

**RUI NUNO GOMES CANGUEIRO DE OLIVEIRA
MINEIRO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA DE
ANTISSÉTICOS COMERCIAIS NA PELE**

Orientadora: Prof.^a Doutora Patrícia Rijo

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Lisboa

2020

RUI NUNO GOMES CANGUEIRO DE OLIVEIRA MINEIRO

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA DE
ANTISSÉTICOS COMERCIAIS NA PELE**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 31/07/2020, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº: 184/2020, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof. Doutor Vinicius Cuña

Orientador: Prof.^a Doutora Patrícia Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Lisboa

2020

Agradecimentos

Este projeto foi possível graças à ajuda da minha família que me inspirou a ir mais além e fez os impossíveis para que este dia chegasse, mas também o foi pelo apoio incondicional da minha mulher, Diana, que nunca deixou que o sonho de me tornar farmacêutico ficasse por terra.

Não esqueço, claro, todos aqueles que me inspiraram a nunca desistir e a aspirar saber sempre mais colocando esse saber em prol dos demais. A esse título sublinho a minha mestre, que me ensinou o rigor, a necessidade de estudar em permanência e o amor à profissão Dra. Manuela Teixeira. Sublinho também a minha orientadora de dissertação Prof.^a Doutora Patrícia Rijo que me ajudou a nortear o pensamento, e fez almejar a mais e melhor, desmultiplicando-se em esforços para que eu conseguisse concluir este projeto no tempo protocolar.

Acrescento ainda a minha inspiração em retidão e conduta profissional, Dra. Maria José Tribolet Bento, que me fez perceber que é possível uma carreira longa, cheia de mérito, mas também de bondade para com os outros.

Agradeço especialmente à minha avó Ângela e ao meu avô João! Não ainda esquecer a influência do ilustre professor desta casa, o meu irmão, Prof. Dr. Daniel Mineiro.

Resumo

O tema desta dissertação surge de uma preocupação cada vez maior da Organização Mundial de Saúde (OMS) com a utilização excessiva dos antissépticos. Esta utilização resulta maioritariamente de tentativas de desinfetar locais, que foram povoados por microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, sendo este o principal agente. Atualmente, o antisséptico mais utilizado é a cloro-hexidina, por apresentar uma atividade residual duradoura, em comparação com outros biocidas.

Assim, este trabalho confronta alguns dos antissépticos disponíveis no mercado (octenidina, cloro-hexidina, polihexanida, iodopovidona, triclosan e ozono – óleo de girassol ozonado) para aplicação cutânea, através do método qualitativo de difusão em poços contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e posteriormente confirma, fazendo uso da obtenção da CMI dos mesmos antissépticos contra *S. aureus*. Através dos resultados obtidos, foi possível observar que a octenidina e a cloro-hexidina têm maior efetividade em comparação com os restantes antissépticos estudados e por isso lhes é atribuído maior potencial bacteriostático e bactericida. Contudo, os resultados obtidos carecem de mais ensaios para que assumam a robustez necessária e se possa confirmar a sua reprodutibilidade/efetividade. Não obstante, estas evidências promissoras poderão ser apostas relevantes para integrar o arsenal terapêutico.

Palavras chave: Antissépticos, Bactericida, Bacteriostático, Resistências e Ozonólise.

Abstract

The theme of this dissertation emerges from an increasing concern of the World Health Organization (WHO) for the excessive use of antiseptics. This use results mainly from attempts to disinfect places that have been populated by microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*, which is the main agent. Currently, the most widely used antiseptic is chlorhexidine because it has a long-lasting residual activity compared to other biocides.

Thus, this work confronts some of the antiseptics available on the market (octenidine, chlorhexidine, polyhexanide, povidone-iodine, triclosan and ozone - ozonated sunflower oil) for cutaneous application, through the qualitative method of diffusion in wells against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Then, confirms the results obtaining the CMI of the same antiseptics against *S. aureus*. Through the results obtained, it was possible to observe that octenidine and chlorhexidine are more effective in comparison with the other studied antiseptics, and that is why they are attributed greater bacteriostatic and bactericidal potential. However, the results obtained require further tests to assume the necessary robustness and to confirm its reproducibility / effectiveness. Nevertheless, this promising evidence could be relevant bets to integrate the therapeutic arsenal.

Keywords: Antiseptics, Bactericide, Bacteriostatic, Resistance and Ozonolysis.

Lista de abreviaturas e siglas

AINES – anti-inflamatórios não esteroides

APA – *American Psychological Association*

°C – graus Celsius

CBM – concentração bactericida mínima

CMI – concentração mínima inibitória

Da – Dalton (unidade de medida)

DHA – ácido docosa-hexaenóico

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPA – ácido eicosapentaenóico

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

LCR – líquido cefalorraquidiano

M/V- Massa/ Volume

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilcilina

OMS – Organização Mundial de Saúde

ppb – partes por bilião

ROS – espécies reativas de oxigénio

UCI – unidade de cuidados intensivos

V/V – Volume/volume

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

Índice

1. Introdução.....	11
1.1. Objetivos da dissertação.....	12
1.2. Antissépticos – definição.....	12
1.2.1. Tipos de antissépticos (substância ativa).....	15
1.2.1.1 Cloro-hexidina.....	16
1.2.1.2. Triclosan.....	17
1.2.1.3. Iodopovidona	18
1.2.1.4. Octenidina (dicloridrato).....	19
1.2.1.5. Polihexanida.....	21
1.2.1.6. Álcool.....	22
1.2.1.7. Peróxido de hidrogénio	23
1.2.1.8. Sulfadiazina de prata	23
1.2.1.9. Ozono.....	24
1.2.2. Resistências	28
1.2.2.1. Resistências cruzadas.....	30
1.3. Antissépticos comerciais	31
1.4. Microbioma da pele	31
1.4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	32
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	33
1.4.4. Biofilmes	33
1.5. Métodos de análise	34
1.5.2. Microdiluição e suspensão quantitativa	34
2. Materiais e Métodos.....	37
2.2. Antissépticos comerciais (substância ativa)	37
2.3. Meios de cultura.....	37

2.4. Método de difusão em poços	37
2.5. Ozonólise.....	38
3. Resultados e Discussão.....	41
3.2. Método de difusão em poços	41
3.3. Concentração mínima inibitória.....	44
4. Conclusão	46
5. Referências bibliográficas.....	48

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular da cloro-hexidina (PubChem Database, s.d.-a).....	16
Figura 2 - Estrutura molecular da octenidina (PubChem Database, s.d.-d).	20
Figura 3 - Estrutura molecular da polihexanida (PubChem Database, s.d.-f).....	21
Figura 4 - Estrutura molecular do peróxido de hidrogénio (PubChem Database, s.d.-c).....	23
Figura 5 - Estrutura molecular do ozono (PubChem Database, s.d.-e).	24
Figura 6 - Ação terapêutica do Ozono (“Biblioteca virtual en salud - Medicinas tradicionales complementarias e integrativas,” 2020).	27
Figura 7 - Ozonizador (fotografia da autoria do aluno).	27
Figura 8 - Mecanismo da ozonólise de alcenos (Montevecchi et al., 2013).	28
Figura 9 – Procedimento de ozonização: aparelho, oxigénio medicinal e proveta com óleo de girassol a ser ozonado; e respetiva tabela para acerto do fluxo de ozono (fotografias do aluno).	38
Figura 10 - Equações que permitem determinar o tempo de ozonização de um líquido (Palacios, 2010).....	39
Figura 11 – Resultados dos halos de inibição nos meios de cultura. Placas do lado esquerdo correspondem aos três ensaios para a <i>C. albicans</i> e as placas do lado direito correspondem aos três ensaios para <i>S. cerevisiae</i> (fotografias do aluno).....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Substâncias ativas presentes nos antissépticos (PubChem Database., s.d.; PubChem Database, s.d.-b, s.d.-g, s.d.-a, s.d.-d, s.d.-f, s.d.-c, s.d.-e, s.d.-h)	14
Tabela 2 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-a).....	16
Tabela 3 - Mecanismo de ação (Williamson et al., 2017)	17
Tabela 4 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-g)	18
Tabela 5 - Mecanismo de ação (Hübner, Siebert, & Kramer, 2010).....	19
Tabela 6 - Mecanismo de ação (Wattanaploy, Chinaronchai, Namviriyachote, & Muangman, 2017).....	21
Tabela 7 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-b)	22
Tabela 8 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-c).....	23
Tabela 9 - Lista de antissépticos comerciais e respetiva substância ativa (<i>Sifarma 2000</i> , s.d.)	31
Tabela 10 - Artigos que comparam a ação de diferentes antissépticos	35
Tabela 11 - Identificação por siglas da substância utilizada no teste in vitro.....	40
Tabela 12 – Resultados dos três ensaios (valor médio) referentes aos halos de inibição (mm) no meio de Sabouraud para a <i>C. albicans</i> e <i>S. cerevisiae</i> ; e no meio de Mueller-Hinton para o <i>S. aureus</i> (O – Octiset [®] , dicloridrato de octenidina; D – Ducray [®] , cloro-hexidina; P – Protosan [®] , polihexanida; H – Iodopovidona; 1 – Óleo de girassol puro; 2 – Óleo de girassol ozonado; + Nistatina; - água desionizada).....	43
Tabela 13 - Concentração mínima inibitória para estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	44

1. Introdução

Esta dissertação tem a sua origem num problema levantado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Na verdade, têm sido somados artigos, que dão conta da recrudescente resistência criada aos antissépticos usuais, ficando assim implicado o arsenal terapêutico capaz de fazer frente a feridas infetadas, assim como fica comprometida a ação de antibióticos pela similitude nos mecanismos de ação (Organization, 2014). Com efeito, este trabalho faz uma comparação entre os antissépticos triclosan, iodopovidona, octenidina, cloro-hexidina, polihexanida, álcool, água oxigenada, sulfadiazina de prata e óleos ozonados, através de uma revisão bibliográfica, chegando ao “estado de arte atual”.

De entre as hipóteses foi escolhido o método de difusão em poços, por ser um método de execução simples e capaz de avaliar o potencial bactericida e bacteriostático dos diferentes antissépticos com ação cutânea.

Para levar a cabo este método, foram escolhidos criteriosamente três microrganismos designadamente: *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. O primeiro foi escolhido, porque está abundantemente presente na pele e é causador de doenças da pele; o segundo por ser um bom indicador de toxicidade geral, e, por último, a *C. albicans* como comensal do ser humano. Finalmente, foram apurados quais os antissépticos, que são detentores do maior potencial antisséptico, fato confirmado pela avaliação dos valores da concentração mínima inibitória (CMI).

Acresce dizer que, durante toda a realização desta dissertação, foram utilizadas as normas *American Psychological Association* (APA), para a referência bibliográfica, como exigido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

1.1. Objetivos da dissertação

Os objetivos desta dissertação são:

- Comparar os antissépticos octenidina, cloro-hexidina, polihexanida, iodopovidona e triclosan e ozono (óleo de girassol ozonado) através do método qualitativo de difusão em poços contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Confirmar a ação dos antissépticos octenidina, cloro-hexidina, polihexanida, iodopovidona e triclosan e ozono (óleo de girassol ozonado) contra *S. aureus* através da obtenção da CMI.

1.2. Antissépticos – definição

A propósito da definição de antisséptico, importa começar com uma breve explanação sobre a pele e o seu respetivo microbioma, sendo este um dos locais de ação dos antissépticos, que são o objeto de estudo desta dissertação. A este respeito, a literatura dá conta de três tipos principais de flora: residente, transitória e infecciosa. A flora residente consiste nos comensais por excelência e por isso são de carácter permanente da pele. Estes são encontrados principalmente na superfície da pele, mas também sob as células superficiais do estrato córneo. Este primeiro “género” de flora da pele não é considerado patogénico em pele intacta, mas pode vir a causar infeções nas cavidades estéreis do corpo (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014a; Pádua, 2009).

