdermal Delivery of Metoclopramide. **International Journal of Pharmaceutical Frontier Research**. v. 2, n. 1, p. 48-60, 2012.
- ARANHA, L. F. et al. Medidas de prevenção de infecção do trato respiratório. **ANVISA**, v.4, p. 13 – 16, 2013.
- ARAÚJO, D. B. et al. Saúde bucal: a importância dos enxaguatórios com antissépticos. **Rev. Cienc. Méd. Biol.**, v 14, n. 1, p. 88 - 93, 2015.
- ATLANTA (US). CDC/NHSN. Centers for Disease Control and Prevention (US): Surveillance Definitions for Specific Types of Infections. **Atlanta**: CDC, 2015.
- BARBOSA, J. C. S. et al. Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. (4), p. 201-6, 2010.
- BASCONES, A. et al. Influence of additional active ingredients on the effectiveness of non-alcoholic chlorhexidine mouthwashes: a randomized controlled trial. **J. Periodontol**, v. 76, n. (9), p. 1469-75, 2005.
- BLANCO, K. C. et al. Biofilm Destruction on Endotracheal Tube-associated Pneumonia by photodynamic Inactivation. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 18, n. 3, p. 218 – 223, 2018.
- BLUM, D. F. C., et al. Influência da presença de profissionais em odontologia e protocolos para assistência à saúde bucal na equipe de enfermagem da unidade de terapia intensiva. Estudo de levantamento. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 391- 393, 2017.
- BOGDANOVSKA, L.; SALIU, S.; POPOVSKA, M.; DIMITROVSKA, A.; UGRINOVA, L.; PETKOVSKA, R. Development and validation of RP–HPLC assay of chlorhexidine in gingival crevicular fluid. **Arhiv za farmaciju**, v. 64, p. 69– 82, 2014.
- BRASIL. Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017. **Aprova “Critérios para a validação de métodos analíticos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 de agosto de 2017
- BURNS, K.E. et al. Noninvasive positive pressureventilation as a weaning strategy for intubated adults with respiratory failure. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 12, 2013.

CANZI, K. R.; COLACITE, J. Pneumonia frequency associated to mechanical ventilation based on crop of quantitative results of tracheal secretions. **Brazilian Journal of Clinical Analysis**, v. 48, n.2, p. 118 – 122, 2016.

CARRILHO, M. R. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dent Mate**, v. 26, n.8, p. 779-85, 2010.

CARVALHO, C. A.; et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers- Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemis salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 6, n.1, p. 51-58, 2009.

CASSANEGO, A. P.; et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n 12, p. 1433-1440, 2013.

CHEN, H. et al. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discov Today** v.16, n.7-8, p. 354-60, 2011.

CHIAPETTA, S.C.; OLIVEIRA, É.C.B.; OLIVIER, B.C.; MERCANTE, L.A.M.; NETTO, A.D.P. Determinação simultânea de cloreto de benzalcônio, digluconato de clorexidina e triclosan por CLAE-UV-DAD. **31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, p. 1740. 2008

CHLEBICKI, M. P.; SAFDAR, N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. **Crit Care Med**, v.35, p. 595-602, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A10**: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA, USA, 2015.

COSTA, J. C. M. et al. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666-671, 2014.

COUSIDO, M. C. et al. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. **Clin Oral Investig**, v.14, p. 397–402, 2010.

CRAVEN, D. E.; CRAVEN, K. S.; DUNCAN, R. A. Hospital-acquired pneumonia. In: Jarvis WR. Bennett & Brachman's Hospital Infections. **Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia**, 5th edition, chapter v. 31, p. 519, 2007.

CRESPO, J. M. C.; FERNÁNDEZ, C. R. Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica. **Reduca**, v. 6, n. 1, p. 293-299, 2014.

CRUZ, L. et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **Eur J Pharm Sci.**, v. 40, n. 5, p. 441-7, 2010.

CRUZ, M. K.; MORAIS, T. M. N.; TREVISANI, D. M. Avaliação clínica da cavidade bucal de pacientes internados em unidade de terapia intensiva de um hospital de emergência. **Rev Bras Ter Intensiva**, Out-Dez; v.26, n. 4, p. 379-83, 2014

DAMACENA, I. C. L. et al. Factors associated with oral biofilm in ICU patients with infectious diseases. **Rev Odontol UNESP**, v.46, n. 6, p. 343 – 350, 2017.

DHAR S. et al. Contact Precautions: More Is Not Necessarily Better. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 3, p. 213-21, 2014.

DILARRI, G.; MENDES, C. R.; MARTINS, A. O. Synthesis of chitosan biofilms crosslinked with tripolyphosphate acting as chelating agent in the fixation of silver nanoparticles. **Science & Engineering Journal**, v.25, n. 1, p. 97 - 103, 2016.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, 2010.

