

ANDRESSA COELHO DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCEMCOMITANS A COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM AMOXICILINA
E DOXICICLINA EM UM MODELO DE BIOFILME DENTÁRIO *IN VITRO***

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

ANDRESSA COELHO DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCEMCOMITANS A COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM AMOXICILINA
E DOXICICLINA EM UM MODELO DE BIOFILME DENTÁRIO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Esperanza Cortés.

Co-orientadora: Dr^a. Karina Imaculada Rosa Teixeira

Faculdade de Odontologia - UFMG

Belo Horizonte

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

M543a
2013
T

Menezes, Andressa Coelho de.
Avaliação da susceptibilidade de *Aggregatibacter*
Actinomycescomitans a compostos de inclusão com amoxicilina e
doxiciclina em um modelo de biofilme dentário in vitro / Andressa
Coelho de Menezes . – 2013.
116 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés.
Co-orientadora: Karina Imaculada Rosa Teixeira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia.

1. Biofilmes - Efeitos de drogas. 2. Amoxicilina. 3. Doxiciclina.
4. Ciclodextrina. I. Cortés Segura, Maria Esperanza. II. Teixeira,
Karina Imaculada Rosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. IV. Título

BLACK D047

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro concedido (bolsa de mestrado) para a realização do meu projeto.

Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que de várias formas ajudaram na realização deste trabalho:

Aos meus pais, José Soares Coelho e Neuza Maria Milholo, pelo exemplo e por sempre me incentivarem a realizar meus sonhos. Agradeço também à Maria Selma Barbosa Rodrigues, minha segunda mãe, por sempre me apoiar em minhas escolhas e vibrar com minhas conquistas.

Aos Professores Dra. Maria Esperanza Cortés e Dr. Rubén Dario Sinisterra, por me fazerem persistir no desenvolvimento profissional, pela orientação, ajuda e paciência. Não tenho palavras para agradecer a compreensão que tiveram comigo na melhor fase da minha vida. Muito obrigada pelo constante incentivo não só na minha formação acadêmica, mas também como pessoa.

À grande amiga e co-orientadora Karina Imaculada Rosa Teixeira pela enorme colaboração, dedicação, disponibilidade e paciência.

Ao colega Esdras de Campos França, pelo apoio, ajuda e exemplo.

Um agradecimento especial aos colegas do Departamento de Química em especial aos colegas Alinne Damásia Martins e Pedro Pires Goulart Guimarães pela paciência, fundamental ajuda, colaboração e orientações.

Aos professores da disciplina de Ortodontia: Prof. Henrique Pretti, Prof. Alexandre Fortes Drummond e Prof. Marcelo Lombardi.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu eterno amor, Gustavo Batista de Menezes (Gu), pelo exemplo de profissionalismo e amor à ciência, pelo incentivo constante, pelas inúmeras orientações e ajuda, pelos lindos momentos que passamos juntos, pela compreensão na minha ausência, pelo companheirismo, amizade e carinho e, sobretudo, por me mostrar o que é o verdadeiro amor.

À minha filha maravilhosa, Julia Coelho de Menezes (Juju), por ser uma criança tão tranquila e permitir minhas ausências para concluir meu trabalho, pelo amor incondicional, pelos sorrisos que me acalmaram, pelos olhares que me transmitiram segurança e por ter mudado completamente minha vida, me mostrando uma felicidade e um amor que eu nunca imaginei sentir.

Aos meus irmãos, Alessandro e Daniel, pelo grande companheirismo, amizade e afeto.

À todos meus colegas de mestrado, em especial à Viviane e Fernanda.

À Deus, pelo dom da vida.

RESUMO

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) é uma das principais bactérias associadas com as periodontites e sua capacidade de formar biofilmes é um fator de virulência que contribui para o agravamento da doença. Este estudo teve como objetivo preparar os compostos de inclusão de amoxicilina (AMOX) e doxiciclina (DOX) com hidroxipropil- β -ciclodextrina (Hp β Cd) na razão molar de 1:1 e caracterizá-los físico-quimicamente em estado sólido e líquido por espectroscopia de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e por ressonância magnética nuclear (RMN), respectivamente. A atividade antimicrobiana dos compostos de inclusão foi avaliada na forma planctônica e num modelo de biofilme de *A.a* (ATCC 29522) *in vitro*. A concentração inibitória mínima do biofilme (MBIC) foi determinada pelo teste de cristal violeta, após exposição de 4, 16 e 24 horas aos agentes antimicrobianos. Estes agentes foram considerados eficazes quando os valores de biomassa do biofilme foram iguais ou inferiores a 50% do controle positivo (MBIC₅₀). Além disso, as possíveis alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com antimicrobianos foram verificadas no crescimento de bactérias no biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que os compostos de inclusão AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd em todas as concentrações testadas foram mais eficazes na inibição do crescimento de bactérias planctônicas e na redução de biomassa de biofilme após 24 horas de exposição quando comparados com os antibióticos puros. Os compostos de AMOX/Hp β Cd atingiram 42,2% na redução do biofilme na concentração de 2 μ g/mL ($p < 0,05$) enquanto o composto DOX/Hp β Cd foi extremamente efetivo atingindo 62,1% de redução de biomassa no biofilme na concentração de 1 μ g/mL ($p < 0,05$) após 24 h. Análises das microscopias demonstraram que o dano à membrana celular é um dos importantes mecanismos que contribui para os efeitos antimicrobianos dos compostos de AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd. Conclui-se que há uma maior susceptibilidade dos biofilmes de *A.a* aos compostos de inclusão de amoxicilina e de doxiciclina quando complexadas em Hp β Cd, inibindo quantitativamente a biomassa *in vitro*.

Palavras chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Amoxicilina, Biofilme, Ciclodextrina, Doxiciclina.

**EVALUATION OF *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCEMCOMITANS*
SUSCEPTIBILITY TO THE INCLUSION COMPOUNDS WITH AMOXICILLIN
AND DOXYCYCLINE IN AN *IN VITRO* DENTAL BIOFILM MODEL**

ABSTRACT

The Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) is one of the main bacteria associated with periodontitis and their ability to form biofilms is a virulence factor that contributed to the aggravation of the disease. This study aimed to prepare inclusion compounds with amoxicillin (AMOX) and doxycycline (DOX) with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Hp β Cd) in 1:1 molar ratio and characterize them physico-chemically in liquid and solid state by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), and nuclear magnetic resonance (NMR), respectively. The antimicrobial activity of the inclusion compounds was evaluated in planktonic form and in a biofilm model of Aa (ATCC 29522) *in vitro*. The minimum inhibitory biofilm concentration (MBIC) was determined by crystal violet assay after exposure to 4, 16 and 24h to the antimicrobial agents. Antimicrobial agents were considered effective when values of biofilm biomass were found to be equal or lower than 50% of the positive control (MBIC₅₀). Also, Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to verify biofilm bacterial growth and to assess cellular membrane integrity and morphologic changes caused by the drug treatments. Our data have shown that amoxicillin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin (AMOX/Hp β Cd, 1:1 molar ratio) and doxycycline/hydroxypropyl- β -cyclodextrin (DOX/Hp β C, 1:1 molar ratio) were more effective in reducing biofilm biomass after 24 h of biofilm exposure when compared with the antibiotics alone in all concentrations tested. AMOX/Hp β Cd achieved 42.2% of biofilm reduction at 2 μ g/mL ($p < 0.05$) while DOX/Hp β Cd was extremely effective achieving 62.1% of biofilm reduction at 1 μ g/mL ($p < 0.05$) after 24 h. SEM images demonstrated that cell membrane damage is one of the important mechanism that contributes to the antimicrobial effects of AMOX/Hp β Cd and DOX/Hp β Cd compounds. It can be concluded that there is a greater susceptibility of Aa biofilms to the inclusion compounds of amoxycillin and doxycycline when complexed in Hp β Cd, inhibiting quantitatively the biofilm biomass *in vitro*.

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Amoxicillin, Biofilm, Cyclodextrin, Doxycycline.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Microscopia Eletrônica Confocal de biofilme de <i>Aa</i> após 24h e de colônia primária de <i>Aa</i>	20
FIGURA 2 - Representação esquemática do desenvolvimento temporal do biofilme oral	22
FIGURA 3 - Fórmula estrutural da amoxicilina.....	26
FIGURA 4 - Fórmula estrutural da doxiciclina.....	29
FIGURA 5 - Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.....	35
FIGURA 6 - Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas naturais α , β e γ	38
FIGURA 7 - Placa de 96 poços. Ensaio do Cristal Violeta após 16 horas de exposição de biofilmes de <i>Aa</i> aos agentes antimicrobianos.....	49
FIGURA 8 - Espectro FTIR de AMOX, mistura física (PM) de AMOX e HP β CD, AMOX/HP β CD (1:1) e HP β CD.....	52
FIGURA 9 - Espectro FTIR de DOX, mistura física (PM) de DOX e HP β CD, DOX/HP β CD (1:1) e HP β CD.....	53
FIGURA 10 - Vista expandida do mapa de contorno RMN 2D-ROESY (400 MHz, spin lock = 600 ms) obtido do sistema DOX/ Hp β Cd /D ₂ O.....	54
FIGURA 11 - Gráficos da biomassa de biofilme (%) de <i>A.a</i> após tratamento com AMOX e 1:1 AMOX/Hp β Cd após 4h (A), 16h (B) e 24h (C) de exposição obtidos através do teste de cristal violeta.....	57
FIGURA 12 - Gráficos da biomassa de biofilme (%) de <i>A.a</i> após tratamento com DOX e 1:1 DOX/Hp β Cd após 4h (A), 16h (B) e 24h (C) de exposição obtidos através do teste de cristal violeta.....	59

FIGURA 13 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Aa* não tratados (controle 1 e 2), bactérias tratadas com 2µg/mL de AMOX (A1 e A2) e 2µg/mL de AMOX/HpβCd (B1 e B2) após 24h de exposição a um biofilme de *Aa* de 24h..... 61

FIGURA 14 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Aa* não tratados (controle), bactérias tratadas com 1µg/mL de DOX (C1 e C2) e 1µg/mL de DOX/HpβCd (D1 e D2) após 24h de exposição a um biofilme de *Aa* de 24h..... 62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração Inibitória Mínima de amoxicilina (AMOX), doxiciclina (DOX), compostos de inclusão AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd (μ g/mL) na razão 1:1 molar e Hp β Cd contra <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (<i>A.a</i>) na forma planctônica.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Chemical Shift
β C	β -ciclodextrina
<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AMOX	Amoxicilina
AMOX/HP β CD	Amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina
ATB	Antibiótico
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
D ₂ O	Heavy water
DOX	Doxiciclina
DOX/HP β CD	Doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina
Et al	e colaboradores
FTIR	Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier
g/mol	gramas por mol
HP β CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MBIC ₅₀	Concentração Inibitória de Biofilme Mínima 50%
mg	Milligramas
mL	Millilitros

µg	Microgramas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PM	Mistura Física
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	19
2.1.2. Biofilmes Orais	21
2.1.3. Amoxicilina	24
2.1.4. Doxíciclina	29
2.1.5. Sistema de Liberação Controlada de Antimicrobianos	34
2.1.6. Ciclodextrinas	37
3. JUSTIFICATIVA	42
4. OBJETIVOS	43
4.1. Objetivos Gerais	43
4.2. Objetivos Específicos	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1. Materiais	44
5.2. Métodos	44
5.2.1. Preparação dos compostos de inclusão	44
5.2.2. Caracterização físico-química	45
5.2.2.1 Análise no estado sólido - Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier	45
5.2.2.2 Análise em solução – Ressonância Magnética Nuclear	45
5.2.3. Concentração Inibitória Mínima	46
5.2.4. Formação do Biofilme de Aa.	47
5.2.5. Quantificação da Biomassa de Biofilme pelo ensaio do Cristal Violeta e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme	48
5.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura	50
5.2.7. Análise Estatística	50
6. RESULTADOS	51

6.1 Caracterização dos compostos de amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	51
6.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier.....	51
6.1.2 Ressonância Magnética Nuclear.....	53
6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	54
6.3 Quantificação da Biomassa de Biofilme pelo ensaio do Cristal Violeta e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme.....	55
6.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	60
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICES.....	81
ANEXOS.....	111

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais representam um grave problema de saúde em todo o mundo e são uma das principais causas de perda de dentes (HOUSHMAND et al., 2012; SAINTRAIN, DE SOUZA, 2012). Nos EUA, 64,7 milhões de pessoas (~ 47% da população) sofrem de gengivite ou periodontite, sendo a taxa de prevalência após os 65 anos de idade superior a 70% (PAPAPANOU, 2012). No Brasil, estudos mostram uma prevalência maior (57%) de gengivite em pacientes jovens (12-19 anos) e de periodontite agressiva generalizada (36%) em pessoas de 60 anos ou mais (MEDEIROS, ROCHA, 2006).

A periodontite é geralmente associada com o acúmulo de biofilme em tecidos periodontais. Em alguns casos, porém, a periodontite pode ocorrer também na ausência de placa visível. Nestes casos, fatores imunológicos e genéticos podem estar envolvidos (LAINE et al., 2010). Apesar de diferentes cepas bacterianas terem sido associadas com a doença periodontal em adultos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) é considerada uma das principais bactérias periodontais responsáveis pela patogênese da periodontite (SLOTS, TING, 1999; ROMAN-TORRES et al., 2010), principalmente da periodontite agressiva localizada (OETTINGER-BARAK et al., 2013). Esta bactéria está também associada à infecções sistêmicas que podem resultar em endocardite (WANG et al., 2010), meningite e abscessos cerebrais (STEPANOVIC et al., 2005). *Aa* é um microrganismo pleomórfico, gram-negativo anaeróbio facultativo que coloniza a cavidade oral (ZAMBON, 1985; HAUBEK et al., 2008; YOSHIDA et al., 2012), com a capacidade de formar biofilme, que é definido como uma comunidade microbiana relativamente indefinida, associada à superfície do dente ou a qualquer outro material duro não-descamativo (LINDHE, 2005).

Biofilmes bacterianos podem causar infecções crônicas, principalmente pela sua maior tolerância a antibióticos (HOIBY et al., 2010). Um fato de grande importância é que os biofilmes efetivamente protegem as bactérias dos agentes antimicrobianos. As bactérias podem ser ~ 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico em um biofilme, quando comparado com as mesmas bactérias planctônicas (WALKER, SEDLACEK, 2007), embora os mecanismos de resistência envolvidos ainda sejam desconhecidos. Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, enquanto as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e espalhar no biofilme após o tratamento. Além disso, as

bactérias dentro dos biofilmes também podem dificultar a resposta do sistema imune (ARCIOLA et al., 2012).

O foco principal do tratamento periodontal é a remoção completa do biofilme e seus produtos, geralmente por raspagem e alisamento radicular não cirúrgicos. Entretanto, esta terapia pode não eliminar completamente todos os patógenos periodontais do ambiente subgingival, que futuramente poderão recolonizar a bolsa periodontal (SEDLACEK, WALKER, 2007). O tratamento, nesses casos, pode ser associado com uma terapia antimicrobiana coadjuvante. Diversos antibióticos são empregados no tratamento da periodontite, incluindo aqueles que apresentam efeito bactericida, tais como a amoxicilina (AMOX), e aqueles que exercem efeito bacteriostático ou previnem o seu crescimento, tais como a doxiciclina (DOX).

Ao se decidir pelo uso de antibióticos no tratamento periodontal, três fatores devem ser considerados: a classificação da doença periodontal, os prováveis microrganismos envolvidos e as possíveis condições sistêmicas do hospedeiro. A escolha do antibiótico também deve levar em consideração o microrganismo causador, a sua susceptibilidade e a toxicidade comparada entre os diversos agentes a serem utilizados. Os antibióticos AMOX e DOX são muito utilizados no tratamento das periodontites por apresentarem amplos espectros. Entretanto, diversos grupos bacterianos têm sido relatados exibindo resistência a esses agentes antimicrobianos, como por exemplo o *Aa* (FERES et al., 1999; MADINIER et al., 1999; VAN WINKELHOFF et al., 2005; KULIK et al., 2008; ARDILA et al., 2010). Devido a este grande número de agentes patogênicos resistentes à antibióticos, é de grande importância o desenvolvimento de tecnologias mais avançadas para o estudo de antimicrobianos com eficácia clínica.

A inclusão de fármacos em ciclodextrinas (CDs) é uma estratégia de modificação da molécula que pode intensificar a interação da mesma com células e microrganismos. Estudos anteriores mostram que a inclusão molecular em CDs pode impedir a biodegradação dos fármacos associados (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2010), podendo minimizar a resistência bacteriana aos antimicrobianos. Sabe-se que a administração sistêmica de fármacos, rotineiramente utilizada, fornece concentrações terapêuticas no local da infecção, mas por curtos períodos de tempo, obrigando o uso de doses repetidas e durante períodos mais longos.

Esse tipo de administração exhibe grande número de desvantagens, incluindo o alto risco de toxicidade, interações com outras drogas, redução da colaboração do paciente e possibilidade de resistência bacteriana. Neste sentido, a liberação local de agentes antimicrobianos incluídos em ciclodextrinas é um método farmacotécnico que traz a possibilidade de minimizar ou eliminar as limitações da terapia sistêmica (CORTES et al., 2001; FRANCO et al., 2003; PATARO et al., 2003; DENADAI et al., 2007). Estas formulações fornecem um tratamento eficaz, de maior duração no local da infecção, em doses menores (PRAGATI et al., 2009; PRAKASAM et al., 2012). A DOX complexada em Hp β Cd já foi estudada em um hidrogel de liberação oftálmica (HE et al., 2011), no entanto, nenhuma formulação de liberação local e controlada de antibióticos com ciclodextrinas foi aprovada para o tratamento da periodontite em seres humanos. Este estudo teve como objetivo preparar e caracterizar compostos de inclusão de AMOX e DOX com Hp β Cd e avaliar sua atividade antimicrobiana contra biofilmes de *A.a in vitro*, com o intuito de utilizá-los futuramente como coadjuvantes na terapia periodontal em pacientes com periodontites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A etiologia da periodontite geralmente está associada com uma infecção microbiana, seguindo-se de uma destruição de tecido mole mediada pelo hospedeiro causada por leucócitos hiperativados e pela produção de citocinas, eicosanóides, e metaloproteinases de matriz que causam destruição clinicamente significativa dos tecidos de suporte (osso, ligamento periodontal, tecido gengival) (ARDILA et al., 2010). Os principais patógenos envolvidos na progressão da periodontite são: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ARIGBEDE et al., 2012),

2.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Apesar de diferentes cepas bacterianas terem sido associadas com a doença periodontal em adultos, *Aa* é considerada uma das principais bactérias responsáveis pela patogênese da periodontite (SLOTS, TING, 1999; ROMAN-TORRES et al., 2010). *Aa* tem sido intimamente associado com periodontite em indivíduos jovens e em casos de periodontite refratária do adulto (SLOTS, TING, 1999). *Aa* é um microrganismo pleomórfico, em geral com morfologia cocobacilar, gram-negativo (Figura 1 A e B), anaeróbio facultativo, que coloniza a cavidade oral (ZAMBON, 1985; HAUBEK et al., 2008; YOSHIDA et al., 2012).

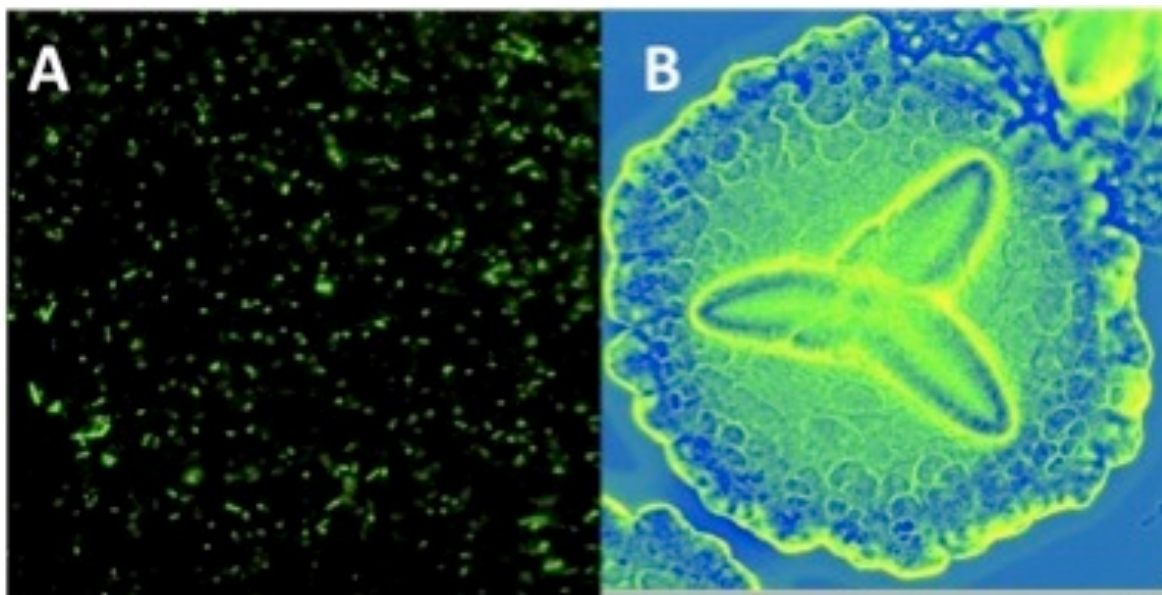


Figura 1. Microscopia Eletrônica Confocal de biofilme de *Aa* após 24h. Fonte: próprio autor (A) e de colônia primária de *Aa*. Fonte: <http://www.scielo.org.ve>. (B).

Na associação bacteriana com a doença periodontal, o *Aa* deve ser capaz de infectar sítios periodontais pela adesão às células epiteliais, aos microrganismos existentes ou à superfície do dente, através de uma competição efetiva contra a grande população microbiana residente e pela superação dos mecanismos de defesa do hospedeiro tanto celular quanto humoral. Estas bactérias são capazes de produzir múltiplos fatores de virulência, como leucotoxinas, endotoxinas, bacteriocinas, lipopolissacarídeos (LPS) e outras proteínas de membrana que atuam localmente dentro do sulco, resultando em destruição tecidual (SLOTS, TING, 1999; ARDILA et al., 2010). Todavia, essas bactérias causam infecções orais e extra-orais (endocardite, abscessos de tecidos moles, cérebro, meninges, septicemia, infecções do trato urinário, pneumonia nosocomial e osteomielite vertebral)(RASMUSSEN et al., 1966; PIOVANO, 1999; SLOTS, TING, 1999; FINE et al., 2001; PATIL et al., 2006; ARDILA et al., 2010).

Aa são capazes de invadir células epiteliais bucais humanas em cultura de células. Invasividade e ampla distribuição intraoral podem ser as principais razões para o pobre resultado obtido após terapia convencional, meramente mecânica, de infecções periodontais. Assim, terapias coadjuvantes com antibióticos são utilizadas para auxiliar na remoção do biofilme subgengival. Os antibióticos comumente utilizados incluem a clindamicina, o metronidazol e a amoxicilina (ARDILA et al., 2010).

Uma possível dificuldade a esta abordagem, entretanto, é que a população microbiana oral é encontrada principalmente na forma de biofilme. A sua complexa organização, taxa lenta de crescimento e fatores de virulência são os principais responsáveis pela proteção da bactéria no interior do biofilme e podem afetar a eficácia de agentes antimicrobianos de maneiras complexas e muitas vezes indeterminadas, dificultando o tratamento da periodontite (SUCI, YOUNG, 2011).

2.2 Biofilmes Orais

O termo biofilme descreve uma comunidade microbiana relativamente indefinida, organizada em estruturas multicelulares, associada à superfície do dente ou a qualquer outro material duro não-descamativo. A placa dental, como depósito microbiano de ocorrência natural, representa um biofilme verdadeiro que consiste em bactérias em uma matriz composta principalmente de polímeros extracelulares de origem bacteriana e produtos do exsudato do sulco gengival e/ ou saliva (LINDHE, 2005; ZIJNGE et al., 2010). O grau de organização e complexidade das estruturas multicelulares pode variar de uma fina camada e agregados à estruturas complexas.

O biofilme é inicialmente formado pela película adquirida, constituída por macromoléculas (glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos, componentes do fluido gengival e anticorpos) adsorvidas por superfícies sólidas dentro de um meio líquido (por exemplo: dentes na cavidade oral). As bactérias se aderem de forma variável a essa superfície. A colonização primária é feita por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos (como *S. sanguis*). Na próxima fase, bastonetes Gram-positivos superam em número os estreptococos. Gram-positivos filamentosos, particularmente *Actinomyces spp.*, são espécies predominantes nesse estágio. Receptores de superfícies nos cocos e bastonetes Gram-positivos permitem aderência subsequente de microrganismos Gram-negativos. *Veillonella*, fusobactérias e outras bactérias anaeróbias Gram-negativas podem aderir também dessa forma (Figura 2). Troca de nutrientes entre diferentes espécies e interações negativas, como produção de bacteriocinas, desempenham papel importante no estabelecimento de uma comunidade bacteriana estável (LINDHE, 2005).