Do ponto de vista da sua função, a flora residente assume como papel escudar a integridade da pele, fazendo uma efetiva resistência à colonização de outros microrganismos, resultando da qual dois processos importantes para a manutenção do meio ambiente saudável: antagonismo microbiano e competição por nutrientes no ecossistema. Neste âmbito, a espécie dominante é *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), havendo ainda outros residentes regulares como *Staphylococcus hominis*, e outros *Staphylococcus* de coagulase-negativos seguidos de bactérias corineformes (Barroso et al., 2014a; Pádua, 2009).

Relativamente à flora transitória da pele, cumpre dizer que pode ser constituída por bactérias, fungos e vírus. Estando o processo de transmissibilidade diretamente correlacionado com: a espécie, número de bactérias presentes, sobrevivência na pele, e por último teor dérmico de água (Günter Kampf & Kramer, 2004). Assim quando se instala no hospedeiro uma população de microrganismos infecciosos, podem ocorrer processos vários que incluem: a

alteração da sua homeostasia, início de uma infecção (com consequências diversas associadas), e por último se a gravidade assim o ditar a sua morte (Barroso et al., 2014a; Pádua, 2009).

Posto isto, a OMS defini antisséptico como: “substância que inibe o crescimento e desenvolvimento de microrganismos sem necessariamente os matar. Antissépticos são normalmente aplicados sobre superfícies do corpo” (Mundial Da Saúde, 2004). Para o efeito, têm ao seu dispor dois métodos: a esterilização e a desinfecção, que permitem o controlo do desenvolvimento de microrganismos. Embora a esterilização e desinfecção sejam termos comumente utilizados para a mesma ação, é importante distinguir o seu significado.

A desinfecção remonta à segunda metade do século XIX, começando com a utilização de fenol e de soluções de hipoclorito no ambiente hospitalar. Esta prática conduziu a uma diminuição de infeções pós-operatórias, o que mais tarde veio a contribuir para a utilização de agentes químicos como desinfetantes e antissépticos. Assim, esta consiste na eliminação total ou parcial de microrganismos (não forçosamente esporos) de um objeto ou superfície por meio físico ou químico. Por seu turno, a esterilização é o processo pelo qual ocorre uma completa destruição ou remoção de todos os microrganismos presentes (incluindo esporos) (Barroso et al., 2014a; Mundial Da Saúde, 2004).

Para estes dois processos, os agentes utilizados podem ser de três etiologias distintas, designadamente: física, química ou biológica; ainda que nesta dissertação explore apenas os agentes químicos com composição diversa que são utilizados para destruir microrganismos. Contudo, a sua utilização constante no quotidiano pode provocar consequências nefastas para o Homem, uma vez que podem ser demasiado tóxicos e irritantes, pelo que se aconselha a sua diluição.

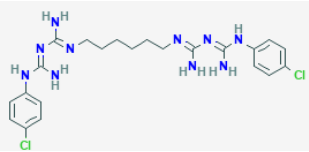
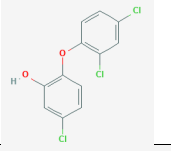
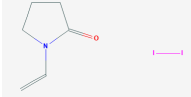
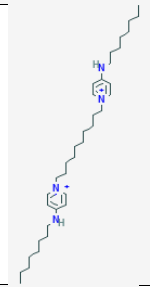
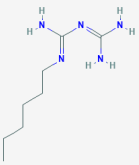
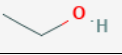
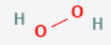
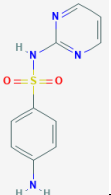
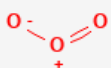
Dito isto, importa perceber o conceito de biocida, que segundo a OMS é um “termo geral para qualquer agente que mata organismos” (Mundial Da Saúde, 2004). Este, uma vez que possui um espectro de ação mais amplo que os antibióticos (múltiplos alvos celulares não específicos) e é de uso frequente, origina menos resistências. No entanto, a total compreensão dos seus mecanismos de ação é limitada, com diminuta vigilância, o que se traduz numa preocupação crescente com o desenvolvimento de resistências a biocidas (possível surgimento de agentes patogénicos multirresistentes) (Williamson, Carter, & Howden, 2017).

Daqui resulta a demonstração cabal de que os biocidas são um tópico maior do qual derivam antissépticos e desinfetantes. Estes têm uma atividade antibacteriana, que pode manifestar-se por duas formas: bacteriostática que provoca a inibição do crescimento

bacteriano; e bactericida que leva à morte celular bacteriana (Barroso et al., 2014a; Pádua, 2009).

Após as exposições acima feitas, cumpre enumerar os antissépticos tópicos, que têm relevância comercial e, portanto, com eficácia e segurança comprovadas, como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Substâncias ativas presentes nos antissépticos (PubChem Database., s.d.; PubChem Database, s.d.-b, s.d.-g, s.d.-a, s.d.-d, s.d.-f, s.d.-c, s.d.-e, s.d.-h)

Substância ativa	Molécula	Estrutura molecular
Cloro-hexidina	$C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$	
Triclosan	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	
Iodopovidona	$C_6H_9I_2NO$	
Octenidina	$C_{36}H_{64}Cl_2N_4$	
Polihexanida	$C_8H_{19}N_5$	
Álcool	CH_3CH_2OH	
Peróxido de hidrogénio	H_2O_2	
Sulfadiazina de prata	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	
Ozono	O_3	

1.2.1. Tipos de antissépticos (substância ativa)

Genericamente, a prevenção e o tratamento de infecções da pele podem ser resolvidas mediante a aplicação de um antimicrobiano tópico, que pode ser um antibiótico ou um antisséptico. A esse título, pelo uso indiscriminado de antissépticos, são observadas taxas crescentes de resistência bacteriana e reações locais de hipersensibilidade, que potencialmente conduzem a resistência a antibióticos. Existindo, por essa via, evidências limitadas para apoiar o uso profilático ou terapêutico generalizado de agentes tópicos. (Williamson et al., 2017). Acrescem ainda preocupações reconhecidas sobre o possível impacto ecológico deletério, devido ao uso cada vez mais difundido de antissépticos tópicos, como a cloro-hexidina e o triclosan (Williamson et al., 2017).

O padrão atual para antisepsia cutânea passa pela utilização de cloro-hexidina e iodopovidona ou ainda a combinação de um dos anteriores com álcool. A esse propósito e com intuito de o comprovar, o estudo de revisão de Mermel (2019), passou em revista o efeito do uso sequencial da cloro-hexidina e/ou iodopovidona na redução da flora microbiana como profilático. Sendo demonstrada eficácia na combinação de ambos, ou uso sequencial quando comparado com outros agentes. De onde se conclui, que o uso sequencial de iodopovidona e cloro-hexidina reduz crescimento bacteriano aeróbio e anaeróbio na pele, a colonização de cateteres intravasculares e de locais cirúrgicos, onde estão presentes principalmente os *S. aureus* e *S. epidermidis*. Ainda a referir que a assepsia da pele com a cloro-hexidina (na sua forma de gluconato) e iodopovidona têm tempos de permanência distintos, o que se traduz numa melhor ação (Mermel, 2019).

Assim, a cloro-hexidina permanece ativa na presença de fluidos orgânicos como pus e sangue, o que antagoniza com os iodóforos que se tornam inativos, sugerindo que é o antisséptico mais eficaz (Ritter, Herlyn, Mittlmeier, & Herlyn, 2019). Contudo, não esquecendo que a cloro-hexidina faz parte do padrão de tratamento como antisséptico, importa ter em conta que esta pode desencadear anafilaxia, que é potencialmente fatal¹.

¹Segundo dados epidemiológicos, não sendo contudo reportada reatividade cruzada da mesma com outros antissépticos, porque existe uma crescente alergia à cloro-hexidina (Fernandes et al., 2019).

1.2.1.1 Cloro-hexidina

Tabela 2 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-a)

Mecanismo de ação	O gluconato de cloro-hexidina é um composto usado como agente antisséptico, que tem atividade antibacteriana tópica. O composto tem carga positiva e vai reagir com a superfície celular microbiana, que tem carga negativa, destruindo a integridade da membrana celular. Ao entrar na célula os componentes intracelulares vão sair para o meio extracelular causando a morte da célula. As bactérias gram-positivas têm maior carga negativa e por isso são mais sensíveis a este agente.
--------------------------	--

A cloro-hexidina é uma molécula catiónica de biguanida divalente, que foi descrita pela primeira vez em 1954, como podemos observar na **Figura 1**.

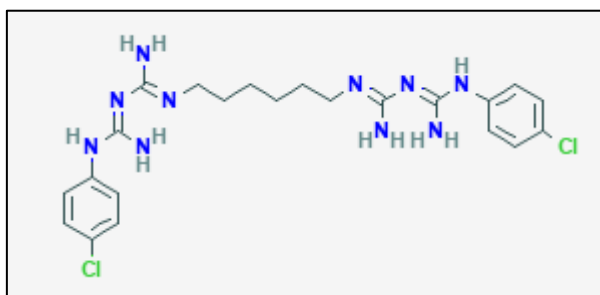


Figura 1 - Estrutura molecular da cloro-hexidina (PubChem Database, s.d.-a).

Esta é um antisséptico de amplo espectro que também exibe atividade residual duradoura em comparação com outros antissépticos. Demonstra maior atividade contra bactérias Gram-positivas, mas também possui atividade contra bactérias Gram-negativas, alguns vírus com invólucro e fungos. No entanto, mostra baixa atividade contra vírus sem invólucro e é inativa contra esporos bacterianos. Algumas espécies bacterianas, como as micobactérias, são intrinsecamente resistentes à cloro-hexidina, por apresentarem uma barreira impermeável (membranas externas) intransponível. Por último, a capacidade de formar biofilme e esporos, que certas espécies bacterianas têm, permite sobrevivam na sua presença (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014b; Williamson et al., 2017).

A cloro-hexidina é utilizada em diferentes formas, mas a mais comum é a forma solúvel em água, o gluconato. Por esta via, pode assim ser incorporada em diferentes produtos e ter utilizações várias no corpo Humano. Esta é mais frequentemente usada em concentrações

de 0,5% a 4% (V/V), sendo que a concentração requerida depende em muito da utilização clínica. Por exemplo, desinfetantes para as mãos geralmente contêm entre 0,5% e 4% (V/V) de cloro-hexidina, enquanto que para a descolonização de *Staphylococcus aureus* metilcilina resistentes (MRSA) é mais comum usar um pó de cloro-hexidina a 1% (V/V) ou um líquido a 4% (V/V). Uma vez que tem demonstrado segurança, tem havido uma crescente adoção do seu uso na “descolonização universal” a pacientes nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) para reduzir infeções associadas a cuidados de saúde e na impregnação de curativos e cateteres centrais. Prática que levantou preocupações sobre o potencial impacto nas taxas de resistência bacteriana (Williamson et al., 2017).

Dada a sua importância para a ciência, rapidamente conheceu a hegemonia clínica, tornando-se o principal antisséptico na prevenção de infeções relacionadas com a saúde e também na descolonização de microrganismos na pele. Todavia, são conhecidos efeitos adversos relativos, nomeadamente, irritação da pele e, mais raramente, reações alérgicas (Williamson et al., 2017).

Para efeitos de medição da suscetibilidade dos microrganismos a este agente, não existem métodos padronizados, devido à sua baixa taxa de difusão através de ágar sólido, dificultando a comparação entre diferentes investigações. Pese embora, existam numerosos métodos, designadamente, diluição em ágar, *time-kill*, CMI e ensaios de concentração bactericida mínima (CBM), que visam avaliar fenotipicamente a suscetibilidade à cloro-hexidina (Williamson et al., 2017).