EL-RABBANY M, ZAGHLOL N, BHANDARI M, AZARPAZHOOH A. Prophylactic oral health procedures to prevent hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: a systematic review. **Int J Nurs Stud**, v.52, p. 452–464, 2015.

FAN, W. et al. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. **Journal Nanobiotechnology**, v.14, p. 72, 2016.

FERNÁNDEZ-BARAT, L.; TORRES, A. Biofilms in ventilator-associated pneumonia. **Future Microbiol**, v.11, n.12, p. 1599–1610, 2016.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GARNER, S. J. et al. An antifungal coating for dental silicones composed of chlorhexidine nanoparticles. **Journal Of Dentistry**, v. 43, n. 3, p. 362-372, 2015.

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

GRAP, M. J. et al. Early, single chlorhexidine application reduces ventilator-associated pneumonia in trauma patients. **Heart & Lung**, v. 40, n. 5, p. 115-122, 2011.

GUPTA, R.; CHANDAVARKAR, V.; GALGALI, S. R.; MISHRA, M. Chlorhexidine, A Medicine for all the Oral Diseases. **GJMEDPH**, v. 1, n. 2, p. 43-8, 2012.

HASAN, N. A. et al. Microbial community profiling of human saliva using shotgun metagenomic sequencing. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 97699, 2014.

HASEEB, R. et al. Synthesis and Characterization of New Chlorhexidine-Containing Nanoparticles for Root Canal Disinfection. **Materials**, v. 9, p.452, 2016.

HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; HAJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, p.1169-1173, 2007.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.22, n. 2, p. 178-84, 2010.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, v.13, p. 862–74, 2013.

HOU A, Voorhoeve PM, Lan W, Tin M, Tong L. Comparison of gene expression profiles in primary and immortalized human pterygium fibroblast cells. *Exp Cell Res*. v. 319, p. 2781-2789, 2013.

HUYNH, T. T. et al. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent. *PLOS ONE*, **Journal Information**, v. 7, n. 8, p. 1-14, 2012.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – **Validation of analytical procedures: Text and methodology**, ICH Steering Committee: Geneva, 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/

IMRAN, M.; AMJAD, A.; HAIDRI, F. R. Frequency of hospital acquired pneumonia and its microbiological etiology in medical intensive care unit. **Pak J Med Sci**, v. 32, n. 4, p. 823-826, 2016.

JANSSON, M. M. et al. Effects of simulation education on oral care practices – a randomized controlled trial. **British Association of Critical Care Nurses**, v. 22, n. 3, p. 161-168, 2017.

JAYAPRAKASH, K.; VEERESHA, K. L.; HIREMATH, S. S. A comparative study of two mouthrinses on plaque and gingivitis in school children in the age group of 13-16 years in Bangalore city. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 25, n. 3, p. 126-9, 2007.

JOONG, S. E. The impact of ventilator bundles on preventing ventilator-associated pneumonia: a multicenter study. **American Journal of Infection Control**, v. 42, p. 34, 2014.

KALANURIA, A. A.; ZIAI, W.; MIRSKI, M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. **Crit Care**, v. 18, p. 208, 2014.

KALIL, A. C. et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical Infectious Diseases®**, v. 63, n. 5, p. 61–111 2016.

KHAN, R. A. et al. Introducing the Comprehensive Unit-based Safety Program for mechanically ventilated patients in Saudi Arabian Intensive Care Units. **Ann Thorac Med**, v. 12, n. 2, p. 132, 2017.

KHAN, R. A. The impact of implementing multifaceted interventions on the prevention of ventilator-associated pneumonia. / **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 6, p.320 - 321, 2016.

KIBBE, A. Handbook of pharmaceutical excipients. 3 ed. Washington: **American Pharmaceutical Association**, 2008.

KLOMPAS, M. Associations Between Ventilator Bundle Components and Outcomes. **JAMA Internal Medicine**. Published online July 18, 2016.

KOLLEF, M. H. et al. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Crit Care Med**, v. 42, p. 2178–87, 2014.

KRAMER, A. et al. Antimicrobial efficacy of the combination of chlorhexidine digluconate and dexpanthenol. **GMS Hygiene and infection Control**, v. 11, n. 1, p. 1 – 6, 2016.

