

KARINA IMACULADA ROSA TEIXEIRA

**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**

BELO HORIZONTE

2008

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA, UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS**

KARINA IMACULADA ROSA TEIXEIRA

**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**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra

Belo Horizonte, 2008.

T266e Teixeira, Karina Imaculada Rosa
2008 Estudo das alterações da membrana celular de microorganismos por compostos de inclusão de clorexidina:Beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura / Karina Imaculada Rosa Teixeira, 2008
T 117 fls.:il.
Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia
1. Membrana Celular – Teses. 2. Clorexidina – Farmacologia - Teses . I. Cortés Segura, Maria Esperanza II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	IX
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO LENTA DE FÁRMACOS.....	28
2.2 JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVO GERAL.....	37
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 EQUIPAMENTOS.....	38
4.2 PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO.....	38
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	39
4.3.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.....	39
4.3.2 ANÁLISE TÉRMICA.....	39
4.3.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	39

4.3.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	40
4.4 AVALIAÇÃO DA SUBSTANTIVIDADE EM DENTINA BOVINA.....	40
4.5 TESTES MICROBIOLÓGICOS.....	41
4.5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	41
4.5.2 DOSAGEM DE LÍPIDEOS.....	42
4.5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	43
4.5.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	44
5.RESULTADOS.....	47
5.1.CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	47
5.1.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.....	47
5.1.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	49
5.1.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	53
5.1.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	55
5.2 AVALIAÇÃO DA SUBSTANTIVIDADE EM DENTINA BOVINA.....	56
5.3 TESTES MICROBIOLÓGICOS.....	58
5.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
5.3.2 DOSAGEM DE LÍPIDEOS.....	60
5.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	62
5.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	62
5.4.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	75
6. DISCUSSÃO.....	92
7. CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da liberação controlada de fármacos.....	14
Figura 2. Representação esquemática do Cloridrato de Clorexidina.....	16
Figura 3. Representação esquemática da estrutura celular bacteriana.....	17
Figura 4. Desenho esquemático da estrutura da membrana celular.....	19
Figura 5. Representação esquemática do citoesqueleto das células eucariotas.....	21
Figura 6. Microscopia Eletrônica confocal: colônia primária de <i>A.a.</i>	24
Figura 7- Desenho esquemático dos possíveis arranjos moleculares resultantes da interação de Clorexidina-beta-ciclodextrina.....	28
Figura 8. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.....	29
Figura 9. Representação esquemática da liberação controlada de Fármacos utilizando-se polímeros biodegradáveis.....	31
Figura 10. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais α , β e γ	32
Figura 11. Difrátogramas de raios -X do Cloridrato de Clorexidina; Cx: β -cd 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; β -ciclodextrina.....	48
Figura 12. Curvas TG do cloridrato de Clorexidina e compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4.....	51
Figura 13. Curvas DTA do cloridrato de Clorexidina e compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4.	52

Figura 14. Espectro da região do infravermelho da β -cd, Cx: β -cd 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e Cx.....	54
Figura 15 A. Espectro de RMN H para o cloridrato de clorexidina.....	55
Figura 15 B. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear dos compostos de Inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1.....	56
Figura 16. Substantividade em dentina bovina de géis de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e cloridrato de clorexidina (Cx).....	58
Figura 17. Percentual do esterol de membranas de <i>C.a.</i> pela Técnica MQE.....	60
Figura 18. Micrografias do cloridrato de clorexidina (esquerda) e clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 (direita) no aumento 5000x.....	63
Figura 19. Micrografias de compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 e clorexidina: beta ciclodextrina 1:3 respectivamente com aumento de 5000x.....	63
Figura 20. Micrografia de compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4 e beta ciclodextrina respectivamente com aumento de 5000x.....	65
Figura 21. Micrografias do <i>A.a.</i> cultivado em caldo sabouraud dextrosado em aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	65
Figura 22. Micrografias do <i>C.a.</i> cultivado em caldo BHI em aumento de 5000 e 10000x.....	66
Figura 23. Micrografias do <i>Aa</i> cultivado na presença de cloridrato de clorexidina com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	66
Figura 24. Micrografias do <i>A.a</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	68
Figura 25. Micrografias do <i>A.a</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	68

Figura 26. Micrografias do <i>A.a</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3 com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	70
Figura 27. Micrografias do <i>A.a</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4 com aumento de 5000 e 10000x.....	70
Figuras 28. Micrografias da <i>C.a.</i> cultivado na presença de cloridrato de clorexidina com aumento de 5000 e 10000x respectivamente.....	72
Figuras 29. Micrografias do <i>C.a.</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	72
Figuras 30. Micrografias do <i>C.a.</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 com aumento de 5000 e 10000x respectivamente.....	73
Figuras 31. Micrografias do <i>C.a.</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3 com aumento de 5000 e 10000x respectivamente.....	73
Figuras 32. Micrografias do <i>C.a.</i> cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4 com aumento de 5000 e 10000 x respectivamente.....	74
Figura 33. Micrografia de Força atômica do microrganismo <i>A.a.</i> cultivado na ausência dos fármacos.....	76
Figura 34. Micrografia de Força atômica dos compostos do cloridrato de clorexidina.....	77
Figura 35. Micrografia de Força atômica da beta-ciclodextrina.....	79
Figura 36. Micrografia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1.....	80
Figura 37. Micrografia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2.....	81

Figura 38. Micrografia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3.....	82
Figura 39. Microscopia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4.....	84
Figura 40. Microscopia de Força atômica dos compostos de cloridrato de clorexidina na presença de <i>A.a</i>	85
Figura 41. Microscopia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1.....	86
Figura 42. Microscopia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 na presença de <i>A.a</i>	88
Figura 43. Microscopia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3 na presença de <i>A.a</i>	89
Figura 44. Microscopia de Força atômica dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4 na presença de <i>A.a</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATP.....	adenosil tri-fosfato
<i>B.f.</i>	<i>Bacterioides fragillis</i>
β -cd.....	Beta-ciclodextrina
BHI.....	Brain Heart Infusion
Ca.....	Cálcio
<i>C.a</i>	<i>Candida albicans</i>
Cd.....	Ciclodextrina
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
Cx.....	Clorexidina
Cx: β -cd.....	Clorexidina:beta-ciclodextrina
DNA.....	desoxiribonucleic acid
DSC.....	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA.....	Derivada da Análise Térmica Diferencial
<i>E.f.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
E.l.....	<i>Enterobacter lentum</i>
EPS.....	exopolissacarídeos
Et al.....	e colaboradores

FT-IR.....	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<i>F.n</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g/mol.....	gramas por mol
IC ₉₀	Concentração inibitória 90%
K.....	Potássio
LPS.....	Lipopolissacarides
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET.....	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFA.....	Microscopia Eletrônica de Força Atômica
mg.....	miligramas
mL.....	mililitros
Mm.....	Massa molar
MQE.....	Método de Quantificação do Esterol
µg.....	microgramas
µm.....	micrometros
nm.....	nanômetros
NCCLS.....	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
PLGA.....	Polímeros de acido láctico e poliglicólico
%.....	por cento
R-X.....	Raios-X

RMN.....Ressonância Magnética Nuclear

S.m.....*Streptococcus mutans*

UFC.....Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) para <i>A.a.</i> (<i>Y4-FDC</i>) e <i>C.a</i> (<i>ATCC 18804</i>).....	59
--	----

RESUMO

A formação de compostos de inclusão de clorexidina para a liberação controlada de antimicrobianos tem mostrado diminuição das concentrações terapêuticas efetivas. Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses compostos de inclusão em relação aos microrganismos. Dessa maneira o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar compostos de inclusão e estudar o mecanismo de ação antimicrobiana dos compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina (Cx:β-cd) nas células bacterianas e fúngica. Foram preparados compostos de inclusão Cx:β-cd em 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4 proporções molares, pelo método de liofilização. Foi feita a caracterização físico-química dos compostos por Difractometria de raios-X, Análise térmica e Ressonância Magnética Nuclear. Os testes de substantividade dos compostos de inclusão de (Cx:β-cd) foram realizados a partir de géis à base de hidroximetil-propilcelulose. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Cx:β-cd foi determinada para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) e *Candida albicans* (*C.a*). A análise dos mecanismos de ação relacionados à membrana foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA) dos microrganismos cultivados e pela Técnica MQE (Método de Quantificação do Esterol). A CMI para os compostos de inclusão foi de 2 µg/mL para *A.a* e 1 µg/mL para *C.a* em todos os grupos. Na MEV foi possível avaliar a morfologia celular e dos fármacos. No grupo da Cx foram observadas estruturas disformes sugestivas de células bacterianas rodeadas por partículas menores semelhantes aos compostos. A desorganização celular foi significativamente maior com o aumento da proporção de ciclodextrina nos compostos, sendo que nas razões molares 1:3 e 1:4 foram observados grandes agregados mistos de

Cx: β -cd e restos bacterianos em contraste com o grupo Cx onde o microorganismo apresentou-se com estrutura coco - bacilar característica ou formando colônias. Para o teste do MQE nos grupos 1:3 e 1:4 o ergosterol ficou significativamente diminuído, com variação de mais de 100% quando comparado às outras substâncias testadas. A MFA mostrou defeitos na membrana resultado da solubilização de lipídeos na região dos domínios dos fármacos testados. O aumento da solubilização dos domínios membranares é diretamente proporcional a concentração de beta- ciclodextrina sendo mais evidente na razão 1:2.

Conclui-se que a ciclodextrina aumenta as ligações com a membrana celular dos compostos de inclusão de Cx: β -cd em nanoagregados, possivelmente influenciadas pela combinação sinérgica de fatores como interações eletrostáticas (entre as cargas negativas da membrana e positivas da clorexidina), tensão superficial, espessura da parede celular.

ABSTRACT

The formation of chlorhexidine inclusion compounds, chlorhexidine:beta-cyclodextrin (Cx: β -cd), for controlled release of the antimicrobial, has shown decreasing in therapeutic concentrations with same effectiveness. However, few studies have been published trying to elucidate the inhibition mechanism. Thus the objective of this work was to prepare and characterize Cx: β -cd inclusion compounds, and also to advance in studying its antimicrobial mechanism of action against bacterial and fungal cells, in various molar proportions prepared by the freeze-dried method. Drug release studies were performed within a 10 days release period. Bovine teeth were included in paraffin blocks, with normalized root-dentin surfaces areas (4 x 8mm) treated for 5 minutes with 75 mg hydroxy-metil-propyl cellulose gels containing 128 μ g/mL of Cx. The gel was washed out in distilled water and the samples were left in plastic vials containing 1 mL buffer solution which was replaced daily. The release media was analyzed using UV-spectrophotometry at 275 nm wavelength. The daily released Cx amount was obtained and the results submitted to the ANOVA statistical test. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Cx: β -cd was determined against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) and *Candida albicans* (*C.a.*). The mechanisms of action analysis in relation to the grown microorganisms membrane was achieved by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (MFA) and the SQM (Sterol Quantification Method) technique. The MIC was 2 μ g/ mL for *A.a* and 1 μ g/ mL for *C.a.* in all groups. SEM assed the cellular and drug morphology. Cx group showed amorphous structures suggesting bacterial cells surrounded by smaller particles, presumably drug compounds. Cell disorganization was significantly higher increasing Cx proportion within the compounds in

the proportion of cyclodextrin compound,. Molar proportions 1:3 and 1:4 groups showed large aggregates mixed with bacterial remains contrasting the Cx_group, in which the microorganism presented a typical coccus-bacilli structure, or forming colonies. For the SQM test, groups 1:3 and 1:4 showed a significantly decreased ergosterol, 100% higher when compared to other tested substances. The AFM showed membrane defects, as consequence of solubilization of membrane lipids related to the tested drugs. Increasing the solubilization of the membrane areas is directly proportional to beta-cyclodextrin concentration, being more evident in the 1:2 ratio. In conclusion, cyclodextrin increases the bondings of inclusion compounds and nanoaggregates with the cell membrane possibly influenced by the synergistic combination of factors such as electrostatic interactions, surface tension and thickness of the cell wall.

1. INTRODUÇÃO

A clorexidina é um anti-séptico usado como coadjuvante no tratamento periodontal, infecções dermatológicas, feridas da pele, infecções oftálmicas e de garganta e tem sido sugerido para uso em endodontia (Teixeira e Cortés, 2005). A principal característica desse anti-séptico é a substantividade, isto é a capacidade de se adsorver às superfícies sendo retida por algumas estruturas da cavidade oral como a hidroxiapatita, proteínas salivares e polissacarídeos extra-celulares bacterianos. Liga-se fortemente a grupos negativamente carregados (ex: grupos OH^-) (Trombelli et al, 1994, Komorowski et al, 2000).

Este antimicrobiano é ativo contra um largo espectro de bactérias Gram positivas e negativas, aeróbios e anaeróbios, bem como espécies de fungos e vírus (Martindale, 1982). Não tem sido relatada resistência bacteriana, após a aplicação, a microbiota foi então mais numericamente reduzida do que seletivamente (Martin et al, 1987). A clorexidina também é um efetivo agente anti-fúngico, tendo efeito principalmente contra a *Candida albicans* (*C.a.*) (Ellepola e Saramanayake, 2001; Budtz-Jorgensen e Lombardi, 1996; Baker et al, 1979; Patel et al, 2001).

Durante muito tempo, a forma mais utilizada da clorexidina tem sido a solução de gluconato de clorexidina a 0,12%. Contudo, para a cavidade bucal o uso de soluções oferece efeitos passageiros, especialmente provocados pela renovação constante da saliva e do muco, substrato biológico (Baker et al., 1979; Netuschil et al, 2003).

Com o intuito de prolongar a atividade antimicrobiana da clorexidina, uma nova abordagem tem sido proposta para este fármaco, os sistemas de liberação controlada. Assim a obtenção de um sistema de liberação controlada para a clorexidina é proposta visando prolongar a sua atividade antimicrobiana. O grande desafio terapêutico é

conseguir um sistema antimicrobiano eficaz que mantenha a concentração inibitória mínima por um determinado período de tempo e reduza a incidência de re-infecção e de efeitos adversos.

Recentemente estudos têm demonstrado a eficácia e vantagens de sistemas de liberação controlada de antimicrobianos em relação aos fármacos tradicionais. Aliando o uso de baixas concentrações, menor número de aplicações e em casos de dispositivos biodegradáveis a vantagem de não ter que retirá-los (Figura 1). Além disso, esses dispositivos têm se mostrado mais biocompatíveis, atenuando os efeitos tóxicos e colaterais dos fármacos associados aos carreadores (Langer, 1990; Langer, 2003). A produção de dispositivos mais próximos das condições ideais, com uma liberação estável durante um período de tempo e em concentrações terapêuticas com efeitos colaterais e citotóxicos mínimos continua como objetivo farmacológico, bem como conhecer os mecanismos pelo qual esses agentes interagem com as células dos microrganismos patogênicos e com as próprias células do organismo.

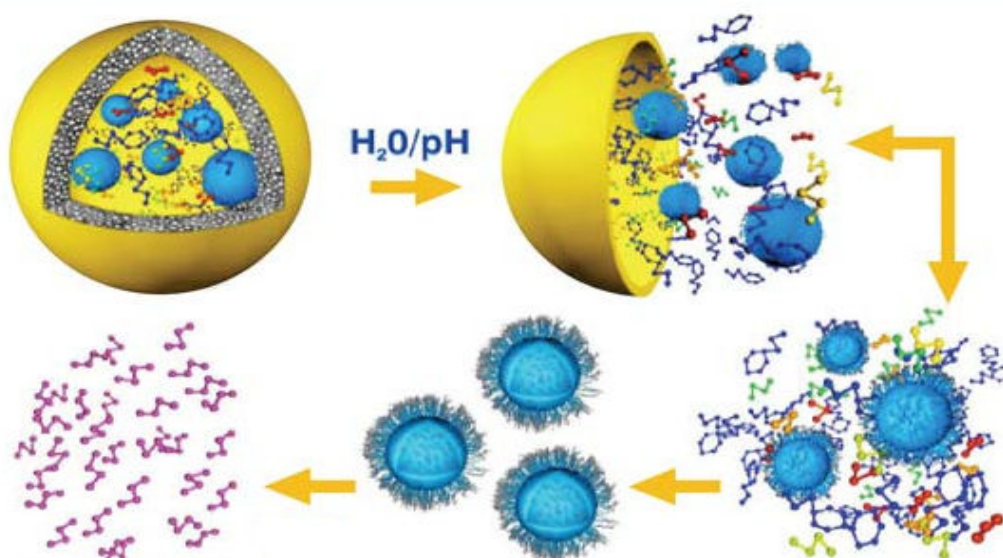


Figura 1. Desenho esquemático da liberação controlada de fármacos a partir de microesferas. Fonte: <http://www.superfund.pharmacy.arizona.edu>.

Entre outras estratégias encontradas na literatura visando melhorar as propriedades físico-químicas e/ou biológicas estão os compostos de inclusão com ciclodextrinas. Os compostos de inclusão formados pela inclusão molecular da clorexidina e a beta-ciclodextrina apresentam potencial aplicação no controle químico do biofilme bacteriano em doses e concentrações menores que aquelas já usadas em soluções, bochechos e géis de clorexidina pura. Dessa maneira, esses novos sistemas de liberação lenta de clorexidina diminuiriam os efeitos colaterais da clorexidina, tais como o manchamento dental, a descamação de mucosa bucal, perda temporária do paladar assim como o sabor desagradável (Cortés et al, 2001; Cortés 1999, Szejtli 1998).

Resultados microbiológicos da atividade dos compostos de inclusão de clorexidina-beta-ciclodextrina, assim como de outros antibióticos incluídos tais como tetraciclina, têm mostrado ser até quatro vezes mais efetivos que os fármacos correspondentes livres (Cortés et al, 2001; Pataro et al, 2003; Diniz , 2007).

Por outro lado, os autores encontraram uma forte correlação da atividade antimicrobiana com a estrutura molecular fornecida pelas diferentes razões molares dos compostos supramoleculares formados (Diniz, 2007; Denadai et al, 2007).

Então é de interesse determinar os mecanismos pelos quais estes compostos interagem com os microrganismos alvo. Assim o presente trabalho se propõe a fazer um estudo das alterações de membrana dos microrganismos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Candida albicans* após tratamento com compostos de inclusão de clorexidina:beta-ciclodextrina. O *A.a* foi selecionado por pertencer à microbiota residente da cavidade oral e por ser o microrganismo predominante em formas agressivas da doença periodontal. A *C.a* foi selecionada por ser uma levedura encontrada na microbiota de todas as superfícies do organismo estando envolvida em diversas infecções oportunistas e também em casos de infecções refratárias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A clorexidina (Cx) é um agente químico de alta efetividade no controle do biofilme dental. Esse anti-séptico é formado por duas guanidas ligadas a uma ponte de metileno com seis carbonos e com a atividade antibacteriana ocorrendo em pH fisiológico. A fórmula estrutural do cloridrato de clorexidina está apresentada na Fig.2 (Hugo e Longworth, 1964).

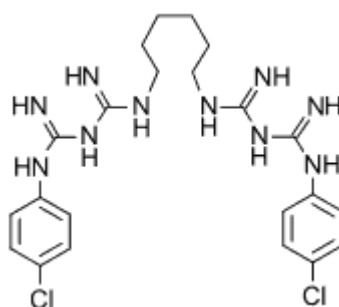


Figura 2. Fórmula estrutural do Cloridrato de Clorexidina

Fonte: [http://: www.upload.wikipedia.org](http://www.upload.wikipedia.org).

A clorexidina tem efeito dose-dependente, em baixas concentrações é bacteriostático e em concentrações mais altas apresenta atividade bactericida. Lang e Brex, (1986); Bonesvoll e Gjermo (1978) demonstraram que ela também se liga aos tecidos, mudando seu campo elétrico para competir com a ligação bacteriana. Para Gjermo (1989) sua ação pode estar envolvida com a aderência das bactérias na superfície pela competição de íons cálcio, e pela formação de pontes de cálcio entre as bactérias e a cavidade bucal.

O efeito antimicrobiano da clorexidina é mediado por diversos mecanismos. Hugo e Longworth (1964), afirmaram que o mecanismo de ação da Cx está associado, inicialmente à adsorção à parede celular bacteriana (Figura 3), facilitada por suas

propriedades catiônicas, isto é, as moléculas com cargas positivas de clorexidina se unem às cargas negativas da parede celular, principalmente aos grupos fosfato dos lipopolissacarídeos e grupos carboxílicos das proteínas.

A Cx é capaz de alterar a hidrofobicidade da membrana celular (Figura 3) por ligação a grupos catiônicos desorganizando a bicamada lipídica, e como consequência, leva ao aumento da curvatura da membrana, induzindo defeitos locais. Após contato com a clorexidina, ocorre um aumento da permeabilidade celular, em situações fisiológicas essa permeabilidade da membrana é menor e aumenta em função da ligação do fármaco à membrana celular. A Cx é capaz de se ligar ao receptor cardiolipina, que é um dos maiores receptores de membrana encontrado nos microrganismos e se localiza preferencialmente em um dos pólos bacterianos.

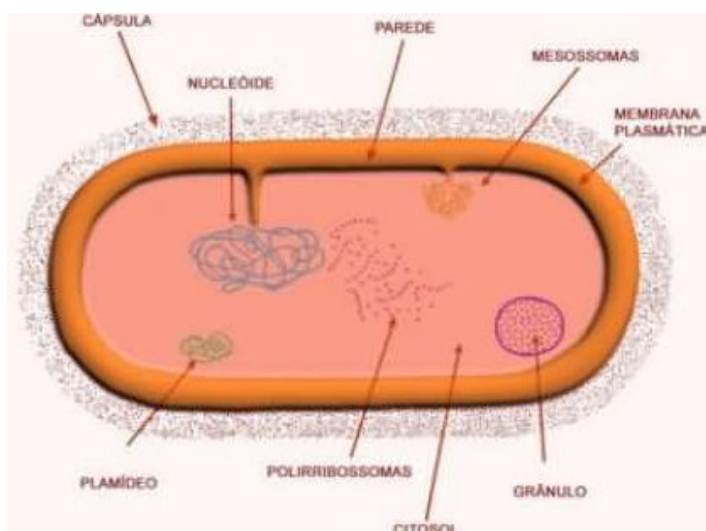


Figura 3. Representação esquemática da estrutura celular bacteriana Fonte:

<http://www.ficharioonline.com-imagens>

Por outro lado, Rye e Wiseman (1966) demonstraram que o mecanismo bactericida da clorexidina é devido à interferência com o transporte da membrana

produzindo um desequilíbrio osmótico, iniciando a saída de substâncias citoplasmáticas de baixo peso molecular, a precipitação e/ou coagulação das proteínas, causando lise celular (Figura 4).

O aumento da permeabilidade celular aumenta o efluxo de substâncias para dentro da célula, aumentando também a concentração do antimicrobiano dentro da célula. A exposição de grupos hidrocarbonados permite que moléculas polares e íons metálicos entrem nas células. No entanto, existem outros fatores envolvidos neste efeito bactericida uma vez que as bactérias podem suportar grandes mudanças na fluidez de seus lipídeos sem afetar o seu crescimento, quando isso acontece, alguns íons se movem no interior da membrana e sendo capazes de prolongar as condições de sobrevivência destes microrganismos (Lang e Brex, 1986; Bonesvoll e Gjermo, 1978).

Marsh et al (1983) afirmaram que baixas concentrações (menores que 0,24mM) de clorexidina inibem o metabolismo dos açúcares via sistema fosfoenol-piruvato-fosfotransferase em microrganismos do grupo *Streptococcus*. A clorexidina inibe a produção de ácido pelos *Streptococcus* e reduz a acidogênese da placa *in vivo*.

Iwami et al (1995) avaliaram o efeito de concentrações de 0,075 a 0,20mM de clorexidina na inibição da glicólise em *Streptococcus mutans* (*S.m.*) e relataram que a produção de ácido láctico, acético decresce à medida que aumenta a concentração de clorexidina, tendo uma forte diminuição no ácido láctico quando usado de 0,1 a 0,15mM de clorexidina. Concluindo que a clorexidina age sobre os metabólitos intracelulares, inibindo a glicólise nos *S. m.* Estes autores sugerem que variações na ação da clorexidina nas bactérias ocorrem em função de variações próprias do metabolismo celular de cada grupo. Sendo as bactérias Gram positivas mais susceptíveis.

A estrutura biológica da membrana é uma bicamada lipídica (Figura 4), composta por camada dupla de fosfolípides (aproximadamente 4 μm de comprimento) com proteínas ocasionalmente inseridas com a função de formar canais iônicos. As moléculas de água se ligam a estes fosfolípides, proteínas e outros constituintes resultando em uma fina camada de água de aproximadamente 1 nm (aproximadamente a espessura de 3 moléculas de água) de cada lado da membrana. Em geral compostos hidrofílicos na superfície da membrana são afetados pela capacidade da superfície da membrana em formar ligações de hidrogênio com a água. A auto-associação de moléculas de água e outras interações mais fortes com superfícies hidrofóbicas é um fenômeno análogo ao efeito hidrofóbico observado quando solutos não-polares são dissolvidos em água (Loftsson e Brewster, 2007)

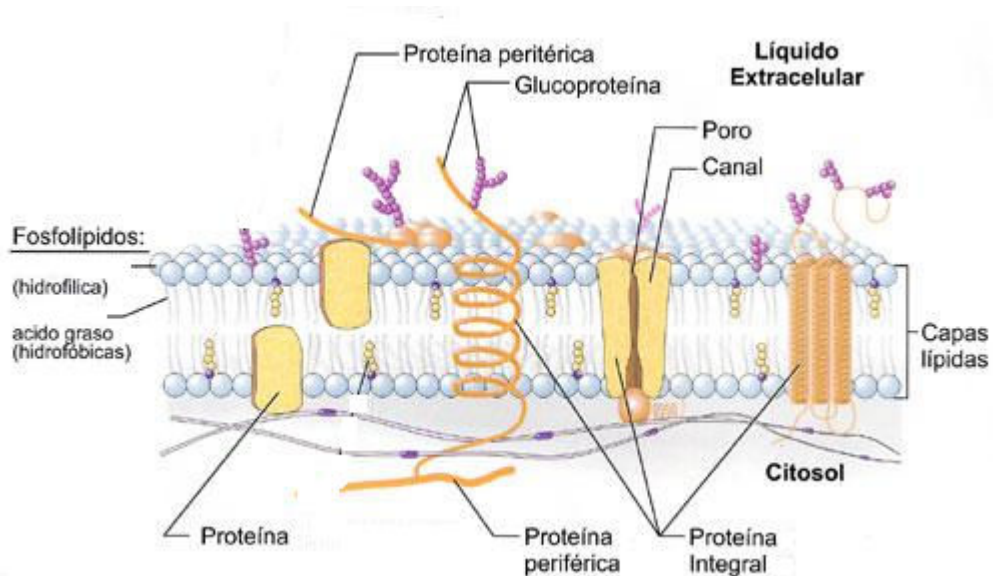


Figura 4. Desenho esquemático da estrutura da membrana celular (Modelo Mosaico fluido). Fonte: <http://www.ficharioonline.com-imagens>.