1.2.1.2. Triclosan

Tabela 3 - Mecanismo de ação (Williamson et al., 2017)

Mecanismo de ação	O triclosan é um policloro fenoxifenol com atividade antibacteriana e antifúngica. Interfere na síntese de ácidos gordos denominada FabI ou InhaA, consoante a bactéria. Este forma um complexo estável com os aminoácidos do centro ativo da enzima enoil-acil redutase presente na FabI/InhaA mimetizando o inibidor natural desta enzima. O que faz com que a síntese de ácidos gordos termine.
--------------------------	--

O triclosan faz parte de um grande grupo chamado bisfenol, exibindo um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos. Este foi desenvolvido

com o propósito de atingir a membrana celular de maneira inespecífica, semelhante a outros antissépticos. Desta forma, o triclosan iria causar lise celular através de efeitos na síntese de RNA e proteínas, levando a efeitos adversos na integridade da membrana. No entanto, vários estudos demonstraram uma posição antagônica por parte deste, agindo sobre um alvo definido na via biossintética bacteriana de ácidos gordos (Williamson et al., 2017).

Apesar da abundante informação sobre o mesmo, à semelhança de outros antissépticos (como, por exemplo, a cloro-hexidina acima descrita), não há um método padronizado para o teste de suscetibilidade. Contudo, existem evidências da resistência desenvolvida ao triclosan, através de vários mecanismos, sendo a mais preocupante a adquirida pelos *Staphylococcus* sp. (Williamson et al., 2017). A resistência ao triclosan é geralmente mediada por mutações no gene *fabI* ou *inhA*, que codifica a proteína enoil-acil redutase importante na síntese de ácidos gordos (FabI/InhA) das bactérias, sendo esta o alvo de ação do triclosan. Por exemplo, as mutações nos genes *fabI* de *S. aureus* demonstraram conferir maior tolerância ao triclosan, em que o aumento da expressão da proteína resulta em níveis intermédios de resistência (Williamson et al., 2017).

O triclosan tem aplicação em múltiplos produtos utilizados em cuidados de saúde e higiene, incluindo sabonetes, soluções para higienização de mãos, pastas de dentes e colutórios. Porém, nos Estados Unidos da América (EUA), a *Food and Drug Administration* (FDA) anunciou em 2017 que seria proibido ser um constituinte em produtos antissépticos de consumo comum. Isto porque, demonstrou recentemente falta de eficácia nestes produtos. No âmbito hospitalar, este era amplamente utilizado, antes de ser substituído pela cloro-hexidina, que possui uma ação antisséptica mais duradoura, em esquemas de descolonização de MRSA (Williamson et al., 2017).

1.2.1.3. Iodopovidona

Tabela 4 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-g)

Mecanismo de ação	O iodo entra facilmente na célula através dos agentes complexantes que têm maior afinidade lipídica. No interior da célula, destabiliza a integridade da membrana, desnatura os ácidos nucleicos e tem uma ação rápida contra os microrganismos, provocando a sua morte. Através da inibição inespecífica dos processos celulares essenciais que incluem transporte de eletrões, respiração celular e síntese de proteínas.
--------------------------	---

O iodo foi descoberto por Courtois no século XVIII desde logo com um potencial antisséptico, contudo o seu uso foi limitado devido a três fatores: baixa solubilidade, estabilidade limitada e toxicidade. Quanto ao primeiro fator limitante (baixa solubilidade) teve uma melhoria através da utilização de iodo livre com sais de iodeto de potássio e álcool, dando origem às soluções de Lugol e tinturas de iodo. Com o advento, da complexação de iodo com grandes polímeros foi possível obter complexos iodóforos (classe mais comum de compostos medicinais de iodo); de onde tem origem a iodopovidona, que consiste em iodo complexado e polivinilpirrolidona (PVP) ou povidona (Williamson et al., 2017).

A iodopovidona de entre os antissépticos disponíveis no mercado é a que possui o mais alargado espectro de atividade, contra uma variedade de bactérias, fungos, protozoários e vírus. Incluindo espécies de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Candida* e *Trichophyton*, assim como, vírus Influenza, vírus da imunodeficiência humano e vírus Ébola. Podendo ter atividade esporídica com o aumento do tempo de exposição (Williamson et al., 2017).

A respeito desta, é incontornável a sua aplicação na administração de injetáveis, cirurgias e outros procedimentos invasivos, como antisséptico da pele. A esse título existem três concentrações (M/V) possíveis, nomeadamente: a 10% para desinfeção pré-cirúrgica da pele, a 5% em procedimentos oftalmológicos, e soluções mais diluídas (menos de 2%) para a profilaxia e tratamento da conjuntivite infantil (Williamson et al., 2017).

À semelhança do anteriormente sucedido com outros antissépticos, não há consenso sobre um método padrão para testes de suscetibilidade. Apesar do uso clínico generalizado de iodopovidona, até ao momento não houve relatos de resistência nem de aumento de tolerância. No entanto, o seu uso clínico em esquemas cirúrgicos e descolonização foi substituído, à semelhança do triclosan, pelo uso de cloro-hexidina, principalmente devido à sua atividade residual prolongada (Williamson et al., 2017).

1.2.1.4. Octenidina (dicloridrato)

Tabela 5 - Mecanismo de ação (Hübner, Siebert, & Kramer, 2010)

Mecanismo de ação	Atua nos sistemas enzimáticos e polissacarídeos presentes na parede celular dos microrganismos, induzindo o vazamento citoplasmático.
--------------------------	---

A octenidina, na sua forma de cloridrato, é uma bispiridinamina com carga positiva (como se observa na **Figura 2**), que difere dos compostos de amónio quaternário, como a cloro-

hexidina, porque a amida e o éster não fazem parte da molécula. A sua estrutura molecular permite que possa aderir a superfícies carregadas negativamente como as membranas celulares microbianas e eucariotas (Amalaradjou & Venkitanarayanan, 2014; Hübner et al., 2010).

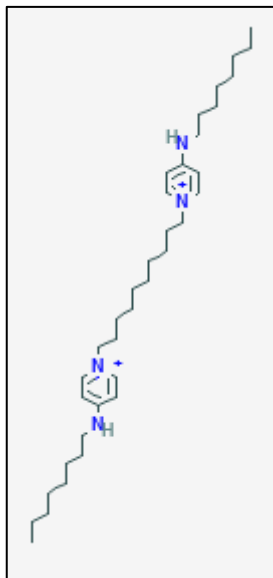


Figura 2 - Estrutura molecular da octenidina (PubChem Database, s.d.-d).

A octenidina tem ação comprovada na neonatologia não causando dano na pele sensível dos recém-nascidos (aplicação comum na Alemanha). Isto acontece porque não é absorvida, contrastando, com a cloro-hexidina e o triclosan. A par desta ação, este antisséptico tem ainda provas dadas quanto à eficácia na descolonização de MRSA, no tratamento do acne e das infeções nas unhas (Hübner et al., 2010).

Quanto à possibilidade de sinergias, é possível dizer que é uma ótima combinação a octenidina com álcoois alifáticos onde não são observados efeitos adversos. À semelhança da combinação anterior, o uso de octenidina com cloro-hexidina em sinergia com antibióticos não só demonstrou ausência de interferências como fez prova de eficácia. Contudo, esta não deve ser usada em conjunto com antissépticos à base de iodo. Tal incompatibilidade deve-se à circunstância de a octenidina fazer libertar radicais iodo do complexo iodopovidona, o que resulta em irritação tecidular (Hübner et al., 2010).

Apesar de não existir consenso sobre um método padrão para testes de suscetibilidade, a octenidina apresenta uma capacidade antimicrobiana superior à cloro-hexidina para vários microrganismos (valores de CMI inferiores). Esta exibe atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos. Tais como, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *A. baumannii*, *S. aureus*, MRSA e *C. albicans*. Ainda lhe é atribuída uma atividade célere contra os biofilmes (conceito explorado mais à frente no tópico

1.4.4) que são muitas vezes o ponto de partida para focos de infeção. Por último, acresce dizer que não foram detetadas resistências à octenidina, o que confere maior confiança na sua utilização (Amalaradjou & Venkitanarayanan, 2014; Hübner et al., 2010).

1.2.1.5. Polihexanida

Tabela 6 - Mecanismo de ação (Wattanaploy, Chinaronchai, Namviriyachote, & Muangman, 2017)

Mecanismo de ação	Devido ao seu pH básico, permite ter interações com as composições fosfolipídicas da membrana bacteriana, o que leva a maior fluidez, permeabilidade, e perda de integridade que redonda na morte de microrganismos.
--------------------------	--

A polihexanida é uma biguanida cujas moléculas formam um polímero (observação da estrutura na **Figura 3**). As biguanidas são bases fortes, e, portanto, estão altamente carregadas positivamente em pH fisiológico, o que tem impacto direto no seu mecanismo de ação (Fjeld & Lingaas, 2016).

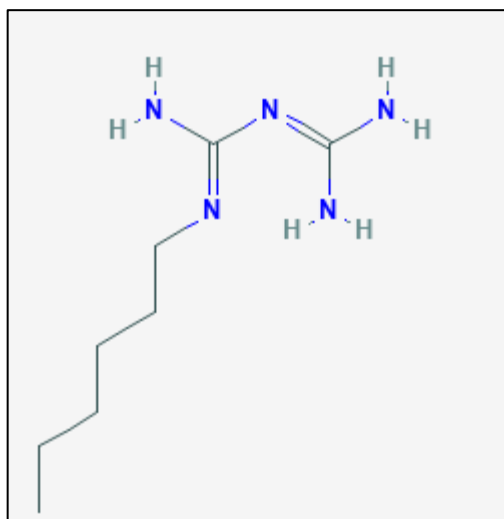


Figura 3 - Estrutura molecular da polihexanida (PubChem Database, s.d.-f).

A par da polihexanida existe a cloro-hexidina com quem partilha semelhanças químicas, sendo possível daqui inferir semelhanças também ao nível da eficácia antimicrobiana. Residindo o único ponto de discordância na ineficácia da cloro-hexidina sobre esporos ou micobactérias. Os estudos *in vitro* demonstraram que a polihexanida tem eficácia quando testada contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, e *C. Albicans* (Fjeld & Lingaas, 2016).

1.2.1.6. Álcool

Tabela 7 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-b)

Mecanismo de ação	Exerce a sua ação por desidratação e precipitação do citoplasma (ação bactericida e antifúngica).
--------------------------	---

O álcool etílico é um líquido volátil obtido a partir da fermentação de hidratos de carbono. A sua ação relevante é de ordem variada, passando por: depressão do sistema nervoso central, diurese, e ação desinfetante/antissética (PubChem Database, s.d.-b). Todavia, é também prática comum a sua combinação com a cloro-hexidina e octenidina, que exibe atividade residual após evaporação do álcool ou que retarda a evaporação do álcool aumentando o tempo de contacto e a eficácia antimicrobiana, respetivamente (Hübner et al., 2010; Williamson et al., 2017).

De entre os vários álcoois existentes no mercado, a utilização como antissépticos está mais reservada para alguns, designadamente: álcool etílico, álcool isopropílico, e *n*-propanol. Particularizando, a atividade dos álcoois etílico e isopropílico é dependente da concentração, pelo que a atividade bactericida ideal é alcançada com concentrações que estão entre 60 e 90% (V/V). Donde se pode dizer que o álcool absoluto (100% V/V) é menos bactericida do que o álcool que foi diluído (70% V/V), sendo este o que é dispensado maioritariamente para efeito antisséptico/desinfetante (Williamson et al., 2017). Isto porque, é o que apresenta maior tempo de permanência nas superfícies (evapora em menor tempo), por conseguinte, tem maior ação.

Para testar a ação do álcool, são necessários testes de suscetibilidade que têm vindo a demonstrar uma possível tolerância, especialmente para o etanol e butanol. Este apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias, bem como, *Mycobacterium* sp, fungos e vírus, falhando a sua ação contra os esporos. No entanto, aquando do uso clínico, a tolerância ao álcool em bactérias como *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. não foi relatada, reflexo provável do modo de atuação inespecífico como bactericida. A exposição ao álcool pode ainda, resultar no aumento da produção de biofilmes (conceito explorado mais à frente no tópico 1.4.4) de algumas bactérias como *S. aureus* e *S. epidermidis* (Williamson et al., 2017).