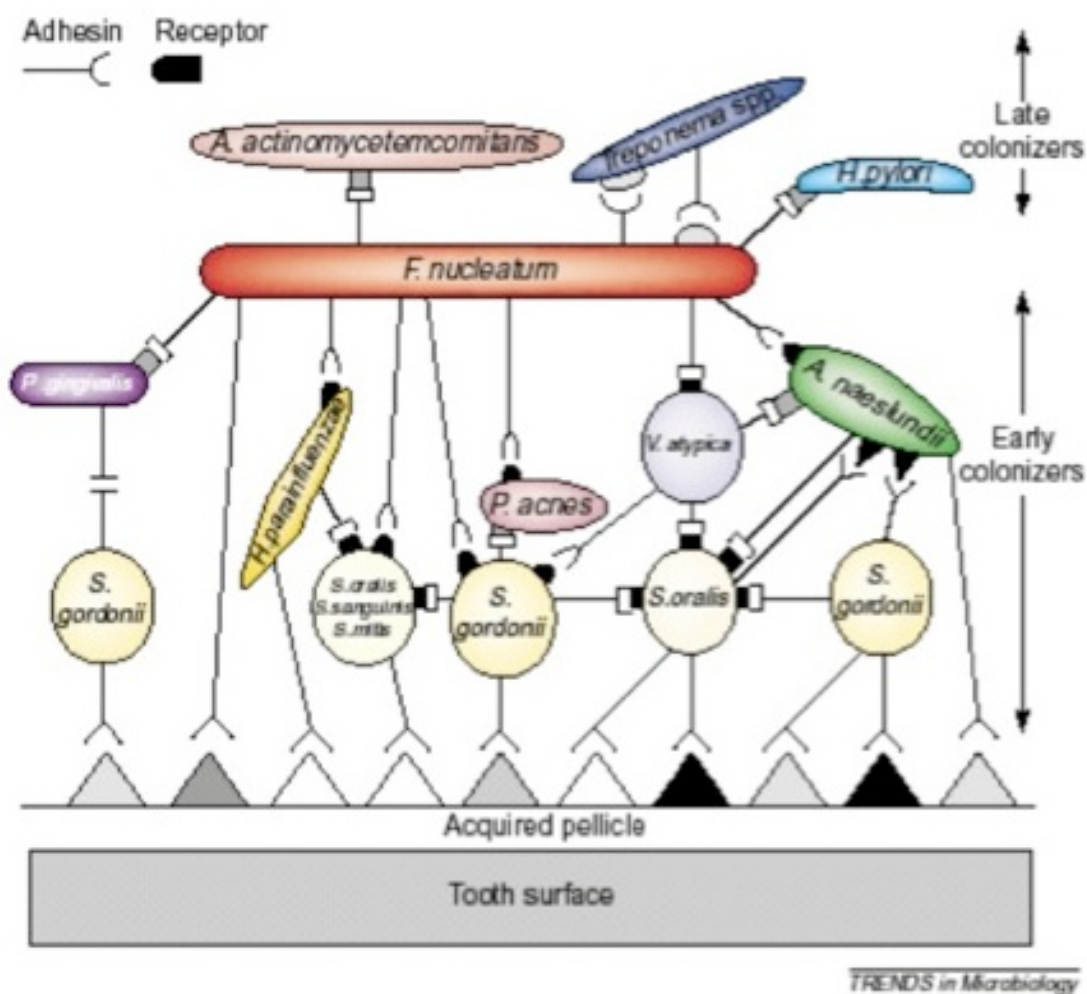


Figura 2: Representação esquemática do desenvolvimento temporal do biofilme oral.
 Fonte: Rickard *et al.*, *Trends Microbiol.*, 11:94-100, 2003

Um fato de notável importância é que biofilmes efetivamente protegem as bactérias dos agentes antimicrobianos. Os biofilmes são resistentes ainda às forças físicas como a produzida pela circulação e pelo escoamento do sangue e a ação da saliva na boca. Microrganismos no interior dos biofilmes também estão menos expostos a carências nutricionais, mudanças de pH, radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos do que organismos do ambiente. Biofilmes são também resistentes à fagocitose, e os fagócitos que tentam atacá-los ainda podem causar mais danos aos tecidos do organismo do que ao próprio biofilme. A natureza de certas infecções crônicas é complexa devido ao desenvolvimento desses sistemas resistentes. Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que terapias antimicrobianas convencionais eliminam em geral formas

planctônicas, deixando células sésseis livres para se reproduzirem e propagarem no biofilme após tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro (RICKARD et al., 2003).

A invulnerabilidade de certos biofilmes não está completamente entendida, mas está relacionada a características específicas, incluindo crescimento lento e microrganismos presentes. Outra importante característica que aumenta a resistência dos biofilmes é a presença de matrizes adesivas que possam conter DNA e outros polímeros, predominantemente composto por exopolissacarídeos (PEREIRA et al., 2006)

O biofilme é também capaz de produzir mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas nas respostas de defesa do hospedeiro contra os microrganismos invasores (principalmente por macrófagos ativados) e causam danos nas moléculas de DNA, proteínas, lipídeos e nas diversas moléculas presentes na célula. Alguns exemplos de ROS são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Dentre os mecanismos de defesa do biofilme contra as ROS estão a produção de enzimas que convertem os agentes oxidantes em espécies menos tóxicas, impedindo o possível dano aos componentes celulares. Entre estas enzimas estão: a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione redutase ou peroxidase (FARR, KOGOMA, 1991).

Dentre outros possíveis mecanismos de resistência aos biofilmes, acredita-se que possa haver inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ou ineficiência da droga em decorrência de taxas de crescimento muito lentas no interior dos biofilmes (RICKARD et al., 2003). Outros mecanismos de adaptação que os microrganismos utilizam para sobreviver no biofilme incluem a adaptação genética, mutação e recombinação genética e aquisição de novo material genético (transformação) ou regulação da expressão de material genético existente. A flexibilidade na expressão genética bacteriana permite a sobrevivência em ambientes com condições instáveis, sendo as bactérias particularmente adaptáveis a quase todos os nichos ambientais do nosso planeta (NASCIMENTO et al., 2006). As bactérias em um biofilme podem participar de uma sinalização intercelular do tipo célula-célula, chamada quorum sensing, para coordenar a expressão de genes. “Quorum sensing” ocorre através da indução ou inibição de expressão de genes por uma densidade crítica de células locais ou “quorum” de bactérias. As células que se encontram dentro do biofilme podem, então, se diferenciar e utilizar moléculas sinalizadoras para coordenar e regular o metabolismo e

desenvolvimento de uma comunidade. Várias espécies bacterianas são capazes de monitorar a densidade de sua própria população e usar essa forma de comunicação para coordenar a expressão de genes particulares (SHROUT et al., 2011).

Dessa forma, biofilmes orais são muito importantes como um sistema modelo para estudo de adesão bacteriana e resistência a antibióticos (ZIJNGE et al., 2010). O estabelecimento de biofilmes *in vitro* é também muito relevante para investigação de substâncias adequadas para supressão da cárie dentária e periodontite (STANDAR et al., 2010). O modelo de biofilme *in vitro* é uma ferramenta que pode ser utilizada para ajudar na concepção racional de experimentos *in vivo* para testar a hipótese de que a morte seletiva de agentes patogênicos irá promover a restauração da homeostase do sistema imune (SUCI, YOUNG, 2011).

2.3 Amoxicilina

A amoxicilina (AMOX) pertence à família de antibióticos com atividade bactericida contra amplo espectro de bactérias (GORDON et al., 1972), embora seja considerada mais eficaz contra microrganismos gram-positivos do que contra gram-negativos. Vários estudos mostraram que a AMOX foi eficaz contra diversos microrganismos com MIC variando de 0,06 a 4 µg/ml. A AMOX é utilizada para tratar infecções do ouvido médio (otite média), das amígdalas (amigdalite e amigdalites), da garganta, da laringe (laringite), da faringe (faringite), dos brônquios (bronquite), dos pulmões (pneumonia), do trato urinário (ITU), da pele e para o tratamento da gonorréia. Também é utilizada na profilaxia contra endocardite bacteriana, em pacientes com a substituição de articulações por próteses e em odontologia (KAUR et al., 2011).

A amoxicilina é bactericida contra microrganismos sensíveis através da inibição da biossíntese da parede celular durante a multiplicação bacteriana. O seu mecanismo de ação principal é a inibição da síntese da parede celular pela inibição da transpeptidase, enzima responsável pela ligação cruzada dos polímeros do peptidoglicano durante a última fase da síntese da parede celular bacteriana. Ela atua através da ligação à proteína penicilina-ligante 1A (PBP-1A) situada no interior da parede celular bacteriana. A AMOX acila a transpeptidase sensível à penicilina no domínio C-terminal através da abertura do anel lactâmico causando a

inativação da enzima, prevenindo a formação de uma ligação cruzada de duas cadeias lineares de peptidoglicanos. Isto inibe a terceira e última fase da síntese da parede celular bacteriana, o que é necessário para a divisão celular, forma da célula e outros processos essenciais. Sendo assim, a letalidade da penicilina para as bactérias envolve tanto mecanismos líticos quanto não líticos. A lise celular é mediada por enzimas autolíticas da parede celular bacteriana, como as autolisinas. É possível que a AMOX interfira com um inibidor de autolisina. A síntese imperfeita da parede celular bacteriana faz com que as células bacterianas absorvam água por osmose, já que as bactérias gram-positivas e gram-negativas possuem 10-30 e 3-5 vezes mais pressão osmótica intracelular do que o ambiente externo. AMOX é mais efetiva contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas e demonstra uma maior eficácia do que a penicilina, penicilina V, e comparável eficácia a outros antibióticos, como por exemplo, ampicilina, azitromicina, claritromicina, cefuroxima e doxiciclina no tratamento de várias doenças/infeções. (KAUR et al., 2011).

É um congênere da ampicilina (uma amino-penicilina semi-sintética), diferindo do fármaco original somente pela adição de uma hidroxila na cadeia lateral fenil. A estrutura básica da penicilina consiste em uma cadeia lateral acílica ligada a grupo amida, que se une a um núcleo de ácido 6-aminopenicilâmico (Figura 3). Modificações e substituições na cadeia acil têm dado origem a grande número de penicilinas semi-sintéticas, entre elas a amoxicilina. Estas mudanças conferem novas propriedades específicas antimicrobianas. Tais propriedades incluem atividade tanto contra gram-negativos como contra gram-positivos, estabilidade a ácidos gástricos, resistência a enzimas hidrolíticas e incremento da absorção no estômago (WALKER, 1996).

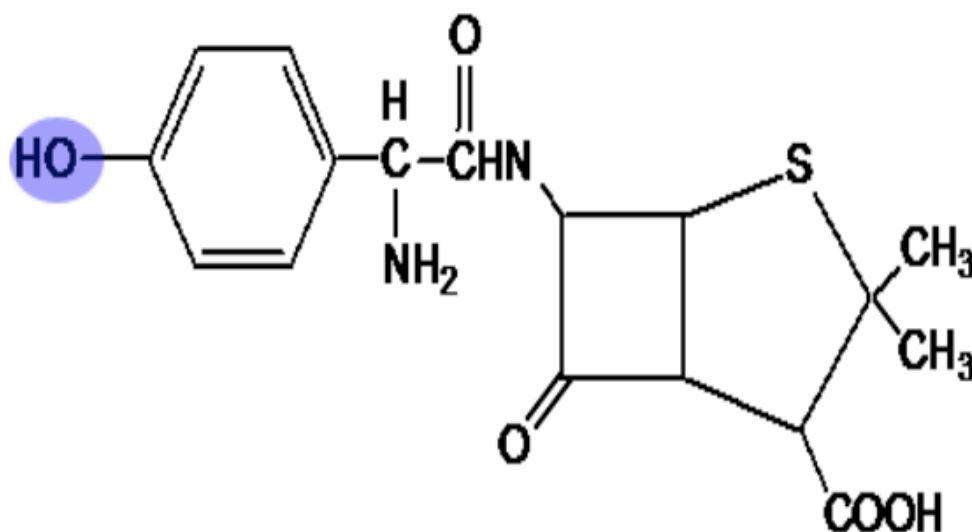


Figura 3. Fórmula estrutural da amoxicilina.

Fonte: KAUR, S.P.; RAO, R.; NANDA, S. Amoxicillin: A broad spectrum antibiotic. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 3, n. 3, p. 30-37, 2011.

A AMOX é um pó de cor branca ou quase branca, com um ligeiro odor sulfuroso. A AMOX tri-hidratada é ligeiramente solúvel em água, muito ligeiramente solúvel em etanol (96 por cento) e praticamente insolúvel em óleos. Ela dissolve-se em ácidos diluídos e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos (KAUR et al., 2011).

Estudos mostram que a AMOX em solução aquosa diluída apresenta taxa de degradação de primeira ordem, em pH constante com uma taxa mínima de degradação em pH 6. A degradação da AMOX foi sujeita a catálise por soluções de fosfato e citrato com um aumento de 10 vezes na taxa com o fosfato. Aumentar a força iônica apresentou efeito positivo na taxa de degradação em solução alcalina e um efeito negativo em ácido. Em concentrações mais altas a AMOX não apresentou uma cinética de degradação de primeira ordem, indicativo de reação de dimerização. Degradação de AMOX em maiores concentrações tornou-se mais rápida na presença de carboidratos (dextrose, dextrano, e sorbitol) e álcoois. A AMOX mostrou estabilidade dependente de pH (com a estabilidade aumentando quando se diminui o pH). A catálise ácido-base parece ser o mecanismo de degradação da AMOX em soluções tamponadas (KAUR et al., 2011).

A AMOX é bem absorvida no trato gastro-intestinal. Apresenta uso clínico difundido, não só pelo seu amplo espectro antibacteriano, mas também por causa da sua elevada biodisponibilidade oral (70-90%) com pico de níveis plasmáticos ocorrendo dentro de 1 a 2 horas. O volume aparente de distribuição de AMOX é cerca de 0,26-0,31 L/kg e é amplamente distribuída para muitos tecidos, incluindo o fígado, pulmões, próstata, músculos, biliar, fluidos ascítico, pleural e sinovial e fluidos oculares. Acumula-se no líquido amniótico e atravessa a placenta, mas apresenta pouca penetração no sistema nervoso central, a menos que uma inflamação esteja presente. Níveis muito baixos da droga são encontrados no humor aquoso, e baixos níveis encontrados em lágrimas, suor e saliva. Possui ligação de aproximadamente 17-20% às proteínas plasmáticas, principalmente com a albumina. A excreção da AMOX é predominantemente renal, e > 80% dos quais 50-70% permanece inalterada e é recuperável na urina, levando a altas concentrações urinárias e também é excretado no leite. Aproximadamente 10-25% é metabolizada em ácido penicilínico. A meia-vida de eliminação do fármaco é de 1 a 1,5 horas (KAUR et al., 2011).

As penicilinas encontram-se entre os agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados, por serem relativamente seguras, eficazes e possuírem espectro de atividade que inclui os patógenos mais comuns. Entretanto, produzem diversos efeitos indesejados, como a perturbação da ecologia microbiana normal e reações alérgicas, que podem ser classificadas em: 1) **agudas**: consideradas as mais perigosas, caracterizam-se por urticária, angioedema, broncoconstrição, distúrbios gastrintestinais e eventualmente choque anafilático, que pode levar à morte, 2) **aceleradas**: incluem urticária, prurido, sibilos, edema discreto da laringe e reações inflamatórias locais e 3) **tardias**: aparecimento de exantemas cutâneos, eritema nodoso e erupções bolhosas. Número significativo de pacientes geralmente apresentam náusea e/ou diarreia após administração de altas doses de penicilina (YAGIELA et al., 2000).

Um estudo de farmacovigilância realizado para documentar os efeitos colaterais de medicamentos no âmbito do Programa da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o Monitoramento Internacional de Fármacos de janeiro de 1988 até junho de 2005 mostraram 1.095 relatórios relacionados com AMOX e 1088 com AMOX combinada (amoxicilina / ácido clavulânico). A porcentagem de reações cutâneas foi alta para ambas (82% para AMOX pura e 76% para a combinada). Entretanto, a porcentagem de reações gastrointestinais, hepáticas e hematológicas foi maior para a AMOX combinada (13%, 4% e 2%, respectivamente) do que para a AMOX pura (7%, 1% e 1%, respectivamente). AMOX combinada parece estar associada a um maior risco de síndrome de Stevens-Johnson, púrpura

e hepatite do que a AMOX isoladamente. Em particular, a taxa reportada de hepatite é em média 9 vezes maior para AMOX combinada do que para a AMOX pura (KAUR et al., 2011).

Quanto às interações com alimentos: refeição gordurosa pode interferir significativamente com a AMOX, fazendo com que o tempo para atingir o MIC seja prolongado. Quanto às interações medicamentosas: a) O ácido clavulânico aumenta o efeito de AMOX e inibe o desenvolvimento de resistência em microrganismos produtores de β -lactamase; b) Probenecida: o uso de AMOX concomitantemente com este produto ou outros inibidores do sistema de secreção de ácido renal aumenta e prolonga as concentrações de AMOX no sangue. c) Alopurinol: pode aumentar a possibilidade de erupção cutânea. d) Anti-coagulantes: prolongamento anormal do tempo de protrombina tem sido raramente relatado em pacientes que receberam AMOX e anticoagulantes orais. e) Metotrexato: AMOX diminui a depuração renal do metotrexato podendo conduzir à deficiências / toxicidade renal. f) Outros: Tetraciclina, cloranfenicol e outros medicamentos bacteriostáticos podem interferir com os efeitos bactericidas da AMOX. Ainda não está totalmente elucidado se a AMOX diminui os efeitos dos contraceptivos orais (KAUR et al., 2011).

O uso da penicilina pode ainda resultar em superinfecções por bactérias, leveduras e fungos não-suscetíveis. O desenvolvimento da superinfecção relaciona-se ao espectro antimicrobiano do antibiótico, à dose do agente utilizada, à duração do tratamento e à via de administração. A via de administração mais comumente utilizada da amoxicilina como coadjuvante no tratamento da periodontite é a via oral (YAGIELA et al., 2000).

A resistência às penicilinas geralmente surge de maneira lenta, gradual. Um mecanismo importante pelo qual bactérias se tornam resistentes à penicilina é através da elaboração da β -lactamase, enzima que inativa a penicilina mediante cisão do anel β -lactâmico, e também pela diminuição do transporte através da parede celular bacteriana. (YAGIELA et al., 2000; BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2010). Estudos prévios sugerem que a degradação da AMOX pode ser evitada utilizando-se uma complexação molecular com β -ciclodextrina (β -CD), o que poderia, portanto, representar uma terapia alternativa interessante (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2010).

Diversos antibióticos são utilizados como coadjuvantes no tratamento da periodontite. Além dos antibióticos bactericidas, como a amoxicilina (AMOX), existem aqueles que exercem efeito bacteriostático ou previnem o crescimento bacteriano, como a doxiciclina (DOX).

2.4 Doxiciclina

A doxiciclina (DOX) (HCl hemietanolato hemiidratada), cujo nome comum é cloridrato de doxiciclina e a denominação científica é a-6-deoxy-5-hydroxytetracycline monohydrate, apresenta aspecto de pó amarelo cristalino, facilmente solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter, dissolve em soluções de hidróxidos alcalinos e carbonatos. A DOX apresenta elevado grau de lipossolubilidade, pouca afinidade de ligação ao cálcio e é altamente estável no soro humano. É um antibiótico de amplo espectro, derivado sintético da tetraciclina (TC), subgrupo cloranfenicol. A sua fórmula química é: $C_{22}H_{24}N_2O_8$ (Figura 4) (TOLEDO, 2007).

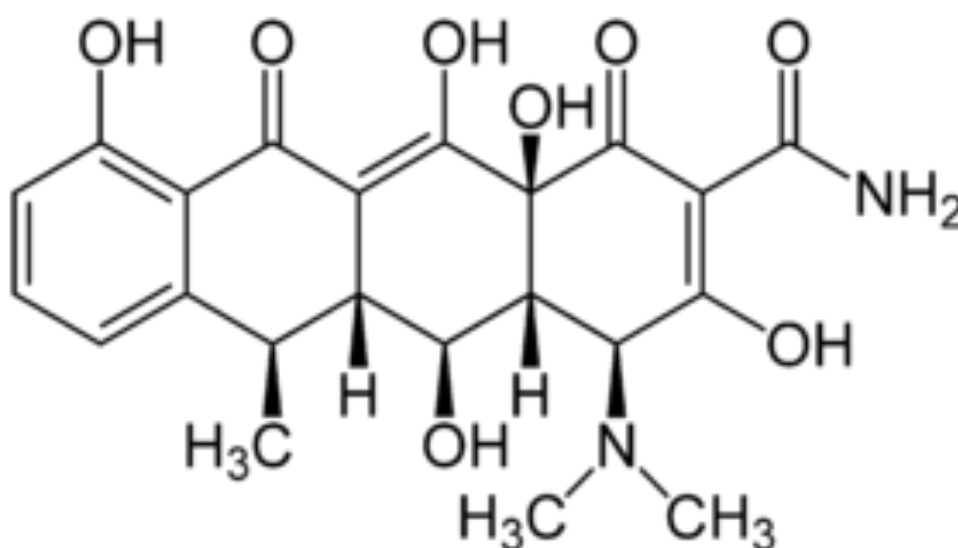


Figura 4. Fórmula estrutural da doxiciclina.

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Doxiciclina>

A DOX possui, na sua estrutura, grupos aminas, carbonila e hidroxila, o que lhe garante alta polaridade. Devido a sua estrutura polar, a DOX tem mais afinidade com a solução do que com a membrana, por isso há maior liberação do fármaco para o sistema. Como a DOX é lipofílica e excretada pela bile, sujeita ao ciclo entero-hepático, apresenta efeito de longa duração (entre 11 a 23 horas em pacientes normais), atinge os vários órgãos e fluidos do organismo, incluindo o microambiente ósseo (TOLEDO, 2007).

Quanto à sua farmacocinética, a DOX administrada por via oral é completamente absorvida e se liga em grau variável às proteínas plasmáticas. O pico médio dos níveis séricos foi de 2-6 µg/mL após 2 horas, diminuindo para 1,45 µg/mL após 18h. Oferece absorção segura e tempo prolongado de meia-vida. Esta propriedade permite frequência de administração menor. A DOX se difunde por todo organismo e atinge concentrações elevadas nos rins, fígado, baço e pulmão, sendo excretada na urina e fezes em altas concentrações sob a forma biologicamente ativa. A excreção renal de DOX é de aproximadamente 40% após 72 horas em indivíduos com a função renal normal (clearance de creatinina de 75 mL/min). Esta porcentagem pode ser reduzida para um valor de até 1-5% após 72 horas em indivíduos com insuficiência renal grave (TOLEDO, 2007).

Ao contrário de outras tetraciclinas (TCs), a absorção da DOX não é alterada pela ingestão de alimentos ou leite. Apresenta a vantagem de ser indicada a pacientes com distúrbios renais, pois não se acumula no organismo. A ausência de grupos hidroxila no C-6 previne a formação de compostos nefrotóxicos. Quando comparada a outras TCs, a DOX é absorvida e excretada mais lentamente sendo sua ação mais prolongada. As concentrações obtidas no pulmão são quase duas vezes maiores que a concentração plasmática, o que demonstra a ação do fármaco no órgão alvo. Sua boa biodisponibilidade permite que baixas concentrações no plasma sejam suficientes para se atingir a MIC para a maioria das bactérias de destino. Sua excreção, sob forma inalterada, ocorre pelos sistemas urinário e digestivo (TOLEDO, 2007)

A sua ação é fundamentalmente bacteriostática e acredita-se que ela exerça ação antimicrobiana pela inibição da síntese proteica. Age no metabolismo de bactérias impedindo sua nutrição, susceptibilidade adequada ao fármaco, desenvolvimento e reprodução. Sugere-se, ainda, ação na membrana citoplasmática bacteriana. Sua propriedade lipossolúvel facilita-lhe a difusão através da membrana celular dos microrganismos susceptíveis, permitindo que ela se ligue à subunidade 30S do ribossomo, inibindo a formação do complexo t-RNA-aminoacil-RNA-ribossomo e impedindo, conseqüentemente, a translação bacteriana ou tradução da síntese proteica (TOLEDO, 2007).

As TCs têm sido largamente usadas como terapia adjuvante nas periodontites (PRESHAW, 2004). Embora inicialmente atribuída a suas propriedades antimicrobianas, a eficácia clínica das TCs na periodontite se deve à sua atividade anti-inflamatória intrínseca. Foi na década de 80 que Golub e colaboradores, em estudos *in vitro* e *in vivo*, verificaram que

as TCs possuíam propriedade anti-inflamatória ao inibir a atividade das metaloproteinases (MMPs) por um mecanismo independente de sua eficácia antimicrobiana. As MMPs são uma família de endopeptidases, enzimas colagenolíticas (colagenases, gelatinases, estromelisinases), zinco-proteases dependentes, que estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo embriogênese, remodelação do tecido, inflamação e tumores, destruição do colágeno, estrutura básica do periodonto, e podem facilitar a aderência de fibronectina à superfície radicular, o que facilita a regeneração de ligamento periodontal. Além disso, as MMPs desempenham um papel essencial na proliferação e diferenciação de populações celulares dos tecidos conjuntivos, incluindo as osteoblásticas (CHOI et al., 2001).

Acredita-se que as TCs exerçam seus efeitos anti-proteolíticos, tanto por inibição direta de MMPs quanto por inibição da sua expressão (de sua síntese). A inibição direta que exercem sobre este grupo de enzimas deve-se à sua capacidade de ligação aos íons metálicos (Ca_{+2} , Zn_{+2}) presentes nas MMP, uma vez que essas enzimas requerem íons Zn_{+2} no seu sítio ativo e íons Ca_{+2} para estabilizar a sua conformação molecular, que são necessários para a sua atividade de degradação da matriz. A eficácia de inibição da TC contra MMPs depende do tipo de TC, da MMP e do PH. Assim, ao inibirem diretamente a ação da colagenase, as TCs diminuem de forma indireta a taxa de reabsorção óssea, pois são potentes inibidores da função osteoclástica (VERNILLO et al., 1994).

A observação de que TCs modificadas, como a DOX, podem inibir a atividade de colagenases por um mecanismo independente de sua eficácia antimicrobiana, tem justificado estudos desse agente na periodontite experimental, especialmente a DOX, considerada a mais potente anti-colagenase das TCs. É considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs (BURNS et al., 1989).

Outra propriedade não antimicrobiana das TCs bem caracterizada é a sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS em excesso são produzidos sob muitas condições patológicas e podem conduzir à destruição oxidativa ou disfunção de muitos constituintes celulares, pois são altamente reativas. As TCs eliminam os radicais livres, semelhante à ação da vitamina E. O anel de fenol das TCs é a chave para as capacidades de remoção de ROS destes compostos (GOLUB et al., 1994).

Cada membro da família das TCs têm semelhanças e propriedades que as diferencia umas das outras, como meia vida e lipofilicidade. Em geral, há uma relação direta entre lipofilicidade e atividade contra bactérias Gram-positivas. A lipofilicidade da DOX foi

determinada como sendo 0,600 (COLAIZZI, KLINK, 1969; GRIFFIN et al., 2010). Lipofilicidade também afeta a distribuição nos tecidos. A DOX apresenta MIC ($IC_{50}=15\ \mu M$), menor do que a minociclina (MIN) ($IC_{50}=190\ \mu M$) e TCs ($IC_{50}=350\ \mu M$), indicando que seria necessária uma dose muito menor deste medicamento para inibir em 50% os níveis de collagenase de um determinado sítio quando comparadas com as doses necessárias de MIN e TC, demonstrando que DOX é a mais potente, mais ativa em menores concentrações (BURNS et al., 1989; GUIMARÃES, 1997). Além disso, as TCs modulam a resposta do hospedeiro, a inibição de formação de radicais oxigenados, derivados de neutrófilos, a regulação da expressão de reguladores pró-inflamatórios e citocinas, o aumento da produção de colágeno, a ativação dos osteoblastos e da formação óssea (PRESHAW, 2004).