Recentemente, comprovou-se que a clorexidina inibi a atividade de matrizes de metaloproteinases bem como a proliferação celular, principalmente de células mononucleares (Gendron et al, 1999) como também diminui a resposta blastogênica de

linfócitos em pacientes periodontais (Lucarotti et al, 1990). Contudo, de acordo com os estudos de Bonacorsi et al., (2004) a clorexidina não apresenta atividade imuno estimulante e em concentrações subtóxicas não afeta a resposta dos macrófagos, porém pode interferir no estímulo receptor dependente de lipopolissacarídeos (LPS) (Hidalgo e Dominguez, 2001). De acordo com Knuutila e Söderling (1981) e Gianelli et al (2008) a clorexidina tem efeitos citotóxicos sobre uma variedade de células eucarióticas e bacterianas, estimulando a liberação de enzimas lisossômicas e inibindo as atividades glicosídicas e proteolíticas da célula.

Em relação à sua atividade tóxica em células eucarióticas a clorexidina apresenta diferentes níveis de toxicidade dependendo do tipo de célula que é afetada. Células epidérmicas, endoteliais, mucosas e osteoblastos são mais susceptíveis a este efeito enquanto tem pouco efeito sobre a proliferação celular. Em cultura de osteoblastos a exposição à clorexidina 0,12% provocou lise em 80% das células, com danos incluindo a fragmentação do DNA (Gendron et al, 1999; Gianelli et al, 2008).

Em uma célula eucariota saudável, os filamentos de actina estão organizados como uma rede ancorada na membrana plasmática através de forças de adesão de sítio que contém vinculina (figura 5). Após o tratamento, os filamentos parecem se dispersar e se distribuir de forma irregular no citoplasma. Estas alterações sobre o citoesqueleto são intensas, provocando progressiva liberação do substrato, sugerindo a capacidade destes compostos em induzir dano celular irreversível. A desorganização da actina prejudica o crescimento celular e pode levar a célula à morte. Estas alterações podem ser observadas em culturas de células endoteliais e fibroblastos (Gianelli et al, 2008).

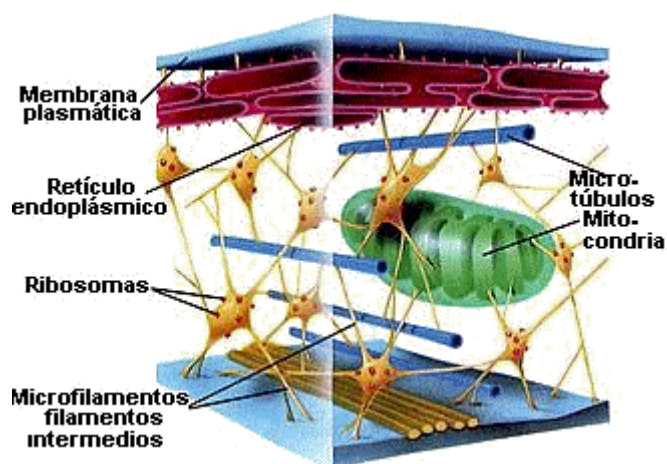


Figura 5. Representação esquemática do citoesqueleto das células eucariotas

Fonte: <http://www.biblioteca.org.ar/libros>.

O uso de formulações de clorexidina também pode interferir na atividade de enzimas mitocondriais e microsossomais. A interferência na atividade mitocondrial envolve a peroxidação lipídica que é um processo natural de dano oxidativo com conseqüências deletérias para membranas biológicas e mudanças na permeabilidade mitocondrial. As alterações da permeabilidade mitocondrial ocorrem em matrizes com concentrações suprafisiológicas de cálcio, aumentando a permeabilidade não seletiva para pequenas moléculas. Este fenômeno é conhecido como fenômeno da transição da permeabilidade mitocondrial e é um mediador da morte celular através da liberação do citocromo C e outras proteínas que induzem a apoptose como as pro-caspases 6 e 9. A perturbação do equilíbrio Ca^{2+} /citossólico tem como conseqüência o aumento da concentração do cálcio mitocondrial que por sua vez estimula excessivamente o ciclo do ácido tricarboxílico aumentando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. A ativação do Ca^{2+} /Calmodulina óxido nítrico sintase e geração de óxido nítrico provocam um stress oxidativo na célula com conseqüências para biomoléculas em todas as células DNA, proteínas e lipídios. O impacto destes eventos sobre a morte celular depende do

grau de disfunção mitocondrial, alteração no balanço eletrolítico, sendo que a necrose é consequência da depleção do ATP (adenosil-trifosfato) (Newton et al, 2004).

Os biofilmes bacterianos têm um importante impacto clínico, o que tem inspirado muitos pesquisadores a investigar os mecanismos reguladores, formação e dissolução destes sistemas com o objetivo principal de identificar objetivos específicos para a ação dos agentes quimioterápicos (Jefferson, 2004). Os biofilmes, e principalmente o oral, que é o mais complexo do organismo apresentam propriedades dinâmicas intrínsecas, que são constantemente moduladas por fatores ambientais e biológicos, como a dieta e o sistema imune do hospedeiro (Gu et al, 2005).

Ainda utilizando como exemplo o biofilme oral, a placa dentária é um biofilme bacteriano composto por mais de 400 espécies de bactérias nos tecidos moles e duros da boca e incorporadas na matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (EPS) de origem bacteriana e salivar. Só uma proporção relativamente pequena das bactérias presentes na placa está implicada em estados patológicos como carie e a doença periodontal. No entanto, no que diz respeito ao processo saúde-doença, é importante determinar a arquitetura do biofilme a qual tem efeitos no potencial de dano dos seus metabólitos, na disponibilidade de substratos e na terapia nas camadas mais profundas da placa retidas nos tecidos moles (Wood et al, 2002; Sutter et al, 1986; Summanen et al, 1996).

Atualmente é reconhecido que os biofilmes contribuem para o estabelecimento e avanço de infecções em humanos e especialmente à resistência aos agentes antimicrobianos. Os elementos no processo de formação dos biofilmes têm sido estudados como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre eles estão dispositivos elétricos que modifiquem ou reduzam a adesão bacteriana às superfícies do

organismo, que liberem antimicrobianos dirigidos aos canais do próprio biofilme. Outros sistemas utilizam polímeros biodegradáveis, lipossomas e hidrogéis reversíveis (Smith, 2005).

O conhecimento da estrutura e propriedades das superfícies microbianas a nível nanométrico é de grande importância. Embora a ultra-estrutura de superfícies microbianas venha sendo estudada desde 1975 por microscopia eletrônica, vários métodos têm sido utilizados para estudar as propriedades físico-químicas e a composição química das superfícies microbianas, entre elas espectroscopia foto eletrônica de raios-X e espectroscopia de infravermelho. Entretanto nenhuma dessas técnicas fornece informações diretas em escala nanométrica. A microscopia de força atômica, devido à sua alta resolução espacial e a habilidade de formar imagem em condições muito semelhantes às fisiológicas, é cada vez mais usadas em biologia. Esta técnica é capaz de quantificar forças e até líquidos relevantes nos processos biológicos (Chen et al, 2006; Hilal et al, 2006).

A *C.a* e outras espécies de *Candida* são organismos comensais que por uma variedade de condições de desequilíbrio hospedeiro-comensais proliferam causando doenças. Estas leveduras podem desenvolver mecanismos específicos de virulência que lhes confere a habilidade de colonizar células epiteliais do hospedeiro para invadir células de camadas mais profundas ou influenciar as defesas do organismo. Um dos mais importantes fatores de virulência da *Candida* saprófita (sp) são as fosfolipases extracelulares que são capazes de degradar constituintes fosfolipídios das membranas do hospedeiro levando à ruptura das células ou alterando suas características de superfícies, o que facilita sua aderência. A clorexidina mesmo em concentrações sub-terapêuticas leva à redução na produção de fosfolipases. Cepas de *C.a.* expostas à clorexidina a partir da concentração 0,1% apresentam mudanças na parede celular com a perda de

componentes citoplasmáticos e coagulação de nucleoproteínas. No meio intracelular, a clorexidina é capaz de induzir desequilíbrios na concentração de K^+ citoplasmático com lise protoplasmática (Kadir et al, 2007; Lin et al, 2003; Ellepole e Saramanayake, 2001; Anil et al, 2001;).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Fig. 6) abrange um grupo de microorganismos Gram-negativos, de morfologia coco bacilar, capnofílico. Possui múltiplos fatores de virulência: leucotoxinas, endotoxinas, bacteriocinas, lipopolissacarídeos (LPS) e outras proteínas de membrana, e também são capazes de penetrar em células humanas. Causam infecções orais e extra-orais (endocardite, abscessos de tecidos moles, cérebro, meninges, septicemia, infecções do trato urinário e osteomielite vertebral (Piovano, 1999; Gasparetto et al, 2000; Fine et al, 2001; Patil et al, 2006; Rasmussen et al 1966).

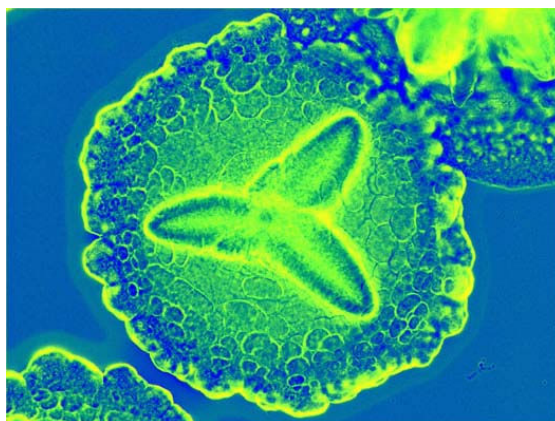


Figura 6. Microscopia Eletrônica confocal: colônia primária de *A.a.* Fonte: <http://www.scielo.org/ve>.

2.3- Estudo e aplicações dos Sistemas de liberação controlada

Após estudos de análise físico-química e estudos microbiológicos in vitro utilizando cepas referência de *Streptococcus mutans* (*S.m.*), *Enterobacterium lentum* (*E.l.*), *Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*), *Bacterioides fragilis* (*B.f.*), *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans (A.a.) e *A.a* isolado a partir de amostras colhidas em pacientes com periodontite, Cortés et al (2001) concluíram que estes microrganismos eram mais susceptíveis aos compostos de inclusão de clorexidina:beta-ciclodextrina do que à 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 contra *A.a.* e *S. m.* e a substantividade de compostos de inclusão de clorexidina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina na proporção molar 1:2 em dentina bovina *in vitro*. A atividade antimicrobiana da clorexidina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina foi observada por até 6 dias, a melhor atividade foi observada em fragmentos tratados com as concentrações 0,24% e 0,12% sendo semelhante nestas duas concentrações para *A.a.*, enquanto para *S.m.* a inibição máxima era obtida a partir de 0, 015%. Puderam concluir que a ciclodextrina modula a liberação de Clorexidina garantindo sua substantividade e liberação de maneira contínua e biologicamente ativa, sem causar danos morfológicos à superfície dentinária. Estes autores sugerem que o emprego do composto de inclusão em baixas concentrações poderia diminuir os efeitos adversos da Clorexidina como a coloração dentária.

Considerando-se estudos de liberação controlada de outros antimicrobianos, Pataro et al (2003) estudaram os efeitos de superfície, atividade antimicrobiana contra *A.a* e a desorção de complexos supramoleculares de tetraciclina:beta-ciclodextrina na razão molar 1:1 em dentina bovina e puderam concluir que complexos supramoleculares de tetraciclina apresentam liberação controlada por até 5 dias, acima da concentração inibitória para *A.a*. A atividade antimicrobiana alcançada foi a 4% para tetraciclina pura

e 1 % para os complexos supramoleculares. Pequena quantidade de Tetraciclina do composto de inclusão liberou-se após 24 horas (13 $\mu\text{g/mL}$) que corresponde à liberação inicial. A desorção máxima da tetraciclina pura foi observada após 6 horas e foi de 64 $\mu\text{g/mL}$, enquanto para o composto Tc: $\beta\text{-cd}$ foi de 25 $\mu\text{g/mL}$ no mesmo período. Estes autores concluíram que os compostos de inclusão de tc: $\beta\text{-cd}$ inibem *A.a* numa concentração mais baixa que as usualmente observadas e se liberam em baixas concentrações produzindo menos pigmentação e menor desmineralização da dentina que a tetraciclina pura.

Yue et al (2004) 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*. Os autores observaram que a liberação controlada de clorexidina se manteve durante duas semanas e que a liberação inicial, característica dos sistemas de liberação controlada, era diminuída com a complexação da ciclodextrina. Os estudos microbiológicos *in vitro* mostraram que a clorexidina derivada deste complexo está sendo liberada em sua forma ativa e que a forma do chip confeccionado é capaz de manter zonas de inibição durante uma semana em testes de difusão em ágar.

Domingues et al (2004) 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 um complexo de inclusão de tetraciclina: beta-ciclodextrina na razão molar 1:1, associado também ao biovidro. Foi observada liberação controlada de tetraciclina até oitenta dias sendo que a liberação inicial correspondeu a 12% da amostra, ocorrendo após 8 horas. Nos exames histológicos não foram observadas reações durante as primeiras 6 horas nos grupos e após 24 horas observou-se um discreto infiltrado de células

polimorfonucleares. Após 48 e 72 horas pode-se observar um infiltrado inflamatório moderado mais extenso sem diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que tetraciclina e Tetraciclina: beta-ciclodextrina quando associadas aos biovidros não representam um fator irritante adicional. A atividade antimicrobiana dos biovidros aumentou quando estavam associados ao cloridrato de tetraciclina e à tetraciclina: beta-ciclodextrina, sendo esta última mais eficiente.

Nos estudos de Dametto et al (2005) também estudaram o efeito antimicrobiano de géis de clorexidina na dentina radicular *in vitro*. Utilizando 80 pré-molares humanos recém extraídos e previamente contaminados com *Enterococcus faecalis* (*E.f.*), os dentes foram divididos em dois grupos, no primeiro utilizaram géis de clorexidina 2% como irrigante intracanal e no segundo, hipoclorito de sódio 5,25%. Foram colhidas as amostras microbiológicas dos espécimes e realizada contagem de unidades formadoras de colônia. Puderam observar que após 7 dias o grupo em que se utilizou clorexidina 2% apresentou menor contagem bacteriana.

Paquete et al (2007) realizaram um estudo de Coorte incluindo 22 pacientes entre 28- 80 anos em tratamento na clínica de endodontia da faculdade de Toronto-Canadá. Neste estudo testou-se gluconato de clorexidina 2% como medicação intracanal durante 7 e 15 dias. Anteriormente foi realizado tratamento endodôntico pelas técnicas tradicionais e irrigação intracanal com soluções de hipoclorito de sódio 2,5%. Os resultados foram mensurados por contagem de unidades formadoras de colônia e microscopia de fluorescência. Neste estudo puderam observar que houve um efeito antimicrobiano inicial. No entanto após 7 e 15 dias as soluções de gluconato de clorexidina 2% não levaram à redução da contagem microbiana no sistema de canais radiculares.

Em 2007, Denadai et al., após análise físico-química concluíram que a estrutura de compostos de inclusão de clorexidina: beta ciclodextrina é dependente da razão molar empregada e que as propriedades químicas dos compostos em diferentes proporções molares eram diferenciadas. Então por ressonância magnética nuclear sugeriu que compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes razões molares, principalmente as maiores apresentavam um arranjo molecular diferenciado. Neste caso as moléculas de clorexidina não se ligariam apenas ao interior da molécula de ciclodextrina e também em outros pontos de ligação e a mais de uma molécula de beta-ciclodextrina ao mesmo tempo, levando á formação de estruturas semelhantes a tubos, ou seja, estes compostos são capazes de formar arranjos supramoleculares complexos.

Ainda neste estudo Denadai et al (2007) fizeram testes para determinação da atividade antimicrobiana destes compostos para *A.a* e *E.f.* e perceberam que nas mesmas concentrações de 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.

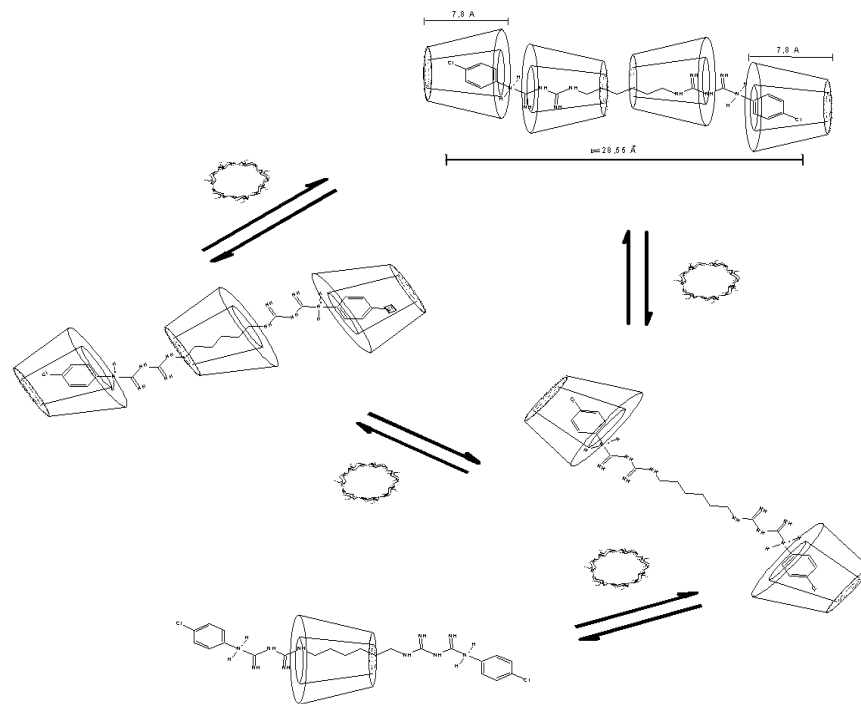


Figura 7- Desenho esquemático dos possíveis arranjos moleculares resultantes da interação de Clorexidina-beta-ciclodextrina (Denadai et al, 2007)

Contudo, de acordo com Basrani et al (2007) soluções de hipoclorito não devem ser usadas concomitantemente às soluções de clorexidina já que inativam as mesmas. A combinação de hipoclorito de sódio e Clorexidina levam à formação de um precipitado ($\text{NaC}_6\text{H}_4\text{Cl}$) resultado da reação ácido base, o que aumenta a citotoxicidade dos dois compostos.

Sistema de liberação controlada é um sistema onde o fármaco libera-se de forma mediata, e com um tempo pré-fixado. Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, sendo mais eficaz do que as formas convencionais. O nível terapêutico descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente (Fig. 8). Um exemplo dessa liberação acontece nos sistemas que empregam fármacos inclusos em ciclodextrinas (Borgman, 1986; Cortés, 1999).

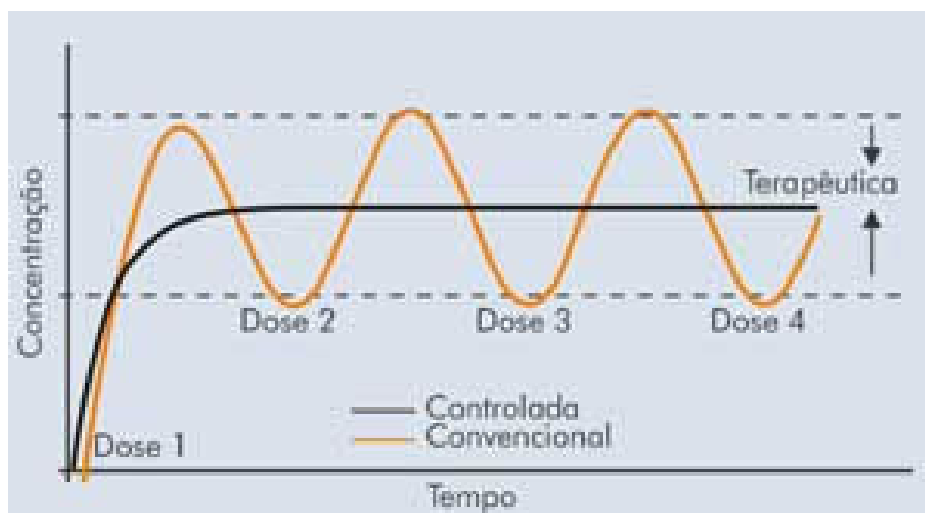


Figura 8. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional. Fonte: <http://www.gerbras.com.br>.

A inclusão molecular é um método farmacotécnico para melhorar as propriedades de um medicamento já existente, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, diminuir a concentração do medicamento, e diminuir o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico. Dessa forma obtém-se maior adesão do paciente (Rajewski e Stella, 1996).

Os principais sistemas transportadores usados para preparar estes sistemas são: as macromoléculas (albumina, anticorpos monoclonais, ciclodextrinas, dextrano, glicoproteínas), as células (eritrócitos, linfócitos): e as vesiculares (lipossomas, nano cápsulas, nanoesferas, sistemas de emulsão múltiplos) (Langer, 2003).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos desenvolvidos têm ampla aplicação, oferecem a vantagem de liberar de forma controlada e em concentrações terapêuticas. Quando são usadas as matrizes biodegradáveis para a liberação de fármacos eliminam a necessidade de retirar o dispositivo de liberação (Fig. 9) (Langer, 1990; Mirth, 1987).

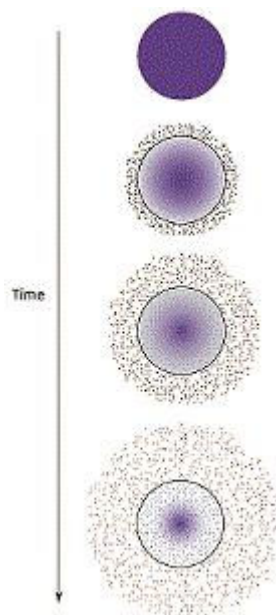


Figura 9. Representação esquemática da liberação controlada de Fármacos utilizando-se polímeros biodegradáveis. Fonte: [http:// www.upload.wikipedia.org](http://www.upload.wikipedia.org)

As ciclodextrinas (cd) são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de glicose. As principais vantagens do uso das ciclodextrinas são: estrutura química bem definida, com locais para modificação ou conjugação química, a disponibilidade das ciclodextrinas em diferentes tamanhos, sua baixa toxicidade, atividade farmacológica, solubilidade e a capacidade de formar Compostos de Inclusão (Uekama et al., 1998; Szejtli, 1988). Os complexos formados pela ciclodextrina são mais estáveis em relação à decomposição por luz, calor e liberação de oxigênio. Fármacos que são capazes de formar estes complexos de inclusão estão mais protegidos da desestabilidade química e da degradação por hidrólise (Másson et al., 1998; Loftsson e Masson, 2001).

A ciclodextrina natural tem vinte um grupos hidroxila e todos esses grupos podem ser considerados pontos iniciais para modificações estruturais, e vários grupos funcionais tem sido introduzidos em seu anel macrocíclico. O encapsulamento de uma substância nestas moléculas pode levar à mudança em propriedades da substância em

questão: solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e bioavaliabilidade ((Hirayama et al,2002).

As ciclodextrinas (cds) naturais são: α , β e γ (Figura 10) e seus derivados sintéticos como a hidroxipropil- β -ciclodextrina têm sendo estudados pela sua capacidade de formar compostos de inclusão com moléculas alojadas em sua estrutura (Uekama *et al.*, 1998; Yue et al, 2004).

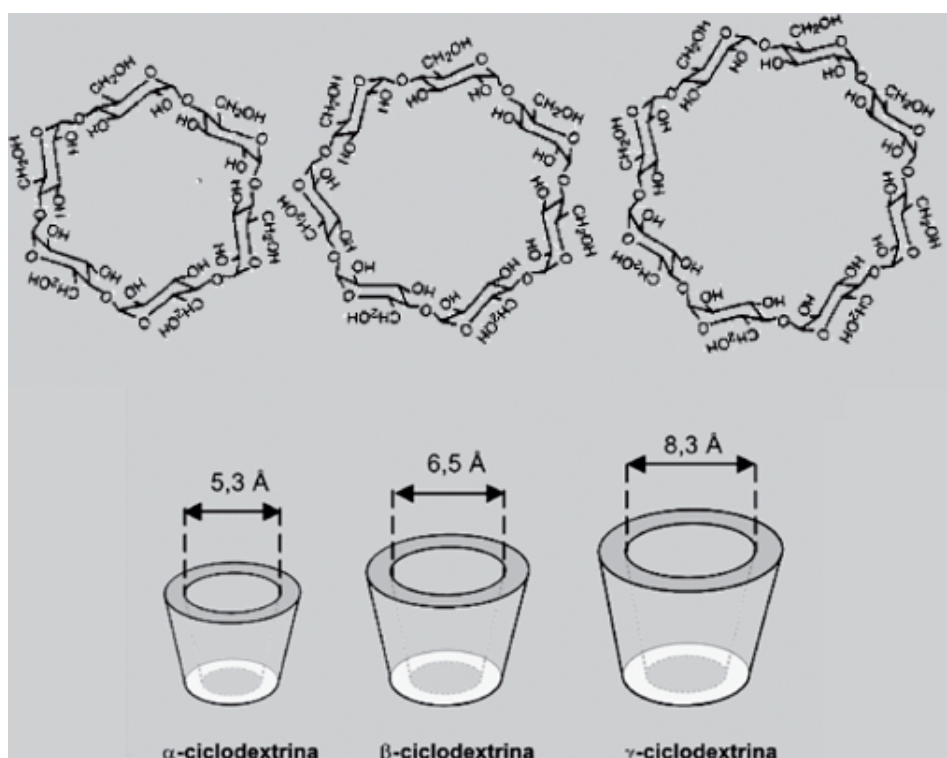


Figura 10. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais α , β e γ (Szejtli, 1990).

Tomando por base o diâmetro de sua cavidade, parece que a α -ciclodextrina tem um diâmetro pequeno para que possa incluir a maior parte dos princípios ativos, ao passo que a beta-ciclodextrina e melhor ainda a gama-ciclodextrina sirvam a este propósito, uma vez que possuem cavidade de maior diâmetro quando comparadas à α -ciclodextrina. Em relação à solubilidade em água, a menos solúvel é a beta-

ciclodextrina. A gama-ciclodextrina seria a mais interessante para o uso farmacêutico, mas seu alto custo torna difícil seu uso em escala industrial. Os principais derivados de ciclodextrina são os obtidos com a beta-ciclodextrina. (Szejtli, 1988; Loftsson e Másson, 2001).

Pequenas quantidades de ciclodextrina são absorvidas através da mucosa gástrica. Em comparação com a glicose marcada as ciclodextrinas apresentam menor velocidade de absorção e distribuição, excreção mais lenta pelos pulmões. Sua biotransformação pode ser comparada à do amido, contudo a velocidade é menor, o que se explica pelo fato de as ciclodextrinas não serem hidrolisadas pelas β -amilases. As ciclodextrinas são excretadas pelas fezes em sua forma inalterada (Szejtli, 1988).

Ciclodextrinas quimicamente modificadas aumentam a absorção das substâncias ligadas a elas, apresentando maior aplicabilidade, constituindo novos carreadores em liberação controlada para drogas solúveis em água, incluindo peptídeos e fármacos com estrutura protéica. O uso combinado dessas diferentes ciclodextrinas e seus aditivos farmacêuticos pode aperfeiçoar as propriedades do fármaco e sua eficácia terapêutica (Hirayama et al, 2002).

Os principais carreadores de antimicrobianos utilizados são as ciclodextrinas e lipossomas. O emprego da liberação controlada para antibioticoterapia adquire uma conotação maior em função dos grandes problemas causados pela resistência bacteriana. Assim, diminuir a concentração do medicamento, e diminuir o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico torna-se cada vez mais importante (Rajewski e Stella, 1996).