1.2.1.7. Peróxido de hidrogénio

Tabela 8 - Mecanismo de ação (PubChem Database, s.d.-c)

Mecanismo de ação	Gera espécies oxidativas de radicais livres para induzir de seguida danos no DNA, proteínas e lípidos da membrana (via de oxidação).
--------------------------	--

O peróxido de hidrogénio foi descoberto no século XVIII por Louis Thenard. Este é de origem inorgânica e consiste em dois grupos hidroxilo unidos por uma ligação covalente simples oxigénio-oxigénio, podendo apresentar-se em duas formas líquida ou gasosa (PubChem Database, s.d.-c; Williamson et al., 2017).

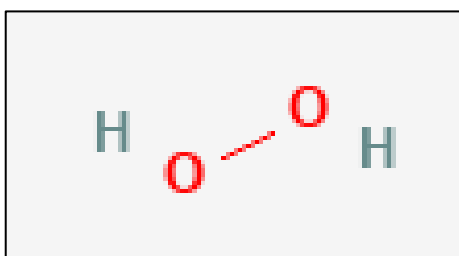


Figura 4 - Estrutura molecular do peróxido de hidrogénio (PubChem Database, s.d.-c).

A sua forma líquida assume particular interesse, enquanto antisséptico cutâneo em duas concentrações (3 e 6% V/V). O mecanismo pelo qual atua beneficia quando se junta iodo, sendo requeridas concentrações mais baixas de ambos para obter o efeito pretendido contra *S. aureus* (Williamson et al., 2017).

Tal como os restantes antissépticos, foram realizadas tentativas para definir um método padrão, sem resultados. Todavia, para avaliar os valores de CMI e de CBM foi utilizado o método de microdiluição. Este é considerado um antimicrobiano robusto e de amplo espectro, que é ativo contra todas as formas de microrganismos incluindo bactérias, vírus e protozoários. Pese embora, a sua grande utilização nos últimos anos, não foram relatados níveis significativos de tolerância. (Williamson et al., 2017).

1.2.1.8. Sulfadiazina de prata

A prata tem sido usada para tratar feridas desde a época romana (solução de nitrato de prata). A sua forma iónica é a mais interessante e também mais eficaz como bacteriostática e bactericida (Percival et al., 2014). Desta feita, aproveitando o seu potencial, estão disponíveis

duas apresentações farmacêuticas uma em pomada (Silvederma®) e a outra como transdérmico (Aquacel Ag⁺ extra®) (Sifarma 2000, s.d.).

No que ao mecanismo diz respeito, quando a prata interage com o exsudado da ferida o metal é ionizado, passando de um estado inativo para ativo. Começando desde logo a atuar como antimicrobiano em várias frentes. A primeira das quais é ao nível das proteínas bacterianas, onde a prata se liga a grupos funcionais o que leva à desnaturação de proteínas. Segue uma atuação ao nível da respiração celular, por impedimento da captação dos iões fosfato. O que se traduz, na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Estas uma vez formadas vão danificar o DNA bacteriano. Em terceiro lugar, a prata interage com as bases constitutivas do DNA. O que vai hipotecar a capacidade replicativa da célula bacteriana. Por último, a prata é ainda capaz de impedir a divisão celular e, portanto, comprometer a vida das bactérias infestantes da pele. Este processo acontece por crescendo osmótico (acumulação da prata dentro dos vacúolos intracelulares) (Percival et al., 2014; PubChem Database, s.d.-h).

Estudos genómicos deram conta da eficácia obtida no emprego da prata não só como antibacteriano de amplo espectro, mas também como garante do impedimento do crescimento de bactérias formadoras de biofilme (conceito explorado mais à frente no tópico 1.4.4) (Percival et al., 2014).

Pese embora a sua eficácia comprovada, foram apontados aspetos negativos que levantavam questões quanto à sua biocompatibilidade, citotoxicidade e resistência por parte das bactérias. Visto que, foi comprovado a sua toxicidade em células mamíferas e uma pigmentação irreversível quando ocorria exposição prolongada à prata (Percival et al., 2014).

1.2.1.9. Ozono

Consiste em três átomos de oxigénio interligados por ligações duplas, derivando de uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de ozono (Coelho et al., 2015; Vollhardt & Schore, 2004). O ozono é um gás que condensado adquire cor azul escura e molecularmente instável, como podemos ver na **Figura 5**.

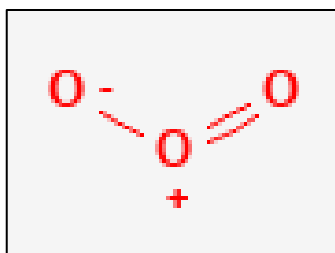


Figura 5 - Estrutura molecular do ozono (PubChem Database, s.d.-e).

O seu mecanismo de ação passa por romper a barreira lipossómica, danificando a membrana e aumentando a permeabilidade da mesma, permitindo a entrada das moléculas de ozono na célula. Logo de seguida, têm lugar reações no meio que libertam radicais livres de oxigénio o que destrói por completo a hemóstase e o microambiente. Particularizando, no caso da imunorregulação, o ozono é capaz de fazer aumentar a quantidade de leucócitos, aumentando a capacidade fagocitária dos granulócitos, facilitando a formação de monócitos e ativação de células T. Simultaneamente aumenta a libertação de citocinas como interleucinas e interferão α que desencadeia uma citotoxicidade celular. De referir ainda, que o ozono é ainda capaz de aumentar a produção de peróxido de hidrogénio, a fim de matar as células patogénicas (Zeng & Lu, 2018).

O ozono foi originalmente utilizado na medicina, ainda que de modo impreciso e empirista, durante a primeira Guerra Mundial no tratamento aos soldados alemães, que tinham feridas em fase de gangrena, uma vez que à época já lhe era conferido um forte poder bactericida (Palacios, 2010).

Desde então, muito se alterou quando se percebeu os benefícios da ozonoterapia, baseada num modelo de fluxo contínuo com pressão moderada [obrigatório utilização de um filtro de carvão vegetal para a segurança do utilizador (Palacios, 2010)]. Este melhorava consideravelmente a vasodilatação do local assim como a circulação sanguínea (*bagging system*). Através da ozonoterapia, foi ainda possível perceber que o ozono exercia o seu poder antimicrobiano,, mesmo que apenas fosse utilizada água como meio de continuidade (Coelho et al., 2015).

Com o avanço tecnológico, foi possível subdividir preparações com ozono em três grupos designadamente: hidroterapia com ozono; óleo ozonado que é usado externamente, e auto-hemoterapia menor e maior (Coelho et al., 2015; de Araújo et al., 2017; Katzung & Trevor, 2017; Palacios, 2010; Zeng & Lu, 2018). Das citadas apenas será explanado o método do óleo ozonado, visto ser um dos métodos utilizados nesta dissertação.

O óleo ozonado consiste numa mistura entre ozono e ácidos gordos (como por exemplo, o óleo de girassol). Este método (exemplificado na **Figura 8**) é sujeito a uma subdivisão, que corresponde ao tipo de ácido gordo utilizado (óleo). Assim, o primeiro consiste numa série de ω 9-insaturados representados pelo ácido linoleico que está presente no óleo do chá. Seguidamente, surge a série ω 6-insaturados que é representada pelos subácidos presentes nos óleos vegetais. Por último, a série ω 3-insaturados que é representada pelo ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA), que está presente no óleo de

peixe. Esta ozonização direta leva à formação de 1,2,4- trioxolano, que representa a forma ativa do ozono nos substratos. Este anel de trioxolano dentro da matriz, do óleo que está ozonado, leva a uma rápida produção de compostos responsáveis por processos de cicatrização. Sendo também atribuída a ação antimicrobiana e antimicótica. Não esquecendo que uma vez ozonado o óleo vegetal, o composto que está dissolvido já não é o ozono propriamente dito, mas sim ozonídeos (Zeng & Lu, 2018).

Além da ação acima descrita, a utilização de óleo ao invés de água nesta terapia conduz ainda a outra vantagem decorrente diretamente do próprio óleo. Este atua como hidratante e protetor principalmente em pacientes com problemas na função barreira da pele, gozando ainda da possibilidade de ser armazenado e transportado (Coelho et al., 2015).

Como conclusão, é ainda possível dizer que o ozono *per si* tem ação terapêutica comprovada muito pela observação na prática clínica humana e veterinária (Coelho et al., 2015; de Araújo et al., 2017; Diário da República Eletrónico, 2020). Não obstante, da observação clínica é ainda possível ter dados físico-químicos que comprovam a ozonização do óleo. Há uma alteração clara dos índices de saponização, de iodo e do nível de peróxido de hidrogénio o que corrobora os dados científicos, sendo recomendada a sua utilização com óleos vegetais devido ao seu efeito bactericida, bacteriostático e a sua capacidade de formação de tecido (de Araújo et al., 2017).

Na verdade, o óleo ao ser ozonado torna-se um óleo saturado o que é mais próximo de um óleo de origem animal havendo maior afinidade, o que se traduz necessariamente em maior eficácia do tratamento. Não obstante, é um interessante adjuvante no tratamento padrão com antibióticos, relevando em alguns casos mais valias uma vez que é um produto mais barato e também desenvolve menos resistências do que as preparações com antibióticos (Coelho et al., 2015; de Araújo et al., 2017; Palacios, 2010; Zeng & Lu, 2018). Todavia, com a chegada da epigenética, estão a ser abertos novos horizontes na compreensão completa do mecanismo de ação na ozonoterapia (Zeng & Lu, 2018).

Na **Figura 6** estão apresentados exemplos da ação terapêutica exercida pelo ozono em diferentes sintomas, quando veiculado por meio de um líquido ou mesmo só enquanto gás por via retal (“Biblioteca virtual en salud - Medicinas tradicionales complementarias e integrativas,” 2020).

Intervenções		Desfechos	Cicatrização								Dor						
			Cicatrização Completa da Lesão	Melhora da Vascularização	Melhora de Sensação de Peso em Membros Inferi...	Melhora do Prurido	Redução do Risco de Amputação de Membros	Redução do Tamanho da Ferida (área)	Redução do Tempo de Cicatrização	Redução do Tempo de Internação	Alívio Completo da Dor	Dor Articular	Dor Associada ao Fenômeno de Raynaud	Dor em Feridas	Dor Lombar	Redução da Dor	Redução do Volume da Hérnia de Disco
Mistura Gasosa Oxigênio-Ozônio Tópica	Bolsa (bagging) Hiperbárica																
	Bolsa (bagging) Normobárica																
	Insuflação Intrafístula																
Óleo Ozonizado Tópico	Embrocação																
Sistêmica por Administração..	Pequena Auto-Hemoterapia (P..																
Sistêmica por Via Intestinal	Insuflação Via Retal																
Sistêmica por Via Venosa	Grande Auto-Hemoterapia (G..																
Solução Salina Ozonizada Par..	Endovenosa																

Nível de confiança

Alto

Baixo

Moderado

Figura 6 - Ação terapêutica do Ozono (“Biblioteca virtual en salud - Medicinas tradicionales complementarias e integrativas,” 2020).

1.2.1.9.1. Ozonólise

A oxidação de alcenos com tetróxido de ósmio acontece de uma forma geral quebrando a ligação π , mas outros reagentes também podem romper a ligação σ . Assim o método mais genérico de quebra oxidativa de alcenos é a reação com ozono, ficando conhecida como ozonólise (Vollhardt & Schore, 2004). Esta reação que acontece entre o ozono e as ligações duplas carbono-carbono, tem o seu mecanismo descrito desde a década de 60 (Montevecchi, Dorigo, Cricca, & Checchi, 2013).

De uma forma mais lapidar, pode dizer-se que o ozono, O_3 , é produzido em laboratório num aparelho chamado ozonizador, como podemos observar na **Figura 7**.

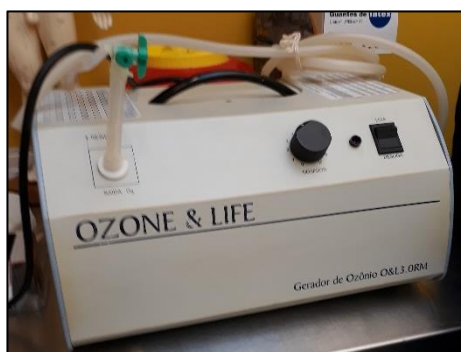


Figura 7 - Ozonizador (fotografia da autoria do aluno).