Recentemente, comprovou-se que a DOX inibe a atividade das MMPs, bem como a proliferação celular de células mononucleares e também diminui a resposta blastogênica de linfócitos em pacientes periodontais. Grenier *et al.* (2002) sugeriram que a DOX tem potencial para inibir proteinases bacterianas, as quais contribuem para degradação tecidual durante a periodontite (GRENIER et al., 2002).

A DOX é o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento de doenças periodontais em dose “subantimicrobiana”, ou seja, em doses que produzem concentrações plasmáticas menores do que as requeridas para sua ação antimicrobiana (LEE et al., 2004). Alguns autores recomendaram baixas dosagens de DOX (BDD), isto é, subantimicrobianas (20 mg, duas vezes por dia), por um longo período, com intuito de inibir a ação das collagenases do hospedeiro. As BDD reduzem a perda de inserção e a atividade excessiva de collagenase no fluido gengival sem alterar a microbiota da cavidade oral (GOLUB et al., 1994; PRESHAW, 2004). Desta forma, a inibição da atividade das MMPs seria então responsável pelas propriedades anti-collagenases protetoras das TCs e não pelos efeitos antimicrobianos.

Além disso, o uso da DOX tem demonstrado efeitos benéficos no tratamento de outras doenças em que as MMPs desempenham papéis patológicos, tais como aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer de colo. Castro *et al.* (2010) mostraram que a DOX pode inibir o remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial (CASTRO, 2010).

Antibióticos de tetraciclina, incluindo DOX, têm sido utilizados para tratar doenças de reabsorção óssea, em parte por causa de sua atividade para suprimir osteoclastogênese

induzida pelo receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL). Estudos anteriores relataram que a DOX é capaz de diminuir a perda óssea e aumentar a formação de osso (WILLIAMS et al., 1996). No entanto, o seu mecanismo inibitório permanece obscuro.

Bettany *et al.* (2000) demonstraram que as TCs podem induzir diretamente a apoptose celular em osteoclastos (BETTANY et al., 2000). Além disso, Holmes *et al.* (2004) revelaram que a DOX pode regular a osteoclastogênese *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com receptor ativador de NF-kB ligante (RANKL) e colônia de macrófagos estimulando o fator (M-CSF). Esta evidência sugere que acumular TCs pode suprimir a reabsorção óssea através da inibição não só da atividade lítica da enzima de osteoclastos (isto é, a inibição da atividade MMPs), mas também a sua diferenciação em RANKL (HOLMES et al., 2004).

A DOX é ativa contra uma ampla variedade de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. É indicada em infecções causadas principalmente por microrganismos: *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Campylobacter* e outros. Quando a penicilina é contraindicada, a DOX é um fármaco alternativo no tratamento de infecções causadas por *Treponema pallidum*, *Clostridium sp*, *Actinomyces sp* e outros. É útil como adjuvante na amebíase intestinal aguda, na acne severa e na conjuntivite de inclusão. É indicada na prevenção da leptospirose, no tratamento e prevenção seletiva da cólera, na prevenção da diarreia de viajante e da malária (TOLEDO, 2007).

Dentre as reações adversas: não deve ser utilizada durante a gravidez por atravessar a barreira placentária e ser encontrada nos tecidos fetais e no leite materno em doses relativamente altas, podendo provocar reações adversas graves no feto e lactentes. Quanto às interações medicamentosas, o uso concomitante de 200 mg de DOX com álcool, barbitúricos, carbamazepina e fenitoína pode causar a diminuição da sua meia-vida. As doses de DOX devem ser ajustadas em pacientes com doença hepática. Deve-se evitar o uso de DOX e de penicilina ao mesmo tempo e o uso concomitante de DOX e contraceptivos orais pode reduzir a eficácia destes últimos (TOLEDO, 2007).

2.5 Sistemas de liberação controlada de antimicrobianos

Devido à natureza infecciosa da periodontite e aos limitados resultados algumas vezes encontrados com as terapias mecânicas convencionais, o uso de antibióticos é justificado para certas formas da doença ou para certos pacientes (BIDAULT et al., 2007). A administração de fármacos como coadjuvantes para o tratamento da periodontite pode ser realizada por via sistêmica ou local, através de irrigação subgengival ou com a inserção de fibras, tiras e géis para liberação de agentes antibacterianos no local.

A administração sistêmica de fármacos fornece concentrações terapêuticas no local da infecção, mas por curtos períodos de tempo, obrigando o uso de doses repetidas e durante períodos mais longos. Além disso, apresenta uma série de desvantagens, já que é absorvida pela corrente sanguínea e distribuída pela circulação do paciente. As desvantagens são o alto risco de: 1) toxicidade; 2) resistência bacteriana; 3) interações com outros fármacos; 4) redução da colaboração do paciente (LIE et al., 1998; SOMAYAJI et al., 1998). As altas doses de antibióticos sistêmicos levam ainda a outros efeitos colaterais, incluindo alergias e distúrbios gastro-intestinais (MAGNUSSON et al., 1994). A administração local de agentes antimicrobianos tem sido estudada pela possibilidade de minimizar ou eliminar as limitações da terapia sistêmica (CORTES et al., 2001; FRANCO et al., 2003; PATARO et al., 2003; DENADAI et al., 2007).

A administração tópica de agentes antimicrobianos na forma de enxaguatórios bucais tem se mostrado efetiva no controle da placa dental supragengival. Entretanto, o acesso à bolsa periodontal e à microbiota subgengival é limitado e ainda ineficiente no controle da progressão da doença. A liberação local de agentes nas bolsas por meio de seringas de irrigação tem se mostrado eficiente contra a microbiota subgengival, mas clinicamente não tem se mostrado efetiva no controle da progressão da perda de inserção, provavelmente pelo curto tempo que a solução irrigadora permanece em contato com o ambiente da bolsa. Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada utilizados subgengivalmente tem possibilitado a manutenção de efetivos níveis de agentes antimicrobianos dentro da bolsa periodontal por períodos prolongados de tempo.

Sistema de liberação controlada é definido como um sistema onde o fármaco é liberado com um tempo prefixado. Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, seu nível sanguíneo se mantém dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior,

sendo mais eficaz do que formas convencionais. O nível terapêutico descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente (Figura 5). Um exemplo dessa liberação acontece nos sistemas que empregam fármacos incluídos em ciclodextrinas (CORTES, 1999).

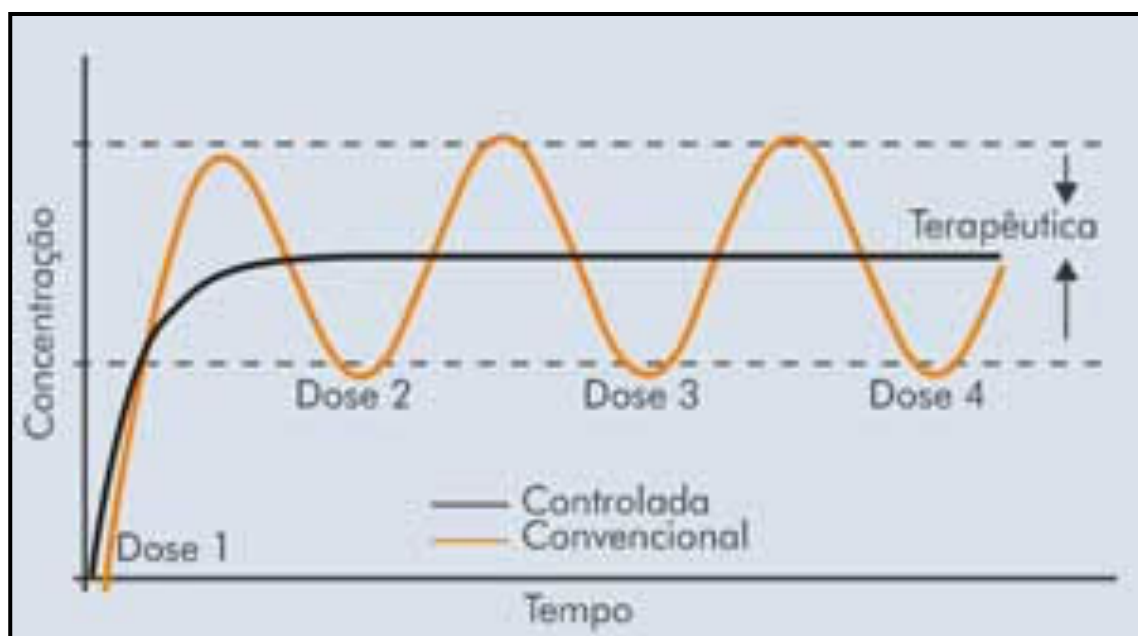


Figura 5. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.

Fonte: <http://www.gerbras.com.br>.

Esse sistema de liberação controlada fornece um tratamento eficaz, de maior duração no local da infecção, em doses muito menores (PRAGATI et al., 2009; PRAKASAM et al., 2012) e consiste de um reservatório do fármaco e de um elemento limitante que controla o padrão de liberação do medicamento. Esses dispositivos têm se mostrado biocompatíveis, atenuando os efeitos tóxicos e colaterais dos fármacos. A aplicação desses sistemas aumenta a eficácia dos agentes antimicrobianos quando associadas ao tratamento periodontal mecânico (LANGER, 2003). Seu objetivo principal é que o antimicrobiano permaneça por tempo suficiente em contato com as bactérias para eliminá-las e/ou reduzir sua quantidade até um nível onde mecanismos de defesa do hospedeiro possam controlar a infecção. Têm sido utilizados para obter e manter saúde periodontal em conjunto com o tratamento mecânico, aumentando ou facilitando seu efeito, já que a liberação local pode atingir lugares na superfície radicular ou no cimento e dentina de raízes infectadas que não são acessíveis através da instrumentação manual (LÓPEZ, GAMONAL, 1998). Uma pequena redução na profundidade de sondagem pode reduzir a quantidade ou mesmo eliminar totalmente a

necessidade de se realizar cirurgia para determinado paciente, e ainda facilitar a manutenção da saúde periodontal para o mesmo. Dessa forma, antimicrobianos de uso local podem ter um papel importante em sítios que responderam pobremente à terapia mecânica.

Para promover a liberação controlada de fármacos foram desenvolvidos dispositivos, biodegradáveis ou não, em forma de fibras, tiras e /ou géis para liberar agentes antibacterianos no local. Dispositivos biodegradáveis possuem a vantagem de reduzir a quantidade de visitas do paciente ao dentista, já que não precisam ser retirados do local. Dispositivos não-biodegradáveis, apesar de proporcionarem melhor controle sobre o tempo de exposição da droga no local de ação, quando deixados no local por longos períodos de tempo podem se tornar um risco em potencial, já que podem ser considerados pelo organismo como corpos estranhos (SOSKOLNE, 1997). Alguns exemplos de dispositivos de liberação controlada são: fibras contendo tetraciclina (GOODSON et al., 1991), gel com 2% de minociclina (VAN STEENBERGHE et al., 1993), metronidazol (NORLING et al., 1992) e digluconato de clorexidina (STEINBERG et al., 1990). Em estudos clínicos, estes sistemas de liberação controlada têm possibilitado modificar a microbiota subgengival e influenciar no restabelecimento dos níveis das margens gengivais (MAGNUSSON et al., 1994).

A inclusão de fármacos em macromoléculas tem sido estudada para liberação controlada de antimicrobianos (LANGER, 2003). A inclusão molecular é um método farmacotécnico que melhora significativamente as propriedades de um medicamento já existente. Esse método tem como objetivo diminuir efeitos colaterais, diminuindo a concentração do medicamento e o número de aplicações de determinado arsenal terapêutico. As principais macromoléculas envolvidas no sistema de transporte de fármacos são: a albumina, os anticorpos monoclonais, as glicoproteínas e as ciclodextrinas (CDs).

2.6 Ciclodextrinas

Entre as estratégias encontradas na literatura visando melhorar as propriedades físico-químicas e/ou biológicas de fármacos estão os compostos de inclusão (CORTES et al., 2001; TEIXEIRA, 2008). Substâncias largamente utilizadas para esse fim são as ciclodextrinas.

Ciclodextrinas (CD) são carboidratos complexos, compostos de unidades de glicose, provenientes da hidrólise enzimática do amido, unidas por ligações tipo α -1,4, com estrutura semelhante a um tronco de cone (BRITTO et al., 2004) e formam complexos de inclusão com

diferentes fármacos, podendo apresentar características físicas diversas do medicamento padrão (UEKAMA et al., 1998).

A inclusão de uma molécula ou fármaco na ciclodextrina pode alterar de forma considerável suas características, principalmente no sentido farmacocinético: melhora da solubilidade e estabilidade, redução de certos efeitos secundários (como odor e sabor desagradáveis), transformação do estado líquido para sólido, melhora da estabilidade das moléculas hóspedes incluídas contra hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação (CORTES, 1999).

Ciclodextrinas naturais α , β e γ (Figura 6) e seus derivados sintéticos, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina, têm sido estudados pela sua capacidade de formar compostos de inclusão com moléculas alojadas em sua estrutura. Através da formação de compostos de inclusão, aumenta-se a estabilidade e/ou disponibilidade dos medicamentos a elas associados. Como resultado destas associações, atividade, solubilidade e seletividade das drogas aumentam, ao passo que são reduzidos seus efeitos adversos (UEKAMA et al., 1998).

Biologicamente, as CDs naturais não apresentam toxicidade após administração oral e tópica, visto que, devido ao tamanho molecular (1000–2000 Da) e à característica hidrofílica não são absorvidas pela mucosa do trato gastrointestinal e pele (SZEJTLI, 1992).

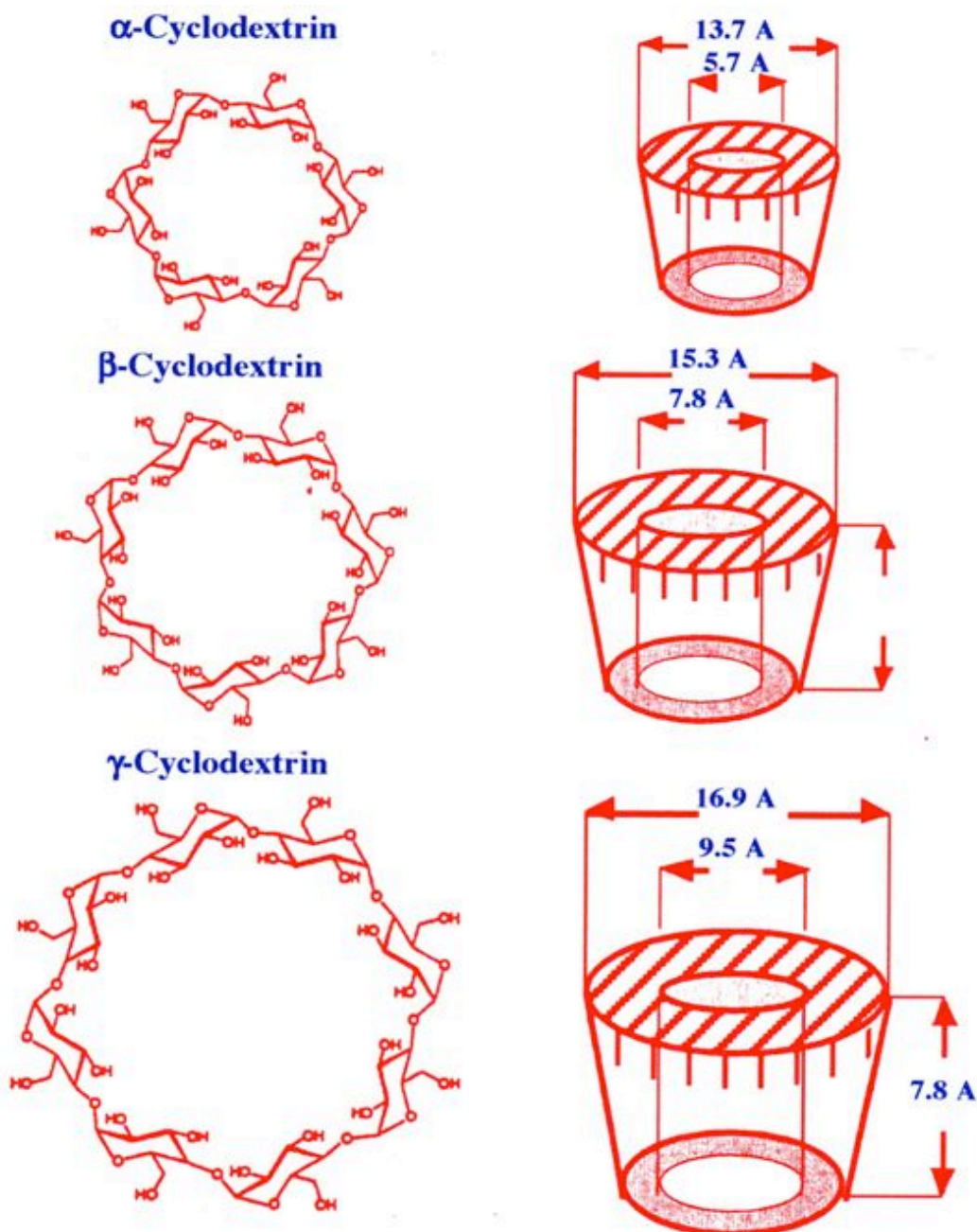


Figura 6. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais α , β e γ .

Fonte: Szejtli, 1992.

Beta-ciclodextrinas (β -CD) contêm sete grupos de dextrose e são as mais utilizadas para formação de compostos de inclusão. Possuem 21 grupos oxidrilas, sendo 14 na parte hidrofílica e 7 na base menor. Essas ciclodextrinas são de baixo custo, encontradas em grande quantidade e apresentam características de interagir com várias substâncias. Estudos recentes mostraram que a β -CD possui efeito estabilizador na amoxicilina, quando é formado o

composto de inclusão (HIDAKA et al., 2010). Outra característica importante é o fato da ciclodextrina proteger o anel β -lactâmico da amoxicilina, evitando sua biodegradação (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2010). Essa ciclodextrina apresenta baixa solubilidade em água. Essa propriedade pode ser aumentada adicionando-se solventes e sais orgânicos, formando complexos de inclusão estáveis em relação à luz, calor e liberação de oxigênio. A hidroxipropil- β -ciclodextrina tem a vantagem de apresentar melhor solubilidade em água (CORTES, 1999).

Diversos estudos têm mostrado o aumento do efeito antibacteriano, melhora da estabilidade e de várias outras propriedades de fármacos, quando associados à ciclodextrinas:

Cortes et al (2001) concluíram que microrganismos orais (como *A.a.*) eram mais susceptíveis aos compostos de inclusão de clorexidina:beta-ciclodextrina do que com clorexidina pura e também do que misturas mecânicas de clorexidina e ciclodextrina. Estes resultados poderiam ser explicados por duas razões: primeiro pela aderência destes compostos à parede celular bacteriana em função dos grupamentos OH presentes e segundo porque a ciclodextrina retardou a liberação da clorexidina.

Franco et al (2003) estudaram a atividade antimicrobiana de compostos de inclusão de clorexidina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina na proporção molar 1:2 contra *A.a.* e puderam concluir que a ciclodextrina modula a liberação de Clorexidina garantindo sua substantividade e liberação de maneira continua e biologicamente ativa, sem causar danos morfológicos à superfície dentinária.

Pataro et al (2003) também estudaram a atividade antimicrobiana de complexos supramoleculares de tetraciclina:beta-ciclodextrina (TC: β -cd) na razão molar 1:1 contra *A.a.* e puderam concluir que os compostos de inclusão de TC: β -cd inibem *A.a.* numa concentração mais baixa que as usualmente observadas pela tetraciclina pura (a atividade antimicrobiana alcançada foi de 4% para tetraciclina pura e 1 % para os complexos supramoleculares).

Alguns autores desenvolveram um sistema antimicrobiano de liberação controlada à base de PLGA ciclodextrina e clorexidina em microesferas e estudaram suas propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana in vitro contra *A.a.* Eles observaram que a liberação controlada de clorexidina se manteve durante duas semanas e que a clorexidina derivada do complexo estava sendo liberada em sua forma ativa e que a forma do chip

confeccionado foi capaz de manter zonas de inibição durante uma semana em testes de difusão em ágar (YUE et al., 2004).

Ainda em 2004, pesquisadores avaliaram as propriedades físico-químicas, biocompatibilidade *in vivo* e a atividade antimicrobiana contra *A.a.* *in vitro* de um biovidro usado para liberação controlada de cloridrato de tetraciclina comparado a outro contendo um complexo de inclusão de tetraciclina: beta-ciclodextrina na razão molar 1:1. Seus resultados mostraram que a atividade antimicrobiana dos biovidros aumentou quando estavam associados ao cloridrato de tetraciclina e à tetraciclina: beta-ciclodextrina, sendo esta última mais eficiente (DOMINGUES et al., 2004).

Em 2007, Denadai et al. fizeram testes com compostos de inclusão de clorexidina: beta ciclodextrina para determinação da atividade antimicrobiana destes compostos para *A.a.* e perceberam que nas mesmas concentrações de clorexidina (Cx) a atividade varia com a razão molar das misturas em solução (1:1; 1:2; 1:3 e 1:4). Assim em razões molares maiores de Cx como, Cx: β -cd 1:4 mostrava maiores zonas de inibição que os demais grupos; Todos os grupos apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória e nenhum dos complexos apresentou diminuição do efeito da clorexidina pura. Ainda os autores sugerem que 64 μ g/mL do composto de inclusão, independente da razão molar empregada, era capaz de inibir o crescimento dos microrganismos estudados.

He et al. (2011) prepararam uma formulação química e fisicamente estável de doxiciclina e hidroxipropil- β -ciclodextrina em um hidrogel para liberação oftálmica. Os resultados demonstraram que a inclusão da DOX pela HP β CD melhorou acentuadamente sua estabilidade em solução aquosa tanto em 8 como em 40°C. Os autores concluíram que a formulação de um complexo de inclusão de doxiciclina : HP β CD em um hidrogel representa um sistema de liberação oftálmica de DOX potencialmente eficaz.

Consuegra et al. (2013) estudaram a atividade antimicrobiana de peptídeos antimicrobianos (AMPs) associados com β -ciclodextrinas na proporção molar de 1:1 contra cepas de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*. Os autores concluíram que os compostos de AMPs / β -CD são mais eficazes para inibir as bactérias periodontopatogênicas do que os peptídeos não complexados e possuem a capacidade adicional de inibir a proliferação de células epiteliais, em concentrações não citotóxicas de osteoblastos e eritrócitos.

Devido ao grande número de estudos demonstrando a melhora das propriedades dos fármacos associados às ciclodextrinas, é de fundamental importância a pesquisa de novas associações com outros fármacos e o estudo desses em comunidades bacterianas que se aproximem mais com as situações encontradas *in vivo*, já que a população microbiana oral é encontrada primariamente na forma de biofilmes (SUCI, YOUNG, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A periodontite constitui um grave problema de saúde pública constituindo uma das principais causas de perda dentária. Cerca de 47,2 % da população americana sofre de periodontite leve, moderada ou grave. Estima-se que as taxas de prevalência sejam de aproximadamente 70% para os adultos acima de 65 anos, superando outras doenças crônicas como as doenças cardiovasculares e o diabetes. No Brasil, a prevalência de doença periodontal (leve a moderada) não chega a 70%, porém aumenta também conforme o avanço da idade da população. Levando-se em conta o aumento da resistência bacteriana e a limitação das terapias existentes para o tratamento da doença é de grande relevância o estudo de novos agentes antibacterianos. Este estudo propõe o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem menores efeitos colaterais e que sejam capazes de inibir a progressão dos biofilmes orais. Modificações na farmacocinética de antibióticos para liberação local têm demonstrado ser efetivas, ao passo que se reduzem os efeitos colaterais associados à aplicação sistêmica. Os sistemas de liberação controlada amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina apresentam-se como alternativas ao uso de antibióticos utilizados via administração sistêmica. A inclusão de antibióticos em ciclodextrinas os protege da degradação e aumenta sua biodisponibilidade na bolsa periodontal, com efeitos colaterais mínimos. Essas características permitem que esses sistemas de liberação controlada possam ser utilizados como coadjuvantes no tratamento da periodontite, possivelmente eliminando bactérias resistentes, não susceptíveis ao tratamento mecânico convencional e ao tratamento com antibióticos sistêmicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar o composto de inclusão tipo hospedeiro-convidado entre a hidroxipropil- β -ciclodextrina e a amoxicilina e doxiciclina em um modelo de biofilme dentário *in vitro*, visando à produção de novos dispositivos de liberação controlada para prevenção e/ou tratamento da periodontite.

4.2 Objetivos específicos

1. Preparar o sistema hospedeiro-convidado entre amoxicilina e hidroxipropil- β -ciclodextrina e entre a doxiciclina e a hidroxipropil- β -ciclodextrina na razão molar 1:1.
2. Caracterizar físico-quimicamente os compostos de inclusão de amoxicilina e doxiciclina através de espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN).
3. Determinar a concentração inibitória mínima dos antibióticos amoxicilina e doxiciclina, dos compostos de inclusão amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e da hidroxipropil- β -ciclodextrina pura para cepa planctônica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
4. Preparar biofilmes dentários *in vitro* de um dos principais patógenos periodontais: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
5. Comparar a ação da amoxicilina e doxiciclina isoladas e dos compostos amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina frente aos biofilmes.
6. Realizar microscopia eletrônica de varredura (MEV) para confirmar os testes de quantificação de biofilme pelo ensaio do Cristal Violeta e avaliar a integridade da membrana celular e alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com fármacos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

O cloridrato de doxiciclina (DOX) e a amoxicilina tri-hidratada (AMOX) foram obtidos da Sigma-Aldrich[®] (St Louis, MO) e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (Hp β Cd) da Cerestar[®], Co. (Milwaukee, WI, USA). O caldo BHI (Brain Heart Infusion) e o extrato de levedura foram obtidos da Biobrás S.A. (Minas Gerais, Brasil) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) da Fundação Oswaldo Cruz.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparação dos compostos de inclusão

Foram preparados os compostos de inclusão AMOX/Hp β CD e DOX/Hp β CD na razão molar 1:1 pelo processo de liofilização de soluções aquosas empregando-se o equipamento *Savant Modulo D-Freeze Dryer* da *Thermo-Electron Corporation*[®], tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (CORTES et al., 2001). Foram preparadas, inicialmente, soluções aquosas de cloridrato de DOX (PM: 480,99g/mol) e AMOX tri-hidratada (PM: 419,40g/mol) deixadas sob agitação constante a 40° C durante meia hora, e foram acrescentadas a estas soluções aquosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina (PM: 1376g/mol) na massa indicada. A seguir, as soluções resultantes foram distribuídas em tubos Falcon de 15mL, congeladas em nitrogênio líquido e levadas à sublimação.