Uma possível aplicação para sistemas de liberação controlada de antimicrobianos seria em periodontia, devido ao difícil acesso dos antimicrobianos ao fundo da bolsa

periodontal. A bolsa periodontal pode ser definida pelo aprofundamento do sulco gengival em função do acúmulo de placa dental, cálculo, sendo limitada, de um lado pelo dente e do outro pelo tecido gengival. Têm sido desenvolvidos dispositivos em forma de fibras, tiras e/ou géis biodegradáveis ou não, para liberar agentes antibacterianos no local (Daneshmand et al, 2002; Radvar *et al.*, 1996).

Recentemente foi demonstrado que o encapsulamento e a liberação de complexos inorgânicos a partir de microesferas poliméricas biodegradáveis podem ser controlados pela formação de complexo com ciclodextrinas (Sinisterra et al, 1999).

Estudos também demonstraram que sistemas de liberação controlada de antimicrobianos mantêm altas concentrações do fármaco nas bolsas periodontais por 10 dias (Goodson *et al.*, 1991; Steinberg et al, 1990).

A liberação apropriada de um fármaco em função da dosagem é de importância crítica para sua eficácia. Para planejar a forma e dosagem mais apropriada vários tipos de materiais carreadores estão sendo desenvolvidos para liberação da quantidade necessária do fármaco ao sítio por um período, obtendo eficiência e eficácia (Hirayama et al, 2002).

A superfície radicular exposta à bolsa periodontal pode conter células bacterianas bem como produtos citotóxicos representando então um substrato pobre para a adsorção de proteínas plasmáticas e subsequentemente para a adesão de fibrinas. Dessa forma o tratamento da dentina radicular com soluções de antimicrobianos tem demonstrado aumento na ligação de glicoproteínas e fibronectina da matriz extracelular e estimula o crescimento e adesão de fibroblastos (Trombelli et al, 1994; Stabholz et al, 1991; Ercan et al, 2006).

Algumas limitações nas formulações existentes no mercado têm motivado o desenvolvimento de alternativas que possam vir a contribuir ao melhor aproveitamento dos dispositivos de liberação controlada de medicamentos. Dentre os antimicrobianos recentemente empregados em sistemas de liberação controlada destacam-se: Tetraciclina, Clorexidina e Metronidazol.

Diniz (2007) em seu estudo preparou um sistema de liberação controlada de nanoesferas de Tetraciclina: beta-ciclodextrina e PLGA em quatro razões molares (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) associadas ao PLGA, analisaram físico-quimicamente e testaram microbiologicamente *in vitro* para *P.g.* e *A.a.* O tamanho do complexo aumentou gradualmente com o aumento da razão molar de beta-ciclodextrina e pelos estudos físico-químicos puderam demonstrar que realmente houve a formação de novos compostos diferentes tanto da beta-ciclodextrina quanto do cloridrato de tetraciclina. As quatro razões molares de tetraciclina: beta-ciclodextrina apresentaram o fenômeno da liberação controlada e importantes mudanças estruturais e conformacionais da tetraciclina. As nanoesferas formadas tiveram diâmetro na faixa de 285- 396 nanômetros com liberação controlada mantendo-se durante 10 dias acima de 4 µg/mL diários. As mudanças estruturais derivadas das novas interações moleculares dos compostos refletem diretamente sobre as propriedades antimicrobianas da tetraciclina, que inibiu *A.a.* e *P.g.* em concentrações mais baixas que as encontradas na literatura. Para o *A.a.*, a tetraciclina: beta-ciclodextrina 1:2 teve concentração inibitória mínima de 0,25 µg/mL enquanto outros estudos mostram CIM de 0,8-1,2 µg/mL e para a *P.g.*, a Tc: β-cd 1:2; 1:3 e 1:4 inibiu seu crescimento com 0,25 µg/mL enquanto em outros estudos a CIM de 1-4 µg/mL para tetraciclina. Concluiu que este sistema aperfeiçoa as propriedades antimicrobianas da Tetraciclina pura.

3 - Justificativa

Considerando-se os aspectos clínicos e biológicos, a clorexidina tem vasto uso como auxiliar na terapia periodontal. Apesar disso, existe a necessidade de prolongar seu efeito terapêutico para permitir a regeneração dos tecidos periodontais. O sistema de liberação controlada de clorexidina: beta-ciclodextrina apresenta-se como uma alternativa eficaz para tratar as superfícies dentais e as superfícies afetadas pela doença periodontal e/ou biofilme eliminando a Smear layer e estimulando a formação de um substrato para inserção de fibras colágenas e tecido conjuntivo. O uso desse composto de inclusão emprega baixas concentrações de clorexidina, tem baixa toxicidade ao passo que mantém efetividade antimicrobiana. Por outro lado, sabe-se que estes compostos supramoleculares de clorexidina: beta-ciclodextrina apresentam atividade antimicrobiana em concentrações mais baixas que as convencionais e que razões molares diferentes da ciclodextrina implicam em diferenças na atividade antimicrobiana mesmo mantendo-se a mesma concentração de clorexidina. No entanto, pouco se conhece sobre as interações destes compostos com os microrganismos. Estes fármacos provavelmente possuem os mesmos mecanismos de ação antimicrobiana, porém é necessário determinar a relação entre as estruturas molecular dos compostos com as celulares. A inclusão molecular em ciclodextrinas apesar da manutenção das mesmas quantidades de clorexidina indiferentemente da razão molar empregada provoca mudanças na organização molecular destes compostos que podem chegar a se organizar em complexos supramoleculares de organização mais elaborada. Especula-se que está mudança organizacional esteja relacionada às diferenças na atividade antimicrobiana destes compostos nas mesmas concentrações de clorexidina.

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é preparar, caracterizar, avaliar a atividade antimicrobiana e a interação molecular do sistema de liberação controlada de clorexidina: beta-ciclodextrina (Cx: β -cd) sobre microrganismos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar compostos de inclusão de clorexidina: β -ciclodextrina em diversas razões molares;

Caracterizar físico-quimicamente o sistema clorexidina: β -ciclodextrina;

Determinar a atividade antimicrobiana do sistema clorexidina: β -ciclodextrina através de testes microbiológicos *in vitro*;

Estudar o efeito da clorexidina: β -ciclodextrina em diferentes razões molares na parede celular do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) e *Candida albicans* (*C.a.*) por microscopia eletrônica de varredura;

Estudar o efeito da clorexidina: β -ciclodextrina em diferentes razões molares na parede celular do *A.a.* por microscopia de força atômica;

Avaliar o efeito sobre os lipídeos de membrana (colesterol) presente na parede celular da *Candida albicans* (*C.a.*)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A β -cyclodextrina (β -CD) foi obtida da Cerestar[®] (EUA), cloridrato de clorexidina (Cx) (Ecadil[®] Indústria Química S.A). O caldo BHI (Brain Heart Infusion), Caldo Sabouraud dextrosado, Ágar sangue, Müller Hinton, Sabouraud dextrosado da Biobrás S.A. (Minas Gerais, Brasil); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Y4-FDC) da Universidade Federal de Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e as cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804) da Fundação Oswaldo Cruz.

5.1. Equipamentos

O processo de liofilização foi realizado empregando-se o equipamento Savant Modulo D-Freeze Dryer da Thermo-Electron Corporation[®].

A Calorimetria Exploratória Diferencial foi feita num equipamento Shimadzu dta-50[®], do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (DQ-ICEX) da UFMG.

As análises de termogravimetria foram realizadas em equipamento Mettler TA 4000 thermogravimetric analyzer (TG50)[®].

Os espectros de infravermelho dos complexos foram obtidos pelo Espectrofotômetro Perkin Elmer modelo GX[®] (Boston, MA, USA).

A caracterização por difração de raios-X foi realizada pelo equipamento Rigaku X-ray[®].

As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidas através de Bruker DRX 400-AVANCE spectrômetro[®] equipado com uma sonda inversa.

A espectrofotometria por UV-visível foi feita em um Espectrofotômetro de luz UV-visível Spectrumb 22PC[®] e, em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401[®].

As amostras de Microscopia Eletrônica de Varredura foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JFM 840A[®].

As amostras de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram analisadas em microscópio Eletrônico Zeiss- EM10[®].

As imagens de Microscopia de Força Atômica foram obtidas em Microscópio de Força Atômica Veeco Multimode SPM Nanoscope Controller[®].

5.2. Preparação dos compostos

5.2.1. Preparação dos compostos de inclusão

A preparação dos compostos de inclusão clorexidina: β -ciclodextrina foi feita pelo método de liofilização de suspensões aquosas de beta-ciclodextrina (β -cd) e clorexidina em diferentes razões molares (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) ou cloridrato de clorexidina, tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (Cortés et al, 2001). Foram preparadas inicialmente soluções aquosas de cloridrato de clorexidina (Massa molar: 578g/mol) deixadas sob agitação constante a 40° C durante 24 horas foram acrescentadas a estas, soluções aquosas de Beta-ciclodextrina (Mm: 1135g/mol) na concentração indicada para se obter as quatro razões molares de Clorexidina: beta-ciclodextrina (1:1; 1:2; 1:3; 1:4). A seguir as soluções resultantes foram distribuídas em tubos de Falcon, congeladas em

N₂ e levadas à sublimação. Esse método de liofilização tem o propósito de preservar a integridade, estrutura e atividades biológicas ou químicas dos fármacos.

As misturas mecânicas foram preparadas utilizando-se as mesmas razões molares dos grupos comparados. Foram feitas por agregação física, com a massa molar do cloridrato de clorexidina e beta-ciclodextrina satisfazendo-se a equivalência molar para compostos de clorexidina:beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4.

Os compostos assim preparados serviriam como grupos teste para todos os experimentos tendo como controles os grupos: Cx e β-cd.

5.3. Caracterização físico-química

5.3.1. DIFRATOMETRIA POR RAIOS-X

As amostras foram irradiadas por Cu K_α monocromático e analisadas em ângulos 2θ entre 5 e 40° C. A voltagem empregada neste teste foi de 30Kv com corrente de 5mA durante 1 minuto por análise.

5.3.2. ANÁLISE TÉRMICA

A Calorimetria exploratória diferencial foi utilizada com o objetivo de medir a mudança de fases dos compostos. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) registra a quantidade de calor absorvida ou liberada pelo sistema, em relação a um material termicamente inerte, quando os dois são aquecidos simultaneamente, a uma razão constante. Dessa forma detectam-se mudanças entálpicas do sistema, tais como fusão, vaporização, transição de fase cristalográfica ou reações químicas, através de bandas e picos endotérmicos ou exotérmicos que aparecem nas respectivas curvas.

As curvas da DSC foram feitas a uma velocidade de aquecimento de 10° c/min, em atmosfera dinâmica de N₂ e cadinho de alumínio (Cortés, 1999).

As análises de Termogravimetria (TG) foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 10° c/min de 25 a 750° C em atmosfera dinâmica de N₂ usando cadinho de platina. A massa das amostras era de 2mg cada.

5.3.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

FT-IR (ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER)

Os espectros dos complexos de inclusão, misturas mecânicas e compostos livres foram obtidos em pastilhas de KBr na região de 4000 a 400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹ realizando 32 scans por amostra.

5.3.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

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 hospede - 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.

As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrofotômetro equipado com uma sonda inversa de 5 mm e bobina de gradiente z operado a 27° C com corrente de 400 MHz. O experimento de Ressonância Magnética Nuclear foi realizado pela Técnica de Watergate com supressão do sinal residual. Todos os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram usados para confirmar o perfil do sinal de prótons das moléculas dos compostos de inclusão de Clorexidina.

5.4. Avaliação da substantividade em dentina bovina

Foram preparados géis de Clorexidina: beta-ciclodextrina 128µg/mL ($2,21 \times 10^{-4}$ mol/L). Todas as concentrações foram normalizadas, para que houvesse 128µg/mL ($2,21 \times 10^{-4}$ mol/L) de clorexidina em todas as amostras. Os grupos foram os seguintes: Clorexidina: beta ciclodextrina (Cx: β-cd) 1:1; Cx: βcd 1:2; Cx: β-cd 1:3; Cx: β-cd 1:4. Tendo como controle Cloridrato de clorexidina (Cx);

Os géis foram preparados utilizando-se inicialmente uma solução aquosa contendo 0,15% de metilparabeno preparada a 40° C sob agitação mecânica. A esta solução inicial eram adicionados propileno glicol (15%), hidroximetilpropil celulose (3%) e clorexidina ou compostos de inclusão de Cx: βcd. Os géis foram deixados em repouso por 24h em refrigerador 5° C e então os testes eram realizados

Dentes bovinos recém-extraídos e previamente limpos foram incluídos em parafina, foram expostas superfície de dentina radicular 4x8 mm no terço médio radicular onde foram colocados aproximadamente 75 mg dos géis de Clorexidina: beta-ciclodextrina. Após 5 minutos foram lavados em água destilada estéril por 2 minutos.

Após as lavagens foram colocados em potes plásticos estéreis contendo 1mL de solução tampão fosfato, estas soluções foram diariamente coletadas durante 14 dias, em triplicata. As amostras recolhidas diariamente foram então analisadas em Espectrofotômetro de luz UV-visível num comprimento de onda de 275 nm. Para a determinação da concentração de clorexidina foi construída uma curva de calibração com concentrações de Cx conhecidas. Dessa forma obteve-se a quantidade em microgramas de clorexidina liberada diariamente a partir da dentina.

5.5. Testes Microbiológicos

5.5.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana

Para o cultivo inicial do *A.a.* foram usados caldo BHI suplementado e ágar sangue sob condições de anaerobiose (90% de Nitrogênio, 10% CO₂) em estufa a 37° C. Para *C.a.* foram usados caldo e ágar Sabouraud Dextrosado e cultivado sob condições de aerobiose em estufa a 34° C. Para os testes de atividade antimicrobiana os microrganismos foram cultivados em ágar Müller Hinton. A escolha dos microrganismos foi feita baseando-se no fato que o *A.a.* é importante patógeno envolvido na doença periodontal enquanto *C.a.* está envolvido em grande parte de infecções oportunistas da cavidade oral.

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados em ensaio de diluição conforme as normas do National Commitee for Clinical Laboratory Standards, M27-A2 (NCCLS) com algumas adaptações. A faixa do CI (concentração inibitória) foi definida como a menor concentração na qual 100% do crescimento celular de *A.a.* ou *C.a.* eram inibidos, quando comparados aos grupos-controle. Os grupos-controle constam das culturas crescidas na ausência dos compostos de Clorexidina: beta-ciclodextrina, nas mesmas condições das demais na presença e na ausência dos

microrganismos. A análise espectrofotométrica foi feita em espectrofotômetro de Luz UV sendo registradas após 24h de incubação. O inócuo foi preparado baseando-se na densidade óptica usando o espectrofotômetro ajustado a 600 nm, correspondendo a 0.5 na escala de turbidez de McFarland, o que indica a presença de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (UFC, unidades formadoras de colônias). Os experimentos foram preparados pipetando-se o inóculo em 4 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion), acrescentando-se à solução compostos de clorexidina. Os experimentos foram realizados em triplicata por 4 vezes. Os resultados obtidos em caldo foram então plaqueados em Agar Müller Hinton e os resultados observados após 24 horas.

Os grupos teste foram os seguintes: 1) Clorexidina: beta ciclodextrina (Cx: β -cd) na razão molar 1:1; (Cx: β -cd) 1:2; (Cx: β -cd) 1:3; (Cx: β -cd) 1:4. Todas as concentrações foram normalizadas, para que houvesse a mesma quantidade de clorexidina em todas as amostras. Tendo como controles negativos os grupos: Cloridrato de clorexidina (Cx), Fluconazol e positivos os grupos: Beta-ciclodextrina (β -cd), culturas de *C.a.* e *A.a* cultivadas na ausência dos compostos.

5.5.2. Dosagem de Lipídeos (Esterol e Ergosterol)

O ergosterol e o esterol, intracelulares, foram extraídos da levedura conforme o Método de Quantificação de Esterol (MQE) descrito por Arthington-Skaggs com algumas modificações. As colônias de *C.a* retiradas da cultura crescida em ágar Sabouraud Dextrosado foram inoculadas em 2 mL de caldo Sabouraud Dextrosado na presença de 1 μ g/mL ($1,73 \times 10^{-6}$ mol/L) e 0,5 μ g/mL ($8,65 \times 10^{-7}$ mol/L) dos compostos de Cx: β -cd em estudo e na ausência destes como controle de 24 horas, em constante agitação, a 37° C (incubador orbital). As células foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos e os sedimentos lavados com água destilada estéril por duas

vezes. Os sedimentos foram secos à temperatura ambiente e logo após, suas massas foram determinadas. A partir da obtenção dos sedimentos secos foram adicionadas quantidades da solução de KOH alcoólico de tal forma a se ter a mesma concentração determinada pela turbidez (verificada com espectrofotômetro) em todas as amostras. As suspensões das células serão transferidas para eppendorfs e incubadas em banho a 90° C por 1 hora. Seguindo a incubação, os eppendorfs foram resfriados à temperatura ambiente (24° C) Os lipídeos foram então extraídos por adição de uma mistura de 0,5 mL de água destilada estéril e 1 mL de n-heptano seguida de agitação vigorosa em vórtex por 3 minutos. A camada de heptano foi transferida para outro eppendorf e estocada a -20° C por 24 horas. O esterol foi extraído pela adição de uma mistura de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de n-heptano seguida de mistura em agitação vigorosa em vórtex por 3 minutos. Para a dosagem, uma alíquota de 20 µL da solução contendo ergosterol e de esterol extraídos foram diluídas em etanol P.A. e analisada espectrofotometricamente a 365 nm. O conteúdo de ergosterol foi calculado como porcentagem do peso do pelet conforme descrito por Arthington- Skaggs[17] pelas equações, onde F é fator de diluição e 290 e 518 são os valores E (em %/ cm) determinado pelo ergosterol cristalino e 24(28) DHE. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{281.5}/290)3F] / \text{ massa pellet}$$

$$\% \text{ 24(28) DHE} = [A_{230/518} 3F] / \text{ massa pellet}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} - \% \text{ 24(28) DHE}] / \% \text{ 24(28) DHE}$$

Foi realizada uma caracterização espacial da estrutura das amostras através de técnicas de microscopia: eletrônica de varredura, eletrônica de força atômica.

5.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análises ultra estruturais, culturas de *A.a.* em caldo BHI (Brain Heart Infusion) em condições de anaerobiose, 10% CO₂ 90 % N₂ a 37° C durante 24 horas e *C.a.* em Caldo Sabouraud dextrosado em atmosfera aeróbica a 34° C por 24 horas tratadas com compostos de Clorexidina: beta-ciclodextrina, na concentração encontrada para o IC₉₀, 2 µg/mL (3,46 x 10⁻⁶ mol/L) para *A.a.* e 0.5 µg/mL (8,65 x 10⁻⁷ mol/L) para *C.a.* As culturas não tratadas com estes compostos (grupos controle) foram coletadas após 24 horas de incubação a 34° C. As culturas, em suspensão, foram centrifugadas durante 1 minuto a 3000 rpm. Os peletes resultantes foram fixados com 2.5% de glutaraldeído. Uma alíquota de 5 µL era então retirada e deixada em placas de mica. As amostras foram deixadas em estufa aeróbica a 37° C durante sete dias para secagem.

As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura com 4-10 Kv, sendo que as amostras foram fixadas em fita condutora e recobertas por uma fina camada de ouro (1000-300Å) por 30 segundos. As imagens foram obtidas através de elétrons secundários.

5.5.4. Microscopia de Força Atômica

Para análises ultra estruturais, culturas de *A.a.* em caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com Hemina(0,1%), Menadiona (0,1%) e Extrato de levedura (0,5%) tratadas com compostos de Clorexidina: beta-ciclodextrina, na concentração encontrada para o IC₉₀ (2 µg/mL / (3,46 x 10⁻⁶ mol/L), e as culturas não tratadas com

estes compostos (grupos controle) foram coletadas após 24 horas de incubação a 37° C sob condições de anaerobiose.

Foram retiradas alíquotas do IC e diluídas até 10^{-9} em água destilada estéril, desta solução 5 μ L eram colhido e deixados em placas de mica. As amostras foram deixadas em estufa de secagem durante 14 dias. A partir daí, as imagens eram obtidas em Microscópio de Força Atômica. As imagens foram obtidas por contato intermitente de uma sonda de Silício (Si). Imagens topográficas do material eram obtidas simultaneamente a imagens de contraste de fase de acordo com o tempo de oscilação do cantilever.

6. Resultados

6.1. Caracterização dos compostos de Clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares

6.1.1. Difractometria de Raios-X

Na figura 11 estão apresentados os difratogramas de raios-X para o Clorexidina: beta-ciclodextrina. Cloridrato de Clorexidina; Clorexidina: β -ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e β -ciclodextrina.

A comparação dos difratogramas de raios-X se faz sob a formação ou não de novas fases cristalinas após a interação: hospedeiro- convidado. A β -ciclodextrina (Fig. 11) apresenta um perfil predominantemente poli-cristalino, bem como o cloridrato de clorexidina, com seus maiores picos de intensidade em 5, 10 e 15° (2 θ). O cloridrato de clorexidina (Fig. 11) apresenta um perfil tipicamente poli-cristalino destacando-se picos máximos de intensidade em torno de 15 e 25° (2 θ). A partir de 40° não são mais observados esses picos.

Nos compostos de inclusão observa-se um perfil semicristalino, ou seja, parte amorfa e alguns sinais de cristalinidade.

O composto de inclusão clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 apresenta propriedades semicristalinas com discretos picos de intensidade entre 25 e 30° (2 θ). Enquanto que na razão molar 1:2 observa-se além do perfil predominantemente semicristalino um pico de intensidade em torno de 15 e 25° (2 θ), semelhante ao cloridrato de clorexidina, porém bem mais discreto. Na clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3 o perfil permanece semicristalino, com maior predominância de amorficidade entre os grupos testados, mas ainda conserva alguns picos de intensidade discretos nas mesmas regiões descritas para o cloridrato de clorexidina. O composto de inclusão na razão molar 1:4 apresentou entre os complexos o perfil mais próximo ao da

ciclodextrina com um pico de intensidade em 10° (2θ). Isto talvez pelo alto teor de ciclodextrina no mesmo.

De acordo com os difratogramas analisados sugere-se que ocorreu a formação de novas fases cristalinas e portanto, sugerem a interação hospede:hospedeiro no estado sólido.

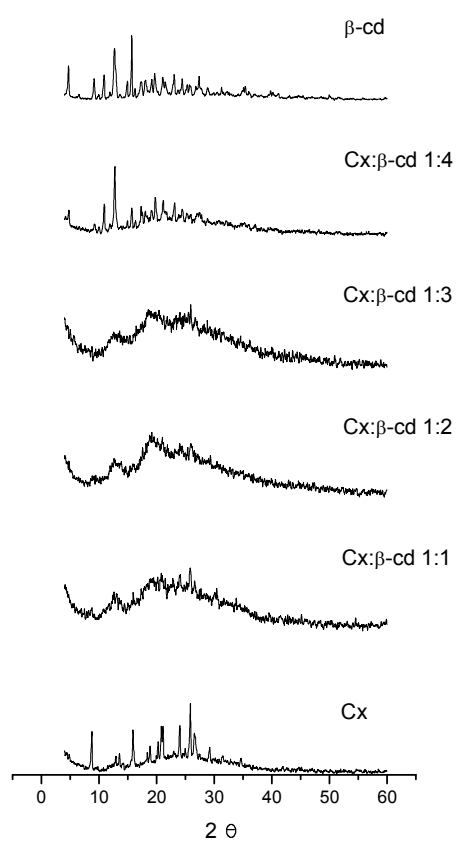


Figura 11. Difratogramas de raios-X do Cloridrato de Clorexidina e compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e β -ciclodextrina.

6.1.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

Na Figura 12 estão representadas as curvas de termodecomposição da clorexidina, da beta-ciclodextrina e Clorexidina: beta-ciclodextrina nas quatro razões molares. Analisando a curva TG da clorexidina observou-se uma perda de massa inicial de 2% em torno de 32° C, sugerindo a saída da água de hidratação da mesma. Em seguida observou-se um perfil de termo decomposição caracterizado por vários eventos térmicos, evidenciados por picos em 120, 277, 360 e 460° C respectivamente observados na curva DTG.

As curvas TG dos compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina são muito semelhantes apresentando uma perda de massa inicial em torno de 10% na temperatura 39° C indicando saída de moléculas de água de hidratação do composto de inclusão. Posteriormente, observou-se um patamar de estabilidade entre 120 e 180° C. Posteriormente a partir de 270° C os compostos de inclusão perderam massa continuamente por uma larga faixa de temperatura.

Na Figura 13 esta representada a curva de calorimetria exploratória diferencial (DTA) da Clorexidina. Observou-se que a clorexidina teve três eventos endotérmicos nas temperaturas 50, 134, 253° C, respectivamente, e um evento exotérmico na temperatura de 400° C.

O primeiro evento está associado à energia gasta para retirar as moléculas de água da hidratação do composto. O segundo evento está associado à fusão da clorexidina o qual foi confirmado pela medida de ponto de fusão dos compostos. O outro evento endotérmico esta associado a uma mudança de fase da clorexidina. Nas DTA dos compostos de inclusão observou-se grande similaridade entre estas curvas as quais apresentaram dois picos endotérmicos e um exotérmico nas temperaturas de 53, 239 e 265° C, respectivamente. O primeiro pico endotérmico está associado à saída de

moléculas de água da hidratação dos compostos de inclusão como foi discutido para curva TG. Por outro lado, não foi observado o pico de fusão da clorexidina em torno de 239° C o qual evidencia a formação de uma nova espécie química hospedeiro: convidado. O outro pico endotérmico discutido foi devido talvez à mudança de fase cristalinas dos compostos de inclusão como discutido nas curvas TG. O pico exotérmico em 265° C associou-se à termod decomposição dos compostos de inclusão como evidenciado nas curvas TG para os mesmos compostos.

De acordo com os resultados de Cortés (1999), que realizou a caracterização físico-química de compostos de clorexidina e beta-ciclodextrina 1:1 e 1:2 comparando-os às respectivas misturas mecânicas, os resultados da análise térmica de misturas mecânicas de clorexidina e beta-ciclodextrina evidenciam que não há a formação de um composto de inclusão puro. Na TG ocorre uma perda de massa muito rápida associada à termo decomposição completa da mistura mecânica. Enquanto na DTA destas misturas mecânicas não foi observado o pico de fusão da clorexidina em torno de 140° C, o qual sugere a formação de uma mistura mecânica e o composto de inclusão no estado sólido como já discutido também por Sinisterra et al (1995) para estudos de infravermelho comparando-se compostos de inclusão e misturas mecânicas.