Todavia, detalhando o seu mecanismo propriamente dito, este começa com uma adição eletrofílica do ozono à ligação dupla para formar uma espécie instável chamada molozonido. Esta espécie, devido às suas características de instabilidade, quebra-se sofrendo rearranjos de ordem vária. A recombinação destes fragmentos leva a uma outra espécie chamada ozonído, que constitui o intermediário isolável do mecanismo (Montevecchi et al., 2013; Vollhardt & Schore, 2004).

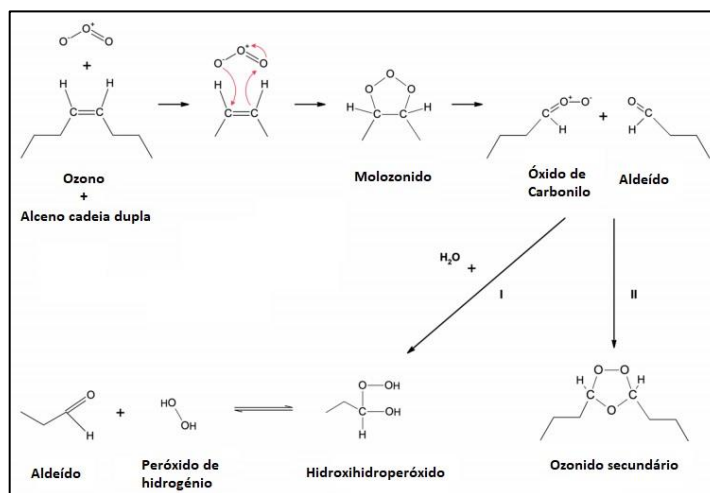


Figura 8 - Mecanismo da ozonólise de alcenos (Montevecchi et al., 2013).

O ozonído é reduzido na etapa subsequente pelo zinco em ácido acético ou pela reação com dimetil-sulfeto, como se pode observar na **Figura 8**. O resultado é a quebra da ligação dupla entre carbonos, ficando um átomo de oxigénio ligado a cada carbono originalmente envolvido na dupla ligação. Não esquecendo também a formação de peróxido de hidrogénio como produto final. Desta ligação do oxigénio aos carbonos primordiais podem ser obtidos produtos distintos, donde se pode dizer que se o carbono original for secundário o produto será um aldeído. Por seu turno, se o carbono original for terciário o produto será uma cetona (Vollhardt & Schore, 2004). Importa ainda dizer que, por norma nas reações de ozonólise deve estar presente o zinco como garante do impedimento que os produtos formados sofram oxidação (Vollhardt & Schore, 2004).

1.2.2. Resistências

As resistências dos microrganismos aos antibióticos surgem pela sua necessidade de sobrevivência, por isso desenvolveram mecanismos de defesa tão sofisticados sendo premente a conceptualização do “o antibiótico ideal”. Valha a verdade, uma vez que não foi conseguido o objetivo. Verificando-se antes de um modo geral que todos podem afetar em maior ou menor grau, as células eucariotas. Seja por via da dose, da ação de amplo espectro ou da falta de

especificidade. A somar ao possível efeito das resistências, está ainda identificada uma ação semelhante entre antisséptico e antibiótico ao nível dos mecanismos de ação. Comprometendo o primeiro a efetividade do segundo no que à terapêutica diz respeito (Pádua, 2009).

Como é do conhecimento geral, os antibióticos podem conduzir a graves problemas de saúde pública à escala mundial (CDC, 2020b). Os quais levam a consequências de grande monta, como seja um inevitável aumento da morbilidade e da mortalidade. Não obstante a toda a problemática já existente, a emergência de estirpes resistentes aos novos antibióticos faz com que num futuro próximo possa não haver opções terapêuticas para tratar infeções bacterianas (CDC, 2020b). O aparecimento de estirpes de *Staphylococcus* resistentes à penicilina, logo após o seu surgimento foi o precursor do que mais tarde viria a acontecer, isto é, estirpes resistentes aos antibióticos (Barroso et al., 2014a; CDC, 2020a; Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Novos contornos se afiguram com a problemática da resistência múltipla em determinadas estirpes, como por exemplo (Barroso et al., 2014a): *A. baumannii*, resistente a antibióticos de várias famílias, *S. aureus* resistente à metilcilina e à vancomicina e bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado.

Esta resistência aos antibióticos pode ainda ter uma dupla classificação que pode ser natural ou adquirida. Assim, a resistência natural pode ser intrínseca à bactéria e específica para certos antibióticos, nomeadamente: ausência de local de ação, ausência de transporte e impermeabilidade celular (Barroso et al., 2014a; CDC, 2020a; Murray et al., 2013).

Por sua vez, a resistência adquirida pode ser feita por cinco mecanismos diferentes (Barroso et al., 2014a; CDC, 2020a; Murray et al., 2013):

- a) Alterações genéticas provocadas por mutações espontâneas ou pela aquisição de genes exógenos;
- b) Redução da entrada do antibiótico (diminuição da permeabilidade da parede celular);
- c) Alteração do alvo celular;
- d) Inativação ou alteração enzimática do antibiótico pela bactéria;
- e) Saída rápida do antibiótico do meio intracelular bacteriano.

Esta resistência aos antibióticos não é estanque, mas sim feita por etapas. Assim algumas bactérias com um baixo nível de resistência que poderão evoluir para níveis mais elevados (Barroso et al., 2014a; CDC, 2020a; Murray et al., 2013).

1.2.2.1. Resistências cruzadas

A propósito da ação terapêutica desenvolvida contra microrganismos perniciosos presentes na pele, pelo uso de antissépticos ou antibióticos, foram registadas resistências cruzadas. Assim, para fazer frente às infeções são aplicados antissépticos, por exemplo, cloro-hexidina e octenidina como forma de tratamento e prevenção do agravamento da infeção. Deste facto, surge um novo paradigma do qual emergem duas problemáticas, a saber: resistência aos antibióticos e tolerância antisséptica (G. Kampf, 2016).

Devido à eficácia comprovada da cloro-hexidina, foi disseminada a utilização mesmo que em baixas concentrações, sendo algumas aplicações, discutíveis como na higiene rotineira de pacientes em ambiente hospitalar, uso em combinação com álcoois, ou mesmo até como parte integrante de sabonetes. Apesar da utilização confiante, foram notadas mais tarde resistências adquiridas a agentes antissépticos como a cloro-hexidina, sendo até relatados surtos (G. Kampf, 2016). Esta utilização continuada levou ao desencadeamento de tolerância, o que mais tarde levou a investigações de onde se retirou uma correlação entre o uso de antissépticos e o aumento do risco de desenvolver resistência cruzada a antibióticos por semelhança nos mecanismos de ação, sendo que, o mecanismo de resistência a antibióticos e antissépticos é muitas das vezes mediado pelos mesmos plasmídeos (G. Kampf, 2016).

Posto isto, recorrendo a um estudo recente (Nicolae Dopcea, Dopcea, Nanu, Diguta, & Matei, 2019) é possível apurar que a exposição à cloro-hexidina levou ao aumento dos valores de CMI, para todos os *Staphylococcus* com exceção do *S. epidermidis* resistente à metilcilina. Por seu turno o CBM permaneceu inalterado. Facto comprovado aquando da exposição repetida à cloro-hexidina por parte do *S. aureus* (sensível à metilcilina ou resistente), que conduziu a uma diminuição acentuada da suscetibilidade à penicilina, tetraciclina e gentamicina. Quanto à octenidina, a exposição a este antisséptico levou a um aumento do valor de CMI em *S. epidermidis* sensível à metilcilina e também um aumento de CBM. Conclui-se de uma forma geral que o uso incorreto de antissépticos em qualquer concentração pode levar a uma suscetibilidade reduzida (Nicolae Dopcea et al., 2019).

1.3. Antissépticos comerciais

Tabela 9 - Lista de antissépticos comerciais e respetiva substância ativa (*Sifarma 2000*, s.d.)

Substância ativa	Antissépticos – nome comercial
Cloro-hexidina	Bepanthe plus [®] (Bayer [®])
	Diaseptil [®] spray (Ducray [®])
Triclosan	Bexident [®] pomada
Iodopovidona	Betadine [®] solução e pomada
Polihexanida	Prontosan [®]
	Hansaplast [®] spray e bálsamo
Octenidina	Octiset [®]
Álcool	Sterillium [®]
Água oxigenada	Água oxigenada [®]
Sulfadiazina de prata	Aquacel Ag ⁺ extra [®]
	Silverderma [®]
	Hansaplast [®] aqua protect XL

1.4. Microbioma da pele

Na pele existem organismos comensais que estão em simbiose com o organismo parasitado (hospedeiro) – dando-se o nome de flora comensal. A sua composição varia consoante o local do corpo humano, sendo constituída maioritariamente por bactérias e fungos que são importantes para o equilíbrio do organismo. Todavia, em determinadas circunstâncias de fragilidade do hospedeiro podem causar doença (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

A relação das bactérias com o hospedeiro pode ter um elevado grau de especialização, o que confere melhor adaptação ao meio ambiente. Na vida uterina, o Homem está estéril, mas a flora comensal é adquirida durante e logo após o parto, estando em constante mutação (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

Em face de uma colonização tão forte, por parte destes microrganismos, a pele constitui uma excelente barreira que trava o avanço dos mesmos. Este facto é devido a um ambiente relativamente hostil, com um pH ácido de 5.6, que faz com que a maioria dos

organismos não consiga aqui sobreviver (antagonismo microbiano) (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

É ainda relevante dizer que a colonização não é feita por igual. Dividindo as populações bacterianas por duas áreas: expostas e secas com um número reduzido e húmidas (axilas, períneo, etc.) com um número muito elevado de microrganismos. Acresce dizer que a população de microrganismos é preponderante abaixo do nível da cintura, o que é justificável pela proximidade do local de disseminação (tratos gastrintestinal e geniturinário) (Barroso et al., 2014a).

As principais bactérias da pele são gram-positivo:

- *Staphylococcus* sp.
- *Propionibacterium* sp.
- *Corynebacterium* sp.
- *Streptococcus* sp.
- *Micrococcus* sp.
- *Clostridium* sp.

Às bactérias acima descritas também devem ser somados os géneros de leveduras, *Candida* e *Malassezia*, que também podem ser encontrados na pele em locais muito bem definidos (couro cabeludo, ao redor das unhas e entre os dedos dos pés) (Barroso et al., 2014a).

Dos microrganismos acima referidos, irei apenas dar relevo ao género de bactérias *Staphylococcus* sp., concretamente as espécies: *S. epidermidis* e *S. aureus*; por serem os que em maior número surgem na pele, mas também devido à sua relevância para aquilo que pretende ser o objeto de estudo experimental desta dissertação.

Os *Staphylococcus* sp. são bactérias gram-positivas aero-anaeróbias facultativas, que apresentam atividade para a enzima catalase. Como já referido estão presentes na pele mas também nas mucosas do ser-humano. O seu nome surge da similitude com um “cacho de uvas” pela observação de uma lâmina ao microscópio corada pela técnica de Gram. Quanto às diferentes espécies deste género, estas podem ser diferenciadas pela presença ou ausência da enzima coagulase (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

1.4.2. *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é um dos microrganismos mais abundantes na pele, sendo o mais representativo (mais de metade) de entre os estafilococos coagulase-negativa. Por

forma a distinguir as diferentes espécies de estafilococos coagulase negativa utilizam-se diversos testes laboratoriais (ex. fosfatase alcalina, urease, ornitina-descarboxilase, polimixina B, entre outros) (Pádua, 2009).