Os compostos assim preparados serviriam como grupos teste para todos os experimentos tendo como controles os grupos: AMOX, DOX e Hp β Cd.

A inclusão molecular foi confirmada através da espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (para AMOX e DOX) e da ressonância magnética nuclear (para DOX).

5.2.2 Caracterização físico-química

5.2.2.1 Análise no estado sólido - Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

As caracterizações no estado sólido da DOX, AMOX, HP β Cd, DOX/HP β Cd e AMOX/HP β Cd e das misturas físicas (PM) de AMOX e DOX com HP β Cd em uma razão molar de 1:1 foram realizadas usando FTIR. As amostras foram preparadas como pastilhas de brometo de potássio (KBr) e o escaneamento foi realizado de 4000 a 400 cm^{-1} à uma resolução de 4 cm^{-1} utilizando-se 32 scans por amostra. Os espectros de FTIR foram registrados usando um espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum GX; Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

5.2.2.2 Análise em solução – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica através da qual é possível conhecer a disposição espacial de átomos ou grupos funcionais de moléculas ou ainda complexos, assim como dados relacionados à dinâmica molecular destes, avaliar interações moleculares que ocorrem, por exemplo, em sistemas do tipo hóspede - hospedeiro envolvendo ciclodextrinas. Neste caso a RMN poderá fornecer evidências da formação dos complexos de inclusão através do estabelecimento das constantes de formação e correlações espaciais.

Desta forma os experimentos de hidrogênio são de grande importância na caracterização dos complexos supramoleculares através da análise da variação de

deslocamentos químicos em função da variação das espécies envolvidas. As variações mais significativas se referem aos núcleos que estão interagindo de forma mais efetiva e é resultado da complexação das espécies.

O composto de inclusão DOX/Hp β Cd em solução foi caracterizado usando espectroscopia RMN em uma razão molar de 1:1. Experimentos de ¹H NMR chemical shifts (δ) e 2D ¹H-¹H ROESY foram realizados utilizando-se um espectrômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) à 300 K. As soluções analisadas incluíram 2.0 mM de DOX e DOX/Hp β Cd (1:1). Ambas soluções foram preparadas em D₂O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; 99.9 % de pureza isotrópica). O sinal HOD à δ = 4.80 foi usado como referência. Nenhuma formação sólida foi observada nas soluções durante a análise. Os experimentos 2D ¹H-¹H ROESY foram registrados com um bloqueio de rotação de 600 ms, o que foi calculado previamente ao longo da sequência de recuperação de inversão (RAHMAN, 1989; WERNER, 1994). As amostras para este experimento foram preparadas usando o método de liofilização, como descrito anteriormente. Antes da análise por ROESY, o espectro de ¹H RMN da DOX foi atribuído de acordo com Guerra et al. (GUERRA et al., 2006) e o espectro de ¹H RMN da DOX/Hp β Cd foi atribuído de acordo com Schneider et al. (SCHNEIDER et al., 1998).

5.2.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima para bactérias planctônicas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas do National Commitee for Clinical Laboratory Standards (WIEGAND et al., 2008; CLSI, 2011).

Descrição do método: cepas de *Aa* foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com extrato de levedura 0,5%, e incubadas em condições anaeróbicas (10% de CO₂, 90% N₂) a 37° C durante 24 h. Após a incubação, as bactérias foram preparadas em caldo BHI suplementado com extrato de levedura baseando-se na densidade óptica usando o espectrofotômetro ajustado a 610 nm, com uma leitura de absorbância de 0,08 correspondendo a 0.5 na escala de turbidez de McFarland (SLOTS, TING, 1999), o que indica a presença de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL . Após realizada a microdiluição dos antibióticos AMOX e DOX, dos compostos de inclusão DOX/Hp β Cd e

AMOX/Hp β Cd e da Hp β Cd sozinha de 128 μ g/mL até 0,25 μ g/mL, em placas 96 poços, foi adicionado 50 μ L de *Aa* em cada poço e as placas foram incubadas a 37 ° C por um período de 24h. Como controle positivo foi utilizado 50 μ L de caldo BHI suplementado com extrato de levedura e 50 μ L de *Aa*. Como controle negativo foi utilizado somente o caldo BHI suplementado (100 μ L). A concentração inibitória mínima foi definida como a concentração mais baixa de antimicrobiano que impedia o crescimento visível do microrganismo, determinada por um espectrofotômetro à 610nm (WIEGAND et al., 2008).

Foi feita a normalização das concentrações dos fármacos, assim, todos os compostos testados tinham a mesma concentração do fármaco puro, somente variando a quantidade de ciclodextrina. Todos os testes foram realizados em triplicatas, duas vezes.

5.2.4 Formação do Biofilme de *Aa*

O método de formação de biofilme de *Aa* em placas de 96 poços foi adaptado a partir da metodologia empregada em estudos prévios: Fletcher, 1977; O'Toole et al., 1999; Yang et al., 2006 e Erriu et al., 2012. O método modificado foi realizado seguindo as seguintes etapas: cepas de *Aa* foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com extrato de levedura 0,5%, e incubadas em condições anaeróbicas (10% de CO₂, 90% N₂) a 37° C durante 24 h. Após a incubação, as culturas foram diluídas na proporção de 1:20 em caldo BHI suplementado com 0,5% de extrato de levedura baseando-se na densidade óptica usando o espectrofotômetro ajustado a 610 nm, com uma leitura de absorbância de $0,1 \pm 0,02$ (correspondendo a um valor entre 10^7 e $10^{7,4}$ UFC/mL). 0,2 mL da cultura diluída foram adicionados à placas de 96 poços de poliestireno (não tratadas, estéreis, de fundo chato) (TPP® Suíça) e incubadas em condições anaeróbicas a 37° C durante 24 h. Desta forma, permitiu-se que as bactérias se aderissem ao fundo da placa e que as mesmas pudessem crescer e se multiplicar durante o período de 24 horas, formando um biofilme maduro (FLETCHER, 1977; O'TOOLE et al., 1999; YANG et al., 2006; ERRIU et al., 2012) .

5.2.5 Quantificação da Biomassa de Biofilme pelo ensaio do Cristal Violeta e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (MBIC)

Após a formação do biofilme de *Aa*, previamente descrita, o meio (caldo BHI suplementado com extrato de levedura) foi removido e os poços foram lavados três vezes com 200µL de solução tampão de PBS (0,1M, pH 7,4) utilizando-se pipeta multicanal. Foram inseridos nos poços, no lugar do caldo BHI, os agentes antimicrobianos AMOX, DOX, DOX/HpβCd e AMOX/HpβCd nas concentrações de 1, 2, 20 e 200 µg/mL para todos eles. Como controle positivo, o meio do biofilme foi trocado por um novo meio (BHI + extrato de levedura) e como controle negativo foi utilizado somente o caldo BHI suplementado, sem bactéria. Após 4, 16 e 24h de incubação, a biomassa de biofilme foi avaliada por um ensaio de Cristal Violeta.

A figura 7 mostra o ensaio de Cristal Violeta utilizado para quantificar a biomassa de biofilme, como descrito por vários autores (PRESTERL et al., 2005; BURTON et al., 2007; ERRIU et al., 2012). Após a incubação dos biofilmes com os agentes antimicrobianos em momentos pré-definidos (4, 16 e 24h), o meio foi removido e os poços foram novamente lavados três vezes com 200µL de solução tampão de PBS (0,1 M, pH 7,4), deixando-se secar por 15 minutos. Os biofilmes restantes nos poços foram então corados com 200µL de Cristal Violeta 0,1% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Feito isso, retirou-se com cuidado o Cristal Violeta dos poços (com pipeta multicanal), e lavaram-se os poços novamente, três vezes com PBS. Este procedimento permitiu retirar todo o Cristal Violeta não fixado às bactérias e também bactérias que não estavam aderidas ao biofilme. Deixou-se os poços secarem ao ar durante 15 minutos e então foi adicionado ácido acético (200µL, 33%v:v) com o intuito de solubilizar o Cristal Violeta remanescente. A formação de biofilme foi representada pela análise da absorbância realizada com um espectrofotômetro a 620 nm.

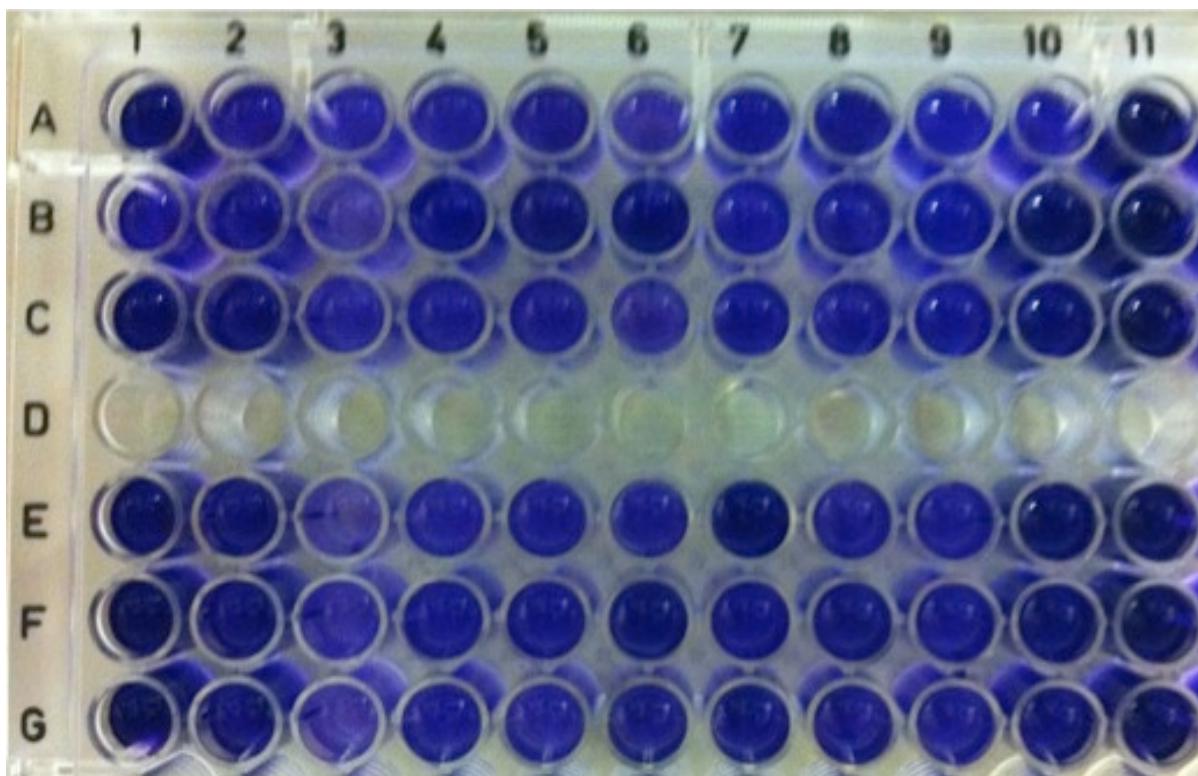


Figura 7: Placa de 96 poços. Ensaio do Cristal Violeta após 16 horas de exposição aos agentes antimicrobianos. Colunas 1 a 5 de A a C: AMOX/HpβCd 0,5; 1; 2; 20 e 200μg/mL, respectivamente. Colunas 6 a 10 de A a C: AMOX 0,5; 1; 2; 20 e 200μg/mL, respectivamente. Colunas 1 a 5 de E a G: DOX/HpβCd 0,5; 1; 2; 20 e 200μg/mL, respectivamente. Colunas 6 a 10 de E a G: DOX 0,5; 1; 2; 20 e 200μg/mL, respectivamente. Coluna 11: Controle positivo.

A biomassa de biofilme restante foi dada pela seguinte equação modificada de Pereira et al. (PEREIRA et al., 2012):

$$\%B.b. = \frac{OD_w}{OD_c} \times 100$$

OD_c

Onde % B.b é a porcentagem de biomassa de biofilme, OD_w é o valor OD_{620nm} para os grupos teste e OD_c é o valor OD_{620nm} para o controle positivo.

Os agentes antimicrobianos foram considerados eficazes quando os valores de biomassa de biofilme foram iguais ou inferiores a 50% do controle positivo (concentração inibitória mínima de biofilme em 50% = MBIC₅₀) (PETTIT et al., 2009).

5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os procedimentos normalizados para MEV foram utilizados para verificar o crescimento de biofilme bacteriano e para avaliar a integridade da membrana celular e alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com fármacos (HAASE et al., 2006). Para tanto, biofilmes foram cultivados sob condições anaeróbias por 24h, como descrito anteriormente, sobre lamínulas tratadas com poli-L-lisina, em placas de 24 poços. Após incubação, os agentes antimicrobianos substituíram o meio na concentração de 1µg/mL para DOX e DOX/HpβCd e 2µg/mL para AMOX e AMOX/HpβCd. Como controle positivo, o meio do biofilme foi trocado por um novo meio (BHI + extrato de levedura). Após 24 horas de incubação em condições anaeróbias a 37 ° C, as lamínulas foram fixadas durante 24 h numa solução contendo 2,5% de glutaraldeído. As lamínulas foram lavadas em 0,1 M de tampão de cacodilato (pH 7,3) e desidratadas numa série graduada de etanol. Posteriormente, as lamínulas foram submetidas ao ponto crítico de secagem com CO₂, revestimento com ouro (espessura aprox. 10 nm), e examinadas em microscópio Zeiss DSM 960A elétron.

5.2.7 Análise Estatística

Os dados apresentados neste trabalho são o resultado de, no mínimo, duas triplicatas de cada experimento. As médias e desvios padrão dos resultados foram calculados e analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software®, CA, USA). A partir dos dados obtidos foram realizadas análises estatísticas pelo método análise das variâncias (ANOVA), seguido pelo método de Bonferroni para verificar as diferenças entre os grupos em que os valores de $p \leq 0,05$, foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos compostos de amoxicilina/hidroxipropil- β -ciclodextrina (AMOX/Hp β Cd) e doxiciclina/hidroxipropil- β -ciclodextrina (DOX/Hp β Cd) na proporção molar 1:1

6.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos espectros de FTIR para caracterizar as interações entre AMOX e Hp β Cd e entre DOX e Hp β Cd no estado sólido. A complexação entre AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd pode ser inferida através da comparação dos espectros de FTIR dos fármacos livres, das misturas físicas (PM), da Hp β Cd e dos compostos de inclusão.

O espectro de FTIR do composto de inclusão AMOX/Hp β Cd não se sobrepõe com os espectros FTIR de qualquer das espécies livres, ou com a PM da AMOX e Hp β Cd (Figura 8). Frequências mais baixas $1,664\text{ cm}^{-1}$ para o anel β -lactâmico $\nu_{\text{C=O}}$ foram observadas para AMOX/Hp β Cd, quando comparada com AMOX livre, que mostrou forte absorção a $1,782\text{ cm}^{-1}$. Não foram observadas mudanças de frequências para ν_{asCOO^-} ($1,582\text{ cm}^{-1}$). Estes dados sugerem que tanto o grupo carbonil β -lactâmico e o carboxilato podem estar envolvidos na complexação da AMOX/Hp β Cd. Além disso, estes resultados estão de acordo com os de Bisson-Boutelliez et al. (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2010).

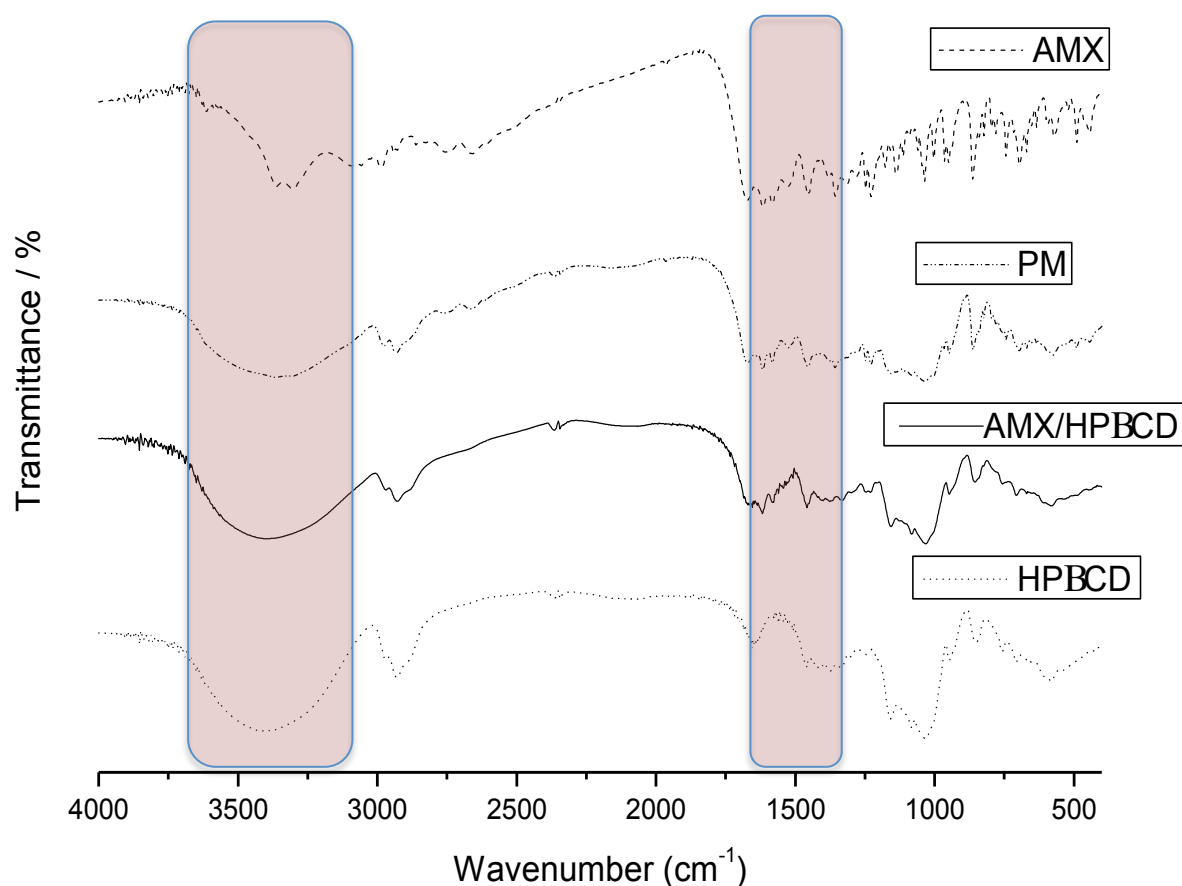


Figura 8. Espectro FTIR de AMOX, mistura física (PM) de AMOX e HP β CD, AMOX/HP β CD (1:1) e HP β CD.

O espectro de FTIR do composto de inclusão de DOX/Hp β Cd (Figura 9) não se sobrepõe nem com o espectro de FTIR das espécies livres, nem com a mistura física (PM) de DOX/Hp β Cd. As interações entre a DOX e a Hp β Cd foram verificadas com as alterações observadas nas bandas de absorção N-H e O-H. Estes incluíram picos mais nítidos para DOX/Hp β Cd em comparação com a Hp β Cd livre e PM, sugerindo que há uma redução no número total de ligações de hidrogênio na complexação. Reduções nas curvas angulares e axiais DOX C-O a 1175 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} foram observadas, bem como nitidez de trechos C=O and C=C DOX a 1700 e 1600 cm^{-1} . Estes dados sugerem que uma forte perturbação do grupo CONH₂ da DOX ocorre no estado sólido, como uma consequência tanto da ligação quanto da quebra de ligações de hidrogênio quando ocorre a inclusão de DOX em Hp β Cd. Além disso, estes resultados estão em conformidade com os de He et al. (HE et al., 2011).

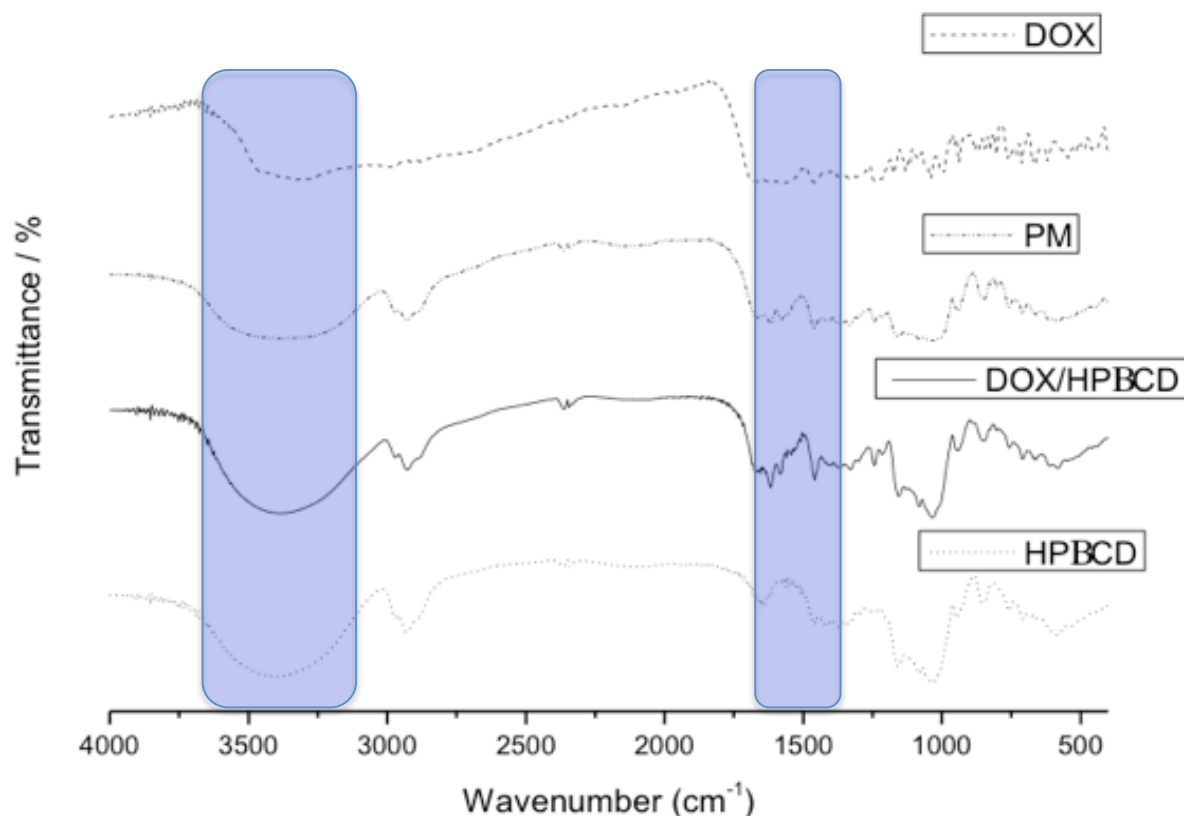


Figura 9. Espectro FTIR de DOX, mistura física (PM) de DOX e HP β CD, DOX/HP β CD (1:1) e HP β CD.

6.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN 2D ^1H - ^1H ROESY)

Através da observação de RMN 2D ^1H - ^1H ROESY, interações intra e intermoleculares de grupos funcionais com 5Å um do outro podem ser detectadas (DE ALVARENGA et al., 2004; DENADAI et al., 2010; LULA et al., 2012). Neste estudo, as experiências de ROESY identificaram interações específicas que ocorrem entre a DOX e a Hp β Cd após a formação do composto supramolecular, e essas interações forneceram informações valiosas sobre o possível mecanismo de inclusão na cavidade da Hp β Cd. A Figura 9 mostra as interações dipolares de prótons entre DOX e Hp β Cd, sugerindo a complexação da DOX. O mapa de contorno expandido de ROESY mostrou correlações cruzadas entre os picos de hidrogênios de DOX aromáticos H7D, H8D e H9D (na região do $\delta \approx 6,5$ to 7,6) com os hidrogênios H3, H5 e H6 da Hp β Cd (Figura 10). Além disso, a correlação cruzada de picos, o que poderia sugerir a inclusão pelo lado alifático, não foi observada. Os resultados indicam inclusão preferencial do lado aromático da DOX em

Hp β Cd. Estes resultados estão de acordo com a interação anteriormente encontrada entre DOX e β Cd por Soares et al., 2013 (resultados não publicados).