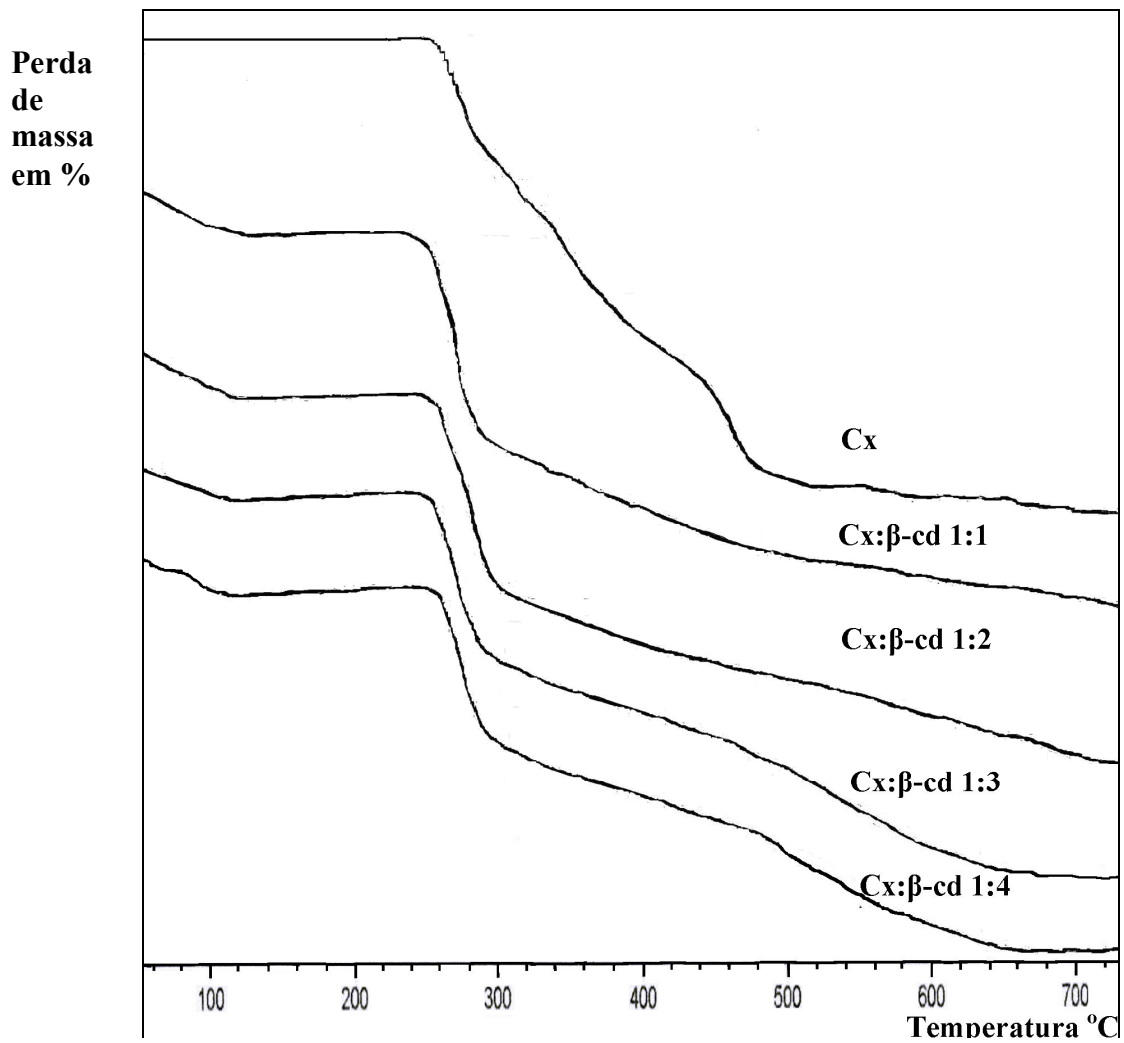


Figura 12. Curvas TG do cloridrato de Clorexidina e compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3, 1:4.

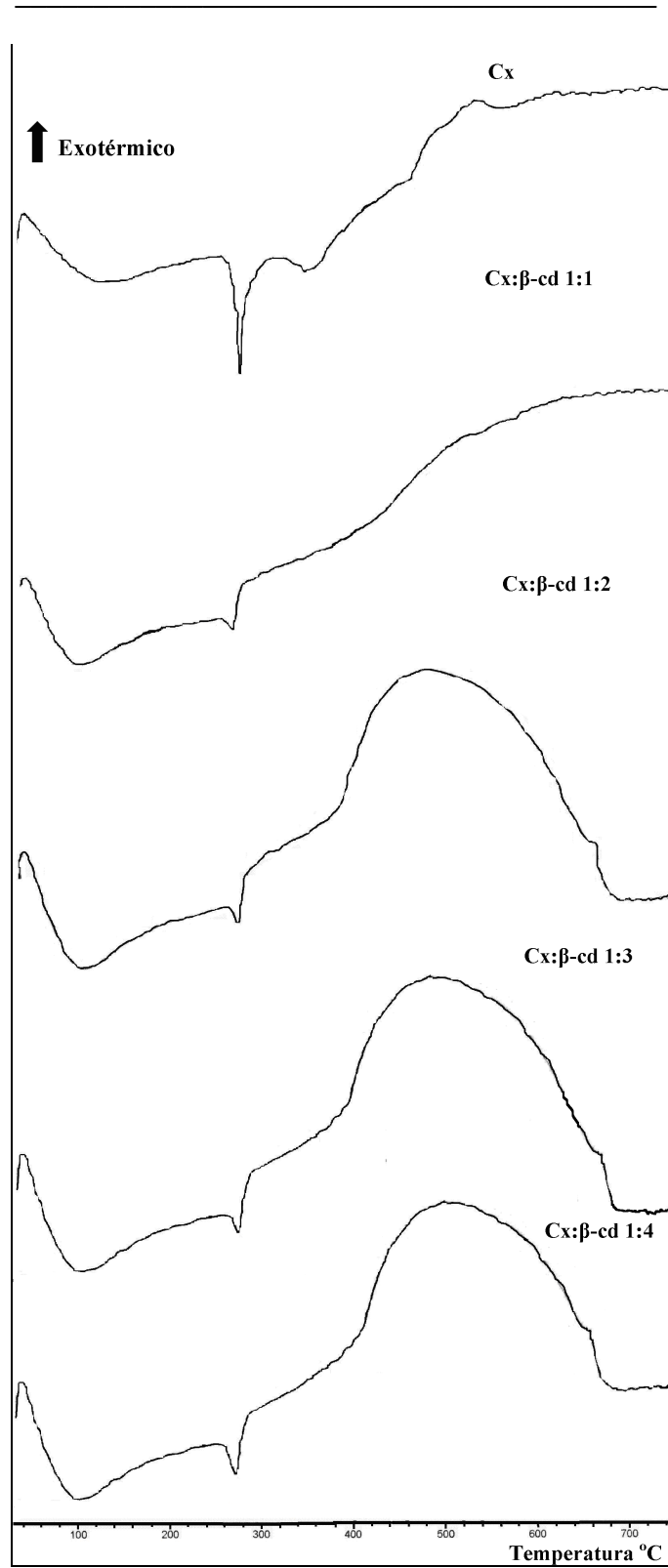


Figura 13. Curvas DTA do cloridrato de Clorexidina e compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3, 1:4.

6.1.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

As espectroscopias de absorção na região do infravermelho (IV) da β -cd, Cx: β -cd 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e Cx estão apresentados na Figura 14.

O espectro da beta-ciclodextrina apresentou bandas largas, características, em $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ e $1100-1000\text{ cm}^{-1}$ associados aos estiramentos assimétricos-OH e C-O-C, respectivamente.

O espectro do cloridrato de clorexidina apresentou bandas largas de intensidade média entre 3190 e 3000 cm^{-1} atribuídas ao estiramento NH da clorexidina, o que sugere a existência de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares na clorexidina indicando a possibilidade de existir uma espécie associada. Foram observadas bandas em 1650 , 1620 , 1600 , 1550 e 1500 cm^{-1} de intensidade alta, característica dos estiramentos C=C dos anéis benzênicos da clorexidina.

Os espectros dos compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina nas quatro razões molares foram muito semelhantes. Ambos os espectros mostraram mudanças sutis na região entre $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ associadas aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos da clorexidina. Esta observação pode ser em função de algum tipo de interação entre o hospedeiro (β -ciclodextrina) e o convidado (clorexidina) (Szejtli 1988, 1996, 1998; Sinisterra et al, 1995). Sendo que 1:2 e 1:4 apresentam-se mais semelhantes entre si nesta mesma região e 1:1 e 1:3 da mesma forma. As bandas de estiramento O-H e C-O-C na região $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ e $1100-1000\text{ cm}^{-1}$ respectivamente mostram-se mais afinadas quando comparadas à beta-ciclodextrina. Estas observações sugerem a saída de moléculas de água da cavidade da β -ciclodextrina e a quebra de ligações de hidrogênio após a inclusão. Observou-se também a atenuação dos modos vibracionais característicos dos anéis benzênicos da clorexidina na região de $1650-1500\text{ cm}^{-1}$. Este

comportamento é comum para produtos de inclusão com ciclodextrina (Szejtli 1988, 1996; Sinisterra et al, 2005).

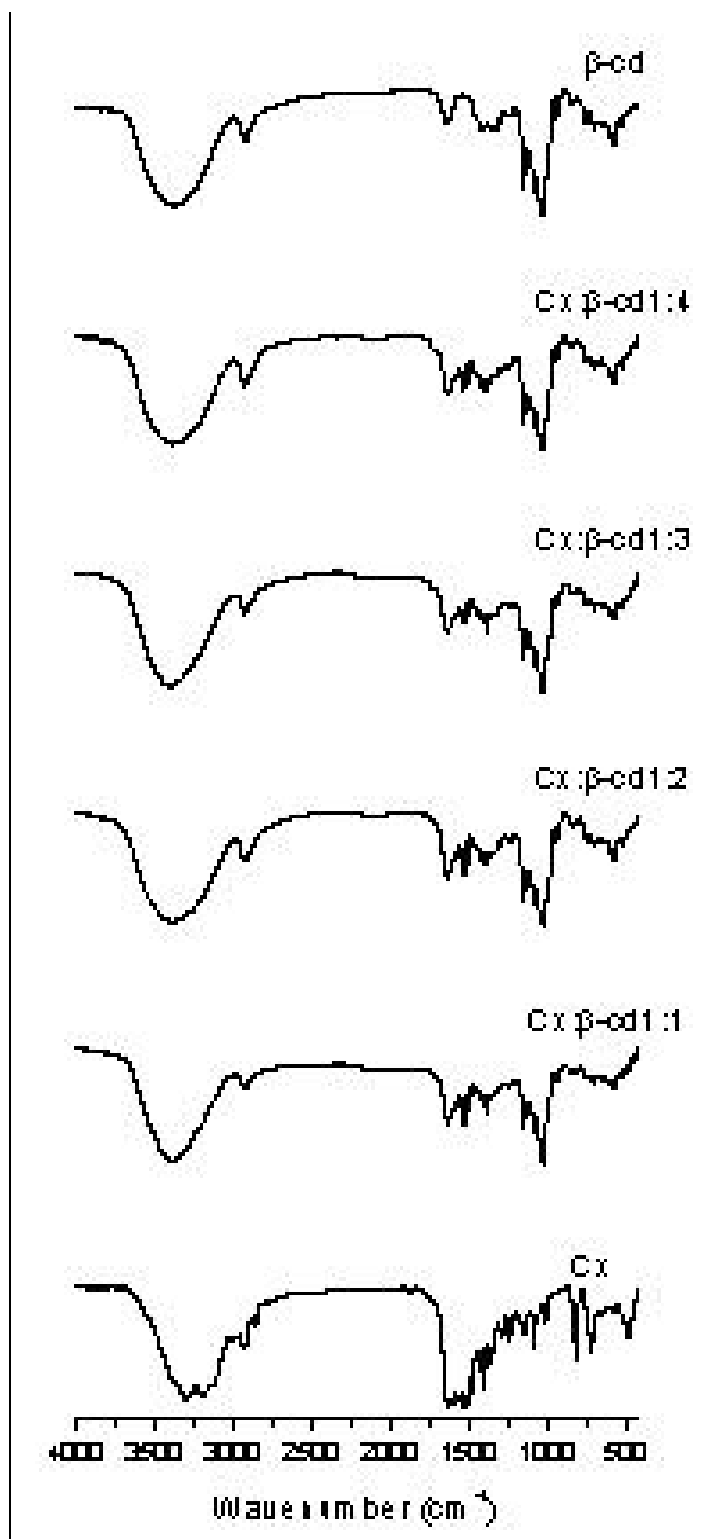


Figura 14. Espectro da região do infravermelho da β -cd, Cx: β -cd 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e Cx

6.1.4. Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia por RMN permitiu observar interações a curta distância entre a Clorexidina e beta-ciclodextrina.

A Fig. 14 ilustra a comparação entre o espectro de RMN do sistema Cx/ β -cd/D₂O 1:1 como exemplo. No início da figura observa-se um pico largo do sinal do ¹H aromático da Cx na presença da β -cd, sugerindo interação. A Figura 15A da β -cd-clorexidina mostra os valores das mudanças nos deslocamentos químicos em outros átomos de hidrogênio.

Estes resultados podem ser descritos como perturbações na densidade eletrônica do anel aromático da Clorexidina causadas por elétrons livres dos átomos de oxigênio C-1-O-5-C-4 das ligações glicosídicas da molécula de ciclodextrina, devido à formação de interações dipolo-dipolo.

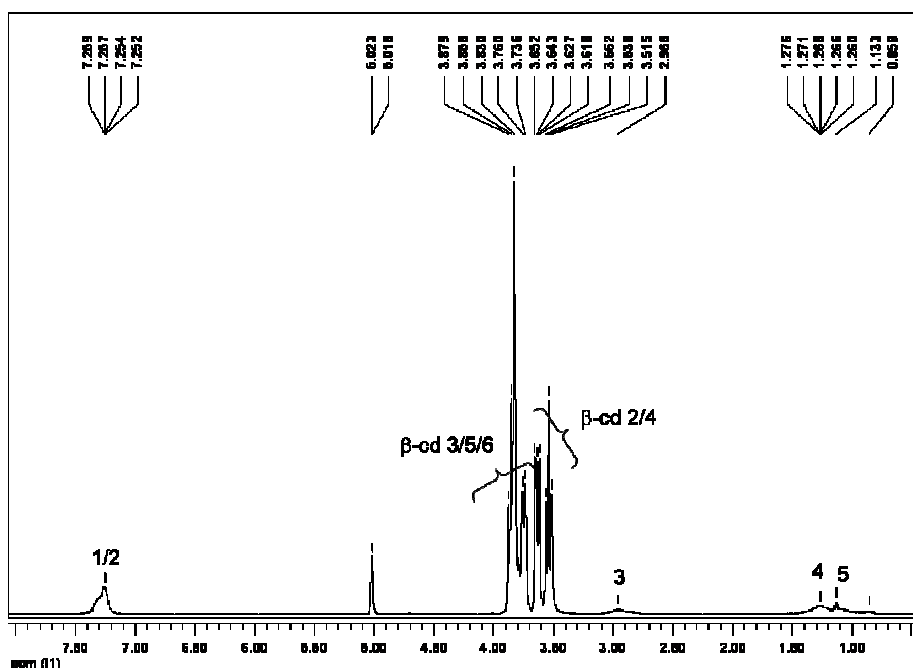


Figura 15 A. Espectro de RMN H para o cloridrato de clorexidina

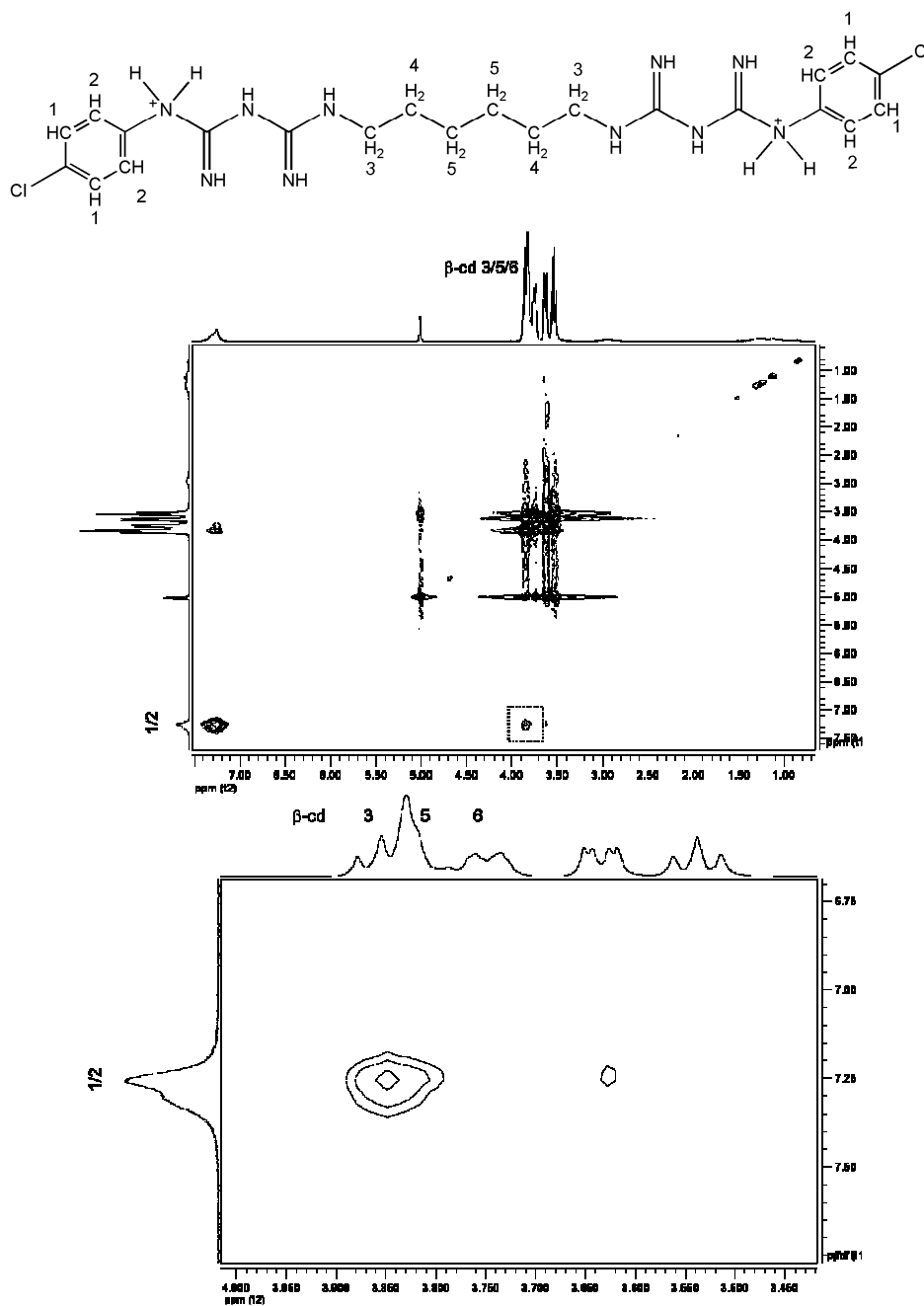


Figura 15 B. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear dos compostos de Inclusão de Clorexidina: β -ciclodextrina 1:1

6.2. Avaliação da substantividade em dentina bovina

Na Figura 16 estão apresentadas as curvas de liberação dos compostos de clorexidina: β -cd encapsulada em géis de hidroximetil-propil celulose. Todos os compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina em gel apresentaram liberação controlada durante 10 dias. Contudo, Cx: β -cd 1:2 apresentou perfil de liberação controlada regular em uma concentração acumulada de 30 $\mu\text{g/ml}$ ($5,19 \times 10^{-5}$ mol/L) sendo mais prolongada do que a Cx, controle positivo. O grupo Cx: β -cd 1:1 representado pela linha rosa, apresentou perfil de liberação irregular destacando-se uma alta liberação no nono dia seguida por uma queda abrupta. Os grupos Cx: β -cd 1:3 e 1:4 apresentaram uma curva de liberação com perfil muito semelhante sendo que quantidade de clorexidina liberada na razão molar 1:3 foi quantitativamente superior, porém não houve diferença estatística entre os mesmos. Até o quinto dia todos os grupos, excetuando-se a razão molar 1:1, apresentaram um padrão de liberação muito semelhante, destacando-se um pico de liberação no quinto dia a partir daí o grupo Cx: β -cd 1:2 mantém uma liberação regular em quantidade superior aos demais grupos. Os resultados obtidos em $\mu\text{g/mL}$ foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, embora não se observou diferença estatística entre os grupos Cx: β -cd 1:2; 1:3; 1:4 no grupo Cx: β -cd 1:1 a liberação foi significativamente maior que as demais.

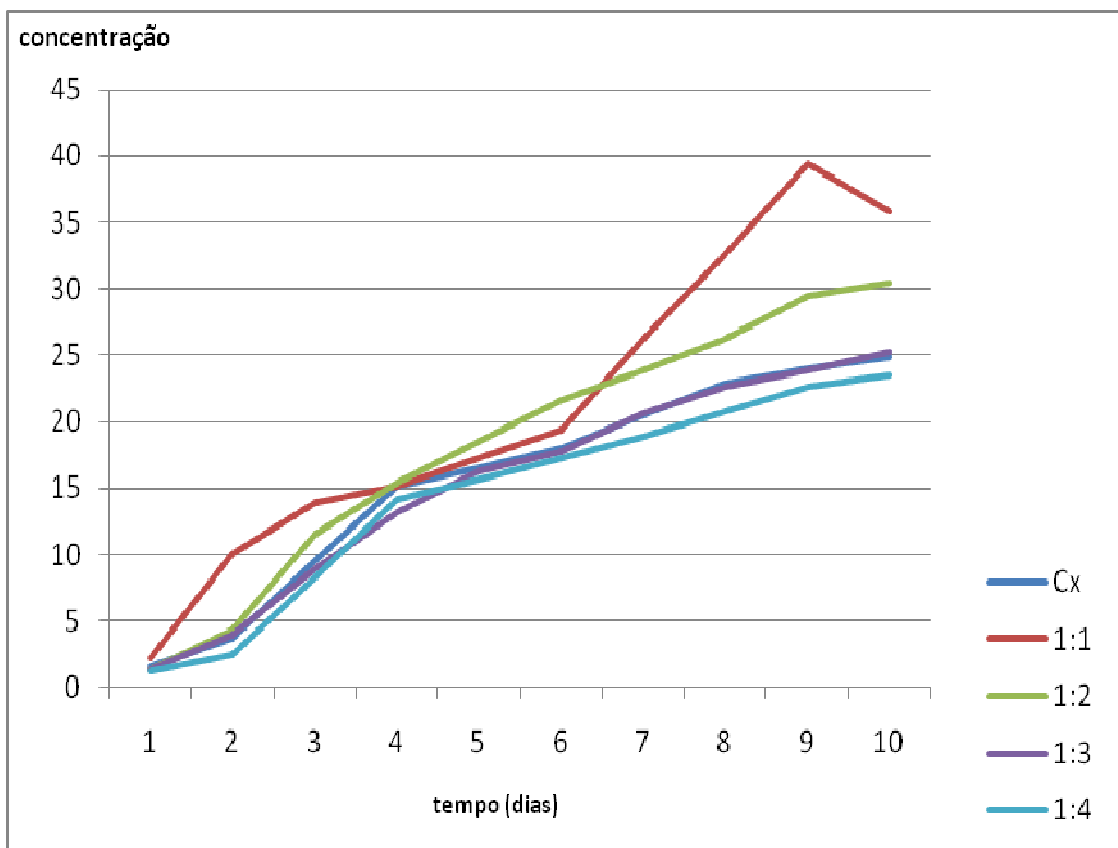


Figura 16. Substantividade em dentina bovina de géis de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e cloridrato de clorexidina (Cx).

6.3. Testes Microbiológicos

6.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os resultados da atividade antimicrobiana dos compostos de inclusão sobre *A.a* e *C.a* estão apresentados na Tabela 1. *A.a* foi mais sensíveis aos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:3 e 1:4 enquanto *C.a* foi mais sensíveis ao compostos na razão molar 1:4. Foi feita a normalização das concentrações do fármaco, assim, todos os compostos testados tinham a mesma concentração de clorexidina com a variação da quantidade de ciclodextrina verifica-se uma diferença na atividade antimicrobiana dos compostos nas diferentes proporções molares. De acordo com testes de Kruskal Wallis houve diferença estatística entre os grupos sendo que as razões molares 1:3 e 1:4 foram semelhantes

entre si, mas mais eficientes que as demais em quanto 1:2 e 1:1 foram semelhantes entre si sendo mais eficientes que o controle positivos mas com atividade inferior às razões molares mais elevadas para A.a. para C.a o controle positivo e a razão molar 1:1 foram semelhantes entre si e inferiores as razões 1:2 e 1:3 que foram semelhantes entre si e menos eficientes que 1:4. Neste caso o controle positivo fluconazol foi estatisticamente diferente das demais amostras, com atividade inferior.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Y4-FDC) e *Candida albicans* (ATCC 18804)

Grupos	A.a	C.a
Cloridrato de Clorexidina	8 $\mu\text{g/mL}$ ($13,8 \times 10^{-6}$ mol/L)	2 $\mu\text{g/mL}$ ($3,46 \times 10^{-6}$ mol/L)
Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1	1 $\mu\text{g/mL}$ ($1,73 \times 10^{-6}$ mol/L)	2 $\mu\text{g/mL}$ ($3,46 \times 10^{-6}$ mol/L)
Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2	1 $\mu\text{g/mL}$ ($1,73 \times 10^{-6}$ mol/L)	1 $\mu\text{g/mL}$ ($1,73 \times 10^{-6}$ mol/L)
Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3	0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($0,86 \times 10^{-7}$ mol/L)	1 $\mu\text{g/mL}$ ($1,73 \times 10^{-6}$ mol/L)
Clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4	0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($3,46 \times 10^{-6}$ mol/L)	0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($3,46 \times 10^{-6}$ mol/L)
Fluconazol	---	19 $\mu\text{g/mL}$ ($32,8 \times 10^{-6}$ mol/L)

5.3.2. Dosagem de lípides (MQE)

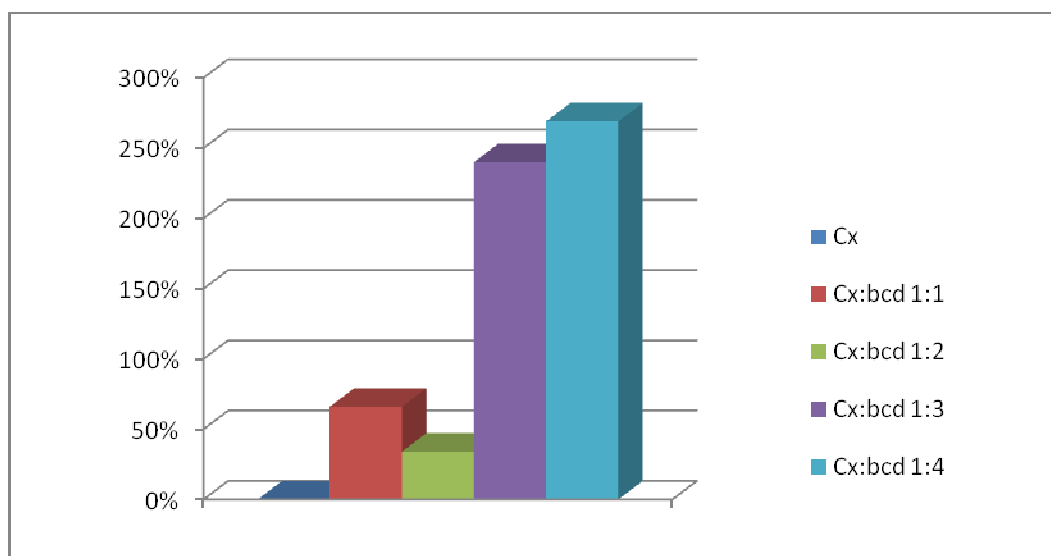


Figura 17. Percentual de efetividade dos compostos em relação à solubilização do esterol de membranas de *C.a.* pelo Método de Quantificação do Esterol.