Este microrganismo desenvolve-se quando surge uma imunodepressão no hospedeiro, sendo, portanto, um microrganismo oportunista (isto é, provoca infeção quando as condições ao seu redor o permitem). Está muitas vezes associado a infeções provocadas pela formação de biofilmes presentes em material de uso médico como cateteres e algália. Ainda a esse respeito pode provocar patologias diversas, como, bacteriemia, endocardite, entre outras (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009). Por último dizer que foi encontrado em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), de cateteres, de cânulas, de válvulas cardíacas, de pacemakers, de próteses diversas, de enxertos, de algalias, etc. (Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

1.4.3. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus*, de entre todas as espécies do género é a principal a causar infeção no ser humano, associada a elevadas taxas de mortalidade e morbilidade. Distinguindo-se facilmente de outras espécies do género pela presença da enzima coagulase (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

Este microrganismo tem ação patogénica extracelular, estando a sua principal força motriz na produção de fatores extracelulares (adesão, evasão e invasão). Por isso, apresenta vários fatores de virulência capazes de causar infeção, como, enterotoxinas, lisinas, toxina da síndrome do choque tóxico, toxinas epidermolíticas, entre outros (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013; Pádua, 2009).

Quanto à patologia propriamente dita, está frequentemente associada a infeções da pele e tecidos moles. Propriamente, bacteriemias, endocardite, pneumonia, pneumonia necrosante, osteomielite, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada estafilocócica, impetigo bolhoso, impetigo e foliculite (Barroso et al., 2014a; Murray et al., 2013).

1.4.4. Biofilmes

A maioria dos microrganismos vivem em biofilmes, como forma de adaptação ao meio ambiente, na forma sésil aderidos a superfícies sólidas. A presença de biofilmes também se verifica nas feridas, o que pode vir a ser um foco de infeção. Assim, biofilme define-se segundo Santos et al., 2013, como: “uma associação de células microbianas fixadas às superfícies,

bióticas ou abióticas, envolvidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas” (Santos et al., 2013).

Os biofilmes estão muitas vezes associados a infeções em dispositivos médicos, isto porque, ficam revestidos com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, onde se inserem (superfície rica para a fixação bacteriana). Estas infeções são muitas vezes provocadas por *S. aureus*, MRSA e resistente à vancomicina (VRSA), o que leva a falhas no tratamento (Amalaradjou & Venkitanarayanan, 2014; Murray et al., 2013). Os estafilococos associados ao biofilme podem levar a várias doenças, incluindo osteomielite, endocardite crônica por infeção de ferida, infeções polimicrobianas e infeções permanentes por dispositivos médicos (Santos et al., 2013).

O tratamento dessas infeções, associadas a corpos estranhos causadas por MRSA e VRSA, é difícil devido à disponibilidade limitada de opções de antibióticos eficazes contra biofilmes bacterianos. O atual protocolo de tratamento contra o MRSA refere o uso de vancomicina como primeira linha (uso de rifampicina nas bactérias suscetíveis) (Amalaradjou & Venkitanarayanan, 2014). No entanto, o aumento das CMI's de vancomicina e rifampicina necessárias para o tratamento contra MRSA e VRSA é uma preocupação significativa. Assim, Amalaradjou & Venkitanarayanan, investigaram a capacidade do etanol na erradicação de biofilmes de MRSA na concentração de 40%, que demonstrou resultados promissores nos biofilmes em uma hora. Todavia, o uso sistémico do etanol é desaconselhado. Coisa diferente se passou com octenidina, que exerceu seu efeito antimicrobiano pela ligação à membrana celular com carga negativa, interrompendo as funções vitais desta (morte celular). Isto deve-se a sua ligação específica a um lipídio proeminente nas membranas celulares bacterianas, sem afetar adversamente as células eucarióticas. Este facto levou a que octenidina se reduzisse a população de *S. aureus*, associada ao biofilme, sem demonstrar redução significativa na formação deste (Amalaradjou & Venkitanarayanan, 2014).

1.5. Métodos de análise

1.5.2. Microdiluição e suspensão quantitativa

Existem diversos métodos para comparar a ação dos antissépticos, entre os quais saliento a microdiluição e suspensão quantitativa. Apesar de serem métodos habituais e fiáveis quanto ao rigor e reprodutibilidade, irá ser utilizado nesta dissertação o método de difusão em poços, por ser de leitura mais fácil e rápida, permitindo retirar conclusões preliminares à cerca do potencial bacteriostático e bactericida dos antissépticos contra os microrganismos

selecionados (Barroso et al., 2014a; Pádua, 2009). Numa perspetiva futura seria ideal continuar o estudo com a confirmação através do método de microdiluição.

Posto isto, entende-se por microdiluição uma diluição em meio líquido, segundo a qual para os poços da microplaca que contêm uma quantidade igual de caldo contendo cerca de 10^5 bactérias/mL (sem turvação), verte-se um volume igual de diferentes concentrações de antibiótico ou antisséptico em ordem crescente. Exceto um deles que servirá de branco/controlo (sem antibiótico ou antisséptico), sendo o objetivo observar a turvação dos poços, após uma incubação de 18 horas, em que o primeiro tubo das concentrações crescentes que não apresenta turvação (crescimento bacteriano) corresponde à CMI. Por definição, a CMI corresponde à mais baixa concentração de um antibiótico (ou antisséptico) capaz de impedir o crescimento visível da bactéria (Pádua, 2009).

Assim, apresento dois artigos na **Tabela 10** que fazem uso das técnicas acima citadas.

Tabela 10 - Artigos que comparam a ação de diferentes antissépticos

Artigo	Método	Sustâncias comparadas
Koburger, Hübner, Braun, Siebert, & Kramer, 2010	Microdiluição Suspensão quantitativa	Triclosan Octenidina Iodopovidona Polihexanida Cloro-hexidina
Dittmann et al., 2019	Microdiluição Suspensão quantitativa	

Koburger et al., 2010 fizeram uma comparação *standard* da eficácia antisséptica das seguintes substâncias ativas (triclosan, iodopovidona, octenidina, polihexanida e cloro-hexidina) contra o *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenza* e *C. albicans*. Para tal,

fizeram uso de dois métodos: microdiluição e suspensão quantitativa, que permitem obter a CMI e CMB.

Por último, Dittmann et al., 2019 fizeram o uso de diferentes antissépticos (triclosan, iodopovidona, octenidina, polihexanida e cloro-hexidina) com intuito de perceber qual destes teria a menor CMI e CMB contra o MRSA.

2. Materiais e Métodos

2.2. Antissépticos comerciais (substância ativa)

A fim de verificar o potencial bacteriostático e bactericida de um antisséptico num estudo preliminar, como é o caso, foram testados diferentes antissépticos comerciais, designadamente por substância ativa:

- Octenidina
- Cloro-hexidina
- Polihexanida
- Iodopovidona
- Triclosan
- Ozono (óleo de girassol ozonado)

As substâncias ativas acima referidas foram testadas contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

2.3. Meios de cultura

Como plataformas de crescimento foram utilizados dois meios, contidos em placas de Petri:

- Mueller-Hinton, para crescimento bacteriano – *S. aureus*;
- Sabouraud, para crescimento fúngico – *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

2.4. Método de difusão em poços

Explicando em maior pormenor e após ter sido feito o garante das condições assépticas, foi realizado o seguinte procedimento para o *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* (otimizado por (Ntungwe N et al., 2017; Pereira et al., 2015)):

- 1) Preparar suspensões com 0,5 de McFarland dos microrganismos a inocular nos meios;
- 2) Inocular as suspensões dos microrganismos no meio de Mueller-Hinton para *S. aureus* e no meio de Sabouraud para *C. albicans* e *S. cerevisiae*, por espalhamento usando uma zaragatoa estéril;

- 3) Fazer poços, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, nos meios com uma pipeta de Pasteur de vidro;
- 4) Colocar 50µl de cada antisséptico, controlo negativo e positivo em cada poço;
- 5) Incubar as placas a 37°C, durante 24 horas (com cuidado de não deixar verter líquido dos poços);
- 6) Realizar 3 ensaios para cada microrganismo.

Concentrações: importa dizer que foram utilizados os antissépticos nas concentrações comercializadas (50µL) a fim de perceber o real poder bactericida e bacteriostático dos mesmos. No caso do óleo ozonado foi realizado o procedimento abaixo descrito (Tópico 2.5.) a fim de definir a concentração com ação antissética.

2.5. Ozonólise

A ozonólise tem sido utilizada como terapêutica no âmbito da medicina veterinária na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias onde realizei este procedimento experimental, sob a tutela do Professor Doutor Vinicius Ricardo Cuña de Souza.

A ozonização de um líquido está dependente de um gerador, neste caso foi utilizado o equipamento: Ozone & Life®; para que seja criado um fluxo contínuo de ozono em perfeita segurança e de concentração conhecida e controlada. Acoplado a este gerador de ozono devem estar um filtro de carvão vegetal por onde passa o ozono, para que durante o manuseio da máquina o contato desta substância com as vias aéreas seja mínimo devido à sua toxicidade para as mesmas. Acresce dizer que deve ainda estar ligada a este gerador uma fonte de oxigénio medicinal com uma pureza acima dos 96% de onde virá o ozono numa proporção de 95% oxigénio para 5% de ozono (Gottschalk, Libra, & Saupe, 2010; Mcmurry, 2005; Vollhardt & Schore, 2004).

Correlação entre o Fluxo de Oxigénio e a concentração de ozônio						
Fluxo de O ₂	O ₂ = 1,0	O ₂ = 3,4	O ₂ = 1,2	O ₂ = 1,4	O ₂ = 0,125	O ₂ = 0,125
	L/min	L/min	L/min	L/min	L/min	L/min
Dosador	Concentração de ozônio mg/L - µg/ml - ppm					
0	1	2	3	5	9	
1	3	5	7	16	24	
2	5	7	10	22	33	
3	8	11	16	32	46	
4	10	14	20	38	53	
5	12	17	23	43	59	
6	15	21	28	51	67	
7	18	25	32	57	73	
8	20	27	36	62	78	
9	25	33	43	72	87	
10	30	39	51	82	96	



Figura 9 – Procedimento de ozonização: aparelho, oxigénio medicinal e proveta com óleo de girassol a ser ozonado; e respetiva tabela para acerto do fluxo de ozono (fotografias do aluno).

Assim a ozonização tem lugar passando pelas seguintes etapas:

- 1) Abrir a válvula na fonte de oxigénio medicinal;
- 2) Ajustar o manómetro do fluxo;
- 3) Ajustar novamente o fluxo segundo a tabela afixada no gerador (neste caso manual);
- 4) Esperar cinco minutos para equalizar pressões;
- 5) Ligar o gerador, tendo lugar no interior descargas elétricas a fim de obter o O_3 ;
- 6) Colocar a mangueira de silicone de saída do ozono (fazendo uso de um aspersor de metal que auxilia no fabrico de bolhas):
 - a) Dentro de uma proveta de plástico alta (resistente ao ozono).
- 7) Interromper o fluxo que vai em direção ao filtro de carbono vegetal, com a abertura da torneira somente quando se pretende retirar o zono com uma seringa.
- 8) Guardar o óleo ozonado num frasco âmbar, para que não se alterem as suas propriedades físico-químicas.

Para determinar a concentração ideal de ozono foi utilizada as equações representadas na **Figura 10** (Palacios, 2010).

$$\frac{1(L/min) \times 21(mg) \times 60(min)}{100(mL)}$$
$$[óleo O_3] = \frac{60mg \text{ de } O_3}{1g \text{ (óleo)}}$$

Figura 10 - Equações que permitem determinar o tempo de ozonização de um líquido (Palacios, 2010).