KUMARI, A; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**; v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

- LAILA, H. J. A.; SANTOS, R. C. V. General aspects and molecular mechanisms involved in the formation of biofilms by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Ciências da Saúde, Santa Maria**, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.
- LARROW, V. I.; KLICH-HEARTT, E. I. Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia in the Intensive Care Unit: Beyond the Basics. **Journal of Neuroscience Nursing, J. Laryngol. Otol.**, v. 3, June 2016.
- LEBEAUX, D. et al. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013.
- LEE, J. M. et al. Biofilm accumulation on endotracheal tubes following prolonged intubation. v. 126, n. 3, p. 267–270, 2012.
- LI, L.; A. I. Z.; ZHENG, X.; JIE, L. Can routine oral care with antiseptics prevent ventilator-associated pneumonia in patients receiving mechanical ventilation? An update meta-analysis from 17 randomized controlled trials. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, p. 1645–1657, 2015.
- LIMA, J. L. C. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev Bras TerIntensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017.
- LOBÃO, F. R. The role of Intensive Dentistry. *Academus* **Revista Científica da Saúde, SMSRIO**, v. 1, n. 3, ago. / dez. 2016.
- LÖE, H.; SCHIOTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J. Periodontal**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 1970.
- LU, B.; ZHANG, J. Q.; YANG, H. Lung-targeting microspheres of carboplatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 1-11, 2004.
- MANCL, K. A.; KIRSNER, R. S. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 352-362, 2013.
- MEINBERG, M. C. A. et al. Uso da clorexidina 2% gel e escovação mecânica na higiene bucal de pacientes sob ventilação mecânica: efeitos na pneumonia associada ao ventilador. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 369- 374, 2012.
- MENOITA, E.; SANTOS, V.; GOMES, C.; SANTOS, A. Role of Biofilms in Chronic Wounds. **Journal of Aging & Inovation**, v. 1, n.2, p. 33-42, 2012.
- MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 35–36, 1982.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharm**, v. 385, n. 1-2, p.113-42, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUNRO, C. L. Oral health: something to smile about. **Ajcc American Journal Of Critical Care**, v. 23, n. 4, p. 283, July 2014.

MUSCEDERE, J. et al. VAP Guidelines Committee and the Canadian Critical Care Trials Group. Comprehensive evidence-based clinical practice guidelines for ventilator-associated pneumonia: Diagnosis and treatment. **J Crit Care.**, v. 35, p. 138–47, 2010.

MUSIAL, W.; KOKOL, V.; VONCINA, B. Deposition and release of chlorhexidine from non-ionic and anionic polymer matrices. **Chem Pap.** v. 64, n. 3, p.346-53, 2011.

MUSZANSKA, A. K. et al. Bacterial adhesion forces with substratum surfaces and the susceptibility of biofilms to antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 4961-4, 2012.

O'HORO JC, LAN H, THONGPRAYOON C, SCHENCK L. "Bundle" Practices and Ventilator-Associated Events: Not Enough. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 37: 1453-1457, 2016.

OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, C. T.; SILVA, R. S. Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.18, n.2, p.233-239, 2012.

OLIVEIRA, H. P. de. et al. Physicochemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1 – 2, p. 55 – 61, 2009.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

ÖZÇAKA, Ö. et al. Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. **J Periodontal Res.**, v. 47, n. 5, p. 584-92, 2012.

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

PALMER, L. B.; SMALDONE, G. C. Reduction of bacterial resistance with inhaled antibiotics in the intensive care unit. **Am. J. Respir. Crit.Care Med.** v. 189, n. 10, p. 1225–1233, 2014.

PANDEY, G. et al. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.74, n. 1, p. 58-80, 2010.

PAPAS, A. S. et al. Efficacy of chlorhexidine varnish for the prevention of adult caries: a randomized trial. **Dent Res**, v. 91, n. 2, p.150-5, 2012.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SANDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, p. 395-400, 2001.

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

PITTET, D. For the systematic review and evidence-based guidance on organization of hospital infection control programmes (SIGHT) study group*. Hospital organisation, management, and structure for prevention of health-care-associated infection: a systematic review and expert consensus. **Lancet Infect Disease**, v.15, p. 212–24, 2015.

RAFFIN, R. P. et al. Powder characteristics of pantoprazole delivery systems produced in different spray – dryer scales. **Drying Techonology**, v. 24, n. 3, p. 339 – 348, 2006.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 23, n. 1, p. 1-10, 24 fev. 2015.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids** v. 55, p. 333-339, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 962-968, 2011.

SANDS, K. M. et al. Respiratory pathogen colonisation of dental plaque, the lower airways and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. **Journal of Critical Care**, v. 37, n. 10, p. 30-37, 2016.

SANSON, M. A. S. **Avaliação do perfil citotóxico e potencial anti-inflamatório de nanopartículas de ouro**. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração: Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

SANTI, S. S.; SANTOS, R. B. Prevalence of nosocomial pneumonia and its relation to periodontal disease: literature review. **RFO, Passo Fundo**, v. 21, n. 2, p. 260-266, maio/ago, 2016.