Na Figura 17 estão apresentadas as porcentagens da efetividade dos compostos em relação à solubilização do esterol de membrana de *Candida albicans* pelo Método de Quantificação do esterol na presença dos compostos de inclusão de Cx: β -cd nas diferentes proporções molares 1:1; 1:2; 1:3; 1:4.

O MQE é um método para testar a susceptibilidade anti-fúngica e pode ser relacionado a correlatos clínicos. Os testes foram realizados utilizando-se a concentração encontrada nos testes de determinação do IC 90 para cada composto e correspondem às primeiras concentrações abaixo do CIM, neste caso o que se testou foi a atividade bacteriostática, assim deve haver algum crescimento bacteriano para que o teste seja realizado, foram utilizadas concentrações aproximadas do IC 90 destes compostos para *Candida albicans*. As razões molares dos compostos de inclusão Cx: β -cd 1:3 e 1:4 (Figura 17) parecem atingir mais significativamente o ergosterol presente na parede celular da *Candida albicans* do que os demais grupos. Sendo que os compostos nas razões molares 1:1 e 1:2 (Figura 17) de acordo com este parâmetro

atingem de forma semelhante os lípideos de membrana enquanto o composto de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 apresentou uma atividade intermediaria em relação ao 1:1 e ao 1:3 e 1:4 que parecem semelhantes para MQE. De acordo com o ANOVA (2 critérios) $p= 0.003115$.

6.4. Análises Microscópicas

6.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 18-A pode-se observar o cloridrato de clorexidina, grupo controle, que apresentou estrutura cristalina, também de acordo com os resultados de difratometria de R-X. A amostra estava homogênea com predomínio de estruturas de maior comprimento longitudinal de tamanhos variados de 100nm a 5 μm num aumento de 1000 vezes. Enquanto os compostos de inclusão Cx: β -cd 1:1 (Figura 18-B) apresenta uma estrutura menos regular e com características de amorficidade, também de acordo com os resultados de espectroscopia na região do infravermelho, misturando estruturas arredondadas e mais compridas que parecem formar agregados.

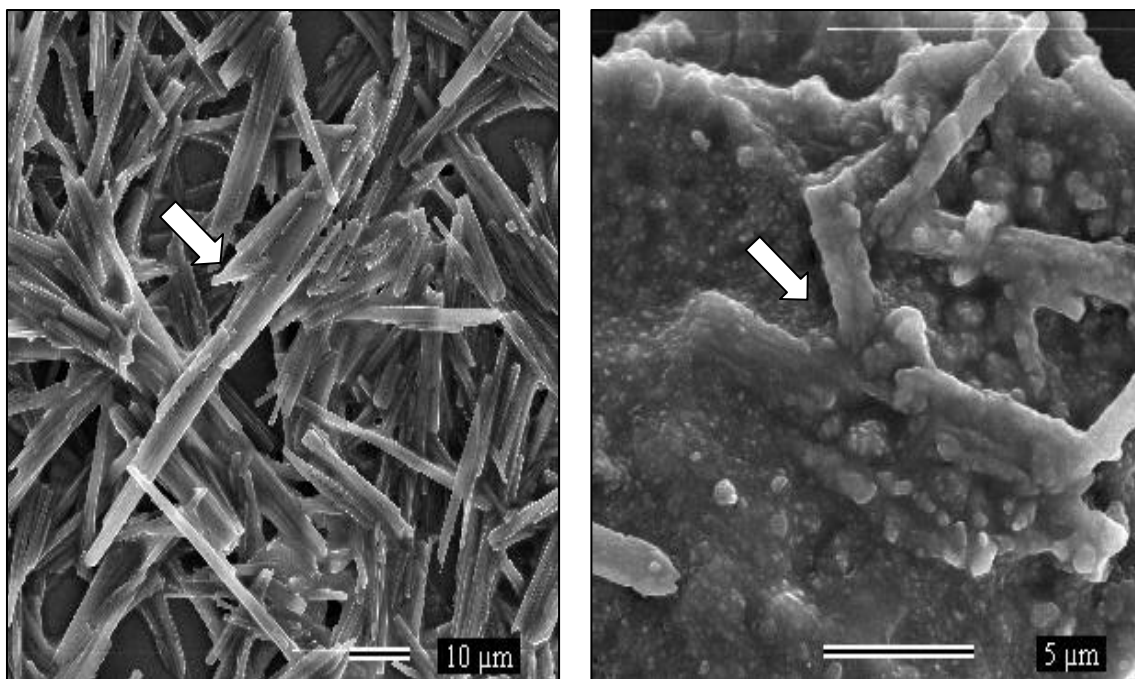


Figura 18. Micrografias do cloridrato de clorexidina (A) e clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 (B) no aumento 5000x.

De forma semelhante ao Cx: β -cd 1:1, o grupo controle Cx: β -cd 1:2 (Figura 19-A) apresentou uma estrutura mista com característica de amorficidade maior do que os

anteriores estando em concordância com os resultados de difratometria por r-x e espectroscopia na região do infravermelho e ainda alguns pontos cristalinos, com forma irregular podendo-se observar a presença de fragmentos de maior comprimento longitudinal misturados a pequenas estruturas arredondadas que neste caso parecem bem mais numerosas também observadas no grupo Cx: β -cd 1:3 (Figura 19-B) num aumento de 5000 vezes.

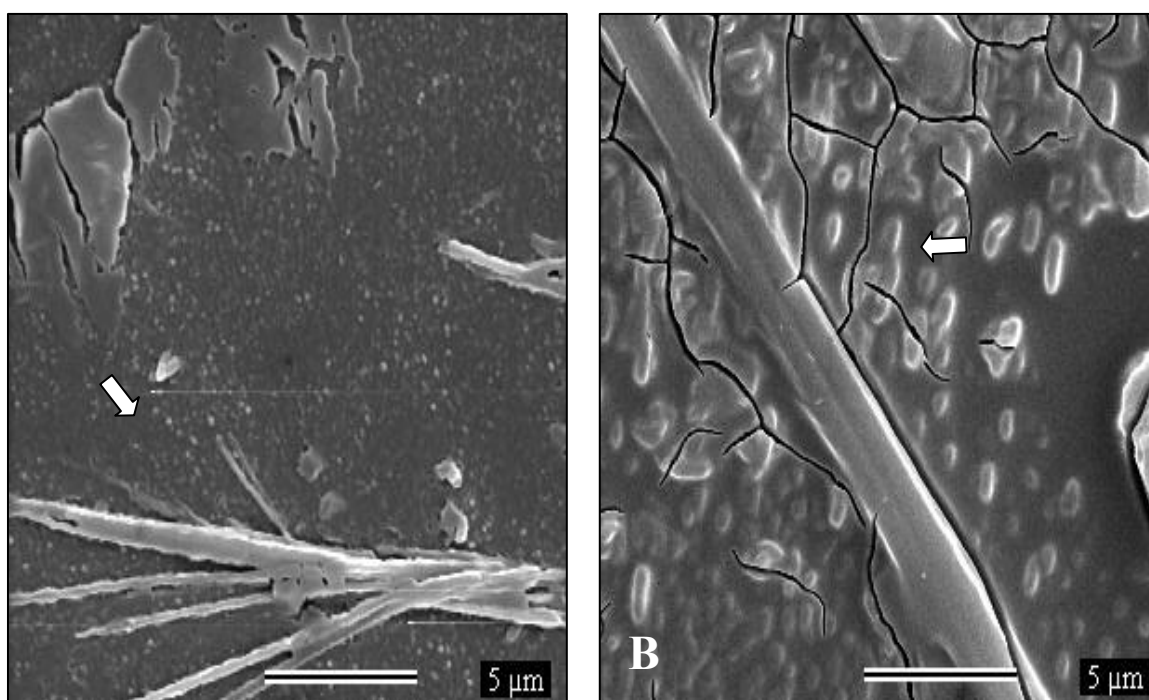


Figura 19. Micrografias de compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2 (A) e clorexidina: beta ciclodextrina 1:3 (B) respectivamente com aumento de 5000x

Entre os compostos de inclusão, aquele que em microscopia de varredura apresentou estrutura morfológica mais semelhante ao cloridrato de clorexidina foi Cx: β -cd 1:4 (Figura 20-A), ocorre o predomínio de estruturas tubulares de maior comprimento com estruturas circulares agregadas a toda a sua superfície revelando uma aparente irregularidade, que esteve presente em toda a amostra. Este composto volta a apresentar cristalinidade também observada em difração de r-x .

Na figura 20-B observamos estrutura da beta-ciclodextrina pura, onde ocorre o predomínio de estrutura globular, parece existir uma organização maior já que as unidades globulares, arredondadas se repetem formando uma rede polimérica extensa. Apresenta características de um material poli-cristalino e muito associado formando “clusters” devido talvez à formação de ligações de hidrogênio.

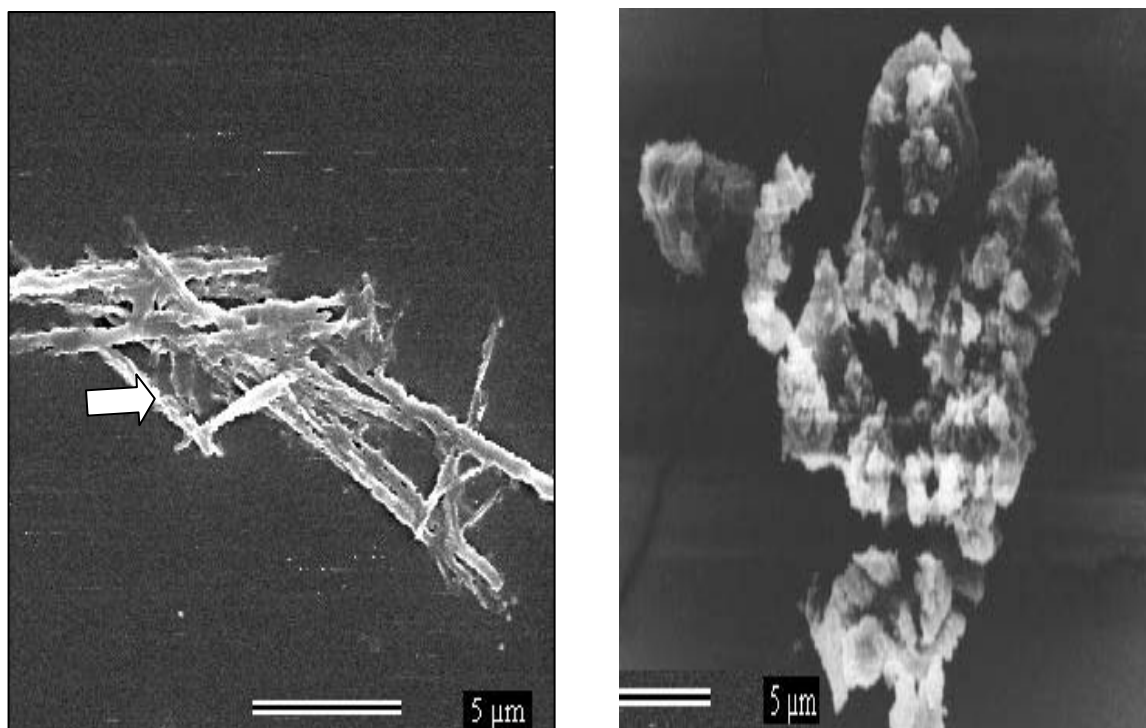


Figura 20. Micrografia de compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4(A) e beta ciclodextrina (B) respectivamente com aumento de 5000x

Nas micrografias onde se observou o microrganismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Figura 21 A E B), este apresentou sua forma comumente encontrada, bacilar uniformemente em toda a amostra (Figura 21-A) Enquanto *Candida albicans* foi observada em sua forma de levedura (Figura 22-B)

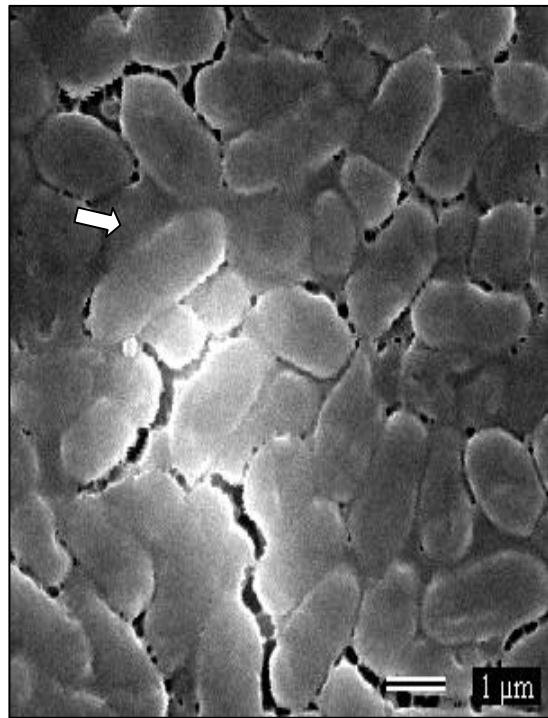
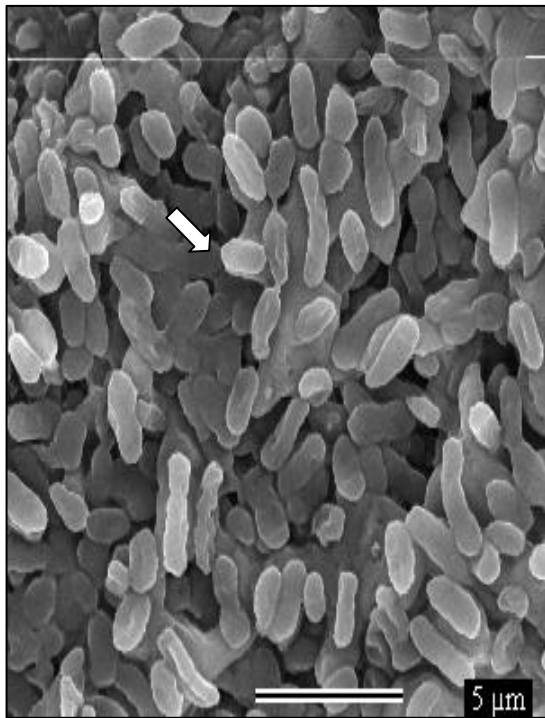


Figura 21. Micrografias do *A.a.* em aumento de 5000 (A) e 10000x (B).

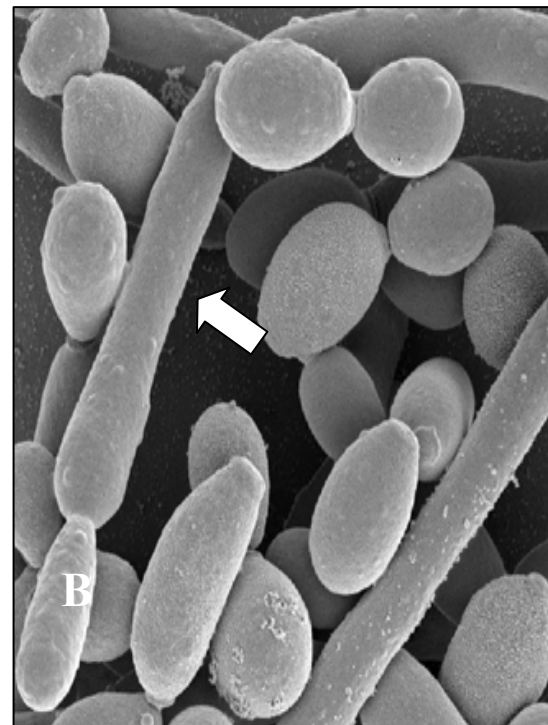
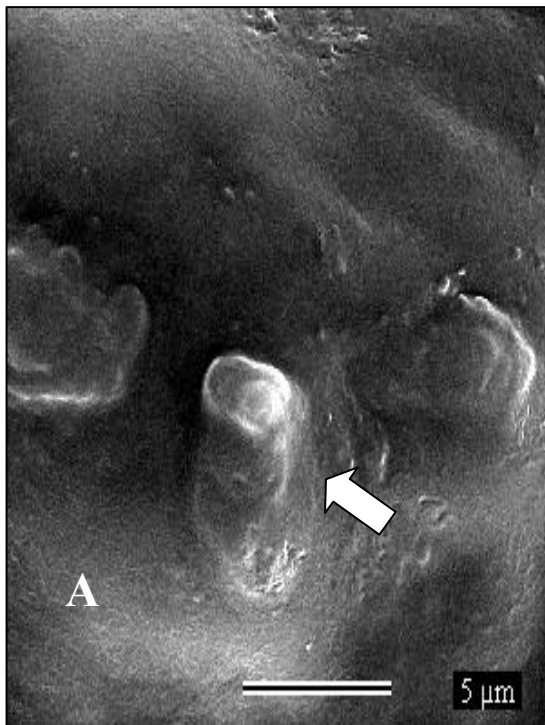


Figura 22. Micrografias do *C.a.* cultivado em caldo sabouraud dextrosado em aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

Nos grupos teste o microrganismo *A.a* foi cultivado na presença de cloridrato de clorexidina e dos compostos de inclusão de Cx: β -cd. Nas micrografias do grupo cloridrato de clorexidina (Figura 23) observa-se o microrganismo em sua forma bacilar, porém já são vistos os efeitos do fármaco que provoca distorções e desorientação da parede celular do *A.a* (Figura 23-A), que aparece como estrutura escura envolta por um halo brilhante, conseqüência do processo de fixação das amostras.

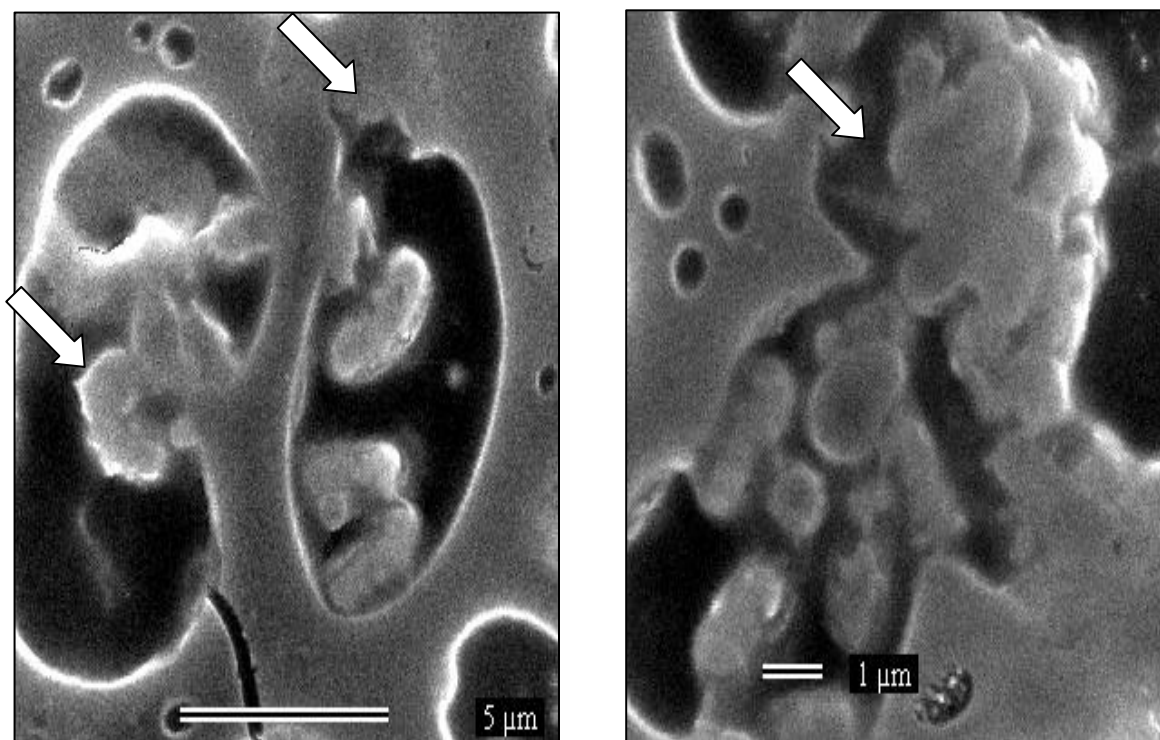


Figura 23. Micrografias do *Aa* cultivado na presença de cloridrato de clorexidina com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

Na Figura 23-A podemos observar pontos de rompimento ou falta de continuidade na superfície bacteriana, bem como, estruturas claras aderidas ao microrganismo. Na Figura 23-B estas estruturas chegam a formar grandes grupamentos aderidos à superfície do *A.a*, tipo “clusters” e próximo a eles o rompimento da membrana.

No grupo 1:1 (Figura 24) podemos observar também as estruturas claras arredondadas sugestivas de agregados do composto de inclusão 1:1 que aparecem em grande número em torno dos microrganismos os quais se aderem à sua superfície (Fig 24-B). Neste caso observamos o rompimento da membrana bacteriana em mais de um ponto no mesmo microrganismo, bem como achatamento da parede com a perda da forma da célula (Figura 24-A).

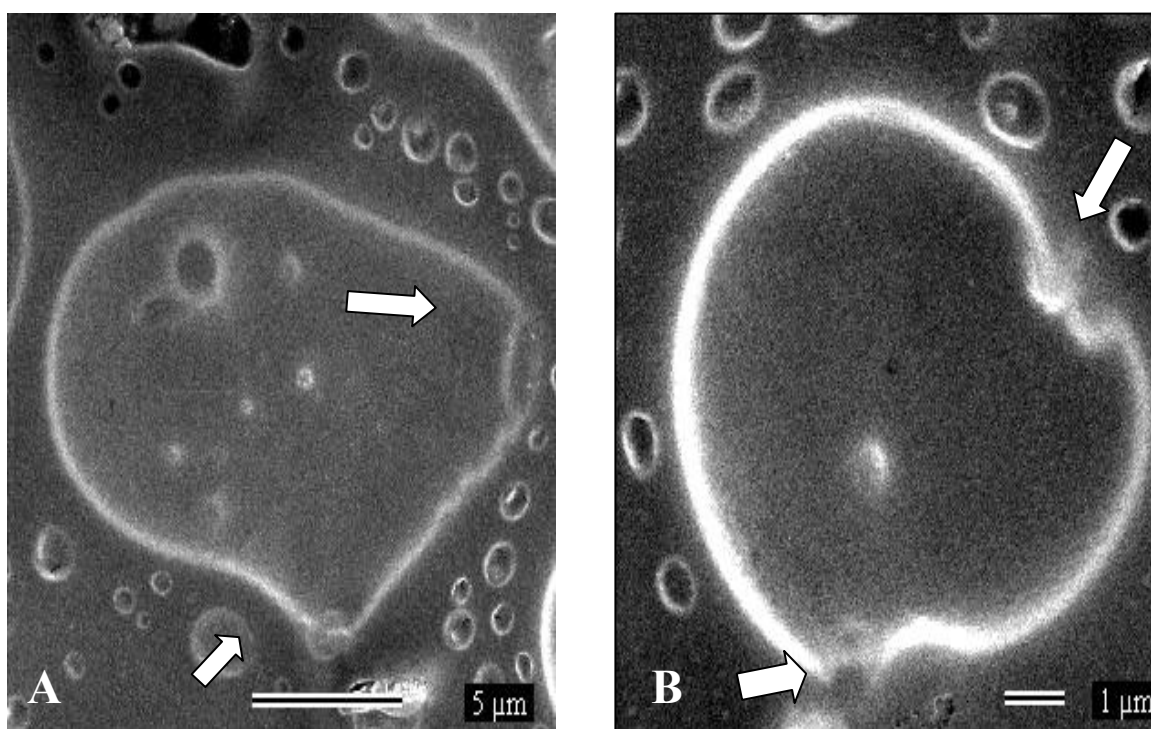


Figura 24. Micrografias do *A.a* cultivado na presença do composto de inclusão Cx:β-cd na proporção molar 1:1 com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

No grupo onde Cx: β -cd 1:2 foi cultivado na presença de *A.a* já observamos maiores variações da morfologia da amostra em relação às anteriores, neste caso, em menor aumento observa-se um grande agregado de estrutura mista onde podem estar presentes bactérias vivas, mortas e fármaco (Figura 25-B). Neste caso os limites entre os diferentes constituintes não podem ser bem identificados sugerindo o extravasamento de líquidos ou fluidos intracelulares que teriam facilitado a formação destes grumos e estruturas aderidas (Figura 25-A). Num maior aumento foi possível observar um grupo de bactérias apresentando estrutura já achatada e disforme, porém ainda apresenta contorno brilhante envoltas por estruturas circulares muito numerosas, provavelmente o composto de inclusão Cx: β -cd 1:2 que em grande número poderia se ligar à superfície bacteriana provocando desorientação e ruptura da membrana que mais tarde levaria ao extravasamento de líquidos periplasmáticos e lise celular (Figura 25-A).

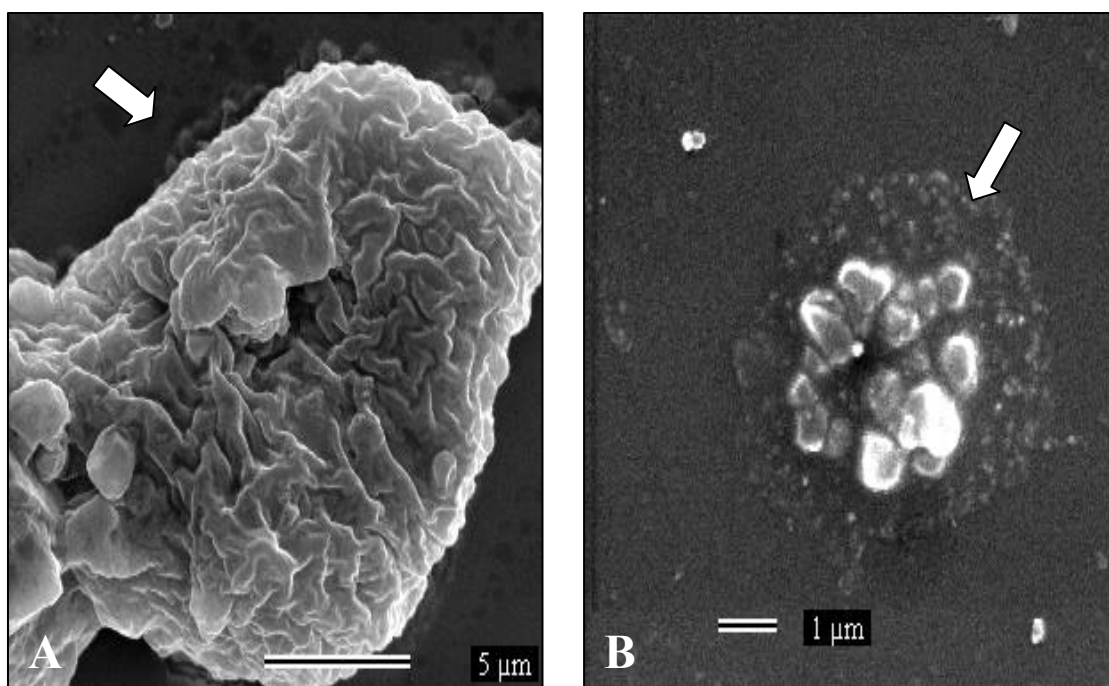


Figura 25. Micrografias do *A.a* cultivado na presença do composto de inclusão Cx: β -cd na proporção molar 1:2 com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

Como já descrito para Cx: β -cd 1:2 o grupo de razão molar 1:3 (Figura 26), em menor aumento revelou a presença de grandes estruturas aderidas umas as outras, sem limites claros, com superfície irregular aparentemente mista, não sendo possível em menos aumento visualizar a forma bacteriana característica (Figura 26-A), porém num aumento maior (10000 x) podemos observar algumas células apresentando ainda sua morfologia inicial envoltas por estruturas sugestivas de Cx: β -cd 1:3 ladeadas por grandes estruturas amorfas e agrupamentos mistos resultantes de células bacterianas mortas e restos do fármaco (Figura 26-B).