De modo a facilitar o procedimento do método de difusão em poços (após a ozonólise de um líquido) foram designadas siglas para cada substância ativa utilizada, assim como os controlos positivo e negativo, apresentadas na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Identificação por siglas da substância utilizada no teste in vitro

Siglas	Substância utilizada	
O	Octiset [®] (dicloridrato de octenidina)	
D	Ducray [®] (cloro-hexidina)	
P	Protosan [®] (polihexanida)	
H	Iodopovidona	
1	Óleo de girassol puro	
2	Óleo de girassol ozonado	
+	Controlo positivo para	Leveduras: Nistatina
		Bactérias: Vancomicina
-	Controlo negativo: água desionizada	

3. Resultados e Discussão

A eficácia antimicrobiana surge como uma preocupação *major* nos dias que correm, devido ao aumento das possíveis resistências decorrentes de feridas infetadas. Assim, do amplo leque que está disponível no mercado surge a necessidade de escolha consoante o caso. Todavia, esta decisão tem que ser informada por forma a que seja a mais adequada a cada situação (Wiegand, Abel, Ruth, Elsner, & Hipler, 2015). No presente, pretendeu-se verificar qual o antisséptico com uma ação mais eficaz na pele. Tendo sido utilizado para esse efeito o Octiset® (dicloridrato de octenidina), o Ducray® (cloro-hexidina), o Protosan® (polihexanida), a Iodopovidona e o óleo de girassol ozonado, contra a *C. albicans*, a *S. cerevisiae* e o *S. aureus*. Para tal, foi realizado o método de difusão em poços como teste preliminar para todos os microrganismos testados e a obtenção da CMI como teste definitivo para o *S. aureus*.

3.2. Método de difusão em poços

Foram realizados três ensaios para cada microrganismo testado.

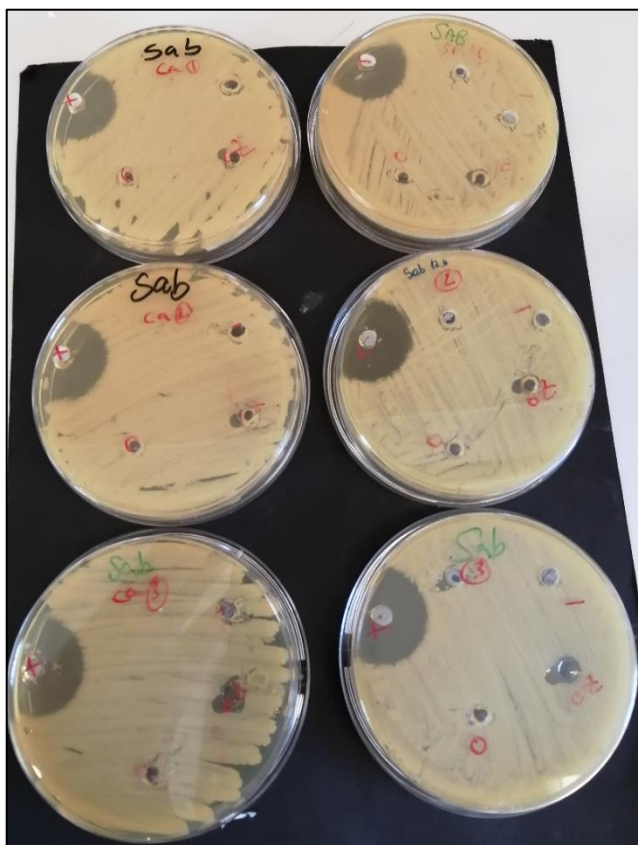


Figura 11 – Resultados dos halos de inibição nos meios de cultura. Placas do lado esquerdo correspondem aos três ensaios para a *C. albicans* e as placas do lado direito correspondem aos três ensaios para *S. cerevisiae* (fotografias do aluno).

Na literatura encontrada foi verificado nos testes *in vitro* que a polihexanida, octenidina e cloro-hexidina tem uma toxicidade comparável, não obstante de serem superiores à da iodopovidona (Hübner et al., 2010). Comparando diretamente a cloro-hexidina com a iodopovidona numa situação de desinfecção pré-operatória, foi notória a diminuição de complicações subsequentes devido a infeção de cicatrizes quando se fez uso da cloro-hexidina. (Ritter et al., 2019). Corroborando o já dito, é possível esmiuçar a razão para tal superioridade em relação à cloro-hexidina, aquele que é o antisséptico mais utilizado no mundo, em relação à iodopovidona encontrando-se explicação em duas ordens de grandeza. A primeira a cloro-hexidina tem uma atividade residual duradoura, em segundo a cloro-hexidina consegue exercer atividade mesmo na presença de fluídos, como por exemplo, sangue e exsudado purulento coisa que não acontece com os compostos iodóforos.

O mesmo deve ser dito para uma combinação entre o triclosan e a cloro-hexidina, pese embora, neste caso ainda não existam testes suficientes para dar uma resposta consolidada sobre a vantagem de uso simultâneo. Havendo, por agora, um efeito semelhante ao uso isolado do triclosan, o que de *per si* já é satisfatório (Wohlrab, Jost, & Abeck, 2007). Acresce ainda dizer que é atualmente a primeira escolha nos casos de dermatite atópica tanto em especialidades como em fórmulas magistrais. Embora, seja prática comum a sua substituição pela cloro-hexidina e iodóforos. (Wohlrab et al., 2007).

Ainda assim, não deve ser excluído o efeito cumulativo que deriva do uso sequencial dos antissépticos, sendo referidas mais valias que, antagonizam com a ideia inicial de fazer o uso de um só antisséptico (Mermel, 2019).

Tabela 12 – Resultados dos três ensaios (valor médio) referentes aos halos de inibição (mm) no meio de Sabouraud para a *C. albicans* e *S. cerevisiae*; e no meio de Mueller-Hinton para o *S. aureus* (O – Octiset®, dicloridrato de octenidina; D – Ducray®, cloro-hexidina; P – Protosan®, polihexanida; H – Iodopovidona; 1 – Óleo de girassol puro; 2 – Óleo de girassol ozonado; + Nistatina; - água desionizada).

Substâncias utilizadas	Valor médio dos halos de inibição (mm)		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. aureus</i>
O	13,7	14	22
D	20,7	19,3	23
P	13	10	10,7
H	14	15,7	11,3
1	5	5	5
2	5	5	5
+	22,7	10	13,3
-	5	5	5

Por leitura dos resultados da **Tabela 12** é possível dizer que há uma relação de resposta que permite saber o grau de sensibilidade dos diferentes microrganismos testados em cada meio aos diferentes antissépticos em concentrações disponíveis no mercado. Assim, por leitura dos respetivos halos no meio Sabouraud para a *C. albicans*, em milímetros, é possível apurar que a cloro-hexidina é o antisséptico que possui maior capacidade bactericida, seguida logo da iodopovidona e octenidina. O que entra em contradição com a literatura, podendo ser este facto explicado pelas diferenças de concentração utilizadas. Por sua vez, para a *S. cerevisiae*, por leitura dos halos de inibição é possível dizer que a maior capacidade inibitória é atribuída à cloro-hexidina seguindo-se a iodopovidona. Em relação aos testes realizados em meio Mueller-Hinton em que os mesmos antissépticos são testados contra o *S. aureus*, fica claro que os antissépticos que possuem maior potencial antibacteriano são a cloro-hexidina e octenidina.

Koburger et al., 2010 realizou uma comparação entre diferentes antissépticos (triclosan, octenidina, iodopovidona, polihexanida e cloro-hexidina) utilizando os métodos de microdiluição e suspensão quantitativa. Desta comparação, surge um ranking de eficácia, que subdivide em dois mediante o contacto do antisséptico seja imediato ou prolongado. Quando se fala de um contato mais imediato, a octenidina aparece em primeiro lugar em termos de eficácia seguida de iodopovidona, cloro-hexidina e termina com triclosan. Por seu turno, quando se fala de um contato prolongado a melhor opção é a polihexanida, à qual se seguem octenidina, cloro-hexidina, triclosan e iodopovidona (Koburger et al., 2010). A polihexanida é preferível neste tipo de contato prolongado (feridas crónicas) por ter um bom perfil de tolerabilidade e não perde

a sua atividade quando na presença de fluídos. Cujo, mecanismo de ação é semelhante ao da cloro-hexidina, sendo que se espera que ambas apresentem halos de inibição similares. Contudo, no presente estudo tal não se verificou, como se pode observar na **Tabela 12**.

Mais recentemente com o ressurgimento da utilização de óleos ozonados na terapêutica médica, é oportuna uma comparação com os antissépticos conhecidos até à data uma vez que também o ozono tem ação antissética reconhecida. Donde, como consequência do processo de produção de óleos ozonados existe um aumento dos valores de peróxido de hidrogénio, que eleva a viscosidade e dificulta o acesso à dupla ligação que é ponto de partida para a ozonólise, e uma diminuição do valor de iodo do óleo escolhido (Díaz et al., 2006). O que explica as diferenças nos diâmetros dos halos obtidos aquando dos testes (**Tabela 12**). Ainda assim, é notória uma maior eficácia antibacteriana por parte do óleo ozonado, seguindo-se posteriormente a cloro-hexidina a 0,2% e a iodopovidona. Estando referenciado halos de inibição contra bactérias e leveduras com um diâmetro médio de 42,4 mm para *S. aureus* (Montevecchi et al., 2013). Importa ainda dizer que o processo de ozonólise está dependente do tempo que o óleo fica exposto ao ozono, podendo assim dizer-se que, o óleo exposto ao ozono por mais tempo terá maior ação sobre os diferentes microrganismos enquanto antissético (R Di Iorio, Otani, J Koh, Maria Liberatore, & Camilo, 2013). O que também pode justificar terem sido obtidos halos com um diâmetro igual ao controlo negativo (ver **Tabela 12**) valores esses que estão muito abaixo do esperado.

3.3. Concentração mínima inibitória

Tabela 13 - Concentração mínima inibitória para estirpes de *Staphylococcus aureus*.

[mg/mL]	Estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 25923
	CMI
Octenidina 0,1%	3,91
Cloro-hexidina 0,2%	1,95
Polihexanida 0,1%	1,95
Iodopovidona 10%	1562,50
Triclosan 0,15%	0,73
O₃ (óleo de girassol ozonado)	Não realizado*

*Por não se terem obtido resultados positivos no método de difusão em poços

Os resultados obtidos, são referentes à CMI quando testados contra o microrganismo *S. aureus* que permitem aferir para a estirpe ATCC 25923 que: o antissético mais ativo foi o triclosan por demonstrar um valor de CMI (0,73 mg/mL) menor em relação às restantes CMI

dos antissépticos testados. O antisséptico menos ativo foi a iodopovidona por demonstrar o maior valor de CMI (1562,50 mg/mL).

Na literatura, surge um apontar para a polihexanida e octenidina como os agentes, que têm a CMI mais baixa e, portanto, são naturalmente mais eficazes (Koburger et al., 2010), seguindo-se por ordem de CMI a cloro-hexidina, triclosan e iodopovidona (Dittmann et al., 2019). O que veio contrariar em alguma medida a gradação obtida na parte experimental desta dissertação, facto que se deveu a utilização da cloro-hexidina a 0,2%, o que segundo a literatura está abaixo da janela estabelecida (0,5 - 4%) para que seja obtida ação antisséptica. A somar a esta explicação, há ainda uma razão física a obstaculizar o resultado que se deve à baixa taxa de difusão da cloro-hexidina no agar sólido.

Apesar de todo o arsenal terapêutico de antissépticos para fazer frente a agentes microbianos como já foi dito, resistências têm sido relatadas. Em verdade, os antissépticos mostram um espectro antimicrobiano mais amplo em comparação com os antibióticos e são menos comprometidos por resistências específicas. Ao passo que, vários fatores contribuem para as resistências conhecidas (Dittmann et al., 2019). Estando a cloro-hexidina incriminada como o principal antisséptico que faz aumentar a resistência a antibióticos, através das resistências cruzadas, quando existe uma exposição abusiva (G. Kampf, 2016). A exposição à cloro-hexidina aumenta a CMI em *S. aureus* e diminui a suscetibilidade dos seguintes antibióticos penicilina, tetraciclina e gentamicina (Nicolae Dopcea et al., 2019). Facto que conduz a preocupações maiores, uma vez que a cloro-hexidina é o antisséptico mais usado em todo o mundo (Dittmann et al., 2019).