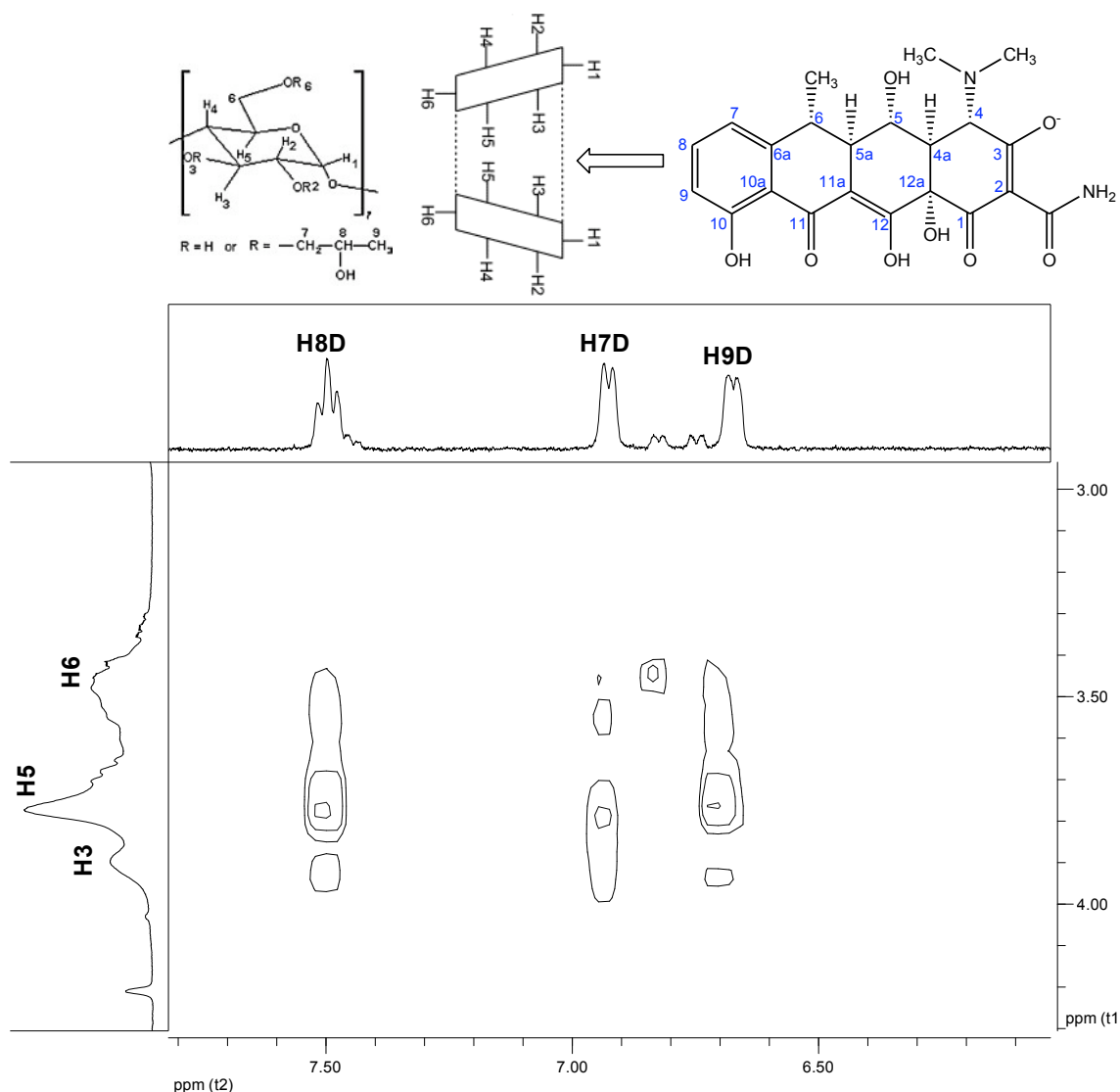


Figura 10 – Vista expandida do mapa de contorno RMN 2D-ROESY (400 MHz, spin lock = 600 ms) obtido do sistema DOX/ Hp β Cd /D₂O

6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os fármacos AMOX e DOX puros exibiram atividade antimicrobiana contra *A.a* em concentrações iguais ou superiores à 2 μ g/mL. Os compostos de inclusão AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd (1:1 molar) exibiram maior atividade antimicrobiana quando comparados aos

antibióticos sozinhos, (1µg/mL e 0,5µg/mL, respectivamente) enquanto a HpβCd sozinha não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima de amoxicilina (AMOX), doxiciclina (DOX), compostos de inclusão AMOX/HpβCd e DOX/HpβCd (µg/mL) na razão 1:1 molar e HpβCd contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) na forma planctônica.

Grupos	MIC (µg/mL)	MIC (µmol/L)
AMOX	2.0	4,7
DOX	2.0	4,1
AMOX/HpβCd	1.0	0,58
DOX/HpβCd	0.5	0,27
HpβCd	-----	-----

6.3 Quantificação da Biomassa de Biofilme pelo ensaio do Cristal Violeta e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (MBIC)

O composto AMOX/HpβCd (200µg/mL) foi o único antimicrobiano capaz de inibir estatisticamente o crescimento do biofilme de *Aa* quando comparado com a AMOX sozinha em todas as concentrações testadas e com o composto nas concentrações de 1, 2 e 20µg/mL ($p=0,01$). Nenhuma concentração de AMOX pura ou do composto AMOX/HpβCd foram capazes de remover pelo menos 50% de biomassa de biofilme após 4h de exposição aos agentes antimicrobianos (Figura 11A).

Aa foi susceptível à maioria das concentrações testadas de AMOX (1-20µg/mL) e à todas as concentrações de AMOX/HpβCd (1-200µg/mL) após 16h de exposição, mostrando significativa redução de biofilme. AMOX (1-20µg/mL) e AMOX/HpβCd (2 e 200 µg/mL) alcançaram a concentração inibitória mínima de 50% de biofilme (MBIC₅₀), sendo que o composto AMOX/HpβCd na concentração de 1µg/mL obteve uma redução de 48% de biomassa de biofilme e não apresentou diferença estatística quando comparado com AMOX pura na mesma concentração. As concentrações de 2µg/mL de AMOX e de AMOX/HpβCd

foram as mais eficazes contra os biofilmes de *Aa* (61% e 62% de remoção do biofilme, respectivamente) (Figura 11B).

Após 24 horas em contato com biofilme de *Aa*, a AMOX pura e o composto AMOX/Hp β Cd não atingiram 50% de redução do biofilme, embora o composto tenha obtido melhores valores de redução em todas as concentrações testadas, especialmente com 2, 20 e 200 μ g/mL ($p < 0,05$) quando comparado com o antibiótico sozinho. O composto AMOX/Hp β Cd na concentração de 2 μ g/mL obteve os melhores resultados contra o biofilme de *Aa* (42% de remoção do biofilme, $p < 0,05$) quando comparado ao antibiótico sozinho com a mesma concentração de AMOX, apresentando uma redução de biomassa 17,93% maior. O composto nas concentrações de 2 e 20 μ g/mL foi estatisticamente melhor do que o antibiótico não complexado (Figura 11C).

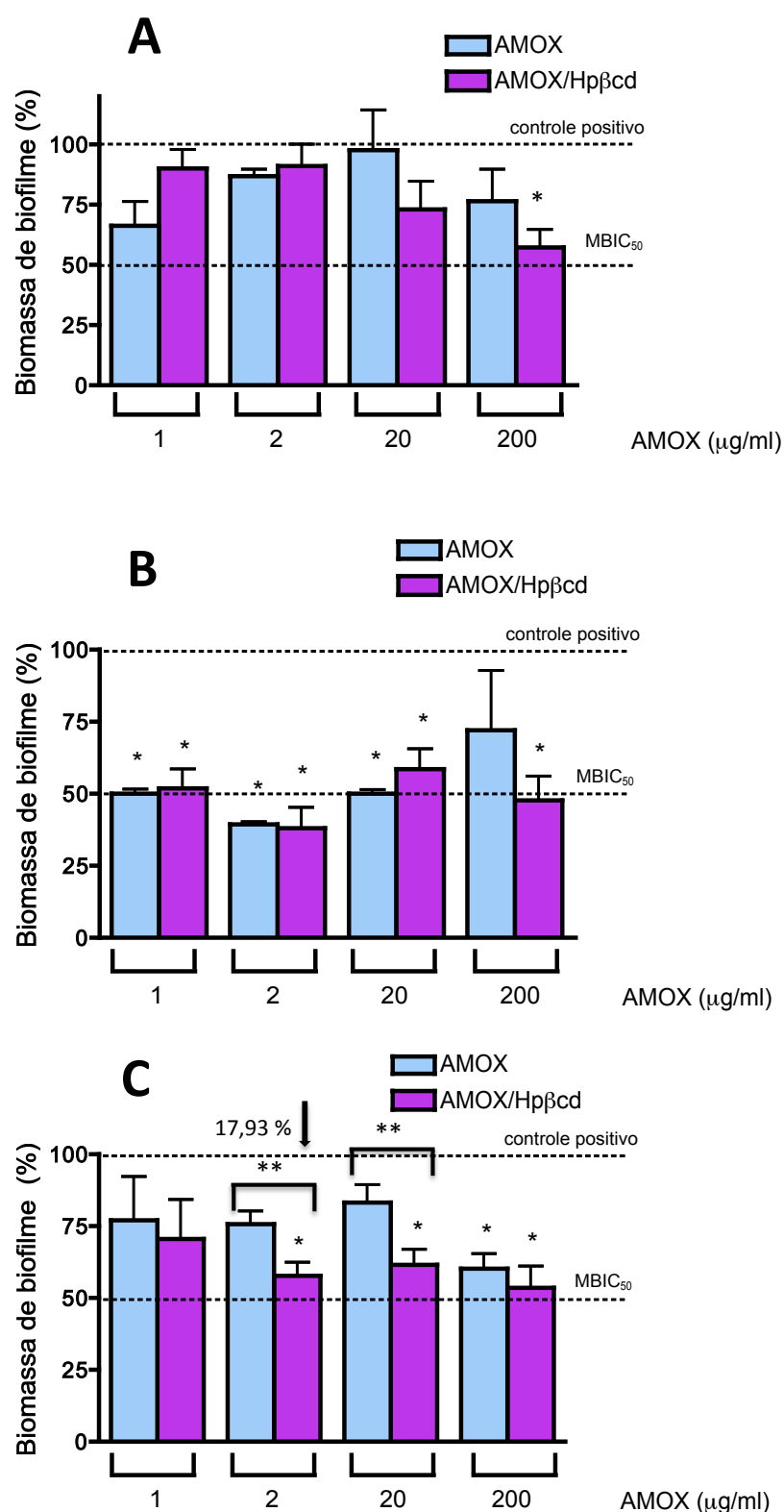


Figura 11. Gráficos da biomassa de biofilme (%) de *A.a* após tratamento com AMOX e 1:1 AMOX/HpβCd após 4h (A), 16h (B) e 24h (C) de exposição obtidos através do teste de cristal violeta. AMOX foi normalizada em todos os grupos nas concentrações de 1, 2, 20 e 200 µg/mL. Médias ± desvio padrão para duas triplicatas estão ilustradas. * Indica significância estatística quando comparada com o controle positivo ($p < 0.05$). ** Indica significância estatística de um grupo teste em relação ao outro na mesma concentração de AMOX ($p < 0,05$).

As concentrações de 1 e 2 µg/mL de DOX e 2 e 200 µg/mL do composto DOX/HpβCd foram capazes de inibir estatisticamente o crescimento do biofilme ($p < 0,05$), sendo que as concentrações de 1 µg/mL de DOX e 200 µg/mL do composto atingiram a concentração inibitória mínima de biofilme (MBIC₅₀) sendo consideradas as mais eficazes após 4h (Figura 12A).

Aa foi susceptível a todas as concentrações testadas de DOX e DOX/HpβCd após 16h de exposição mostrando significativa redução do biofilme ($p < 0,05$). O composto DOX/HpβCd, nas concentrações de 2 e 200 µg/mL foi eficaz contra o biofilme, enquanto a DOX sozinha teve o mesmo efeito apenas na concentração de 2 µg/mL (MBIC₅₀). As concentrações de 2 e 200 µg/mL de DOX/HpβCd proporcionaram uma maior redução do biofilme, quando comparado com a mesma concentração de antibiótico não complexado ($p < 0,05$), sendo a concentração de 2 µg/mL de DOX/HpβCd considerada a mais eficaz no tempo de 16h (Figura 12B).

Após 24 horas em contato com os biofilmes de *Aa*, o composto DOX/HpβCd inibiu estatisticamente os biofilmes de *Aa* em todas as concentrações testadas, enquanto a DOX inibiu somente na concentração de 1 µg/mL ($P < 0,05$). A DOX pura e o composto DOX/HpβCd, ambos na concentração de 1 µg/mL, atingiram pelo menos 50% de redução do biofilme, enquanto que o composto de inclusão também foi eficaz (MBIC₅₀) na concentração de 2 µg/mL. O composto na concentração de 200 µg/mL foi estatisticamente melhor do que o antibiótico não complexado. Não houve diferença estatística entre todas as concentrações testadas de compostos de inclusão. A DOX e o composto DOX/HpβCd na concentração de 1 µg/mL foram considerados os mais eficazes no tempo de 24h, sendo que o composto apresentou inibição de biomassa 11,13% maior do que o antibiótico puro (Figura 12C).

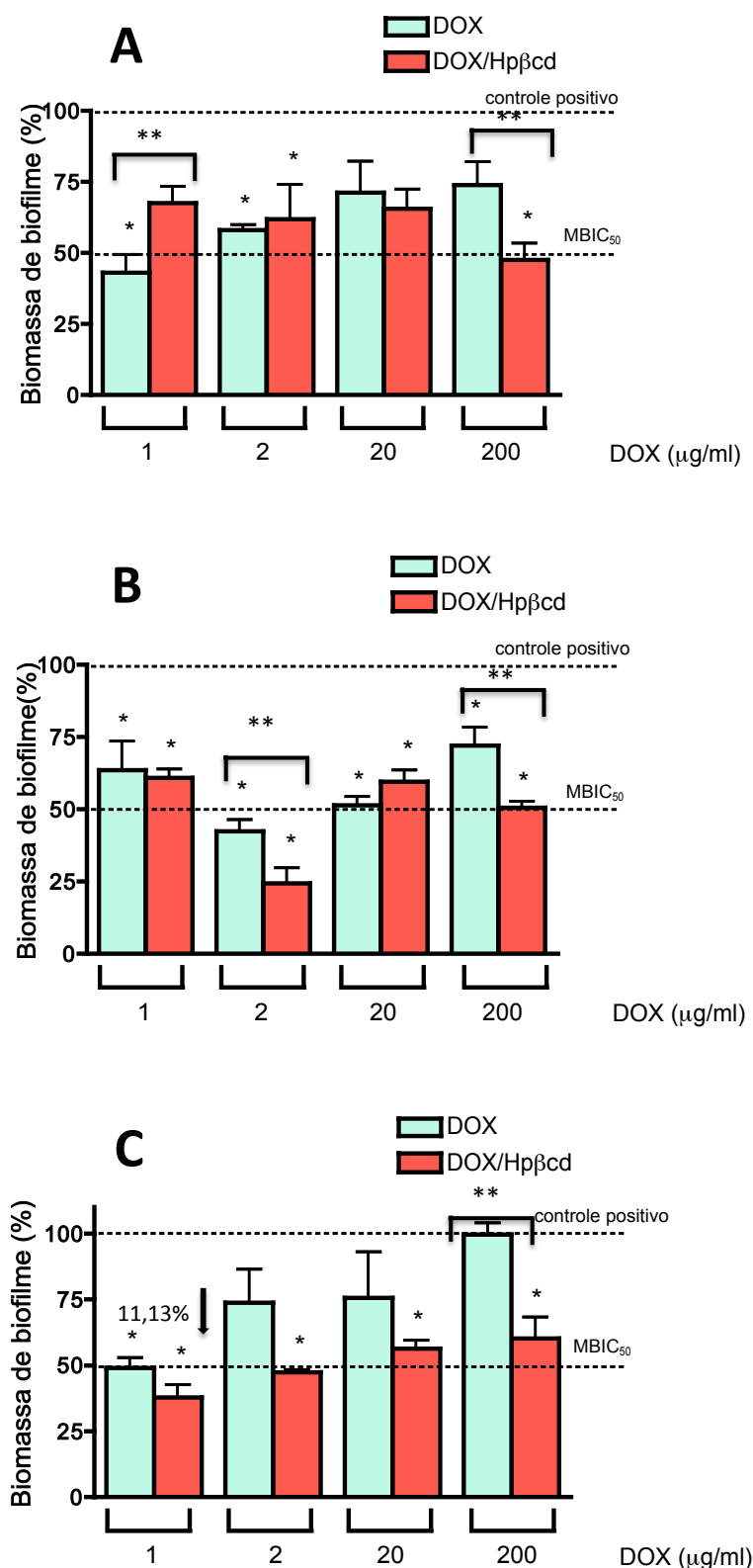


Figura 12. Gráficos da biomassa de biofilme (%) de *A.a* após tratamento com DOX e 1:1 DOX/HpβCd após 4h (A), 16h (B) e 24h (C) de exposição obtidos através do teste de cristal violeta. DOX foi normalizada em todos os grupos nas concentrações de 1, 2, 20 e 200 µg/mL. Médias ± desvio padrão para duas triplicatas estão ilustradas. * Indica significância estatística quando comparada com o controle positivo ($p < 0.05$). ** Indica significância estatística de um grupo teste em relação ao outro na mesma concentração de DOX ($p < 0,05$).

6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Micrografias de bactérias tratadas com fármacos nas concentrações de 2µg/mL para AMOX e AMOX/HpβCD, após 24 horas de exposição a biofilmes de *Aa* de 24h são apresentadas na figura 13. As micrografias corroboram com os resultados obtidos pelo ensaio do cristal violeta.

A partir das imagens observadas pela microscopia eletrônica de varredura observou-se que todas as concentrações testadas de agentes antimicrobianos foram capazes de inibir os biofilmes de *Aa*, quando comparado com o controle, após 24h. No entanto, o composto de inclusão mostrou reduções significativas na quantidade de biofilme de *Aa* quando comparados com os antibióticos puros na mesma concentração (Figura 13 A1 e B1).

Biofilmes formados pelo microrganismo *Aa* consistem em uma matriz de exopolissacarídeos e bactérias em reprodução (Figura 13 e 14 controle 1 e 2). Bactérias em biofilmes são encontradas em pequenos aglomerados de células semelhantes a ilhotas (Figura 13 e 14 controle 1). O aparecimento de rupturas na superfície de algumas células, bem como a presença de alguns resíduos de membrana em torno das células (Figura 13 A2 e B2), foram as alterações morfológicas inicialmente observadas. Ruptura celular com extravasamento de material intracelular também foi observado nos grupos testes. O composto 1:1 AMOX/HpβCD apresentou melhor efeito antimicrobiano (Figura 13 B1 e B2).

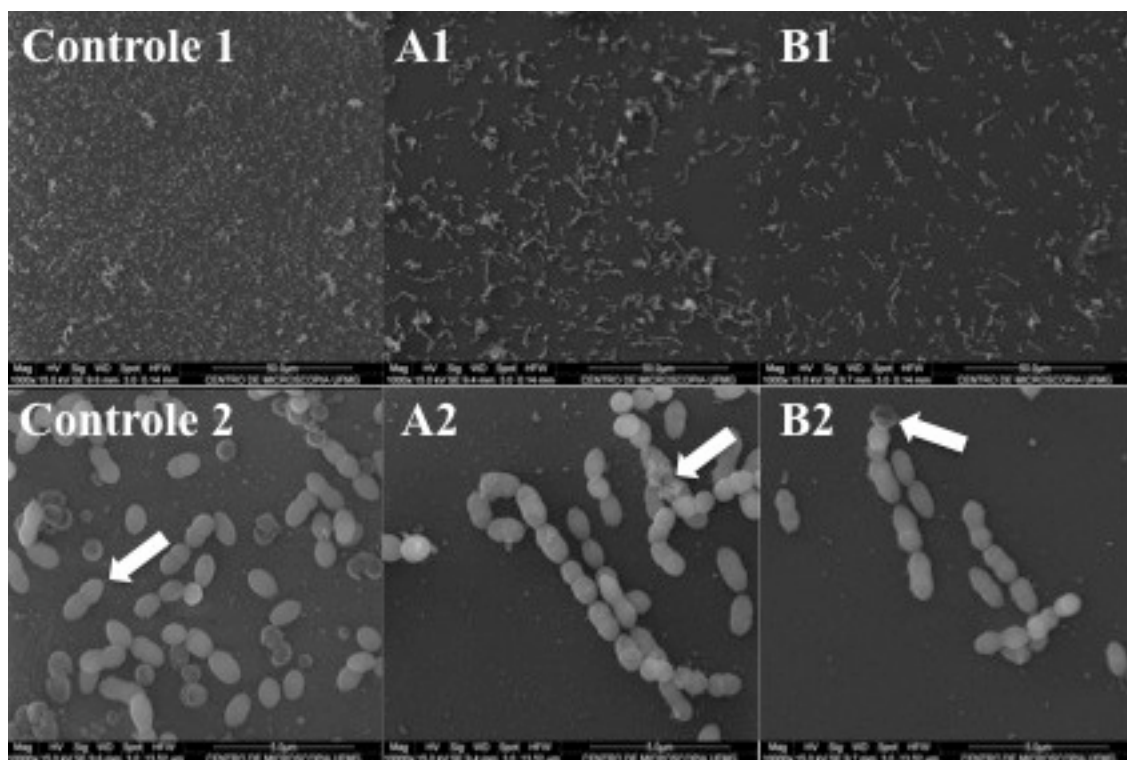


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Aa* não tratados (controle 1 e 2), bactérias tratadas com 2 μ g/mL de AMOX (A1 e A2) e 2 μ g/mL de AMOX/Hp β Cd (B1 e B2) após 24h de exposição a um biofilme de *Aa* de 24h. Micrografias dos grupos Controle 1, A1 e B1 estão apresentadas em uma ampliação de 1000x, enquanto Controle 2, A2 e B2 estão apresentados em uma ampliação de 10000x.

Micrografias de bactérias tratadas com fármacos nas concentrações de 1 μ g/mL para DOX e DOX/Hp β CD após 24 horas de exposição a biofilmes de *Aa* de 24h são mostrados na figura 13. As micrografias corroboram com os resultados obtidos pelo ensaio do cristal violeta.

A partir das imagens observadas pela microscopia eletrônica de varredura observou-se que todas as concentrações testadas de agentes antimicrobianos foram capazes de inibir os biofilmes de *Aa*, quando comparado com o controle, após 24h. No entanto, o composto de inclusão mostrou reduções significativas na quantidade de biofilme de *Aa* quando comparados com os antibióticos puros na mesma concentração (Figura 14 C1 e D1).

Rupturas na superfície de algumas células, bem como a presença de alguns resíduos de membrana em torno das células (Figura 14 C2 e D2), foram as alterações morfológicas comumente observadas. A ruptura celular com o extravasamento de conteúdo intracelular foi observado nos grupos testes. O composto 1:1 DOX/Hp β CD apresentou o melhor efeito antimicrobiano (Figura 14 D1 e D2), inclusive quando comparado com as concentrações de 2 μ g/mL de AMOX e AMOX/Hp β CD (Figura 13 A1, A2, B1 e B2).

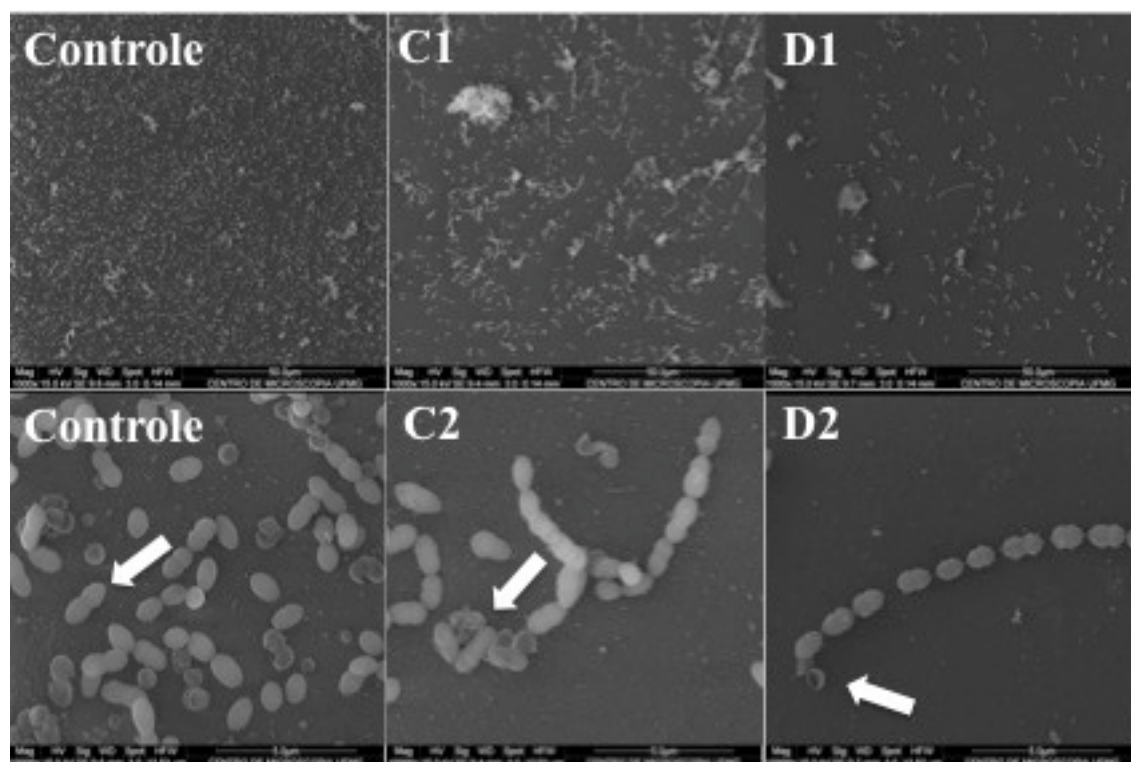


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Aa* não tratados (controle), bactérias tratadas com 1µg/mL de DOX (C1 e C2) e 1µg/mL de DOX/HpβCd (D1 e D2) após 24h de exposição a um biofilme de *Aa* de 24h. Micrografias dos grupos Controle 1, C1 e D1 estão apresentadas em uma ampliação de 1000x, enquanto Controle 2, C2 e D2 estão apresentadas em uma ampliação de 10000x.

7. DISCUSSÃO

A complexação de AMOX e DOX com Hp β CD é proposta como uma estratégia farmacotécnica para melhorar a os fármacos já existentes em algumas de suas propriedades, tais como estabilidade, solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade. Este estudo aborda a caracterização físico-química dos compostos de AMOX/Hp β CD por FTIR e DOX/Hp β CD por FTIR e RMN e os seus efeitos antibacterianos em um modelo de biofilme.