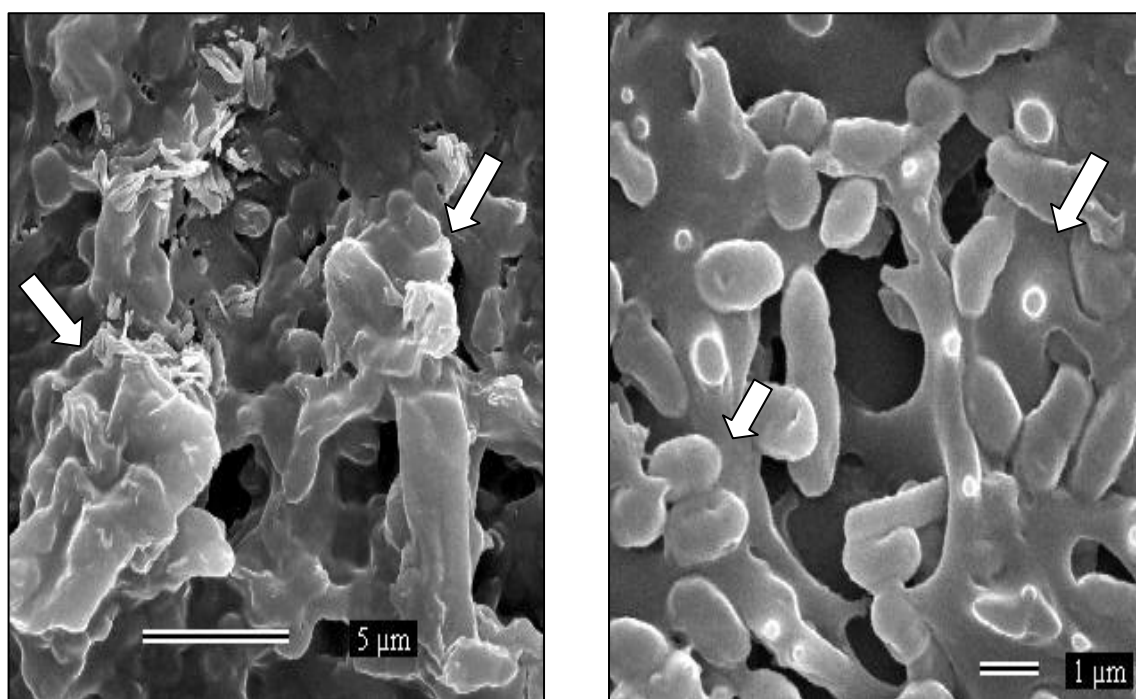


Figura 26. Micrografias do *A.a* cultivado na presença do composto de inclusão Cx: β -cd na proporção molar 1:3 com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

Com o aumento da razão molar de β -cd torna-se cada vez mais difícil observar células bacterianas isoladas em sua forma bacilar típica e até mesmo imagens de células isoladas com rompimento de membrana, nestes grupos a formação de grandes agregados (Figura 27-A) e grumos tipo clusters é cada vez maior, bem como o aparente extravasamento de líquido intracelular que parece aumenta ainda mais a aderência entre

as células mortas e até mesmo entre aquelas que ainda apresentam sua forma intacta, mas acabam presas nestas estruturas que alcançam sua maior predominância neste grupo (Figura 27-B)

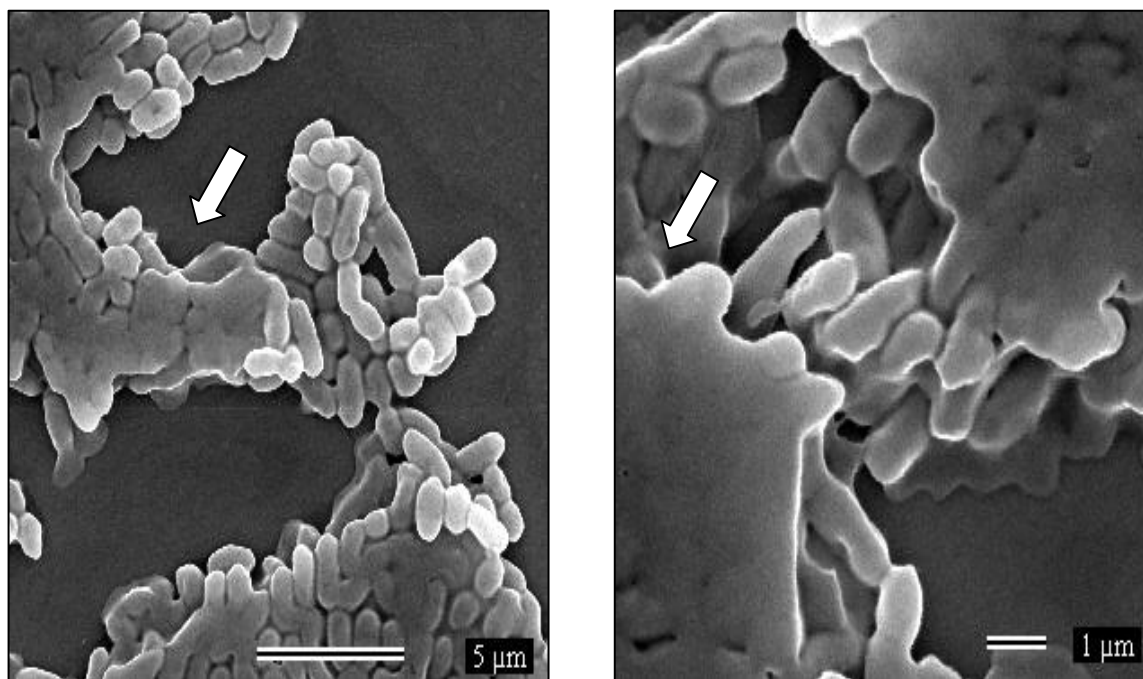
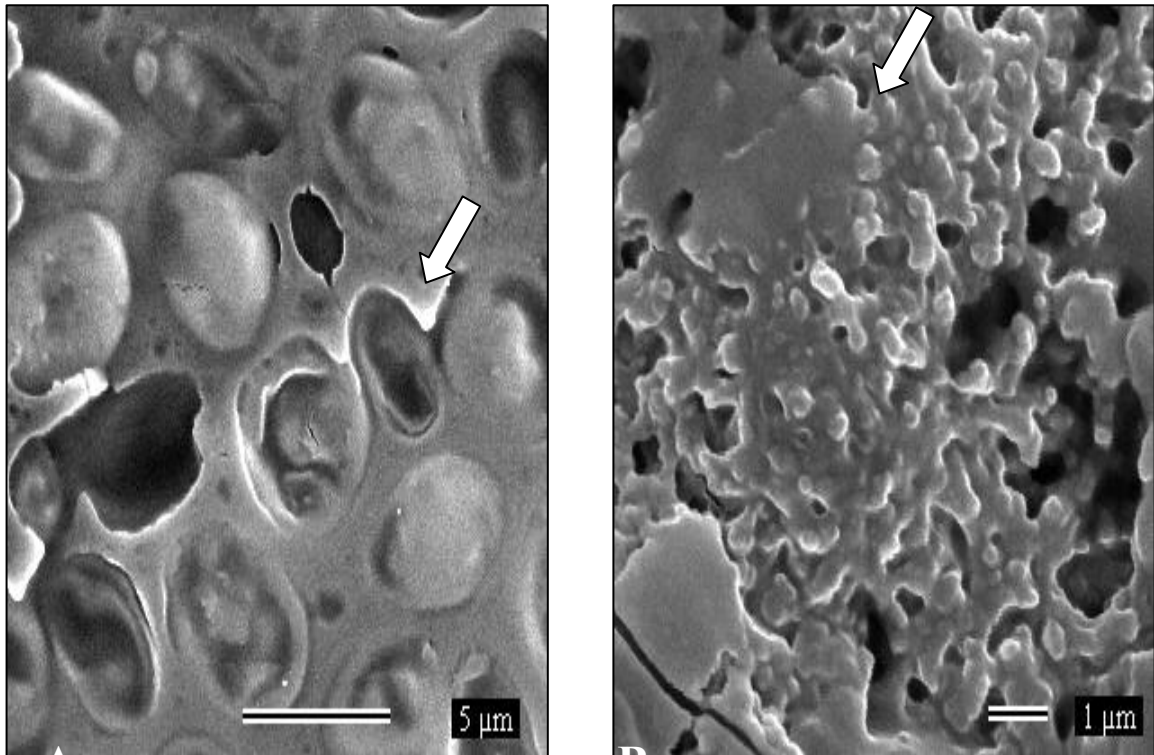


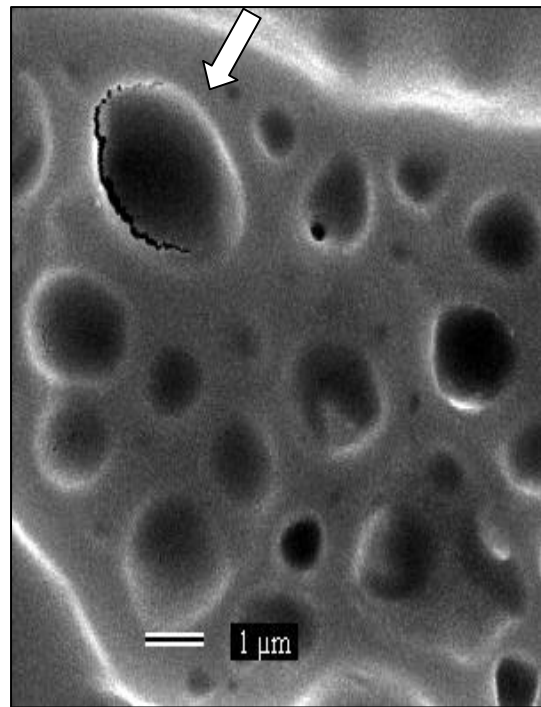
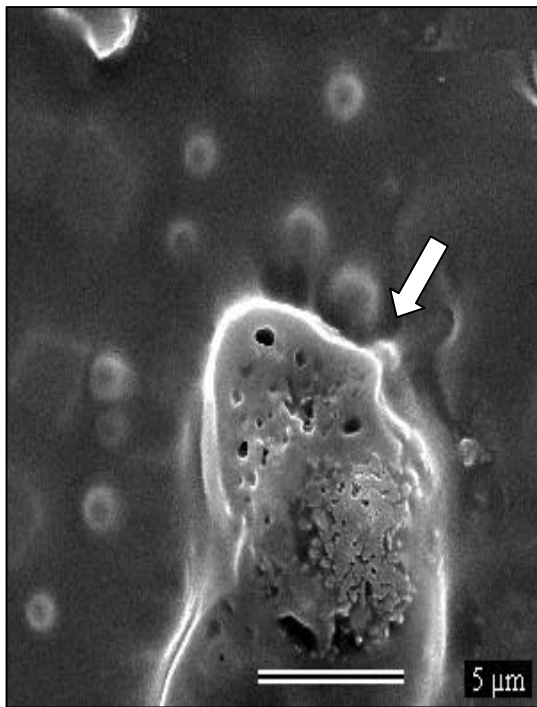
Figura 27. Micrografias do *A.a* cultivado na presença do composto de inclusão Cx:β-cd na proporção molar 1:4 com aumento de 5000 (A) e 10000x (B) respectivamente.

As imagens obtidas em microscopia de varredura para *C.a* tratada com os mesmos compostos apresentam características bem semelhantes. Inicialmente no controle positivo cloridrato de clorexidina pode-se observar a perda de continuidade do envoltório da levedura, quando comparado com a Fig 21B, porém a perda da forma não é tão intensa quanto no caso do *A.a* (Figura 28-A), neste caso já se observou a formação de agregados de células mortas (Fig 28-B).



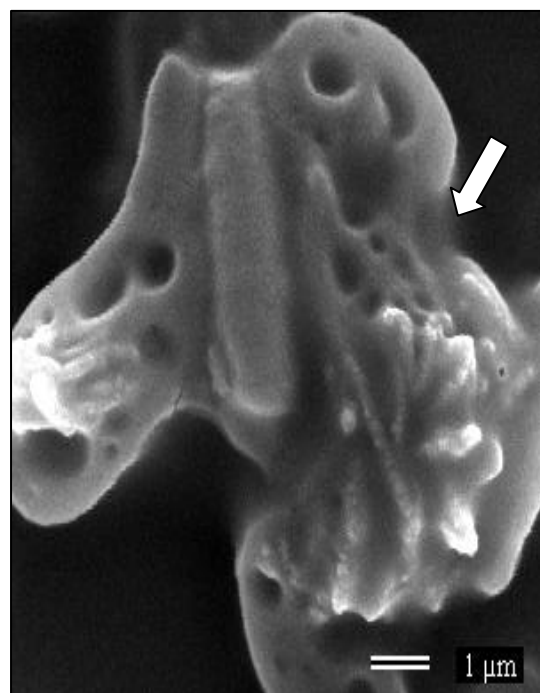
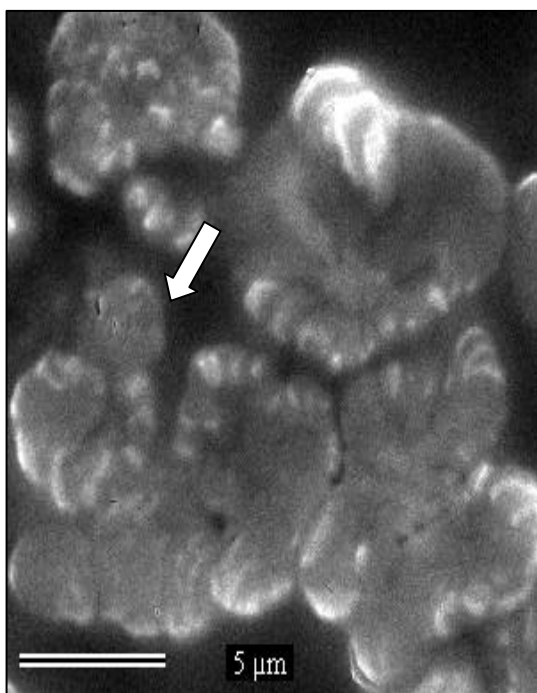
Figuras 28. Micrografias da *C.a.* cultivado na presença de cloridrato de clorexidina com aumento de 5000 (A) e 10000x (B) respectivamente

Na figura 29 correspondente à micrografia eletrônica de *C.a* cultivado na presença de Cx: β -cd 1:1 podemos observar como com os grupos anteriores, estruturas claras sugestivas dos compostos de inclusão envolta da célula fúngica que mostra evidente perda da continuidade e extravasamento de seu conteúdo intracelular (Figura 29-A). Também neste caso a perda da forma é mais discreta podendo observar a presença de numerosas células ovaladas que poderia ser resultado de dano ao equilíbrio osmótico celular com absorção de líquidos, podendo levar a um futuro rompimento devido ao aumento intenso de volume (Figura 29-B).



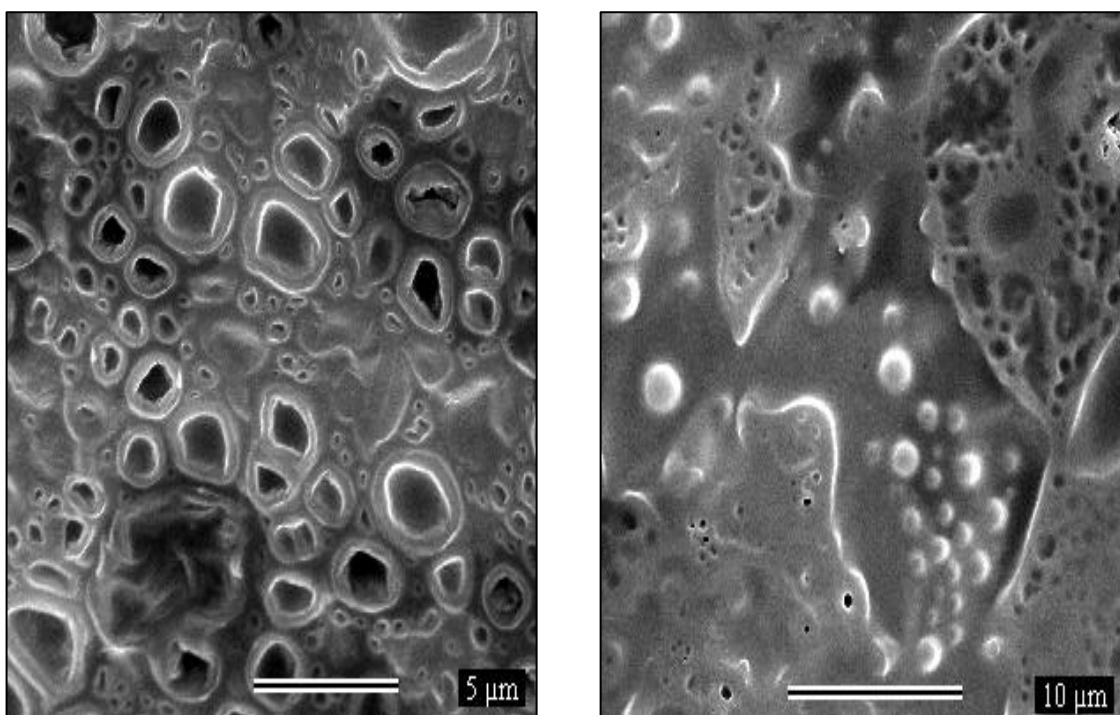
Figuras 29. Micrografias do *C.a.* cultivado na presença do composto de inclusão Cx:β-cd na proporção molar 1:1 com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

No grupo Cx: β-cd 1:2 já não é possível observar células fúngicas intactas nem unidades isoladas (Figura 30-A) com evidente rompimento, predominam estruturas disformes agregando restos celulares e os fármacos (Figura 30-B).



Figuras 30. Micrografias do *C.a.* cultivado na presença do composto de inclusão Cx: β -cd na proporção molar 1:2 com aumento de 5000 (A) e 10000x (B) respectivamente.

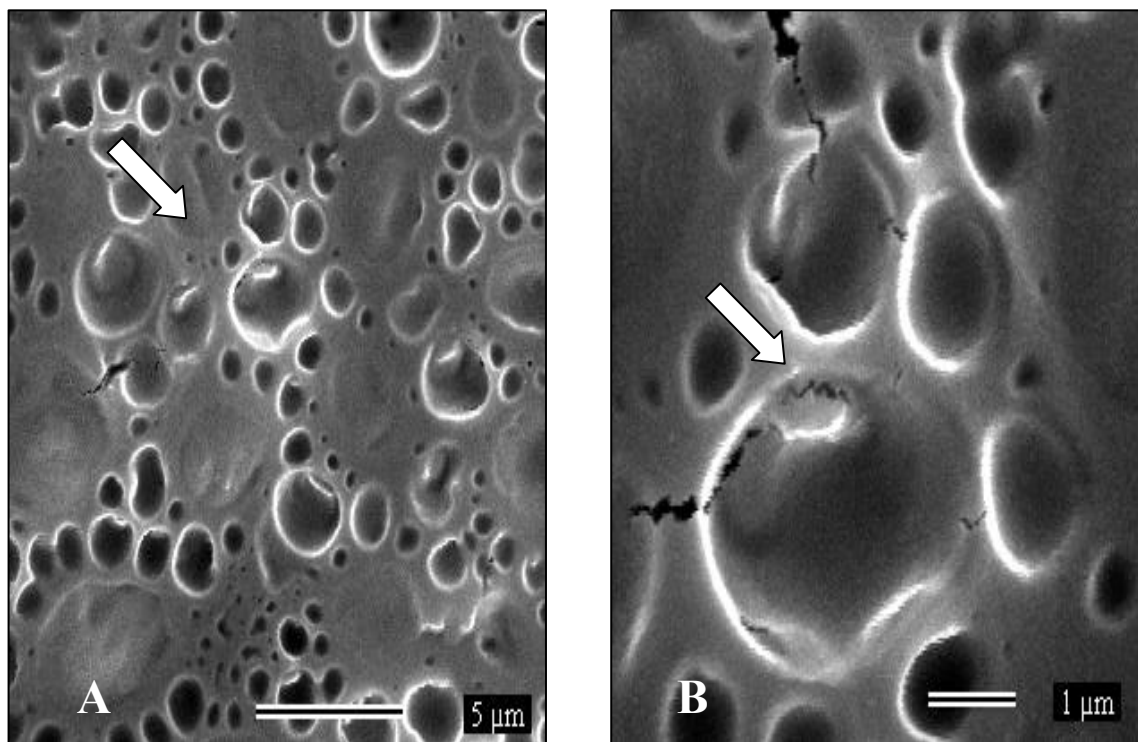
No grupo Cx: β -cd 1:3 voltamos a observar estruturas bacterianas ovaladas e circulares em grande número (Figura 31-A) rodeadas por estruturas claras sugestivas dos compostos de inclusão (Figura 31-B), já estando presentes estruturas irregulares contendo células aderidas. Neste grupo as células já se mostram presas pelo extravasamento de líquido intracelular.



Figuras 31. Micrografias do *C.a.* cultivado na presença do composto de inclusão Cx: β -cd na proporção molar 1:3 com aumento de 5000 (A) e 10000x (B) respectivamente.

Para o grupo Cx: β -cd 1:4 podemos observar a presença de células de *C.a.* com morfologia alterada com danos à superfície bacteriana, evidenciados pela perda de continuidade da parede celular (Figura 32-A) neste grupo tanto os agregados de restos

celulares quanto as células que apresentam morfologia regular mostram-se presas há um conteúdo amorfo proveniente do extravasamento celular (Figura 32-B).



Figuras 32. Micrografias do *C.a.* cultivado na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:4 com aumento de 5000 (A) e 10000 x (B) respectivamente.

6.4.2. Microscopia de Força Atômica (MFA)

A seguir estão apresentadas as imagens de MFA dos grupos controle formados pelos compostos em solução na ausência da bactéria e pela bactéria cultivada na ausência dos compostos de clorexidina.

No grupo do controle *A.a.* podemos observar o microrganismo com aproximadamente 2 μm com irregularidades na superfície sugestiva de fimbrias ou Trichios (Figura 33-D). A amostra observada tem em sua maior parte estruturas coco bacilar reveladas por plotagem da superfície da amostra, de superfície irregular. Com altura média superior a 100 nm (Figura 33-A e B).

Na figura 34 estão as figuras representativas das amostras de cloridrato de clorexidina que de forma geral se mostraram circulares com um halo externo (Figura 34-B e C) de intensidade de cor diferente da porção central também arredondada (Figura 34-D). As estruturas mostram tamanho variável, sendo a maioria maior que 50 nm com 40 nm de altura. Os agregados observados mostraram propriedades predominantemente cristalinas (Figura 34-A).

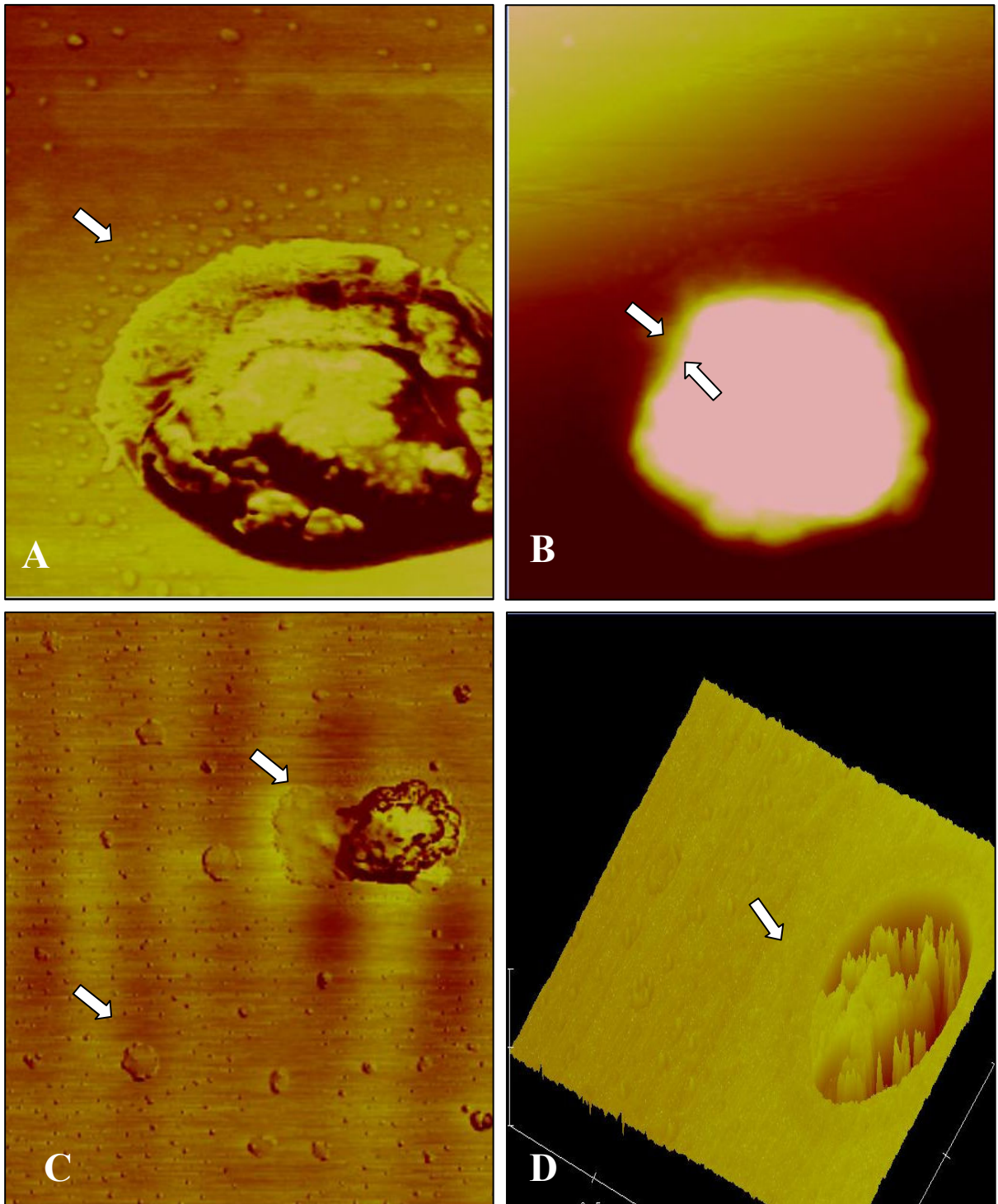


Figura 33. Micrografias de MFA do microrganismo *A.a.* cultivado na ausência dos fármacos Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

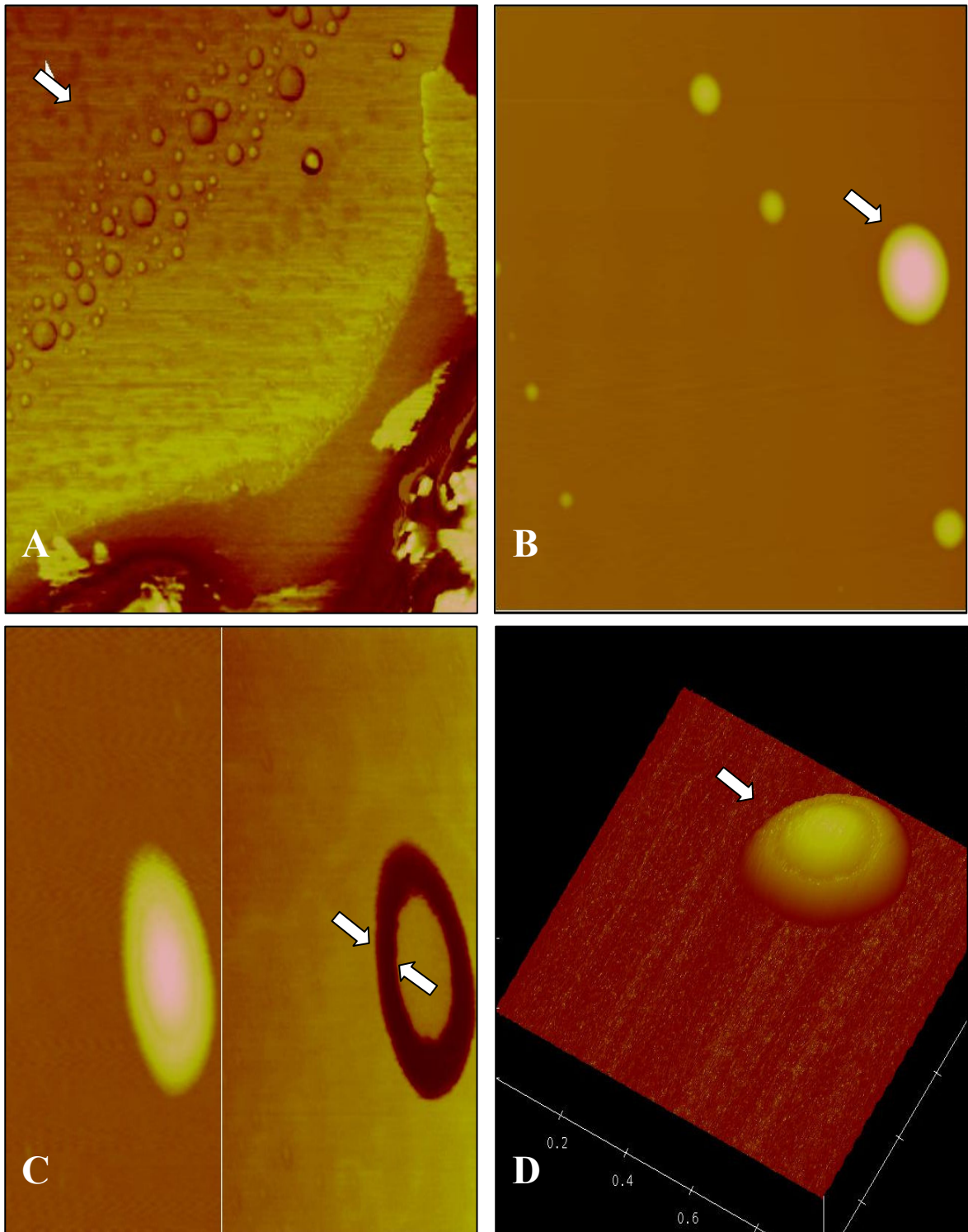


Figura 34. Micrografias de MFA dos compostos do cloridrato de clorexidina. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

Nas amostras de beta-ciclodextrina (Figura 35-A e B) foram observadas estruturas cristalinas organizadas em agregados compridos com 25 nm de altura média e 100nm de tamanho. Parece haver nestes compostos o predomínio de organização regular (Figura 35-C e D).