Apesar das vantagens atribuídas aos antissépticos, estes são ainda passíveis de conduzir a efeitos colaterais cutâneos. A título de exemplo cito a octenidina com um excelente perfil alérgico que no entanto, não deve ser usada concomitantemente com antissépticos à base de iodo, uma vez que liberta radicais de iodo que levam à irritação tecidular. Bem como, a cloro-hexidina à qual têm sido atribuídos alguns casos de dermatite (Lachapelle, 2014).

Em suma, os resultados para os antissépticos cloro-hexidina e a octenidina, tanto no método de difusão em poços para todos os microrganismos testados, como na obtenção da CMI para o *S. aureus* estiveram nos lugares cimeiros, como se esperaria. Residindo as pequenas alterações esperadas na concentração utilizada. Quanto aos óleos ozonados, os resultados também se afastaram do que estava previsto, uma vez que a concentração ideal para obter ação antisséptica não foi encontrada (dentro do tempo estipulado para este trabalho).

4. Conclusão

A utilização pouco criteriosa de antissépticos está a conduzir a resistências aos próprios, alastrando-se também aos antibióticos, o que em última análise constitui um alarme para a saúde pública. Por esta via, este projeto fez-se valer do método de difusão em poços para perceber qual o antisséptico (octenidina, cloro-hexidina, polihexanida, iodopovidona, triclosan e ozono – óleo de girassol ozonado) com maior potencial bacteriostático e bactericida contra *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*; e da obtenção da CMI dos mesmos antissépticos contra *S. aureus*.

No método de difusão em poços, para todos os microrganismos testados, conseguiu-se apurar que a octenidina e a cloro-hexidina (diâmetro dos halos de inibição de 13,7 – 22 mm e 19,3 – 23 mm, respetivamente) são os antissépticos mais eficazes. O que é em certa medida consentâneo, com a literatura mais atual e que atribui o lugar cimeiro à polihexanida, seguida de octenidina e cloro-hexidina. Todavia não se verificou o previsto para a polihexanida, provavelmente devido a uma concentração muito diluída. Não obstante do resultado obtido, foi um dos pressupostos assumidos *à priori*, a utilização das concentrações disponíveis no mercado, de modo a ter uma perceção real do valor terapêutico dos antissépticos. Foi também perceptível que o valor obtido para os halos de inibição do ozono foi muito baixo (5 mm). Devendo-se este facto ao não apuramento da concentração ideal, devido à morosidade do mesmo.

A determinação da CMI para o *S. aureus* (microrganismo com maior prevalência na pele) permitiu concluir que o triclosan (0,73 mg/mL) é o antisséptico mais eficaz, seguido da polihexanida e cloro-hexidina (1,95 mg/mL para ambos). O que contradiz o esperado, segundo o qual a polihexanida e octenidina seriam os antissépticos com a CMI mais baixa, portanto mais eficazes.

Por fim, pode dizer-se que todos os objetivos propostos no início deste trabalho foram cumpridos: comparação de diferentes antissépticos comerciais com ação cutânea contra *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*, utilizando o método preliminar de difusão em poços e determinação da respetiva CMI para o *S. aureus*. Para robustecer as conclusões do presente trabalho, seria necessário realizar um maior número de ensaios, efetuar testes com diferentes concentrações dos antissépticos, analisar a ação dos antissépticos para outros microrganismos presentes na pele, escrutinar com maior cuidado os valores da polihexanida e da cloro-hexidina (apresentam mecanismos semelhantes, o que poderá dar origem a resultados semelhantes, sendo que a polihexanida possui ausência de relatórios de anafilaxia e um excelente perfil de

tolerabilidade) e, porventura, executar a ozonólise de outros óleos. Apesar das limitações deste trabalho foram executados testes considerados suficientes para as conclusões acima descritas.

Em suma, este trabalho poderá contribuir para um acréscimo do conhecimento já existente sobre o uso dos antissépticos, sendo uma mais valia no combate das resistências instaladas. Além de ser, um projeto piloto para uma possível utilização de óleos ozonados como agente antisséptico.

5. Referências bibliográficas

- Amalaradjou, M. A. R., & Venkitanarayanan, K. (2014). Antibiofilm Effect of Octenidine Hydrochloride on *Staphylococcus aureus*, MRSA and VRSA. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(2), 404–416. <https://doi.org/10.3390/pathogens3020404>
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014a). *Microbiologia Médica - Volume 1* (1ª; Lidel, Ed.). Lisboa.
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014b). *Microbiologia Médica - Volume 2* (1ª; Lidel, Ed.).
- Biblioteca virtual en salud - Medicinas tradicionales complementarias e integrativas. (2020). Retrieved January 7, 2020, from <http://mtci.bvsalud.org/efetividad-clinica-de-la-ozonioterapia-medica/>
- CDC. (2020a). About Antibiotic Resistance - Antibiotic/Antimicrobial. Retrieved June 12, 2020, from <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- CDC. (2020b). Antibiotic Resistance. Retrieved June 12, 2020, from <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/about/antibiotic-resistance-faqs.html>
- Coelho, C. S., Abreu-Bernadi, W., Ginelli, A. M., Spagnol, T., Gardel, L. S., & Souza, V. R. (2015). Use of ozone therapy in chronic laminitis in a horse. *Journal of Ozone Therapy*, 1(1). <https://doi.org/10.7203/jo3t.1.1.2015.12164>
- de Araújo, A. L., Teixeira, F. de A., Lacerda, T. F., Flecher, M. C., de Souza, V. R. C., & Coelho, C. S. (2017). Efeitos do uso tópico do óleo de andiroba puro e ozonizado em feridas induzidas em cavalos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(1), 66–74. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.113776>
- Diário da República Eletrónico. (2020). Portaria nº 163/2013. Visualizado a 01 de Agosto de 2020, em <https://dre.pt/pesquisa/-/search/260901/details/maximized>
- Díaz, M. F., Hernández, R., Martínez, G., Vidal, G., Gómez, M., Fernández, H., & Garcés, R. (2006). Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(2), 403–407. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000200026>

- Dittmann, K., Schmidt, T., Müller, G., Cuny, C., Holtfreter, S., Troitzsch, D., ... Hübner, N. O. (2019). Susceptibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) to chlorhexidine digluconate, octenidine dihydrochloride, polyhexanide, PVP-iodine and triclosan in comparison to hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) and community-a. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0580-9>
- Fernandes, M., Lourenço, T., Lopes, A., Spínola Santos, A., Pereira Santos, M. C., & Pereira Barbosa, M. (2019). Chlorhexidine: a hidden life-threatening allergen. *Asia Pacific Allergy*, 9(4). <https://doi.org/10.5415/apallergy.2019.9.e29>
- Fjeld, H., & Lingaas, E. (2016). Polyheksanid - Sikkerhet og effekt som antiseptikum. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening*, 136(8), 707–711. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.14.1041>
- Gottschalk, C. (Christiane), Libra, J. A. (Judy A. & Saupe, A. (Adrian). (2010). *Ozonation of water and waste water: a practical guide to understanding ozone and its applications*. Wiley-VCH.
- Hübner, N. O., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(5), 244–258. <https://doi.org/10.1159/000314699>
- Kampf, G. (2016). Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? *Journal of Hospital Infection*, 94(3), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>
- Kampf, Günter, & Kramer, A. (2004, October). Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 17, pp. 863–893. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.863-893.2004>
- Katzung, B. G., & Trevor, A. J. (2017). *Farmacologia Básica e Clínica* (13^a). McGraw-Hill.
- Koburger, T., Hübner, N. O., Braun, M., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1712–1719. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq212>
- Lachapelle, J. M. (2014). A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *European Journal of Dermatology*, Vol. 24, pp. 3–9.

<https://doi.org/10.1684/ejd.2013.2198>

Mcmurry, J. (2005). *Química Orgânica* (6ª).

Mermel, L. A. (2019). Sequential use of povidone-iodine and chlorhexidine for cutaneous antisepsis: A systematic review. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.287>

Montevecchi, M., Dorigo, A., Cricca, M., & Checchi, L. (2013). Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. *The New Microbiologica*, 36(3), 289–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912871>

Mundial Da Saúde, O. (2004). *Manual de segurança biológica em laboratório* (3ª).

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Medical Microbiology* (7th ed.). Elsevier Saunders.

Nicolae Dopcea, G., Dopcea, I., Nanu, A., Diguta, C., & Matei, F. (2019). Resistance and cross-resistance in *Staphylococcus* sp. after prolonged exposure to different antiseptics. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.021>

Ntungwe N, E., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., Teodósio, C., Oliveira, C., ... Roberto, A. (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.1.153>

Organization, W. health. (2014). WHO | WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. In WHO. Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>

Pádua, M. M. (2009). *Patologia Clínica para Técnicos - Tomo 1, Bacteriologia* (1ª).

Palacios, D. (2010). *Ozonização e caracterização de óleos vegetais para uso dermatológico*.

Percival, S. L., Finnegan, S., Donelli, G., Vuotto, C., Rimmer, S., & Lipsky, B. A. (2014). Antiseptics for treating infected wounds: Efficacy on biofilms and effect of pH. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2), 1–17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940495>

Pereira, M., Matias, D., Pereira, F., P. Reis, C., Simões, M. F., & Rijo, P. (2015). Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. *Journal Biomedical*

- and Biopharmaceutical Research*, 12(1), 127–138. <https://doi.org/10.19277/bbr.12.1.111>
- PubChem Database. (s.d.). Triclosan, CID=5564. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564>
- PubChem Database. (s.d.-a). Chlorhexidine digluconate, CID=9552081. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9552081>
- PubChem Database. (s.d.-b). Ethanol, CID=702. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>
- PubChem Database. (s.d.-c). Hydrogen peroxide, CID=784. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/784>
- PubChem Database. (s.d.-d). Octenidine dihydrochloride, CID=198481. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/198481>
- PubChem Database. (s.d.-e). Ozone, CID = 24823. Retrieved May 13, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24823>
- PubChem Database. (s.d.-f). Polyhexanide, CID=20977. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20977>
- PubChem Database. (s.d.-g). Povidone iodine, CID=410087. Retrieved December 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/410087>
- PubChem Database. (s.d.-h). Sulfadiazine, CID = 5215. Retrieved May 13, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5215>
- R Di Iorio, F. B., Otani, C., J Koh, I. A., Maria Liberatore, A. A., & Camilo, F. F. (2013). Óleo Mineral Ozonizado Com Atividade Antimicrobiana. In *Sociedade Brasileira de Química*.
- Ritter, B., Herlyn, P. K. E., Mittlmeier, T., & Herlyn, A. (2019). Preoperative skin antisepsis using chlorhexidine may reduce surgical wound infections in lower limb trauma surgery when compared to povidone-iodine - a prospective randomized trial. *American Journal of Infection Control*. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.08.008>
- Santos, V., Santos, A. S., & Menoita, E. *Wound biofilm approach: case studies*. (2013).
- Sifarma 2000*. (s.d.).
- Vollhardt, K. P. C., & Schore, N. E. (2004). *Química Orgânica: Estrutura e Função* (4ª).

Bookman.

- Wattanaploy, S., Chinaronchai, K., Namviriyachote, N., & Muangman, P. (2017). Randomized controlled trial of polyhexanide/betaine gel versus silver sulfadiazine for partial-thickness burn treatment. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 16(1), 45–50. <https://doi.org/10.1177/1534734617690949>
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., Elsner, P., & Hipler, U.-C. (2015). pH influence on antibacterial efficacy of common antiseptic substances. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(3), 147–158. <https://doi.org/10.1159/000367632>
- Williamson, D. A., Carter, G. P., & Howden, B. P. (2017, July 1). Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: Agents, action, and resistance patterns. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 30, pp. 827–860. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-16>
- Wohlrab, J., Jost, G., & Abeck, D. (2007). Antiseptic efficacy of a low-dosed topical triclosan/chlorhexidine combination therapy in atopic dermatitis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(2), 71–76. <https://doi.org/10.1159/000097653>
- Zeng, J., & Lu, J. (2018, March 1). Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *International Immunopharmacology*, Vol. 56, pp. 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.040>