A capacidade de formar biofilmes pode ser um fator de virulência das bactérias e pode contribuir para o desenvolvimento de formas mais graves da doença periodontal (PRESTERL et al., 2005). O *Aa* foi escolhido como modelo de estudo porque é um microrganismo associado: à formas agressivas da periodontite localizada e generalizada, à periodontite crônica (ROMAN-TORRES et al., 2010) e à doenças persistentes, como a periodontite refratária (SLOTS, TING, 1999). Esta bactéria apresenta alta resistência aos agentes antimicrobianos, quando associada a outros microrganismos em biofilmes (FERES et al., 1999; MADINIER et al., 1999; VAN WINKELHOFF et al., 2005; KULIK et al., 2008; ARDILA et al., 2010).

Fármacos como AMOX e DOX são utilizados por administração sistêmica para o controle da infecção periodontal. Questiona-se, no entanto, se doses suficientes podem atingir o local da infecção com a terapêutica usualmente utilizada (CHADHA, BHAT, 2012). As formulações de liberação controlada de fármacos com ciclodextrinas mostram-se como alternativas promissoras (PRAGATI et al., 2009), uma vez que elas proporcionam um tratamento eficaz e mais prolongado no local da infecção, em doses muito menores (PRAGATI et al., 2009; PRAKASAM et al., 2012).

A eficácia de antibióticos quando usados como a única terapia para tratar a doença periodontal é controversa. Lopez et al. (2006) mostraram uma abordagem incomum no tratamento da periodontite crônica em pacientes não tratados previamente: a administração de amoxicilina e metronidazol em um grupo e raspagem e alisamento radicular em outro. Resultados benéficos similares foram observados em ambos os grupos, sugerindo a eficácia da monoterapia com antibiótico (LOPEZ et al., 2006). Alguns autores, porém, discordam e questionam essa metodologia (FERES-FILHO et al., 2006; MOMBELLI, 2006). Por outro lado, muitos estudos têm mostrado que um sistema terapêutico coadjuvante de AMOX e

DOX tem efeitos antimicrobianos mais favoráveis do que a terapia mecânica sozinha (SLOTS, TING, 1999; CHADHA, BHAT, 2012). Neste estudo foi mostrado a atividade antibacteriana de AMOX/Hp β CD e DOX/Hp β CD contra biofilmes de *Aa* comparados ao longo de diferentes tempos. A eficácia destes compostos foi demonstrada pela grande diminuição na porcentagem de biomassa do biofilme.

A capacidade da AMOX e DOX em eliminar microrganismos durante um curto período de tempo (4-24h), está de acordo com estudos prévios (MEGRAUD et al., 1991; GAD et al., 2008; CHADHA, BHAT, 2012). Neste estudo, no grupo de 24 horas, uma pequena concentração de AMOX/Hp β CD (2 μ g/mL) e DOX/Hp β CD (1 μ g/mL) mostrou notável redução dos biofilmes de *Aa*. Isto pode ser devido a um efeito prolongado destes agentes antimicrobianos em função da inclusão em ciclodextrina. Essas concentrações de AMOX/Hp β CD e DOX/Hp β CD correspondem ao dobro dos valores encontrados para o MIC desses compostos em bactérias planctônicas. Estes valores de MIC mais elevados eram esperados, uma vez que as bactérias em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos do que bactérias livres (WALKER, SEDLACEK, 2007). Quanto aos valores de MIC dos antibióticos puros para bactérias livres (AMOX e DOX = 2 μ g/mL) foi encontrado valores de acordo com estudos prévios (EICK et al., 2004; KAUR et al., 2011).

Ao observar o tempo de 16h, notamos que o composto DOX/Hp β CD foi eficaz na concentração de 2 μ g/mL. Sugere-se que houve uma liberação mais rápida da DOX do que da AMOX e seu efeito foi mantido até 24 horas, devido a sua estrutura polar, já que a DOX tem mais afinidade com a solução do que com a membrana, por isso há maior liberação do fármaco para o sistema. Os resultados mostraram que em todos os tempos testados, o composto AMOX/Hp β CD seguiu uma tendência similar, mas foi menos eficaz em atingir a biomassa bacteriana total. Isto poderia ser explicado em função da baixa solubilidade da AMOX quando comparado com a DOX e, por outro lado, o *Aa* pode ser mais resistente a esse fármaco. No tempo de 24h observamos que, ao contrário da AMOX/Hp β CD, as concentrações de 1 e 2 μ g/mL de DOX/Hp β CD conseguiram reduzir pelo menos 50% de biomassa de biofilme, o que nos sugere estudos futuros para aplicação clínica do composto de DOX com Hp β CD.

A melhor eficácia da DOX em relação à AMOX em biofilmes também pode ser comprovada no estudo de Yang et al., 2006. Os autores demonstraram que a AMOX exibiu pouca inibição de exopolissacarídeos, proteínas e lipídeos do biofilme, em contraste com os

outros antibióticos, e que a DOX, por outro lado, demonstrou maior inibição de ácidos nucleicos (YANG et al., 2006). Os resultados do estudo de Oettinger-Barak et al. (2013) também comprovaram a melhor eficácia da DOX em relação à AMOX + metronidazol em biofilmes de *Aa*, sendo a DOX cerca de 10 vezes mais eficiente. Este fato já era esperado pois, apesar da AMOX e da DOX possuírem amplos espectros, a AMOX não é muito efetiva contra microrganismos gram-negativos. Além disso a DOX possui, além da sua atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, inibindo a produção e atividade das metaloproteinases, inibindo a reabsorção óssea e estimulando a sua formação e sequestrando as ROS. A estrutura química com grupos hidroxilas (OH), ainda, confere um caráter muito reativo ao composto de inclusão, possivelmente estabelecendo ligações com a membrana bacteriana e subprodutos do metabolismo no interior do biofilme.

O nosso estudo demonstrou que, com a inclusão da AMOX em ciclodextrina, foi possível diminuir a dose utilizada de 200 para 2µg/mL (dose 100 vezes menor) para inibição de biofilme de *Aa* após 24 h. A mesma dose de DOX e do composto DOX/HpβCD (1µg/mL) foi eficaz na redução da biomassa bacteriana após 24 h, porém o composto obteve uma redução 11,13% maior de crescimento bacteriano. Estes resultados mostram que é possível uma redução da dose utilizada quando a liberação controlada com ciclodextrinas é aplicada. A dose de AMOX usada para avaliar a inibição de um biofilme oral de *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Neisseria subflava* e *Agregatibacter Actinomycetemcomitans* em um estudo prévio foi de 97µg/mL. Entretanto, os autores nesse estudo não conseguiram uma inibição satisfatória do biofilme com essa dose de AMOX (YANG et al., 2006). Em outro estudo utilizando AMOX + metronidazol os autores encontram o valor de MBIC para um biofilme de *Aa* de 20,2µg/mL (OETTINGER-BARAK et al., 2013). Estes valores são bem superiores aos encontrados com o composto AMOX/HpβCD (2µg/mL).

A dose de DOX pura necessária para inibição de biofilme de *Aa* em estudos prévios também variou bastante. No estudo de Oettinger-Barak et al. (2013) os autores encontraram um valor de MBIC de 2,1µg/mL para doxiciclina pura em biofilmes de *Aa*. Já outro estudo mostrou ser necessário uma dose de DOX pura de 20µg/mL para se alcançar a concentração inibitória mínima de biofilme de *Aa* (EICK et al., 2004). Esses valores são bem superiores aos encontrados em nosso estudo com o composto de inclusão DOX/HpβCD (1µg/mL). É importante ressaltar que a inibição do crescimento do biofilme após 24 h pode ser um adjuvante importante para a resposta do sistema imune contra organismos patogênicos.

As alterações morfológicas iniciais observadas pela MEV foram o aparecimento de rupturas na superfície de algumas células ou resíduos da membrana extracelular encontrados em volta das células (Figuras 13 e 14 A2, B2, C2, D2). Isto indica que a membrana extracelular bacteriana foi rompida com extravasamento de material intracelular, provavelmente devido a uma interação direta entre a membrana celular e os compostos de inclusão de AMOX e DOX. Isto está de acordo com Loftsson et al. (2007), que compararam os efeitos de ciclodextrinas na liberação de drogas através de membranas biológicas e demonstraram que as ciclodextrinas aumentam a captação das drogas através de membranas biológicas (LOFTSSON, DUCHENE, 2007). Os compostos de AMOX/Hp β CD e DOX/Hp β CD na razão molar 1:1 causaram maiores distúrbios na membrana celular e tiveram o melhor efeito antimicrobiano quando comparados com os antibióticos não complexados (Figura 13 B1 e B2 e Figura 14 D1 e D2). Sugere-se que a interação com a membrana celular foi um dos mecanismos responsáveis pelo melhor efeito antimicrobiano dos compostos de inclusão.

A otimização da atividade antimicrobiana de medicamentos associados com ciclodextrinas, sem aumento dos efeitos citotóxicos, é consistente com estudos anteriores com outros antimicrobianos (CORTES et al., 2001; PATARO et al., 2003; DENADAI et al., 2007; CONSUEGRA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013). O aumento da atividade dos compostos de AMOX/Hp β CD e DOX/Hp β CD comparada com os antibióticos puros pode ser explicado por uma interação eficiente da ciclodextrina com a membrana (LOFTSSON, DUCHENE, 2007). A superfície externa hidrofílica das moléculas de ciclodextrinas forma uma fraca interação com as membranas biológicas (ABDELWAHED et al., 2008).

Novas tecnologias devem ser investigadas para otimizar o efeito das drogas existentes, uma vez que a produção de um novo medicamento é um processo demorado e com elevados custos. A inclusão molecular em ciclodextrinas é simples, o custo é relativamente baixo e pode melhorar as propriedades dos medicamentos pré-existentes. Além disso, estudos precisam ser realizados com biofilmes bacterianos mais complexos, para investigar os mecanismos reguladores, formação e dissolução destes sistemas, bem como a utilização de dispositivos de liberação com tecnologia adequada para o uso a longo prazo *in vivo*.

8. CONCLUSÃO

A caracterização físico-química no estado sólido por espectroscopia no espectro do infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e em solução por ressonância magnética nuclear (RMN) revelou interação, mudanças estruturais e conformacionais entre as moléculas, sugerindo a formação dos compostos AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd na razão molar 1:1.

A inclusão da DOX foi preferencialmente pelo grupo aromático na Hp β Cd. Quanto à AMOX, concluiu-se que tanto o grupo carbonil β -lactâmico quanto o carboxilato podem estar envolvidos na complexação da AMOX na Hp β Cd.

Essas interações tiveram impacto na atividade antimicrobiana dos compostos de inclusão AMOX/Hp β Cd e DOX/Hp β Cd 1:1 molar. Foi mostrado que esses compostos apresentaram maior eficácia antimicrobiana tanto em bactérias planctônicas de *Aa*, com um valor de MIC de duas a quatro vezes menor do que a AMOX e DOX não complexadas, respectivamente, quanto em biofilmes de 24 horas de *Aa*, com um valor de MBIC cem vezes menor do que a AMOX e estatisticamente igual à da DOX não complexada (entretanto com uma redução de 11,13%). Ao contrário da AMOX/Hp β CD, o composto DOX/Hp β CD conseguiu reduzir pelo menos 50% de biomassa de biofilme no tempo de 24h, o que nos mostra sua superioridade e nos sugere a continuação de estudos para sua futura aplicação clínica.

A microscopia eletrônica de varredura confirmou a redução quantitativa de biofilme. Foi observado que tanto os compostos quanto os fármacos livres proporcionaram redução na quantidade de bactérias, entretanto os compostos se mostraram mais eficazes nas concentrações testadas (1 μ g/mL para DOX/Hp β Cd e 2 μ g/mL para AMOX/Hp β Cd).

Assim, foi demonstrado que é possível a formação de compostos de inclusão com doxiciclina e amoxicilina em hidroxipropil- β -ciclodextrina, e que estes podem ser futuramente utilizados para a formulação de dispositivos (nano esferas, géis, entre outros) para a liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. et al. Sulfated and non-sulfated amphiphilic-beta-cyclodextrins: impact of their structural properties on the physicochemical properties of nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 351, n. 1-2, p. 289-295, Mar 3 2008.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, Sep 2012.

ARDILA, C. M. et al. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolates of periodontal disease. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 6, p. E947-E951, Nov 2010.

ARIGBEDE, A. O. et al. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. **J Indian Soc Periodontol**, v. 16, n. 4, p. 487-491, Oct 2012.

BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 75-80, Jul 2000.

BIDAULT, P. et al. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. **J Can Dent Assoc**, v. 73, n. 8, p. 721-725, Oct 2007.

BISSON-BOUTELLIEZ, C. et al. Preparation and Physicochemical Characterization of Amoxicillin beta-cyclodextrin Complexes. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 2, p. 574-581, Jun 2010.

BRITTO, M. A. F. O. et al. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Quím Nova**, v. 27, p. 882-888, 2004.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 30, n. 7, p. 1569-1575, Jul 1989.

BURTON, E. et al. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 1, p. 1-4, Jan 2007.

CASTRO, M. M. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix Biol**, v. 29, n. 3, p. 194-201, 2010.

CHADHA, V. S. ,BHAT, K. M. The evaluation of doxycycline controlled release gel versus doxycycline controlled release implant in the management of periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 16, n. 2, p. 200-206, Apr 2012.

CHOI, S. J. et al. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 5, p. 814-822, May 2001.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First International Supplement**. CLSI document M100-S21.:Wayne,PA. 2011.

COLAIZZI, J. L. ,KLINK, P. R. pH-Partition behavior of tetracyclines. **J Pharm Sci**, v. 58, n. 10, p. 1184-1189, Oct 1969.

CONSUEGRA, J. et al. Peptides:beta-Cyclodextrin Inclusion Compound as Higher Effective Antimicrobial and Anti-epithelial Proliferation Agents. **J Periodontol**, Mar 19 2013.

CORTES, M. E. **Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β -ciclodextrina. Avaliação in vitro**. 1999. 101p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CORTES, M. E. et al. The chlorhexidine: beta-cyclodextrin inclusion compound: Preparation, characterization and microbiological evaluation. **J Inclusion Phen Macrocyclic Chem**, v. 40, n. 4, p. 297-302, Aug 2001.

DE ALVARENGA, E. S. et al. Study of aqueous solution of sodiumdodecylsulfate and polyethyleneoxide 10000 by NMR NOESY. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences**, v. 59, n. 4-5, p. 291-294, APR-MAY 2004.

DENADAI, A. M. et al. Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydr Res**, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, Nov 5 2007.

DENADAI, A. M. L. et al. New insights regarding the cyclodextrin/AAS self-assembly: A molar ratio dependent system. **Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.**, v. 30, n. 3, p. 417-422, Apr 2010.

DOMINGUES, Z. R. et al. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with beta-cyclodextrin. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 327-333, Jan 2004.

EICK, S. et al. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 5, p. 376-383, May 2004.

ERRIU, M. et al. Microtiter spectrophotometric biofilm production assay analysed with metrological methods and uncertainty evaluation. **Measurement** v. 45, p. 1083-1088, 2012.

FARR, S. B. ,KOGOMA, T. Oxidative stress response in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 561-585, 1991.

FERES, M. et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections - (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 12, p. 784-792, Dec 1999.

FERES-FILHO, E. J. et al. Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 12, p. 936-937; author reply 940-931, Dec 2006.

FINE, D. H. et al. Colonization and persistence of rough and smooth colony variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the mouths of rats. **Arch Oral Biol**, v. 46, n. 11, p. 1065-1078, Nov 2001.

FLETCHER, M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. **Can J Microbiol.**, v. 23, p. 1-6, 1977.

FRANCO, C. F. et al. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. **Artif Organs**, v. 27, n. 5, p. 486-491, May 2003.

GAD, H. A. et al. Formulation and evaluation of PLA and PLGA in situ implants containing secnidazole and/or doxycycline for treatment of periodontitis. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 878-884, 2008.

GOLUB, L. M. et al. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 732, p. 96-111, Sep 6 1994.

GOODSON, J. M. et al. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy II. Clinical response. **J Periodontal Res**, v. 26, p. 371-377, 1991.

GORDON, C. et al. Comparative clinical pharmacology of amoxicillin and ampicillin administered orally. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 1, n. 6, p. 504-507, Jun 1972.

GRENIER, D. et al. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. **J Periodontol**, v. 73, n. 1, p. 79-85, Jan 2002.

GRIFFIN, M. O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, n. 3, p. C539-C548, Sep 2010.

GUERRA, W. et al. Three new complexes of platinum(II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. **J Braz Chem Soc**, v. 17, n. 8, p. 1627-1633, Nov-Dec 2006.

GUIMARÃES, S. Tetraciclina e cloranfenicol. In: EDITORA, P. (Ed.). **Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia**, v.2, 1997. p.935-944.

HAASE, E. M. et al. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 4, p. 299-314, Apr 2006.

HALLIWELL, B. ,GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York, NY, USA.: Oxford University Press, 1999.

HAUBEK, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 237-242, Jan 19 2008.

HE, Z.-X. et al. Doxycycline and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex in poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophthalmic delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, p. 254-260, 2011.

HIDAKA, S. et al. Effect of beta-Cyclodextrin on the Degradation Rate of Amoxicillin in Acidic Solution. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 130, n. 6, p. 889-893, Jun 2010.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, Apr 2010.

HOLMES, S. G. et al. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**, v. 35, n. 2, p. 471-478, Aug 2004.

HOUSHMAND, M. et al. Refining definitions of periodontal disease and caries for prediction models of incident tooth loss. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 7, p. 635-644, Jul 2012.

KAUR, S. P. et al. Amoxicillin: A broad spectrum antibiotic. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 3, n. 3, p. 30-37, 2011.

KULIK, E. M. et al. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. **J Antimicrob Chemoter**, v. 61, n. 5, p. 1087-1091, May 2008.

LAINE, M. L. et al. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. **Int J Dent**, v. 2010, p. 324719, 2010.

LANGER, R. Where a pill wont reach. **Scientific American**, v. 4, p. 50-57, 2003.

LEE, H. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J Periodontol**, v. 75, n. 3, p. 453-463, Mar 2004.

LIE, T. et al. Effects of topical metronidazole and tetracycline in treatment of adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 69, n. 7, p. 819-827, Jul 1998.

LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clinica e Implantologia Oral. In: (Ed.). 4.ed. RIo de Janeiro: Guanabara Koogan, v.3, 2005. p.81-103.

LOFTSSON, T. ,DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int J Pharm**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, Feb 1 2007.

LOPEZ, N. J. ,GAMONAL, J. A. Effects of metronidazol plus amoxicillin in progressive untreated adult periodontite: result of a single-week course after 2 and 4 months. **J Periodontol**, v. 69, p. 1291-1298, 1998.

LOPEZ, N. J. et al. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 9, p. 648-660, Sep 2006.

LULA, I. et al. Interaction between bradykinin potentiating nonapeptide (BPP9a) and beta-cyclodextrin: A structural and thermodynamic study. **Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.**, v. 32, n. 2, p. 244-253, Mar 1 2012.

MADINIER, I. M. et al. Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 70, n. 8, p. 888-892, Aug 1999.

MAGNUSSON, I. et al. Treatment of subjects with refractory periodontal-disease. **J Clin Periodontol**, v. 21, n. 9, p. 628-637, Oct 1994.

MEDEIROS, U. V. ,ROCHA, D. S. Estudo epidemiológico da doença periodontal em pacientes adolescentes e adultos . **UFES Rev. Odontol.**, v. 8, n. 2, p. 19-28, 2006.

MEGRAUD, F. et al. Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 5, p. 869-872, May 1991.

MOMBELLI, A. Heresy? Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 9, p. 661-662, Sep 2006.

NASCIMENTO, D. F. F. et al. O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas. **Revista ABO Nacional**, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2006.

NORLING, T. et al. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal-disease. **J Clin Periodontol**, v. 19, n. 9, p. 687-692, Oct 1992.

O'TOOLE, G. A. et al. Genetic approaches to study of biofilms. **Methods Enzymol**, v. 310, p. 91-109, 1999.

OETTINGER-BARAK, O. et al. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. **J Oral Microbiol**, v. 5, 2013.

PAPAPANOU, P. N. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. **J Dent Res**, v. 91, n. 10, p. 907-908, Oct 2012.

PATARO, A. L. et al. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1075-1080, Mar 2003.

PATIL, C. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 6, p. 392-398, Dec 2006.

PEREIRA et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato de punica granatum linn. sobre microorganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.

PEREIRA, A. M. et al. Action of kanamycin against single and dual species biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol Res** v. 2, n. 4, p. 84-88, 2012.

PETTIT, R. K. et al. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 8, p. 28, 2009.

PIOVANO, S. Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. **Anaerobe**, v. 5, p. 221-227, 1999.

PRAGATI, S. et al. Recent advances in periodontal drug delivery systems **International Journal of Drug Delivery**, v. 1, p. 1-14, 2009.

PRAKASAM, A. et al. Antibiotics in the management of aggressive periodontitis. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 4, n. Suppl 2, p. S252-255, Aug 2012.

PRESHAW, P. M. Antibiotics in the treatment of periodontitis. **Dent Update**, v. 31, n. 8, p. 448-450, 453-444, 456, Oct 2004.

PRESTERL, E. et al. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 1, p. 45-50, Jan 2005.

RAHMAN, A. **One and Two Dimensional NMR Spectroscopy**. New York: Elsevier, 1989.

RASMUSSEN, E. G. et al. A taxonomic study of fifty gram positive anaerobic diphtheroids isolated from the oral cavity of man. **Arch Oral Biol**, v. 11, n. 6, p. 573-579, Jun 1966.

RICKARD, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 94-100, Feb 2003.

ROMAN-TORRES, C. V. et al. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 3, p. 242-248, Mar 2010.

SAINTRAIN, M. V. ,DE SOUZA, E. H. Impact of tooth loss on the quality of life. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e632-636, Jun 2012.

SCHNEIDER, H. J. et al. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Chem Rev**, v. 98, n. 5, p. 1755-1786, Jul 30 1998.

SEDLACEK, M. J. ,WALKER, C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. **Oral Microbiol Immun**, v. 22, n. 5, p. 333-339, Oct 2007.

SHROUT, J. D. et al. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. **MRS BULLETIN**, v. 36, p. 367-373, 2011.

SLOTS, J. ,TING, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 82-121, Jun 1999.

SOMAYAJI, B. V. et al. Evaluation of antimicrobial efficacy and release pattern of tetracycline and metronidazole using a local delivery system. **J Periodontol**, v. 69, n. 4, p. 409-413, Apr 1998.

SOSKOLNE, W. A. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 164-174, May 1997.

STANDAR, K. et al. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. **Plos One**, v. 5, n. 10, p. 14, Oct 2010.

STEINBERG, D. et al. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: in vitro release study. **J Periodontol**, v. 61, p. 393-398, 1990.

STEPANOVIC, S. et al. Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **APMIS**, v. 113, n. 3, p. 225-228, Mar 2005.

SUCI, P. ,YOUNG, M. Selective killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by ciprofloxacin during development of a dual species biofilm with *Streptococcus sanguinis*. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 1055-1063, Oct 2011.

SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 375-392, 1992.

TEIXEIRA, K. **Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura**. 2008. 122p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TEIXEIRA, K. I. et al. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. **Pharm Dev Technol**, v. 18, n. 3, p. 600-608, May-Jun 2013.

TOLEDO, L. C. **Book of abstract of 4th international conference on science and technology of composites materials.** 2007.

UEKAMA, K. et al. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chem Rev**, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, Jul 30 1998.

VAN STEENBERGHE, D. et al. Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult type periodontitis: A randomized, doubled blind, vehicle-controlled, multicenter study. **J Periodontol**, v. 64, p. 637-644, 1993.

VAN WINKELHOFF, A. J. et al. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. **J Clin Periodontol** v. 32, n. 8, p. 893-898, Aug 2005.

VERNILLO, A. T. et al. The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. **Curr Opin Periodontol**, p. 111-118, 1994.

WALKER, C. ,SEDLACEK, M. J. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. **Oral Microbiol Immun**, v. 22, n. 3, p. 152-161, Jun 2007.

WALKER, C. B. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. **Periodontol 2000**, v. 10, p. 79-88, Feb 1996.

WANG, C. Y. et al. Invasive infections of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 43, n. 6, p. 491-497, Dec 2010.

WERNER, M. H. **Advance User's Guide.** Fallanden, 1994.

WIEGAND, I. et al. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nat Protoc**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

WILLIAMS, S. et al. Minocycline prevents the decrease in bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized aged rats. **Bone**, v. 19, n. 6, p. 637-644, Dec 1996.

YAGIELA, J. A. et al. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2000.

YANG, Y. et al. Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 10, p. 6734-6742, Oct 2006.

YOSHIDA, A. et al. Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic JP2 clone from non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. **BMC Infect Dis**, v. 12, p. 253, 2012.

YUE, I. C. et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3743-3750, Aug 2004.

ZAMBON, J. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 1, p. 1-20, Jan 1985.

ZIJNGE, V. et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. **Plos One**, v. 5, n. 2, Feb 2010.