Por microscopia de força atômica, nas imagens de Cx: β cd 1:1 (Figura 36-A) pode-se observar estruturas circulares com altura média de 40nm (Fig. 36-B), de superfície irregular, com imagens sugestivas de diferentes pólos eletrostáticos na amostra, evidenciada pela diferença de intensidade nas cores da amostra (Figura 36-C e D).

A polarização, ou diferença de cargas eletrostática já encontrada no grupo de razão molar 1:1 em 1:2 (Figura 37-B) torna-se ainda mais evidente, nestas amostras formaram-se agregados mais achatados maiores atingindo até 800 nm de altura com grande irregularidade superficial (Figura 37-C). Na figura onde se observa a plotagem do material predominam estruturas cônicas regulares de altura variável. As estruturas menores que parecem coalescer para formar os agregados maiores que predominam na amostras tem um tamanho menor que 100nm (Fig 37-A e B).

No grupo Cx: β -cd 1:3 (Figura 38) foram observadas estruturas circulares semelhantes às observadas na razão molar 1:1 com aproximadamente 50 nm de altura (Fig. 38-D) e tamanho médio de 189 nm, a irregularidade superficial é menor nessa amostra (Figura 38-C). Também se observa a formação de pequenos agregados com mais de 500nm (Figura 38-A). Neste grupo, quando observamos a plotagem da amostra (Fig 38-D), como nos demais compostos de inclusão, ocorre o predomínio de estruturas cônicas de altura média de 50 nm com poucas estruturas passando de 100nm.

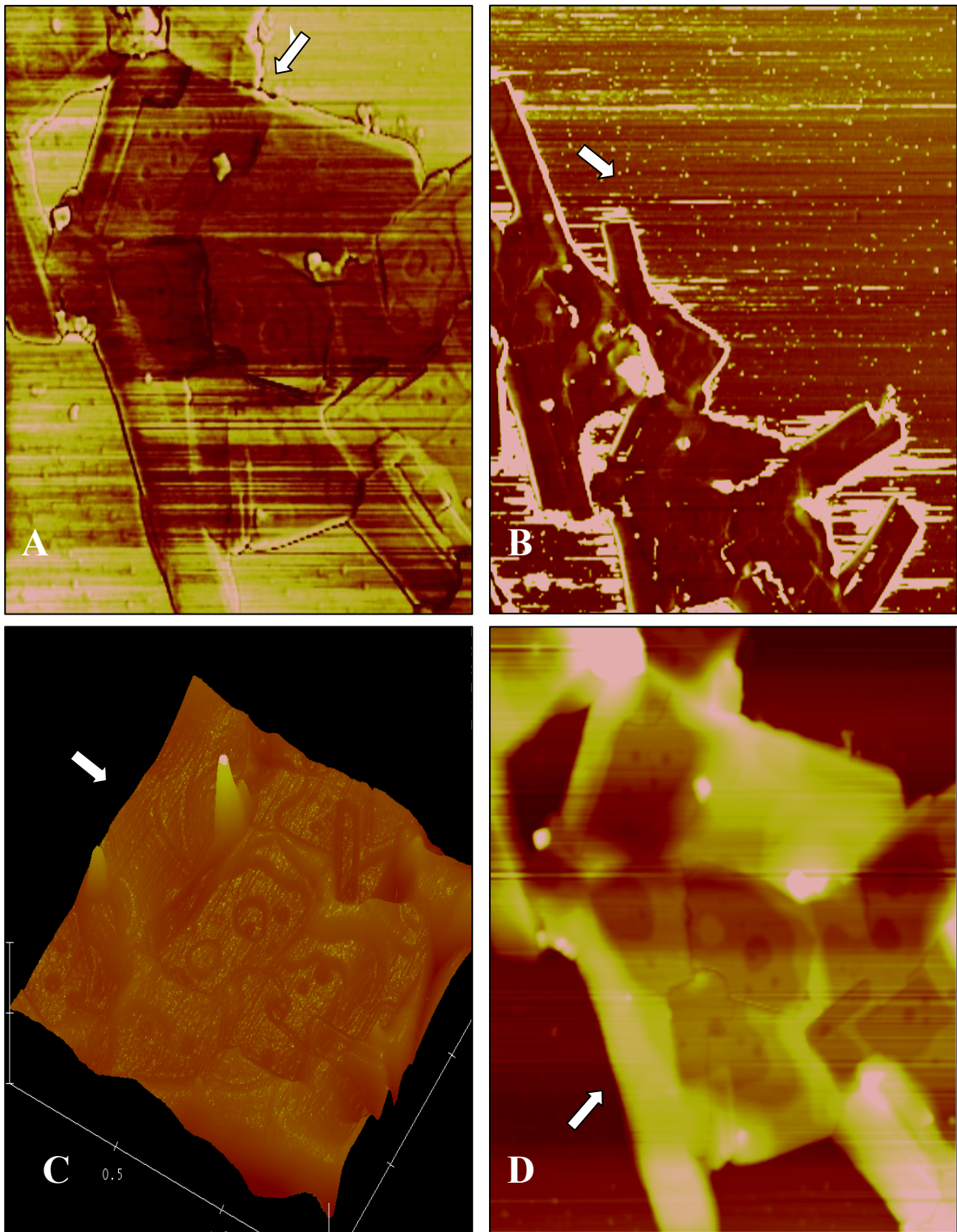


Figura 35. Micrografias de MFA da beta-ciclodextrina. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

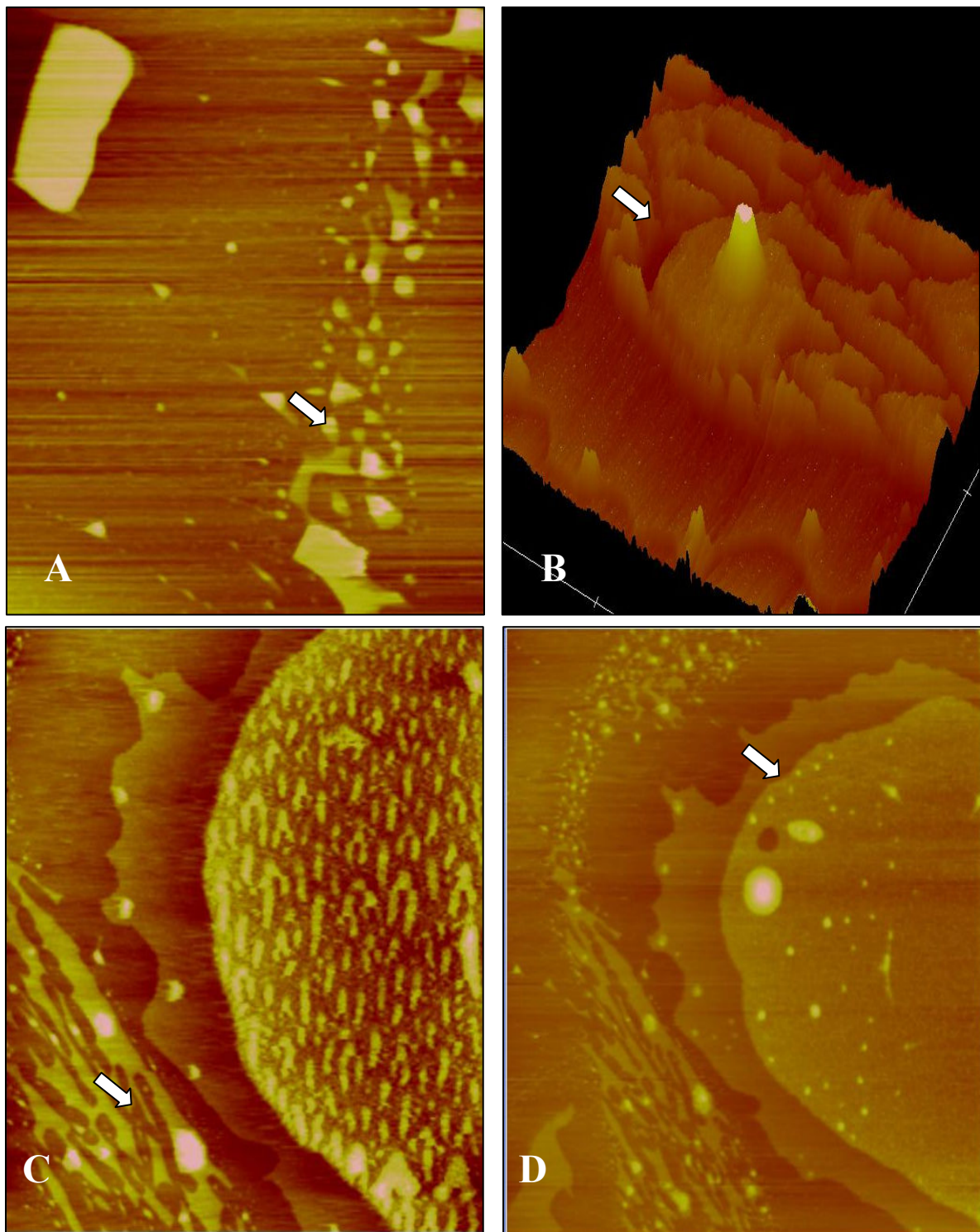


Figura 36. Micrografias de MFA dos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:1.

Escala de largura 2 μ m e escala de altura 30 nm.

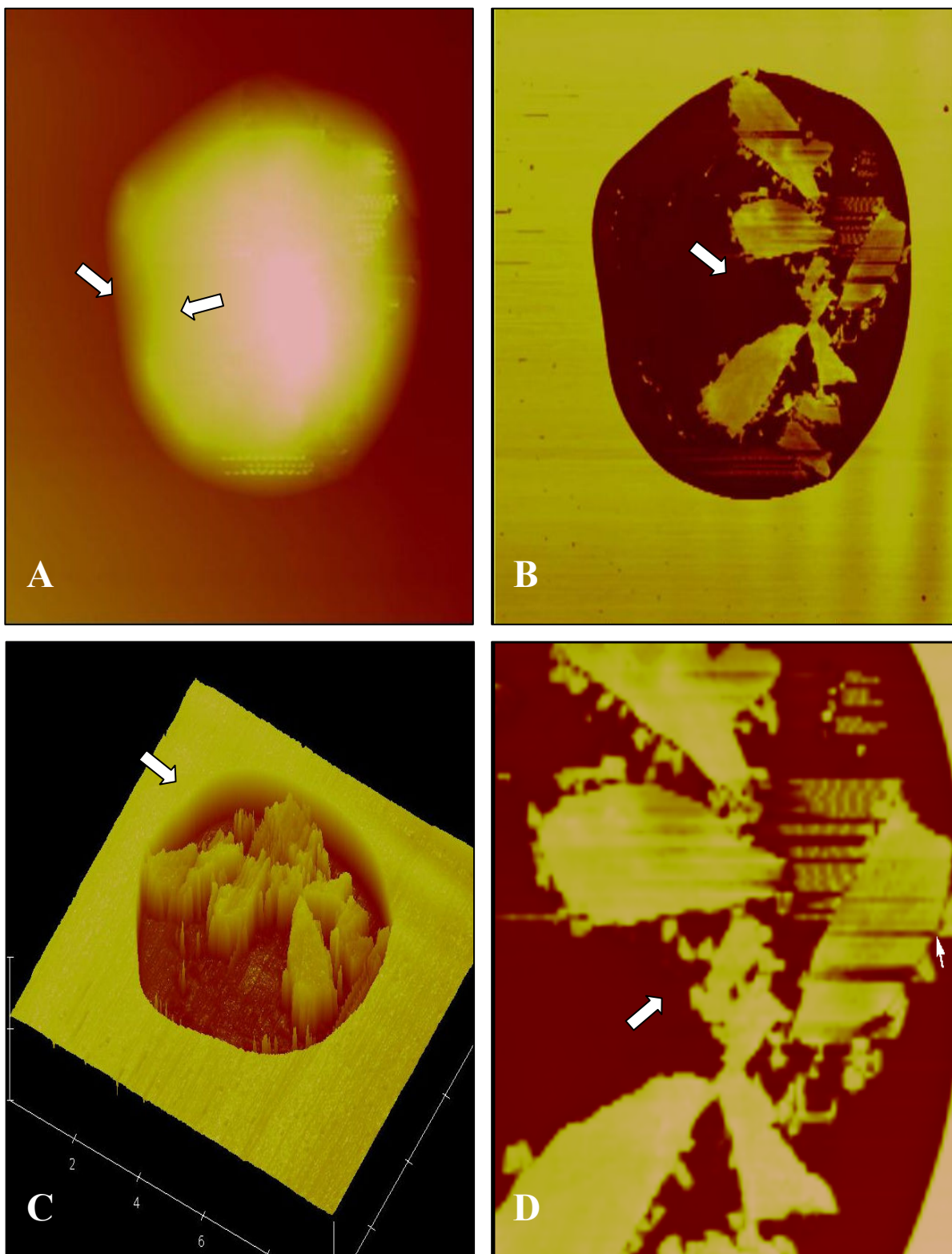


Figura 37. Micrografias de MFA dos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:2.

Escala de largura 2 μ m e escala de altura 30 nm.

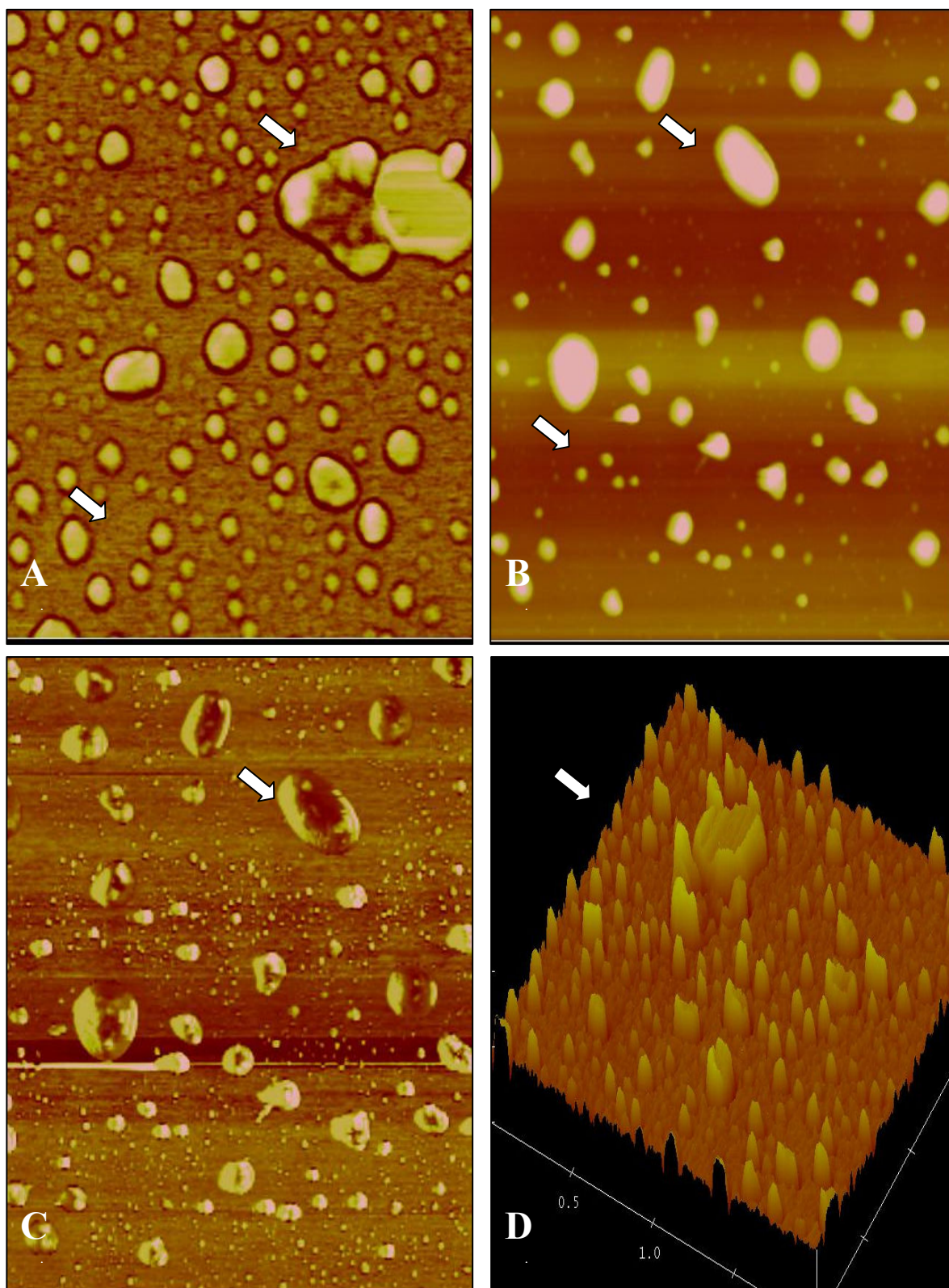


Figura 38. Micrografias de MFA dos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:3.

Escala de largura 2 μ m e escala de altura 30 nm.

Na razão molar Cx: β -cd 1:4 (Figura 39) também estão presentes estruturas circulares com 35 nanômetros de altura em média e menor irregularidade superficial que observado na razão molar 1:2 (Figura 39-C). Neste grupo predominam estruturas com tamanho médio de 180 nm (Fig 39-A). Neste grupo voltam a aparecer estruturas circulares com diferentes intensidades de cor, sugestivas de diferentes pólos eletrostáticos presentes na molécula (Fig 39-B e D).

No grupo controle positivo *A.a* cultivado na presença de Cloridrato de clorexidina (Figura 40) pode-se observar basicamente membranas bacterianas colapsadas com perda da forma coco - bacilar característica (Figura 40-A e B) Observa-se na amostra imagens sugestiva de extravasamento de fluido citoplasmático e periplasma, porém numa escala quantitativa muito inferior à observada nos compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina (Figura 40-C). Estes fenômenos pode ser resultado da ruptura da célula bacteriana que pode ocorrer por diferentes mecanismos que culminam na morte celular. O halo brilhante em torno dos microrganismos provavelmente é formado pela cápsula bacteriana (Figura 40-B).

No grupo onde se cultivou *A.a* na presença de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:1 observam-se grandes estruturas coco-bacilares, condizentes com a estrutura observada na amostra de *A.a* rodeadas por partículas menores em número bem maior (Figura 41-A). Na mesma região é possível observar o extravasamento de líquido citoplasmático de consistência mucosa para a sonda empregada (Fig 41-C). Nas regiões onde o fármaco atinge a superfície bacteriana podemos observar a perda da forma e colapso da membrana com maior extravasamento de fluidos nestas regiões (Fig 41-B). Também foi possível observar grande número de defeitos de superfície, representados por

rugosidades (Fig 41-C). O fármaco parece se ligar em vários pontos da membrana do mesmo microrganismo.

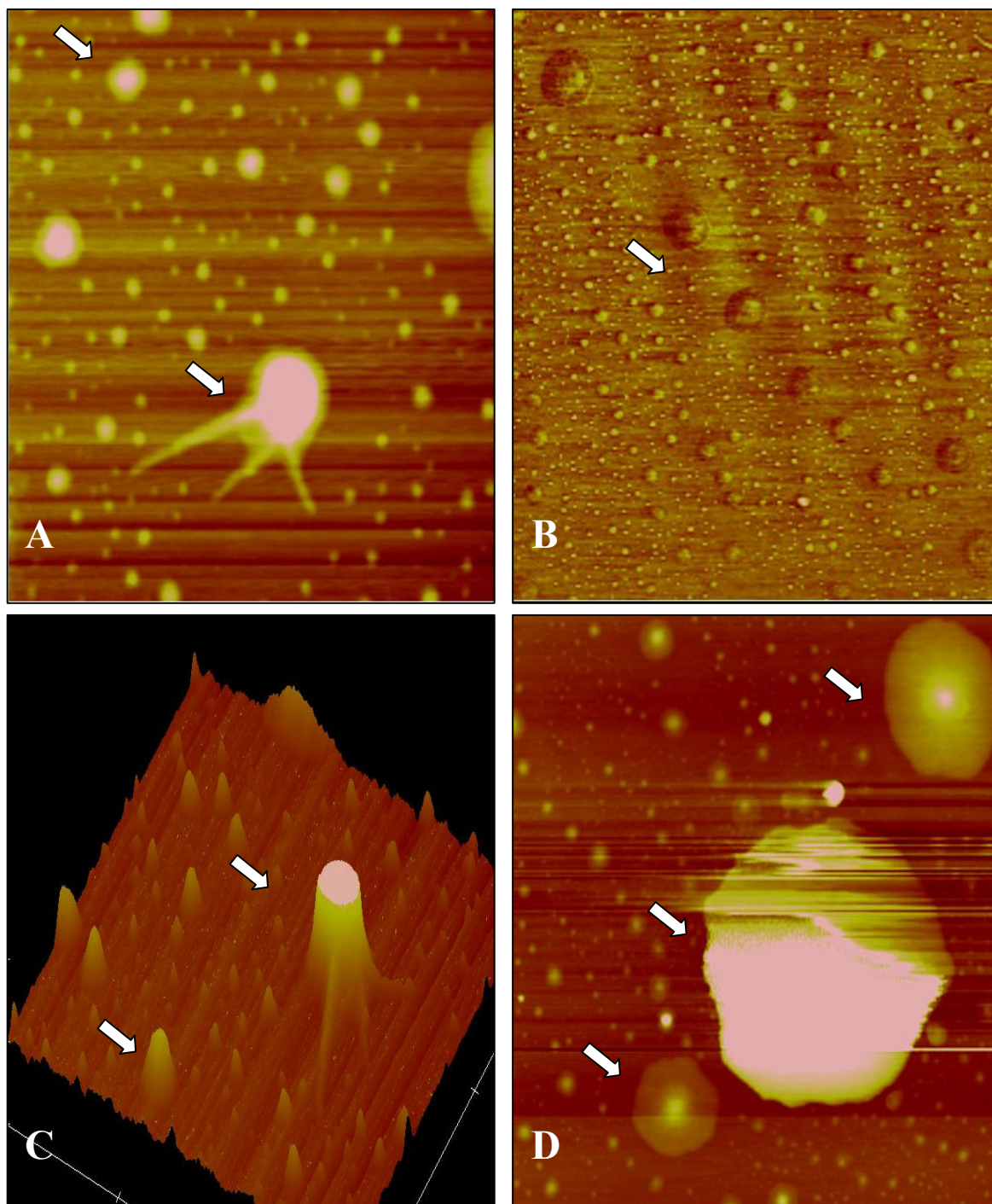


Figura 39. Micrografias dos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:4. Escala de largura 2 μ m e escala de altura 30 nm.