SANTOS, C. T. dos. et al. Evaluation of the oral microbiota in elderly patients admitted to the Intensive Care unit and Clinical Hospital. **Revista Espacios**, v. 38, n. 3, p. 25, 2017.

SANTOS, S.S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against Candida species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1389–1394, 2013.

SCANNAPIECO, F. A. et al. A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. **Crit Care**, v. 13, n. 4, p.117, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERREZ, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, P. A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-37, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, G.; MEZZALIRA, S.S; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspension and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **J Braz Chem. Soc.**, v. 17, n. 3, p. 562-9, 2006.

SCHOEFFEL, A. C. **Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão cloroxidina: B - ciclodextrina obtidos por diferentes métodos**. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração: Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

SCOTT, T. et al. A Case-Control Study Assessing the Impact of Nonventilated Hospital-Acquired Pneumonia on Patient Outcomes. **CHEST**, v. 150, n. 5, p. 1008–1014, 2016.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Nanoparticle-Encapsulated Chlorhexidine against Oral Bacterial Biofilms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p.103-234, 2014.

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

SINNES, E. P.; MIRANDA, J. A. S.; ELIAS, M. F. G. R.; MORAES, R. G. B. Controle químico da placa bacteriana.In: Lascale N. T. Prevenção na clínica odontológica: promoção de saúde bucal. **São Paulo, Artes Médicas**, p. 173-85, 1997.

SOUZA, M. et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1249-52, 2012.

TELLES, I. S.; PRADO, M.; SIMÃO, R. A. Nanoparticles and endodontics applications: a literature review. **Rev. Bras. Odontol. Rio De Janeiro**, v. 74, n. 2, p. 167-75, abr./jun, 2017.

The Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0015016>. Acesso online em 17 de outubro 2017.

TOLEDO, G.; CRUZ, I. The importance of the oral hygiene in Intensive Care Unit as a way of prevention of nosocomial infection-literature review. **Journal of Specialized Nursing Care**. 2009.

TOMAS, I. et al. In situ chlorhexidine substantivity on saliva and plaque-like biofilm:influence of circadian rhythm. **J Periodontol**, v. 84, p.1662–72, 2013.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-238, 2013.

TU, Y.; YANG, C.; CHEN, R.; CHEN, M. Effects of chlorhexidine on stem cells from exfoliated deciduous teeth. **Journal Of The Formosan Medical Association**, v. 114, n. 1, p. 17-22, 2015.

VARONI, E.; TARCE, M.; LODI, G.; CARRASSI, A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. **Minerva Stomatol**, v. 61, n. 9, p. 399-419, 2012.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n.5 p. 1025 – 1058, 2008.

VERMA, U. P.; GUPTA, A.; YADAV, R. K.; TIWARI, R., et al. Cytotoxicity of chlorhexidine and neem extract on cultured human gingival fibroblasts through fluorescence-activated cell sorting analysis: An *in-vitro* study. **Eur J Dent.**, 12(3): 344–349, 2018.

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

VIEIRA, B. G.; AMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**. v.14, n. 1, p. 99-103, 2016.

VILELA, M. C. N.et al. Oral care and nosocomial pneumonia: a systematic review. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 290-6. 2015.

VITALIS, G. S. **Utilização de nanopartículas de clorexidina como alternativa de medicação intracanal.** Dissertação (Mestre em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2012.

WALTRICK et al. Comparação entre um método de diagnóstico clínico e a técnica de vigilância do Center for Disease Control and Prevention para identificação de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 260-265, 2015.

WASHIO, J. et al. Effects of pH and lactate on hydrogen sulfide production by oral Veillonella spp. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 1, p. 4184-8, 2014.

WILSON, A.; GRAY, D.; KARAKIOZIS, J. Advanced endotracheal tube biofilm stage, not duration of intubation, is related to pneumonia. **J. Trauma Acute Care Surg**, v. 72, n. 4, p. 916–923, 2012.

ZANATTA, F. B.; ANTONIAZZI, R. P.; RÖSING, C. K. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaquecovered urfaces. A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 78, n. 11, p. 2127-34, 2007.

ZHANG, G. S. et al. The mechanical properties and moisture permeability of eudragit L100/S100 free films affected by plasticizers and membrane materials ratio. **Yao Xue Xue Bao**, v. 46, p. 1144 – 1149, 2011.

ZHU, Y.; WEI, P. et al. Enhanced oral bioavailability of capsaicin in mixed polymeric micelles: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Functional Foods**: v. 8, p. 358–366, 2014.