APÊNDICE A – ENSAIO DO CRISTAL VIOLETA**Brain Heart Infusion (BHI)**

BHI -----	37g
H ₂ O destilada-----	1000mL
Extrato de Levedura -----	5g

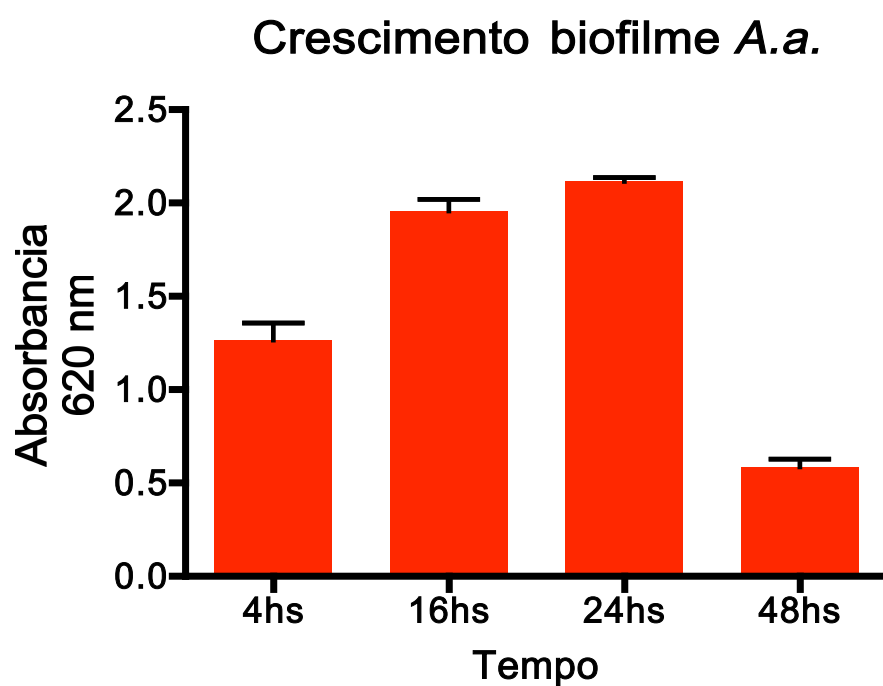
Tampão PBS

Na ₂ HPO ₄ -----	1,46g
KH ₂ PO ₄ -----	0,04g
NaCl -----	1,53g
KCl -----	0,04g
H ₂ O destilada -----	200mL

Solução de Ácido Acético 33%

H ₂ O destilada-----	67mL
Ácido acético glacial -----	33mL

APÊNDICE B – TAXA DE CRESCIMENTO DE BIOFILME DE *A.a* EM FUNÇÃO DO TEMPO EM PLACAS DE 96 POÇOS. MEIO UTILIZADO: BHI + EXTRATO DE LEVEDURA



APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO EM 2013 PARA REVISTA BIOFOULING

Biofouling



Higher efficacy of Doxycycline in an oral biofilm using the host:guest strategy with cyclodextrins

Journal:	<i>Biofouling</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Keywords:	Doxycycline, Cyclodextrin, Biofilm, Aggregatibacter actinomycetemcomitans

SCHOLARONE™
Manuscripts

Higher efficacy of Doxycycline in an oral biofilm using the host:guest strategy with cyclodextrins

Andressa Coelho de Menezes^a, Karina Imaculada Rosa Teixeira^a, Pedro Pires Goulart
Guimarães^b, Rubén Dario Sinisterra^b, Maria Esperanza Cortés^{a*}

^a Restorative Dentistry Department, Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas
Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, Belo Horizonte, CEP: 31270-901, Brazil.

^b Chemistry Department, Exact Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais
(UFMG), Avenida Antônio Carlos, Belo Horizonte, CEP: 31270-901, Brazil.

Word count

Text: 3.834

References: 1.667

Figures: 173

Tables: 36

TOTAL: 5710

* Correspondence: Dr. Maria Esperanza Cortés, Department of Restorative Dentistry,
Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo
Horizonte, Minas Gerais, CEP: 31270-901, Brazil.

Tel: +55 (31) 3409-2437; Fax: +55 (31) 3409-2430; E-mail: mecortes@ufmg.br

ABSTRACT

The demand for effective antimicrobials on the elimination and control of resistant bacterial biofilms has been growing and opens an opportunity to look after safer and efficacy systems. In order to improve the effectiveness of doxycycline (DOX) we used the 1:1 molar ratio DOX inclusion compound with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Hp β Cd). Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), 2D ^1H - ^1H ROESY Nuclear Magnetic Resonance and Scanning Electron Microscopy (SEM) were used to characterize the complex. An *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) biofilm was used not only to verify biofilm bacterial growth and to assess cellular membrane integrity but also to evaluate the antimicrobial efficacy. Higher efficacy 62.1% of DOX/Hp β Cd, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$) and biofilm reduction upon 24 hours was observed. Higher membrane damage was also verified by SEM micrographics. These results bring promising efficacy antimicrobial local formulations against *A.a* biofilms, which are considered to be a major cause of localized aggressive periodontitis.

Key words: Doxycycline, Cyclodextrin, Biofilm, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Introduction

Nowadays, periodontal diseases are a serious healthy issue worldwide and it is one of the major causes of teeth loss (Houshmand et al. 2012, Saintrain and de Souza 2012). Only in US, 64.7 million people (~ 47% of the population) suffer from periodontitis or gum diseases, being the prevalence rate after 65 years old higher than 70% (Papapanou 2012). Periodontitis is usually associated with biofilm accumulation in periodontal tissues; however the host immune response modulates progression of the disease toward destruction or healing. In these cases, immunologic and genetic factors might be also involved and overproduction of certain mediators, such as Interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha and prostaglandins, lead to the chronic, persistent inflammation. These mediators can activate matrix metalloproteinase, which cause bone resorption (Laine et al. 2010). The treatment of periodontal disease is mainly based on mechanical removal of accumulated biofilm, which may be also associated with adjunct antibiotic therapy.

Although different bacterial strains have been associated with periodontal disease in adults, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) is considered to be a major cause of localized aggressive periodontitis (Roman-Torres et al. 2010, Slots and Ting 1999). In fact, *A.a* is a gram-negative, facultative anaerobic coccobacillus bacterium that colonizes the oral cavity (Haubek et al. 2008, Yoshida et al. 2012, Zambon 1985), with ability to form biofilm, a structured consortium of bacteria embedded in a self-produced polymer matrix consisting of polysaccharide, protein and DNA.

Bacterial biofilms can cause chronic infections, mainly because their increased tolerance to antibiotics (Hoiby et al. 2010). A fact of considerable importance is that biofilms effectively protect bacteria from antimicrobial agents. Biofilm cells are generally said to be resistant by comparison with their planktonic counterparts (Bridier et al. 2011). Bacteria can be ~1000 times more resistant to an antibiotic in a biofilm when compared to the same

1
2
3 planktonic cells (Walker and Sedlacek 2007), although the resistance mechanisms involved
4
5 are still largely unknown. Among the possible mechanisms, it is believed that inactivation of
6
7 the drug may occur by polymers or extracellular enzymes, or inefficiency of the drug due to
8
9 very slow growth rates within the biofilm (Mah and O'Toole 2001). Infections associated with
10
11 biofilms are generally recurring in nature, whereas conventional antimicrobial therapies
12
13 eliminate predominantly planktonic forms, leaving free sessile cells to reproduce and spread
14
15 in the biofilm after treatment. Also, bacteria within biofilms may also evade from the immune
16
17 system response (Arciola et al. 2012).
18
19

20
21 Adjuvant antibiotic therapy may also fail due to the emergence of resistant human
22
23 pathogens (van Winkelhoff et al. 2005, Walker and Karpinia 2002). Several antibiotics have
24
25 been used for treatment of periodontics, including those that directly kill bacteria, as
26
27 amoxicillin, and those that exert bacteriostatic actions and prevent their growth, such as
28
29 doxycycline (DOX). DOX is a semi-synthetic antibiotic derived from oxytetracycline,
30
31 commonly used for numerous intracellular and extracellular pathogens (Seymour and
32
33 Heasman 1995). The mechanism of action is through the inhibition of protein synthesis by its
34
35 interaction with 30s ribosomal subunit and the subsequent blocking of the RNA binding to
36
37 the docking sites. It has been also proven to have anti-inflammatory action, ability to inhibit
38
39 matrix metalloproteinase's actions (Gueders et al. 2008), cell proliferation and also reduces
40
41 the blastogenic response of lymphocytes (Griffin et al. 2010).
42
43
44
45
46

47 Despite the broad spectrum of DOX against pathogenic bacteria, several groups were
48
49 reported to exhibit resistance to this antimicrobial agent, such as *A.a* (Ardila et al. 2010, Feres
50
51 et al. 1999, Kulik et al. 2008, Madinier et al. 1999, van Winkelhoff, Herrera, Oteo and Sanz
52
53 2005). Due to this large number of pathogens resistant to antibiotics, it is of great importance
54
55 to develop more safe and efficacy drug delivery. Systemic administration of drugs leads to
56
57 therapeutic concentrations at the site of infection, but for short periods of time, forcing
58
59
60

repeated intakes and for longer periods. Systemic use has a large number of disadvantages including high risk of toxicity, bacterial resistance, interactions with other drugs and reduction of the patient's compliance.

Our research group has been investigated some local delivery of antimicrobials aiming to overcoming the limitations of systemic therapy (Cortés et al. 2001, Denadai et al. 2007, Franco et al. 2003, Pataro et al. 2003). The use of sustained and controlled release formulations to deliver antibacterial to the site of infection has recently gained interest. These formulations provide a long-term, effective treatment at the site of infection at much smaller doses (Pragati et al. 2009, Prakasam et al. 2012).

On the other hand, it is well known that molecular inclusion with cyclodextrins (CDs) could prevent biodegradation of the associated drugs (Bisson-Boutelliez et al. 2010). The DOX complexed in hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Hp β Cd) has been already studied in a hydrogel for ophthalmic delivery (He et al. 2011). However, in the best of our knowledge no local and controlled release of antibiotics formulation with cyclodextrins was approved for periodontitis treatment in humans. Here, we prepared and characterized novel DOX inclusion compound with Hp β Cd and evaluated its antimicrobial activity against *A.a* biofilms *in vitro*, which may hold future adjuvant therapeutic use in patients with periodontitis.

Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals and Bacterial Strain

Doxycycline hydrochloride (DOX) was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (Hp β Cd) was obtained from Cerestar®, Co.

(Milwaukee, WI, USA). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC 29522) (Fiocruz, RJ, Brazil). Brain Heart Infusion (BHI) broth and yeast extract were purchased from Biobras S.A® (MG, Brazil). All other materials and solvents were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Inclusion Compound Preparation

The 1:1 DOX/Hp β Cd molar ratio inclusion compound was prepared adapting the freeze-drying method described elsewhere (Cortés, RD Sinisterra, Ávila-Campos, Tortamano and Rocha 2001). Briefly, DOX and Hp β Cd were weighted at 1:1 molar ratio and dissolved in ultrapure water. DOX solution was protected of direct light. The aqueous solution of DOX and Hp β Cd was mixed and stirred for 2h at 40° C and then submitted to freeze-drying process to achieve a solid inclusion compound. The molecular inclusion was confirmed by both Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR).

2.2.2. Solid state analysis - Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR)

Solid state characterization of DOX, HP β Cd, DOX/HP β Cd and a physical mixture (PM) of DOX and HP β Cd at a molar ratio of 1:1 were performed using FTIR. The samples were prepared as potassium bromide (KBr) pellets and scans were performed from 4000 to 400 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹ using 32 scans per sample. FTIR spectra were recorded using a Perkin Elmer spectrometer (Spectrum GX; Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

2.2.3. Solution analysis - Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

The DOX/HP β Cd inclusion complex in solution was characterized using NMR

spectroscopy at a molar ratio of 1:1. ^1H NMR chemical shifts (δ) and 2D ^1H - ^1H ROESY experiments were performed using a Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) spectrometer, at 300 K. The solutions analyzed included 2.0 mM of DOX and DOX/Hp β Cd (1:1). Both solutions were prepared in D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; 99.9 % isotopic purity). The HOD signal at $\delta = 4.80$ was used as a reference. No solid formation was observed in the solutions during analysis. The 2D ^1H - ^1H ROESY experiments were recorded at a spin lock of 600 ms, which was previously calculated throughout the inversion-recovery sequence (Rahman 1989, Werner 1994). Samples for this experiment were prepared using a freeze-drying method as described above. Prior to the analyses by ROESY, the ^1H NMR spectra of DOX was assigned according to Guerra et al., (Guerra et al. 2006) and the ^1H NMR spectra of DOX/Hp β Cd was assigned according to Schneider et al. (Schneider et al. 1998).

2.2.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

MIC for planktonic bacteria was determined by microdilution method, according to the standards of NCCLS (CLSI 2011, Wiegand et al. 2008). Briefly, *A.a* was anaerobically seeded in BHI broth supplemented with 0.5% yeast extract and incubated anaerobically (10% CO_2 , 90% N_2) at 37°C for 24h. After incubation, bacteria were adjusted to an optical density at 610nm of 0.08 (correspondent to 1.5×10^8 colony-forming unit (CFU)/mL determined spectrophotometrically, according to the McFarland scale (Slots and Ting 1999)) in BHI supplemented with yeast extract, added to double serial dilution of DOX, Hp β Cd, DOX/Hp β Cd (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 96-well plates and incubated at 37°C for a period of 24h. MIC was defined as the lowest concentration that prevented visible growth of the microorganism, determined with a spectrophotometer at 610nm (Wiegand, Hilpert and Hancock 2008). All MICs assays were performed in twice triplicates.

2.2.5. *Biofilm Formation, Quantification of Biomass and Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)*

Overnight cultures were diluted to an optical density at 610 nm of 0.1 ± 0.02 absorbance (between 10^7 and 10^8 CFU/mL) in fresh BHI supplemented with 0.5% yeast extract. In brief, 0.2 mL of the diluted culture was added to a 96-well plate and incubated for 24h. After incubation the antimicrobial agents DOX and DOX/Hp β Cd replaced the BHI broth. The concentrations tested were: 1; 2; 20 and 200 μ g/mL. For positive control was used fresh BHI broth with bacteria and BHI broth supplemented without bacteria as a negative control, respectively. Following 4h, 16h and 24h of incubation, biofilm biomass was assessed by crystal violet assay. Antimicrobial agents were considered effective when values of biofilm biomass were found to be equal or lower than 50% of the positive control (Minimum Inhibitory Biofilm Concentration (MBIC₅₀)(Pettit et al. 2009).

Crystal violet assay was used to quantify biofilm biomass as described elsewhere (Burton et al. 2007, Erriu et al. 2012, Presterl et al. 2005). After incubation with the antimicrobial agents at defined times (4h, 16h and 24h) the medium was removed and the microtiter plate wells were washed with 200 μ l of PBS (0.1M, pH 7.4) buffer and allowed to dry for 15 min. Microtiter wells were stained with 200 μ l of 0.1% crystal violet stain for 30 min at room temperature. The unbound crystal violet stain was removed and the wells were washed with 200 μ l of PBS buffer. Wells were air-dried for 15 min and the remaining crystal violet was solubilized in acetic acid (200 μ l; 33% w:w). Biofilm formation was represented by the analysis of the absorbance carried out with a spectrophotometer at 620nm.

Biofilm Biomass was given by the equation modified from Pereira et al. (Pereira et al. 2012):

$$\%B.b. = \frac{OD_w}{OD_c} \times 100$$

OD_c

Where % B.b is the percentage of biofilm biomass, OD_w is the OD_{620nm} value for tested wells and OD_c is the OD_{620nm} value for the positive control.

2.2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Standard procedures for SEM were used to verify biofilm bacterial growth and to assess cellular membrane integrity and morphologic changes caused by the drug treatments (Haase et al. 2006). Briefly, biofilms were grown under anaerobic conditions for 24h on cover slips treated with poly-L-lysine in 24-well plates. After incubation the antimicrobial agents replaced the medium in the concentration of 1µg/mL for DOX and DOX/HpβCd. For positive control, medium was replaced by fresh BHI supplemented medium. After 24h of incubation under anaerobic conditions at 37 °C, the cover slips were fixed for 24h in a solution containing 2.5% glutaraldehyde. Cover slips were washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) and dehydrated in a graded series of ethanol. Subsequently, the cover slips were subjected to critical point drying with CO₂, sputter-coated with gold (thickness approx. 10 nm), and examined with a Zeiss DSM 960A electron microscope.

2.2.7. Reproducibility and statistics

All experiments were done in sixuplicate. The results were analyzed by the nonparametric test One Way Anova. Results were presented as the means ± SD (standard deviation) and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and Discussion

3.1. Solid state and solution analysis

3.1.1. FTIR characterization

The FTIR spectra of free drug, PM, Hp β CD and DOX/Hp β CD inclusion complex are shown in Figure 1. FTIR spectra are related to verify the DOX and Hp β CD interactions in the solid state. The interactions between DOX and Hp β CD were verified with changes observed in N–H and O–H vibrational peaks. The DOX/Hp β CD spectrum inclusion compound did not superpose to the FTIR spectra of either free species or with the PM of DOX/Hp β CD. Reduction of angular and axial DOX C–O bends at 1175 cm⁻¹ and 1130 cm⁻¹ were observed, as well as sharpening of C=O and C=C DOX stretches at 1700 and 1600 cm⁻¹. These data suggest that strong disturbance of the CONH₂ group of DOX occurs in the solid state as a consequence of both the binding and breaking of hydrogen bonds upon inclusion of DOX in Hp β CD. These results are in accordance with those related by He et al. (He, Wang, Zhang, XinPan, Wen-ru Su, Liang and Wu 2011).

The β CD have been used to form inclusion compound with DOX and their interaction in solid state was study previously for our research group (unpublished results). In the present study we analyzed a similar inclusion compound but using the Hp β CD.

3.1.2. 2D ¹H-¹H ROESY NMR characterization

Observation of 2D NMR ¹H-¹H ROESY, inter- and intra-molecular interactions of functional groups of compounds within 5Å of each other can be detected (de Alvarenga et al. 2004, Denadai et al. 2010, Lula et al. 2012). In this study, ROESY experiments identified the host:guest specific interactions that occur between DOX and Hp β CD upon supramolecular complex formation, and gave insights about the orientation of DOX inside of the Hp β CD

cavity. Figure 2 shows the dipolar proton interactions between DOX and Hp β CD, suggesting the DOX complexation. The expanded contour map of ROESY showed cross peak correlations between aromatic H7D, H8D, and H9D DOX hydrogens (in the region of $\delta \approx 6.5$ to 7.6) with H3, H5, and H6 Hp β CD hydrogens (Figure 3). Furthermore, cross peak correlations, which could suggest inclusion by the aliphatic side, were not observed. The results indicate preferential inclusion of the aromatic side of DOX by Hp β CD. These results are in accord with previously interaction founded between DOX and β CD by Soares *et al*, 2013 (unpublished results).

3.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

DOX alone exhibited antimicrobial activity against *A.a* at concentrations equal or higher 2 μ g/mL. Higher antimicrobial activity of DOX/Hp β Cd when compared with the antibiotic alone it was observed, whereas the Hp β Cd alone did not show antimicrobial activity (Table 1).

3.3. Quantification of Biofilm Biomass and Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)

Only 1 μ g/mL of DOX and 200 μ g/mL of DOX/Hp β Cd were effective (MBIC₅₀) against *A.a* biofilm after 4h of exposure to the antimicrobial agents (Figure 4A). *A.a* was susceptible to all concentrations tested of DOX and DOX/Hp β Cd after 16 h of exposure showing significant biofilm reduction. Efficacy of DOX/Hp β Cd against the biofilm at concentrations of 2 and 200 μ g/mL was verified, while DOX alone had the same effect just at 2 μ g/mL. Higher biofilm reduction using DOX/Hp β Cd at 2 μ g/mL was also observed when compared with the same concentration of antibiotic alone (Figure 4B). After 24 h in contact with *A.a* biofilm, DOX and DOX/Hp β Cd at 1 μ g/mL achieved at least 50% of biofilm reduction,

whereas the inclusion compound was also effective (MBIC₅₀) at 2µg/mL (Figure 4C).

3.4. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM micrographs of bacteria treated with drugs at concentrations of 1µg/mL for DOX and DOX/HpβCd after 24h of exposure to 24h *A.a* biofilms are shown in Figure 5. Based on the SEM images one may verified that all antimicrobial agents tested were able to inhibit *A.a* biofilms, when compared with control, after 24h, these results were also corroborate by the crystal violet assay. However, the inclusion compound showed significant higher reduction in *A.a* biofilm quantity when compared with the antibiotic alone (Figure 5 B1 and C1).

A.a biofilms consist in a matrix composed of exopolysaccharides and are found in small clusters of cells, (islet-like), different stages of bacterial growth (Figure 5 A1 and A2). The appearance of indentations on the surface of some cells as well as some membrane residues around the cells (Figure 5 B2 and C2) were the initial morphological changes observed. Cell disruption with leakage of intracellular material was observed in the test groups. Molar ratio 1:1 DOX/HpβCd caused more leakage in cellular membrane and had the best antimicrobial effect (Figure 5 C1 and C2).

The complexation of DOX with HpβCd have been proposed as a formulation strategy to improve the already existing drugs in some of their properties such as stability, solubility, dissolution rate, and bioavailability. Thus we used this approach to obtain a more safe and efficacious local formulation of DOX/HpβCd against biofilm model.

The ability to form biofilm may be a virulence factor of bacteria and contribute to the serious course of the disease and a lack of response to antimicrobial therapy (Presterl, Grisold, Reichmann, Hirschl, Georgopoulos and Graninger 2005). In this study *A.a* was

chosen as a model microorganism because it is a major putative bacteria associated with localized and generalized aggressive periodontitis, with chronic periodontitis (Roman-Torres, Aquino, Cortelli, Franco, dos Santos, Corraini, Holzhausen, Diniz, Gomez and Cortelli 2010) and with persistent diseases, such as refractory periodontitis (Slots and Ting 1999). This bacteria exhibits high resistance to antimicrobial agents when associated with other bacteria in biofilms (Ardila, Lopez and Guzman 2010, Feres, Haffajee, Goncalves, Allard, Som, Smith, Goodson and Socransky 1999, Kulik, Lenkeit, Chenaux and Meyer 2008, Madinier, Fosse, Hitzig, Charbit and Hannoun 1999, van Winkelhoff, Herrera, Oteo and Sanz 2005).

Many antibiotics, such as DOX have been used in a systemic administration for infection control. It is questionable, though, if sufficient doses can reach the site of infection in commonly used therapeutic (Chadha and Bhat 2012). Sustained and controlled drug release formulations with cyclodextrins have recently gained interest (Pragati, Ashok and Kuldeep 2009), since they provide a long-term and effective treatment at the site of infection at much smaller doses (Pragati, Ashok and Kuldeep 2009, Prakasam, Elavarasu and Natarajan 2012).

In the state-of-the-art still one could find some uncertainty about the efficacy of DOX when used as the only therapy to treat periodontal disease. However some studies have shown that DOX adjunct therapeutic scheme have more favorable antimicrobial effects than mechanical therapy alone (Chadha and Bhat 2012, Slots and Ting 1999). Here, we showed the antibacterial activity of DOX/Hp β Cd against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms compared throughout different times. The efficacy of these complexes was demonstrated by the strongest decreasing in the percentage of the biofilm biomass.

The ability of antimicrobials to eliminate microorganisms during a short period of time (4-24h) is not surprising in light of previous report (Chadha and Bhat 2012, Gad et al. 2008, Megraud et al. 1991). In our study, however, in the 24h group, 1 μ g/mL of DOX/Hp β Cd

showed remarkable effectiveness in reducing *A.a* biofilms. This may due to a prolonged effect of this drug, which is enhanced by cyclodextrin.

This DOX/Hp β Cd value was twice the MIC values for planktonic bacteria. This highest inhibitory concentration value was expected since bacteria in biofilm are more resistant to free antibiotics (Walker and Sedlacek 2007). DOX/Hp β Cd also elicited increase effectiveness in the 16h group at 2 μ g/mL. It may be assumed that its effect was sustained until 24h, although it was observed a stagnation tendency overtime.

Local drug delivery provides a long-term and effective treatment at the site of infection at much smaller doses (Pragati, Ashok and Kuldeep 2009). DOX is prescribed systemically in the dose of 100 mg (Prakasam, Elavarasu and Natarajan 2012). Our study showed that a dose of 1 μ g/mL of DOX/Hp β Cd is effective in reducing bacterial biomass, and it can reduce more than 50% of bacterial growth. The results show that is unnecessary the use of high doses of antibiotics when controlled release with cyclodextrins is applied. The inhibition in biofilm growth within 24h may be an important adjuvant to the immune system response against pathogens.

The initial morphological changes observed by SEM were the appearance of indentations on the surface of some cells or outer membrane residues found around the cells (Figure 5 B2 and C2). This indicates that the bacterial outer membrane was disrupted with leakage of intracellular material, probably due to a direct interaction between the cellular membrane and DOX inclusion compound. This is in agreement with Loftsson et al. (Loftsson and Duchene 2007), who compared the effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes and showed that cyclodextrins increased drug uptake through biological membranes. Molar ratio 1:1 DOX/Hp β Cd caused more leakage in cellular membrane and had the best antimicrobial effect (Figure 5 C1 and C2).

Optimization of antimicrobial activity of drugs associated with cyclodextrins, with no

increased cytotoxic effects, is consistent with previous studies using other antimicrobials (Consuegra et al. 2013, Cortés, RD Sinisterra, Ávila-Campos, Tortamano and Rocha 2001, Denadai, Teixeira, Santoro, Pimenta, Cortes and Sinisterra 2007, Pataro, Franco, Santos, Cortes and Sinisterra 2003, Rosa Teixeira et al. 2013). The higher activity of DOX/Hp β Cd compound compared with free antibiotic could be explained by an efficient adhesion from cyclodextrin with the membrane and the biofilm oligosaccharides through hydrogen bonding interaction (Loftsson and Duchene 2007). In addition could be also explained by cyclodextrin surfactant activity that cause a more efficient biofilms disaggregation (Serno et al. 2011). The hydrophilic outer surface of Cd molecules forms a weak interaction with biologic membranes (Abdelwahed et al. 2008).

New formulation technologies should be investigated to optimize the effect of existing drugs, since the new drug production is very expensive and time and technological demanding process. One method to prolong the effect of DOX on biofilm is the molecular inclusion in cyclodextrins, showing other advantages namely: the simplicity and low-priced process that could improve the properties of the included drugs. Furthermore, our research group is conducting new experiments with more complex bacterial biofilms and releasing devices for long-term antibiotics use *in vivo*.

Conclusion

The DOX included in cyclodextrin had a higher antimicrobial effect against *in vitro* bacterial growth of *A.a* biofilms with prolonged local release. Our study shows that the inclusion compound with DOX has beneficial contributions to future application of this compound with effectiveness in reducing oral bacterial biofilms.

Acknowledgments

We are grateful for CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT/Nanobiofar that support this investigation and the CNPq Nanofar network. The authors also thank Professor Gustavo Menezes, Immunobiophotonics Lab, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for technical support and constructive advice.

Conflict of Interests

The authors have no conflict of interests to declare.

References

- Abdelwahed W, Degobert G, Dubes A, Parrot-Lopez H, Fessi H. 2008. Sulfated and non-sulfated amphiphilic-beta-cyclodextrins: impact of their structural properties on the physicochemical properties of nanoparticles. *Int J Pharm.* 351(1-2):289-295. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063493> doi S0378-5173(07)00824-1 [pii] 10.1016/j.ijpharm.2007.09.035
- Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials.* 33(26):5967-5982. Available from <Go to ISI>://WOS:000306720400001 doi 10.1016/j.biomaterials.2012.05.031
- Ardila CM, Lopez MA, Guzman IC. 2010. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal.* 15(6):E947-E951. Available from <Go to ISI>://WOS:000284036700024 doi 10.4317/medoral.15.e947
- Bisson-Boutelliez C, Fontanay S, Finance C, Kedzierewicz F. 2010. Preparation and Physicochemical Characterization of Amoxicillin beta-cyclodextrin Complexes. *Aaps Pharmscitech.* 11(2):574-581. Available from <Go to ISI>://WOS:000278921400011 doi 10.1208/s12249-010-9412-1
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 27(9):1017-1032. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011093> doi 10.1080/08927014.2011.626899
- Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyastha MS. 2007. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34(1):1-4. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463160> doi 10.1007/s10295-006-0086-3
- Chadha VS, Bhat KM. 2012. The evaluation of doxycycline controlled release gel versus doxycycline controlled release implant in the management of periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 16(2):200-206. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055585> doi 10.4103/0972-124X.99262 JISP-16-200 [pii]
- CLSI. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First International Supplement. CLSI document M100-S21.:Wayne,PA.
- Consuegra J, Elena de Lima M, Santos D, Sinisterra RD, Cortes ME. 2013. Peptides:beta-Cyclodextrin Inclusion Compound as Higher Effective Antimicrobial and Anti-epithelial Proliferation Agents. *J Periodontol.* Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510146> doi 10.1902/jop.2013.120679
- Cortés M, RD Sinisterra, Ávila-Campos M, Tortamano N, Rocha R. 2001. The chlorhexidine:beta-cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem.* 40:297-302. Available
- de Alvarenga ES, Lima CF, Denadai AML. 2004. Study of aqueous solution of sodiumdodecylsulfate and polyethyleneoxide 10000 by NMR NOESY. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences.* 59(4-5):291-294. Available from <Go to ISI>://000221618000015
- Denadai AM, Teixeira KI, Santoro MM, Pimenta AM, Cortes ME, Sinisterra RD. 2007. Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr Res.* 342(15):2286-2296. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618611> doi S0008-6215(07)00224-8 [pii]
- 10.1016/j.carres.2007.05.002
- Denadai AML, Santoro MM, Texeira AV, Sinisterra RD. 2010. New insights regarding the cyclodextrin/AAS self-assembly: A molar ratio dependent system. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl.* 30(3):417-422. Available from <Go to ISI>://000276590000014
- Erriu M, Genta G, Tuveri E, Orru G, Barbato G, Levi R. 2012. Microtiter spectrophotometric biofilm production assay analysed with metrological methods and uncertainty evaluation. *Measurement* 45:1083-1088. Available

- Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. 1999. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections - (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *Journal of Clinical Periodontology*. 26(12):784-792. Available from <Go to ISI>://WOS:000083923300002
- Franco CF, Pataro AL, LC ES, Santos VR, Cortes ME, Sinisterra RD. 2003. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artif Organs*. 27(5):486-491. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752214> doi 7245 [pii]
- Gad HA, El-Nabarawi MA, Abd El-Hady SS. 2008. Formulation and evaluation of PLA and PLGA in situ implants containing secnidazole and/or doxycycline for treatment of periodontitis. *AAPS PharmSciTech*. 9(3):878-884. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654864> doi 10.1208/s12249-008-9126-9
- Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. 2010. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 299(3):C539-C548. Available from <Go to ISI>://WOS:000281389100001 doi 10.1152/ajpcell.00047.2010
- Gueders MM, Bertholet P, Perin F, Rocks N, Maree R, Botta V, Louis R, Foidart JM, Noel A, Evrard B, et al. 2008. A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergen-induced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma. *Biochemical Pharmacology*. 75(2):514-526. Available from <Go to ISI>://WOS:000252842300018 doi 10.1016/j.bcp.2007.09.012
- Guerra W, Silva IR, Azevedo EA, Monteiro A, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, Silveira JN, Fontes APS, Pereira-Maia EC. 2006. Three new complexes of platinum(II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 17(8):1627-1633. Available from <Go to ISI>://WOS:000243386100021
- Haase EM, Bonstein T, Palmer RJ, Jr., Scannapieco FA. 2006. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol*. 51(4):299-314. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226214> doi S0003-9969(05)00219-0 [pii] 10.1016/j.archoralbio.2005.09.002
- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. 2008. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 371(9608):237-242. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207019> doi 10.1016/S0140-6736(08)60135-X S0140-6736(08)60135-X [pii]
- He Z-x, Wang Z-h, Zhang H-h, XinPan, Wen-ru Su, Liang D, Wu C-b. 2011. Doxycycline and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex in poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophtalmic delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 1:254-260. Available
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35(4):322-332. Available from <Go to ISI>://WOS:000274869800003 doi 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
- Houshmand M, Holtfreter B, Berg MH, Schwahn C, Meisel P, Biffar R, Kindler S, Kocher T. 2012. Refining definitions of periodontal disease and caries for prediction models of incident tooth loss. *J Clin Periodontol*. 39(7):635-644. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22612722> doi 10.1111/j.1600-051X.2012.01892.x
- Kulik EM, Lenkeit K, Chenuaux S, Meyer J. 2008. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61(5):1087-1091. Available from <Go to ISI>://WOS:000254955300021 doi 10.1093/jac/dkn079
- Laine ML, Loos BG, Crielaard W. 2010. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent*. 2010:324719. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339487> doi 10.1155/2010/324719
- Loftsson T, Duchene D. 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 329(1-2):1-11. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137734> doi S0378-5173(06)00966-5

- [pii]
10.1016/j.ijpharm.2006.10.044
- Lula I, De Sousa FB, Denadai AML, de Lima GF, Duarte HA, dos Mares Guia TR, Faljoni-Alario A, Santoro MM, de Camargo ACM, dos Santos RAS, et al. 2012. Interaction between bradykinin potentiating nonapeptide (BPP9a) and beta-cyclodextrin: A structural and thermodynamic study. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*. 32(2):244-253. Available from <Go to ISI>://WOS:000300647800026 doi 10.1016/j.msec.2011.10.025
- Madinier IM, Fosse TB, Hitzig C, Charbit Y, Hannoun LR. 1999. Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology*. 70(8):888-892. Available from <Go to ISI>://WOS:000082382400010 doi 10.1902/jop.1999.70.8.888
- Mah TFC, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 9(1):34-39. Available from <Go to ISI>://WOS:000168718800016 doi 10.1016/s0966-842x(00)01913-2
- Megraud F, Trimoulet p, Lamouliatte H, Boyanova L. 1991. Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 35(5):869-872. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1854168>
- Papapanou PN. 2012. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res*. 91(10):907-908. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935674> doi 0022034512458692 [pii]
10.1177/0022034512458692
- Pataro AL, Franco CF, Santos VR, Cortes ME, Sinisterra RD. 2003. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials*. 24(6):1075-1080. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504530> doi S0142961202004039 [pii]
- Pereira AM, Abreu AC, Simões M. 2012. Action of kanamycin against single and dual species biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology Research* 2(4):84-88. Available
- Pettit RK, Weber CA, Pettit GR. 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 8:28. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860905> doi 10.1186/1476-0711-8-28
1476-0711-8-28 [pii]
- Pragati S, Ashok S, Kuldeep S. 2009. Recent advances in periodontal drug delivery systems *International Journal of Drug Delivery*. 1:1-14. Available
- Prakasam A, Elavarasu SS, Natarajan RK. 2012. Antibiotics in the management of aggressive periodontitis. *J Pharm Bioallied Sci*. 4(Suppl 2):S252-255. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066264> doi 10.4103/0975-7406.100226
JPBS-4-252 [pii]
- Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. 2005. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 55(1):45-50. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563519> doi dkh479 [pii]
10.1093/jac/dkh479
- Rahman A. 1989. *One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*. New York: Elsevier.
- Roman-Torres CVG, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GCN, dos Santos JG, Corraini P, Holzhausen M, Diniz MG, Gomez RS, Cortelli JR. 2010. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Biol*. 55(3):242-248. Available from <Go to ISI>://WOS:000276372500009 doi 10.1016/j.archoralbio.2010.01.008
- Rosa Teixeira KI, Araujo PV, Almeida Neves BR, Bohorquez Mahecha GA, Sinisterra RD, Cortes ME. 2013. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharm Dev Technol*. 18(3):600-608. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260726> doi 10.3109/10837450.2011.649853

- Saintrain MV, de Souza EH. 2012. Impact of tooth loss on the quality of life. *Gerodontology*. 29(2):e632-636. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883422> doi 10.1111/j.1741-2358.2011.00535.x
- Schneider HJ, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. 1998. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem Rev*. 98(5):1755-1786. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848948> doi cr970019t [pii]
- Serno T, Geidobler R, Winter G. 2011. Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state. *Adv Drug Deliv Rev*. 63(13):1086-1106. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907254> doi 10.1016/j.addr.2011.08.003 S0169-409X(11)00226-2 [pii]
- Seymour RA, Heasman PA. 1995. TETRACYCLINES IN THE MANAGEMENT OF PERIODONTAL-DISEASES - A REVIEW. *Journal of Clinical Periodontology*. 22(1):22-35. Available from <Go to ISI>://WOS:A1995QD97600003
- Slots J, Ting M. 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 20:82-121. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522224>
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. 2005. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*. 32(8):893-898. Available from <Go to ISI>://WOS:000230290200010 doi 10.1111/j.16000051X.2005.00782.x
- Walker C, Karpinia K. 2002. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology*. 73(10):1188-1196. Available from <Go to ISI>://WOS:000178823100014 doi 10.1902/jop.2002.73.10.1188
- Walker C, Sedlacek MJ. 2007. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*. 22(3):152-161. Available from <Go to ISI>://WOS:000246151500002 doi 10.1111/j.1399-302X.2007.00336.x
- Werner MH. 1994. Advance User's Guide. Fallanden.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 3(2):163-175. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274517> doi 10.1038/nprot.2007.521 nprot.2007.521 [pii]
- Yoshida A, Ennibi OK, Miyazaki H, Hoshino T, Hayashida H, Nishihara T, Awano S, Ansai T. 2012. Quantitative discrimination of Aggregatibacter actinomycetemcomitans highly leukotoxic JP2 clone from non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. *BMC Infect Dis*. 12:253. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050598> doi 10.1186/1471-2334-12-253 1471-2334-12-253 [pii]
- Zambon JJ. 1985. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 12(1):1-20. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3882766>

Captions

Figure 1. FTIR spectra of DOX, PM of DOX and Hp β CD, DOX/Hp β CD (1:1) and Hp β CD

Figure 2. Expanded view of the NMR 2D-ROESY contour map (400 MHz, spin lock = 600 ms) obtained for the DOX/Hp β CD/D₂O system

Figure 3. Structure of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Figure 4. Biofilm Biomass (%) of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) after treatment with doxycycline (DOX) and 1:1 DOX/Hp β CD after 4h (A), 16h (B) and 24h (C) of exposure assessed with crystal violet assay. DOX was normalized in all groups at 1, 2, 20 and 200 μ g/ml. Mean values \pm SD for at least three replicates are illustrated. * Indicates statistical significance when compared with positive control ($p < 0.05$).

Figure 5. SEM micrographs of *A.a* biofilms non-threatened (A1 and A2), cells treated with 1 μ g/ml of DOX (B1 and B2) and 1 μ g/ml of DOX/Hp β CD (C1 and C2) after 24h of exposure to a 24h *A.a* biofilm. Micrographs of A1 to C1 groups were presented in a magnification of 1000x, while A2 to C2 were presented in a magnification of 10000x.

Table 1. Minimal Inhibition concentration of doxycycline (DOX) and DOX/Hp β CD (μ g/mL) inclusion compound at 1:1 molar ratio against planktonic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*).

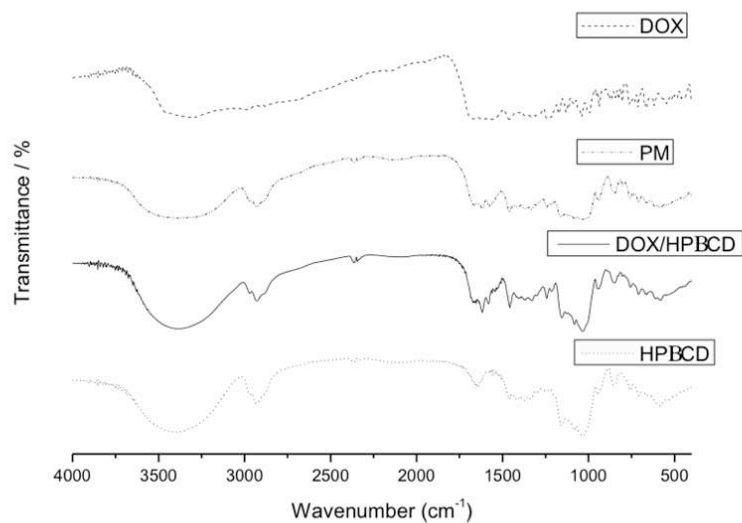


Figure 1. FTIR spectra of DOX, PM of DOX and HpβCD, DOX/HpβCD (1:1) and HpβCD
65x45mm (300 x 300 DPI)

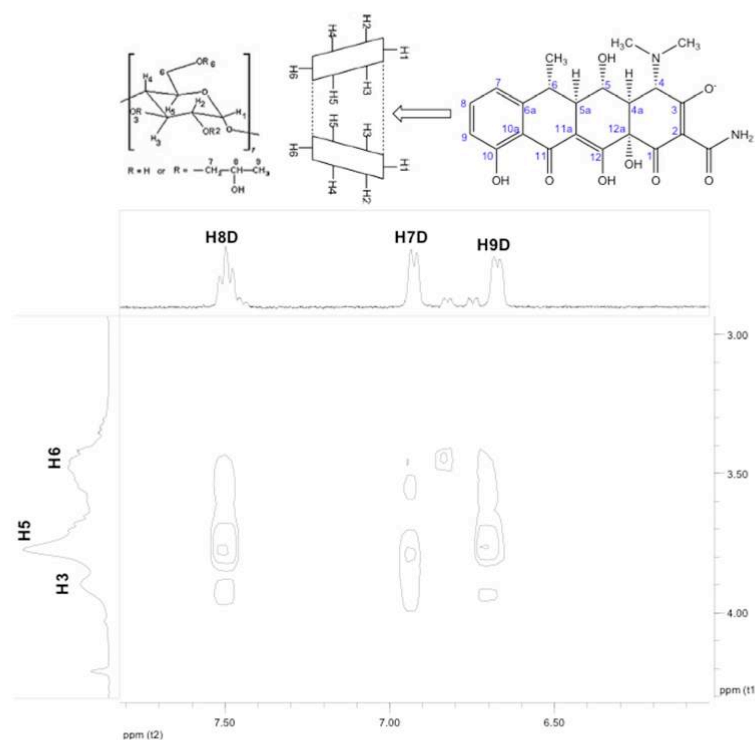


Figure 2. Expanded view of the NMR 2D-ROESY contour map (400 MHz, spin lock = 600 ms) obtained for the DOX/HpβCD/D2O system
58x56mm (300 x 300 DPI)

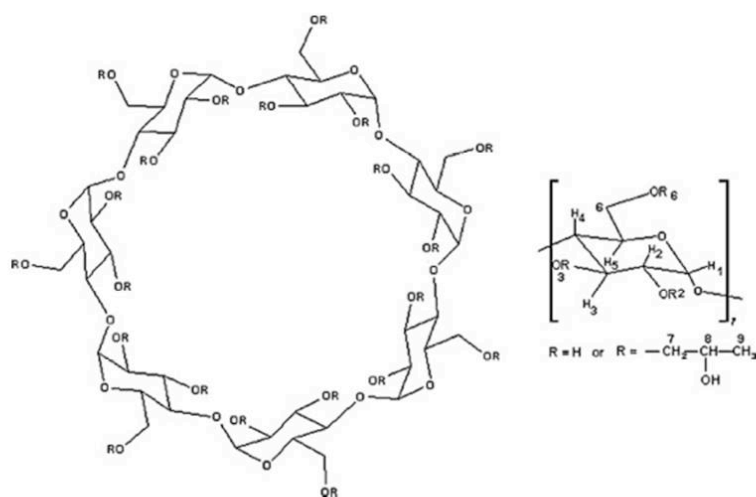


Figure 3. Structure of Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
45x29mm (300 x 300 DPI)

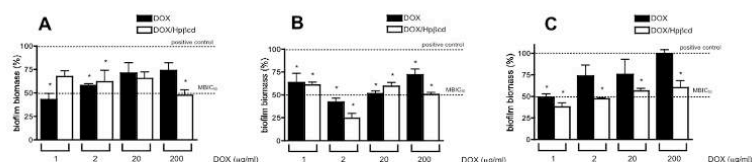


Figure 4. Biofilm Biomass (%) of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) after treatment with doxycycline (DOX) and 1:1 DOX/HpβCd after 4h (A), 16h (B) and 24h (C) of exposure assessed with crystal violet assay. DOX was normalized in all groups at 1, 2, 20 and 200µg/ml. Mean values \pm SD for at least three replicates are illustrated. * Indicates statistical significance when compared with positive control ($p < 0.05$).

110x24mm (300 x 300 DPI)

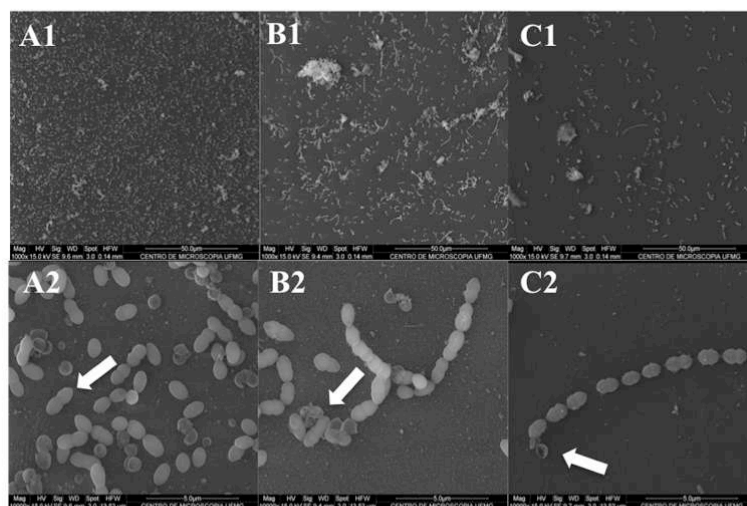


Figure 5. SEM micrographs of A.a biofilms non-threatened (A1 and A2), cells treated with 1µg/ml of DOX (B1 and B2) and 1µg/ml of DOX/HpβCd (C1 and C2) after 24h of exposure to a 24h A.a biofilm. Micrographs of A1 to C1 groups were presented in a magnification of 1000x, while A2 to C2 were presented in a magnification of 10000x. 72x48mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Minimal Inhibition concentration of doxycycline (DOX) and DOX/Hp β Cd (μ g/mL) inclusion compound at 1:1 molar ratio against planktonic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a).

Groups	MIC (μ g/mL)	MIC (μ mol/L)
DOX	2.0	4,1
DOX/Hp β Cd	0.5	0,27
Hp β Cd	-----	-----

ANEXO A – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA DOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 DOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (DOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 4HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilme 4h Dox

One-way analysis of variance

P value 0,0036

P value summary **

Are means signif. different? ($P < 0.05$) Yes

Number of groups 9

F 4,263

R squared 0,6189

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 1,348 8 0,1685

Residual (within columns) 0,8299 21 0,03952

Total 2,177 29

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

Biofilm vs 1:1dox 1 0,3375 2,401 $P > 0.05$ -0.06873 to 0.7437

Biofilm vs dox 1 0,6732 4,789 $P < 0.01$ 0.2669 to 1.079

Biofilm vs 1:1dox 2 0,4158 2,958 $P < 0.05$ 0.009601 to 0.8221

Biofilm vs dox 2 0,4682 3,331 $P < 0.05$ 0.06193 to 0.8744

Biofilm vs 1:1 dox 20 0,3662 2,605 $P > 0.05$ -0.04007 to 0.7724

Biofilm vs dox 20 0,2878 2,048 $P > 0.05$ -0.1184 to 0.6941

Biofilm vs 1:1 dox 200 0,6115 4,350 $P < 0.01$ 0.2053 to 1.018

Biofilm vs dox 200 0,2522 1,794 $P > 0.05$ -0.1541 to 0.6584

ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA DOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 DOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (DOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 16HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilm 16h Dox

One-way analysis of variance

P value P<0.0001

P value summary ***

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 22,96

R squared 0,8974

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 5,635 8 0,7043

Residual (within columns) 0,6443 21 0,03068

Total 6,279 29

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

Biofilm vs 1:1dox 1 0,7342 5,928 P < 0.01 0.3762 to 1.092

Biofilm vs dox 1 0,6825 5,511 P < 0.01 0.3246 to 1.040

Biofilm vs 1:1dox 2 1,465 11,83 P < 0.01 1.107 to 1.823

Biofilm vs dox 2 1,104 8,915 P < 0.01 0.7462 to 1.462

Biofilm vs 1:1 dox 20 0,7625 6,156 P < 0.01 0.4046 to 1.120

Biofilm vs dox 20 0,9258 7,475 P < 0.01 0.5679 to 1.284

Biofilm vs 1:1 dox 200 0,9428 7,612 P < 0.01 0.5849 to 1.301

Biofilm vs dox 200 0,5098 4,116 P < 0.01 0.1519 to 0.8678

ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA DOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 DOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (DOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 24HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilm 24h Dox

One-way analysis of variance

P value 0,0002

P value summary ***

Are means signif. different? ($P < 0.05$) Yes

Number of groups 9

F 7,448

R squared 0,7680

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 5,327 8 0,6659

Residual (within columns) 1,609 18 0,08941

Total 6,937 26

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

Biofilm vs 1:1dox 1 1,312 5,374 $P < 0.01$ 0.5942 to 2.030

Biofilm vs dox 1 1,077 4,410 $P < 0.01$ 0.3589 to 1.794

Biofilm vs 1:1dox 2 1,110 4,547 $P < 0.01$ 0.3922 to 1.828

Biofilm vs dox 2 0,5547 2,272 $P > 0.05$ -0.1631 to 1.272

Biofilm vs 1:1 dox 20 0,9227 3,779 $P < 0.01$ 0.2049 to 1.640

Biofilm vs dox 20 0,5153 2,111 $P > 0.05$ -0.2024 to 1.233

Biofilm vs 1:1 dox 200 0,8417 3,447 $P < 0.05$ 0.1239 to 1.559

Biofilm vs dox 200 0,009667 0,03959 $P > 0.05$ -0.7081 to 0.7274

ANEXO D – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA AMOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 AMOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (AMOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 4HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilm 4hs Amx

One-way analysis of variance

P value 0,1680

P value summary ns

Are means signif. different? ($P < 0.05$) No

Number of groups 8

F 1,747

R squared 0,4332

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 4045 7 577,8

Residual (within columns) 5291 16 330,7

Total 9336 23

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

1:1amx 1 vs amx 1 23,80 1,603 $P > 0.05$ -19.56 to 67.16

1:1amx 1 vs 1:1amx 2 -1,000 0,06735 $P > 0.05$ -44.36 to 42.36

1:1amx 1 vs amx 2 3,233 0,2178 $P > 0.05$ -40.12 to 46.59

1:1amx 1 vs 1:1 amx 20 16,97 1,143 $P > 0.05$ -26.39 to 60.32

1:1amx 1 vs amx 20 -7,567 0,5096 $P > 0.05$ -50.92 to 35.79

1:1amx 1 vs 1:1 amx 200 32,83 2,211 $P > 0.05$ -10.52 to 76.19

1:1amx 1 vs amx 200 13,60 0,9159 $P > 0.05$ -29.76 to 56.96

ANEXO E – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA AMOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 AMOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (AMOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 16HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilm 16h

One-way analysis of variance

P value P<0.0001

P value summary ***

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 8,140

R squared 0,7562

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 5,168 8 0,6460

Residual (within columns) 1,667 21 0,07936

Total 6,834 29

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

Biofilm vs 1:1amx 1 0,9142 4,589 P < 0.01 0.3385 to 1.490

Biofilm vs amx 1 0,9512 4,775 P < 0.01 0.3755 to 1.527

Biofilm vs 1:1amx 2 1,193 5,988 P < 0.01 0.6172 to 1.769

Biofilm vs amx 2 1,166 5,854 P < 0.01 0.5905 to 1.742

Biofilm vs 1:1 amx 20 0,7825 3,928 P < 0.01 0.2068 to 1.358

Biofilm vs amx 20 0,9528 4,783 P < 0.01 0.3772 to 1.529

Biofilm vs 1:1 amx 200 0,9988 5,014 P < 0.01 0.4232 to 1.575

Biofilm vs amx 200 0,5115 2,568 P > 0.05 -0.06418 to 1.087

ANEXO F – ANÁLISE ESTATÍSTICA ONE WAY ANOVA DA AMOXICICLINA E DO COMPOSTO 1:1 AMOXICICLINA /HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (AMOX/Hp β Cd) NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2, 20 E 200 $\mu\text{g/mL}$ APÓS 24HS DE EXPOSIÇÃO A UM BIOFILME DE 24H DE *Aa*.

Table Analyzed

Biofilm 24h

One-way analysis of variance

P value 0,0191

P value summary *

Are means signif. different? ($P < 0.05$) Yes

Number of groups 9

F 3,203

R squared 0,5874

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 2,322 8 0,2902

Residual (within columns) 1,631 18 0,09059

Total 3,952 26

Multiple Comparison Test Mean Diff. q P value 95% CI of diff

Biofilm vs 1:1amx 1 0,6213 2,528 $P > 0.05$ -0.1012 to 1.344

Biofilm vs amx 1 0,4850 1,974 $P > 0.05$ -0.2375 to 1.208

Biofilm vs 1:1amx 2 0,8907 3,624 $P < 0.05$ 0.1682 to 1.613

Biofilm vs amx 2 0,5117 2,082 $P > 0.05$ -0.2108 to 1.234

Biofilm vs 1:1 amx 20 0,8127 3,307 $P < 0.05$ 0.09015 to 1.535

Biofilm vs amx 20 0,3523 1,434 $P > 0.05$ -0.3702 to 1.075

Biofilm vs 1:1 amx 200 0,9817 3,995 $P < 0.01$ 0.2592 to 1.704

Biofilm vs amx 200 0,8380 3,410 $P < 0.05$ 0.1155 to 1.561