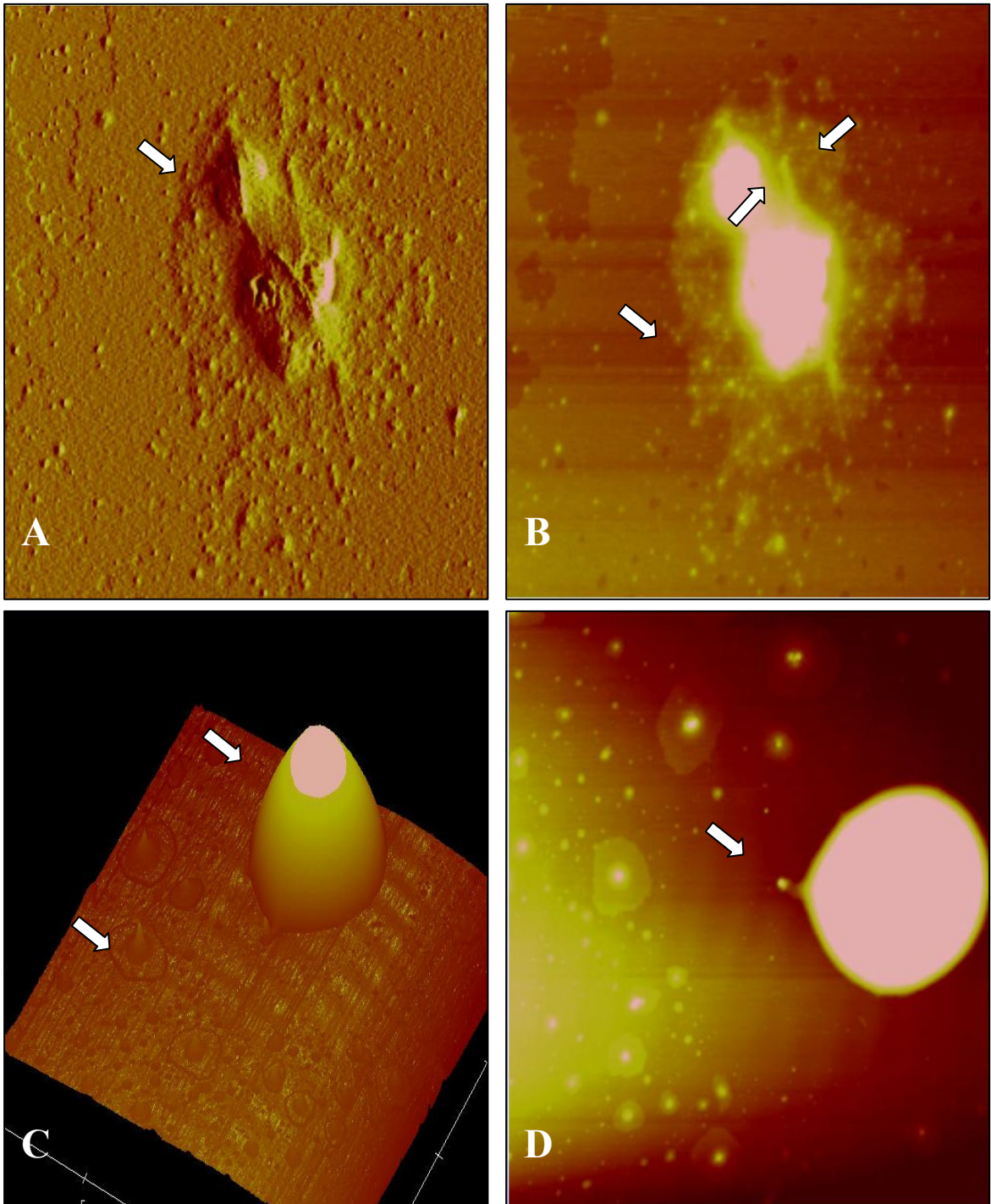


Figura 40. Micrografias de MFA de *A. a* na presença dos compostos de cloridrato de clorexidina. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

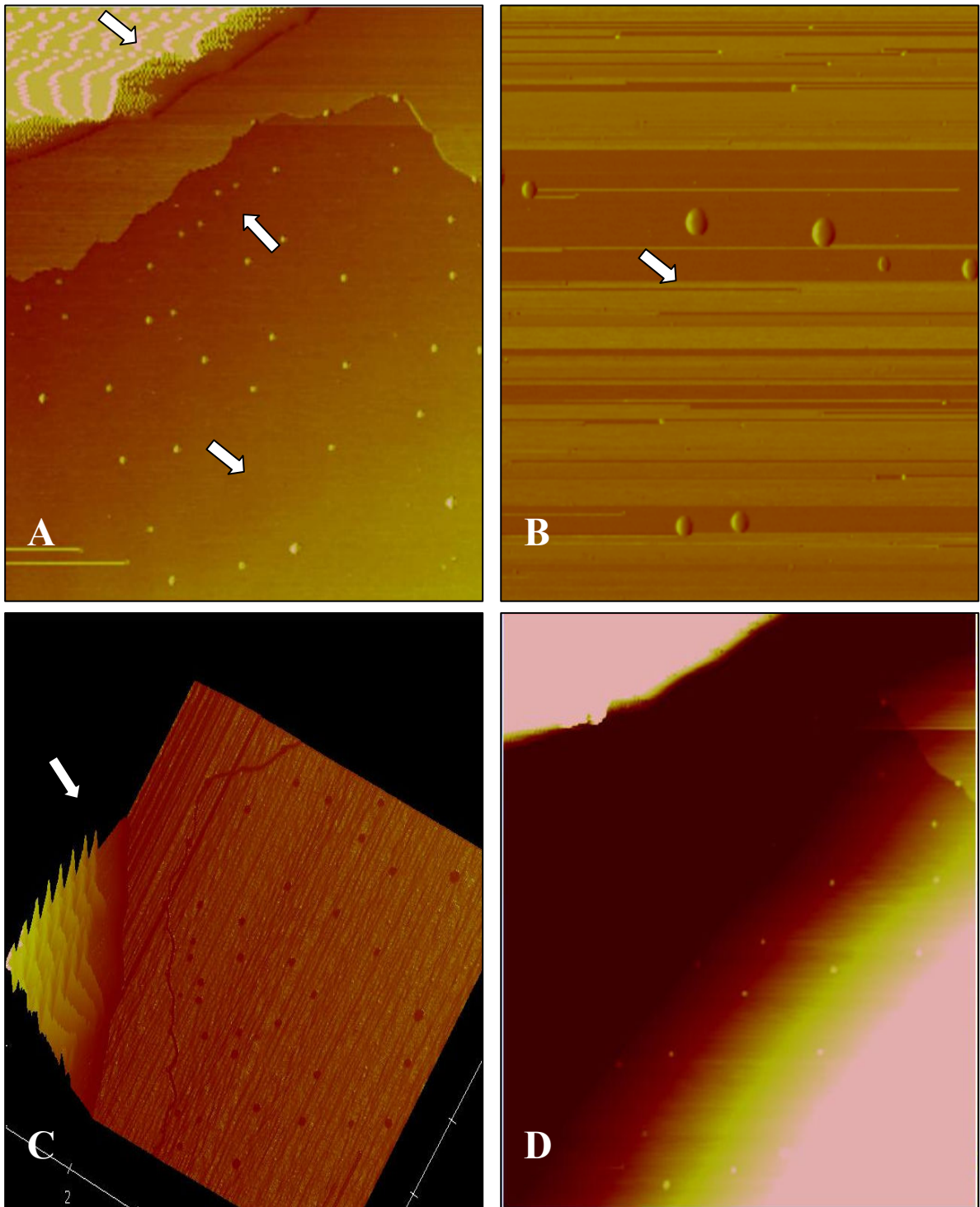


Figura 41. Micrografias de MFA de *A.a* na presença dos compostos de Cx: β -cd na proporção molar 1:1. Escala de largura 2 μ m e escala de altura 30 nm.

Observam-se inicialmente, nos compostos de inclusão Cx: β -cd 1:1 e 1:2, especialmente cultivados na presença de *A.a* pequenos defeitos na membrana resultado da solubilização de lípides na região dos domínios dos fármacos testados (Figura 42-A). A solubilização dos domínios membranares aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de beta- ciclodextrina. Esse fenômeno torna-se mais evidente na razão 1:2 de Cx: β -cd, (Figura 42-C e D) onde parece ocorrer um rearranjo dos fragmentos de membrana em domínios fluídos amorfos e grande quantidade de exsudato citoplasmático uniformemente em toda a amostra (Fig 42-B). Estas formações em mono e bicamada podem ser influenciadas pela combinação de fatores como interações eletrostáticas, tensão superficial, espessura da parede celular. Estas estruturas ainda sim eram vistas rodeadas por estruturas circulares sugestivas do composto Cx: β -cd 1:2.

Nos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:2; 1:3 e 1:4 foram observadas extensas áreas com conteúdo pegajoso para a sonda empregada. Esse achado é sugestivo de extensivo dano ao fluido citoplasmático e periplasma que aparece parcialmente desintegrado e escoado pela lâmina, com o aumento da razão molar a presença destas áreas aumenta progressivamente (Fig 43-A), chegando a dificultar a visualização dos microrganismos tratados com clorexidina: beta-ciclodextrina (Fig. 43-C). Nas imagens de clorexidina: beta-ciclodextrina 1:3 (Figura 43-D) começam a se formar grumos mistos provavelmente compostos do medicamento e bactérias mortas chegando a formar agrupamentos.

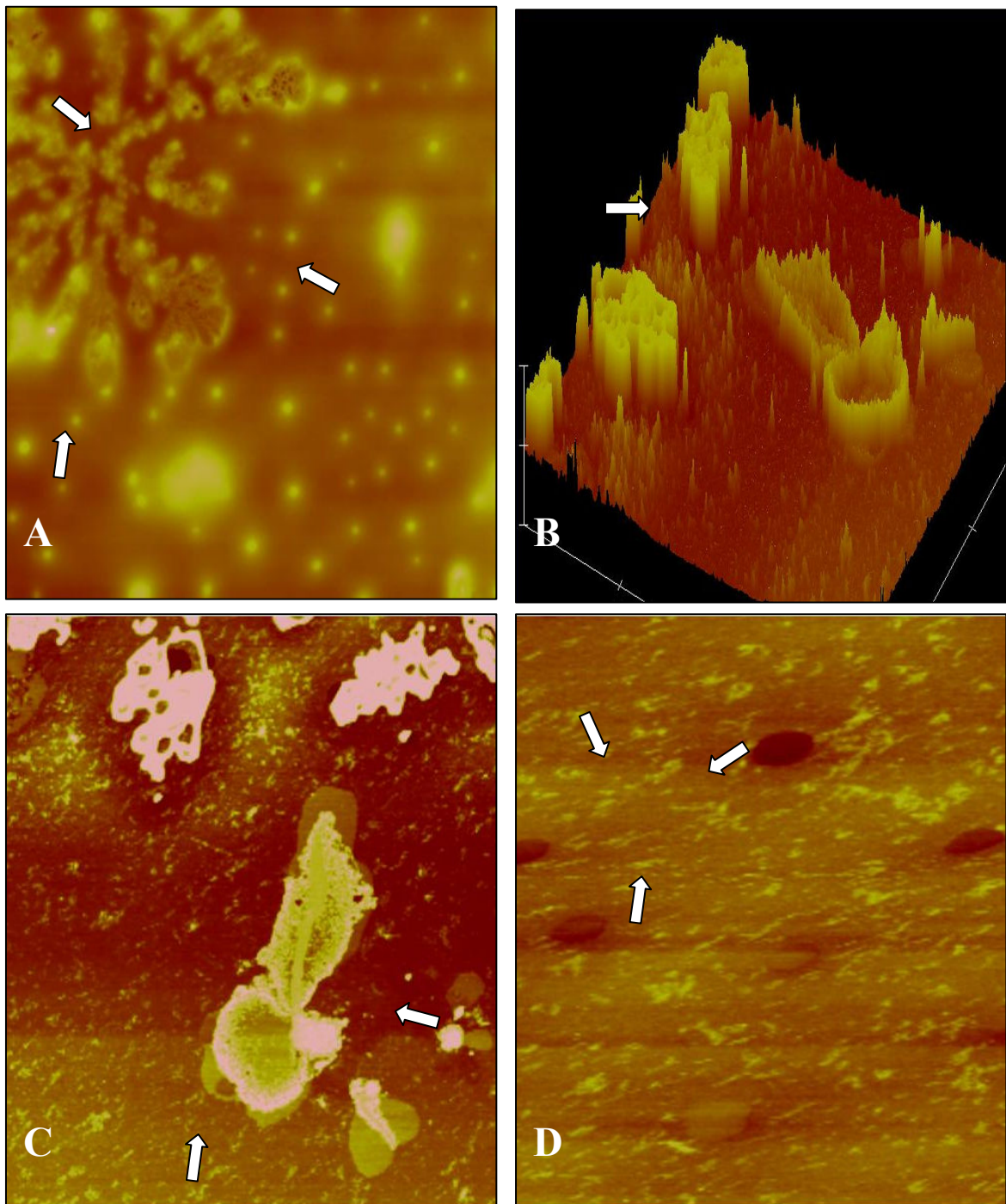


Figura 42. Micrografias de MFA de *A.a* na presença dos compostos de Cx:β-cd na proporção molar 1:2. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

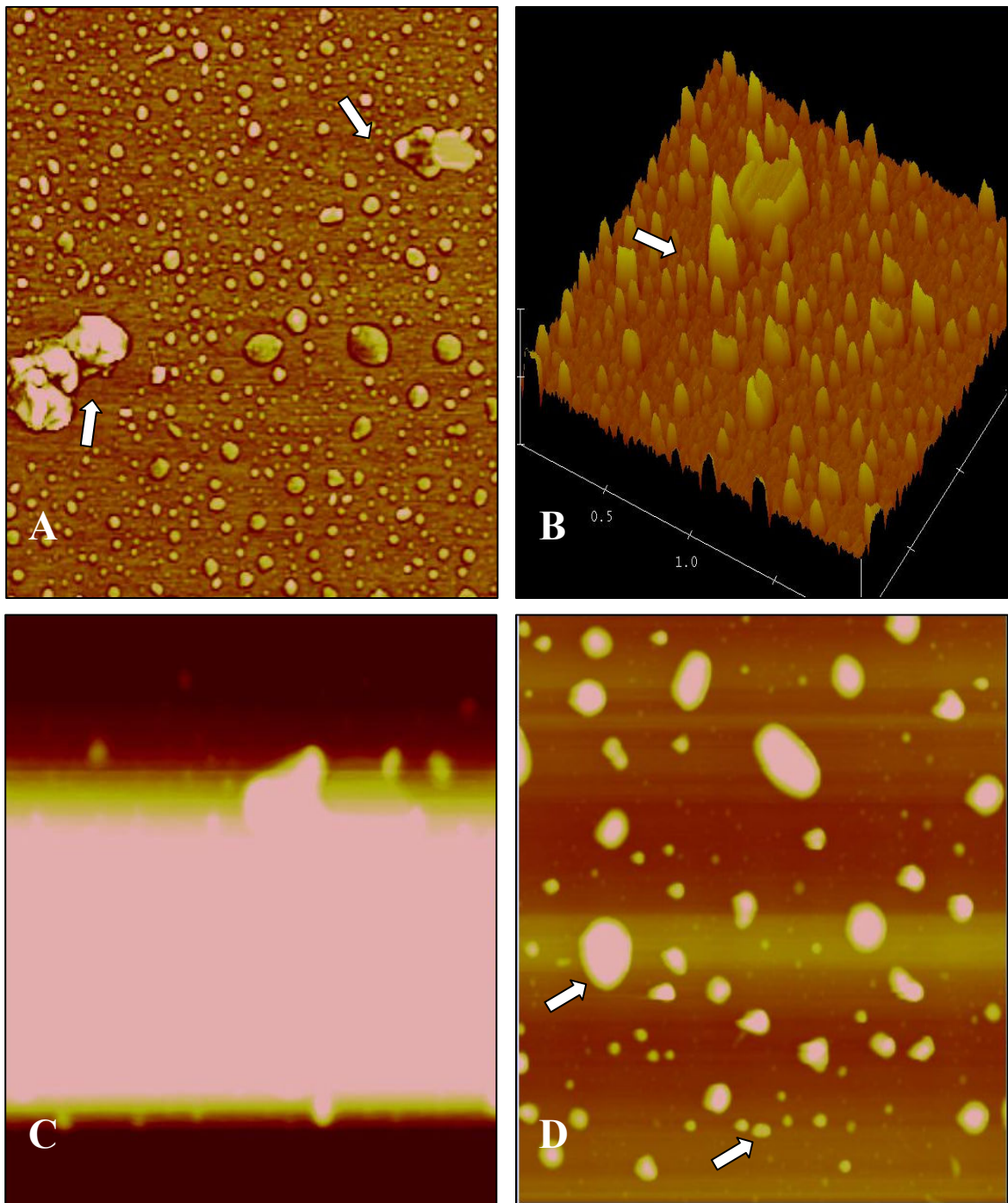


Figura 43. Micrografias de MFA de *A.a* na presença dos compostos de Cx:β-cd na proporção molar 1:3. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

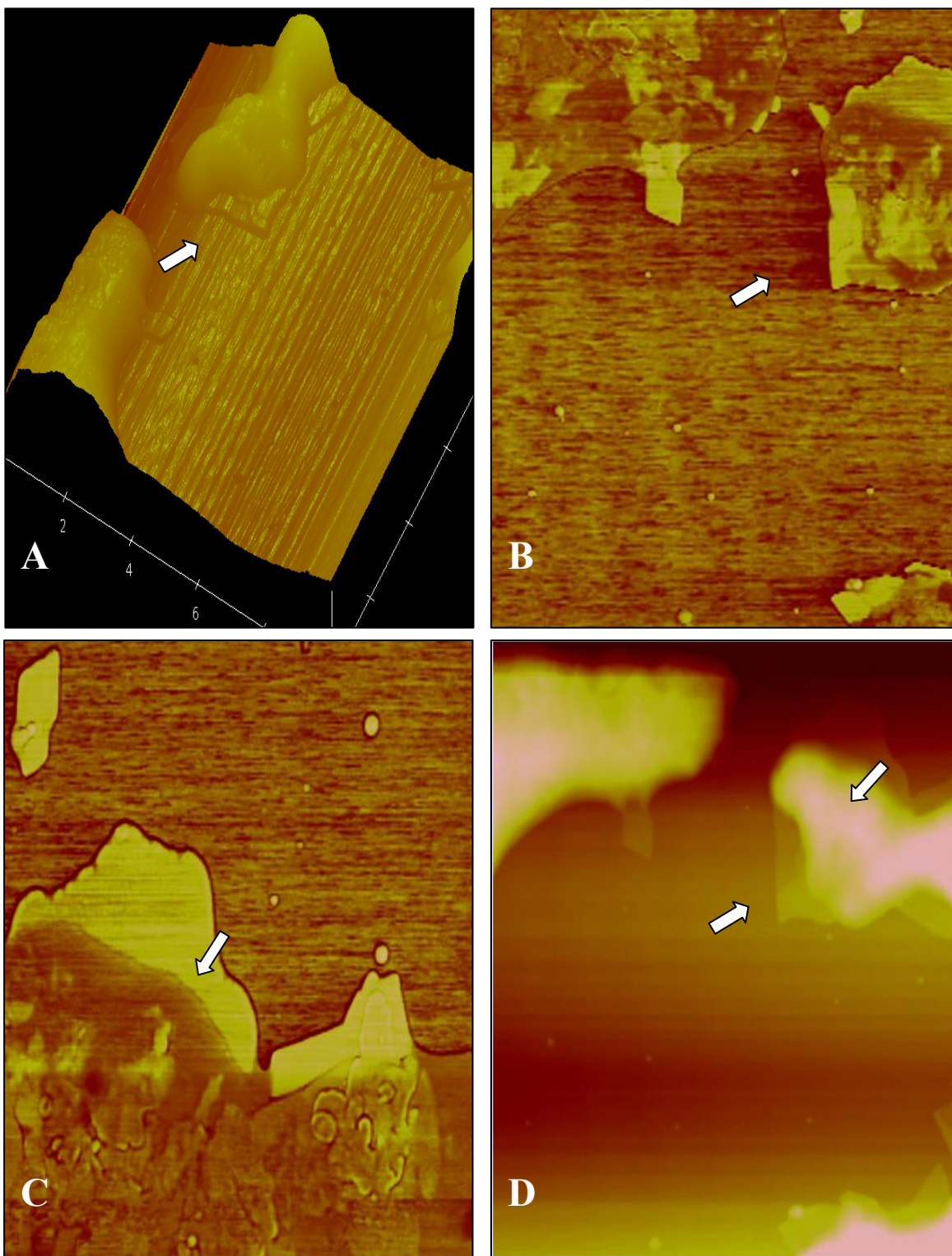


Figura 44. Micrografias de MFA de *A.a* na presença dos compostos de Cx:β-cd na proporção molar 1:4. Escala de largura 2 μm e escala de altura 30 nm.

Os agregados formados por pela matriz adesiva proveniente da ciclodextrina e constituintes celulares estão ainda mais evidentes no grupo clorexidina: beta ciclodextrina 1:4 (Figura 44-B), onde se alternam áreas de extensivo dano ao conteúdo citoplasmático e estes agrupamentos mistos (Fig 44-C e D). Em todos os grupos parece ocorrer um colapso da membrana externa, deixando evidentes os debris originados do periplamas (Fig 44-A). De acordo com Li et al (2007) esse dano concentra-se inicialmente nos pólos bacterianos, percorrendo toda área membranas para em seguida causar danos as faces mais internas que seriam letais.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo propusemos-nos estudar as interações dos compostos oriundos da associação entre o cloridrato de clorexidina e beta-ciclodextrina com membranas de microrganismos.

De acordo com Loftsson e Brewster (2007) existe uma resistência natural das membranas em relação à entrada de fármacos na célula e as ciclodextrinas são capazes de aumentar a solubilidade dos fármacos associados a ela, aumentando assim o gradiente de concentração do fármaco na membrana e permitindo sua passagem por esta barreira.

Durante as últimas décadas diversos artigos demonstraram a atividade microbiocida da Clorexidina. O efeito antimicrobiano da clorexidina é mediado por diversos mecanismos (Lang e Brex, 1986; Bonesvoll e Gjermo 1978).

No entanto, vem ocorrendo um aprimoramento no conhecimento e estudos destes compostos. Cortés et al em 2001 estudaram compostos de clorexidina:beta ciclodextrina nas razões molares 1:1 e 1:2 e verificaram que nas mesmas concentrações de clorexidina estes compostos eram microbiologicamente mais efetivos que o fármaco puro e que entre eles não havia diferença tanto em relação à atividade antimicrobiana quanto em relação às suas propriedades químicas incluindo seu arranjo molecular.

Após a caracterização físico-química de sólidos constatou-se a interação molecular entre a clorexidina e a beta-ciclodextrina representados pelas mudanças observadas na ressonância magnética. Estes resultados parecem refletir que o fenômeno de inclusão das moléculas convidadas ocupa a cavidade da beta-

ciclodextrina, o que já foi observado por Cortés et al (2001) apenas nas razões molares 1:1 e 1:2.

Neste caso houve um padrão de tendência para as razões molares, uma vez que o composto na razão molar 1:4 volta a apresentar características de cristalinidade. No caso do composto de inclusão liofilizado o halo de amorficidade, sugeriu a influência da técnica de preparação do composto de inclusão no estado de cristalinidade, já que a liofilização faz um composto menos cristalino (Szejtli, 1988). Verifica-se um aumento da amorficidade dos compostos de inclusão até a proporção 1:3, já na proporção 1:4 observa-se um padrão de cristalinidade devido à alta concentração de β -ciclodextrina nesta proporção. O halo de amorficidade tem sido verificado na formação de compostos de inclusão de clorexidina (Cortés et al, 2001) e é explicado pela desordem gerada no sistema após o rompimento das ligações de hidrogênio das ciclodextrinas, liberação das moléculas de água no interior da cavidade da beta-ciclodextrina e conseqüente formação de novos compostos (Szejtli et al, 1988; Szejtli et al, 1996).

Esta mudança de estrutura, com a formação dos compostos de inclusão também poderia levar a mudanças na solubilidade dos complexos resultantes. Cabe ressaltar que o cloridrato de clorexidina apresenta baixa solubilidade e com a formação dos compostos de inclusão de Cx: β -cd tornam-se mais solúveis que o fármaco puro (Cortés et al, 2001). Por outro lado, o aumento da quantidade de ciclodextrinas poderia ocasionar uma maior tendência à solubilização de lipídios, um dos componentes principais das membranas celulares, esta propriedade poderia explicar a maior efetividade dos compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina nas razões molares 1:3 e 1:4 em relação 1:1 e 1:2 e também em relação ao cloridrato de clorexidina. Dessa forma a beta ciclodextrina funcionaria como uma matriz de

auto-agregação, aprisionando em sua rede não apenas fármacos, também células bacterianas vivas mortas e debris celulares. A maior capacidade de adesão das ciclodextrinas à parede celular através de ligações de hidrogênio seria outro fator que facilitaria a formação dessa matriz de agregação somando-se a estas o fato de que a clorexidina quando em contato com constituintes intracelulares causa sua coagulação (Galice et al, 2006)

Da mesma maneira as análises térmicas evidenciaram a formação de novos compostos, como relatado em Cortés et al (2001) para compostos nas razões molares 1:1 e 1:2, porém ainda de acordo com Cortés et al (2001), Szejtli (1996) e Sinisterra et al (1995) estes compostos são termicamente menos estáveis que a beta-ciclodextrina livre.

Diniz (2007) estudando compostos de tetraciclina: beta-ciclodextrina nas mesmas razões molares também relatou diferenças nas propriedades microbiológicas e físico-químicas destes compostos sugerindo a formação de compostos diferentes entre si e com arranjos supramoleculares diferenciados de acordo com a estequiometria estudada

A caracterização química dos compostos de inclusão visando a espectroscopia de infravermelho, análises térmicas e principalmente os resultados de RMN-Roesy reforçam os resultados de Denadai et al (2007) sugerindo que a clorexidina e a ciclodextrina formam compostos de inclusão nas proporções molares 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 formando assim um composto supramolecular de tamanho nanométrico (Figura 14).

Neste estudo resultados da liberação controlada em dentina bovina evidenciaram que os compostos apresentam uma liberação regular por mais de dez dias. Sendo que os compostos na razão molar 1:2 apresentaram perfil de liberação

mais próximo ao zero o que está de acordo com os resultados da análise térmica onde 1:2 é o composto de inclusão mais estável sendo que a liberação e solubilização da clorexidina parece ser modulada pela beta-ciclodextrina.

Estes resultados sugerem que estes compostos poderiam ser empregados para liberação controlada em periodontia, dermatologia, desinfecção de cateteres com a vantagem de não terem apresentado uma liberação inicial grande, podendo manter níveis do antimicrobiano superiores ao MIC durante 10 dias no sítio alvo diminuindo o número de aplicações do fármaco minimizando assim a necessidade da colaboração do paciente durante o tratamento. Além disso, com o emprego destas baixas dosagens os efeitos colaterais como manchamento e descamação da mucosa bem como os efeitos citotóxicos seriam minimizados.

Jabbour et al(2005) estudaram o efeito antimicrobiano, e a capacidade de compostos derivados do boro afetar a viabilidade celular e a formação de biofilmes, sabendo que a formação dos biofilmes está fortemente relacionada a interações eletrostáticas. A presença de domínios catiônicos altamente carregados a Cx pode promover aderência bacteriana em concentrações superiores à sua concentração mínima inibitória. Em concentrações de 1mM compostos catiônicos de oxazaborolidinas têm menos efeito na aderência bacteriana, enquanto que em concentrações maiores de 6 e 120mM a adesão bacteriana é 50% maior, demonstrando assim a correlação estrutura química- atividade biológica este fenômeno pode ser observado de modo geral em fármacos contendo o grupamento beta-butiril, do mesmo modo, afeta a viabilidade bacteriana. A presença dos domínios catiônicos, expressados pelas diferentes cargas eletrostáticas verificadas pelas diferentes intensidades de cor na Microscopia de força atômica, no presente

estudo poderia justificar a presença de diferentes pólos eletrostáticos nos compostos de inclusão.

A caracterização espacial por MEV e AFM da interação microrganismos-compostos de inclusão foi realizada com o objetivo de se estudar qualitativamente esta relação e as possíveis diferenças da interação dos microrganismos com esses complexos supramoleculares em relação ao cloridrato de clorexidina.

A microscopia de varredura foi utilizada para realizar uma caracterização morfológica superficial das amostras e posteriormente de sua interação com os microrganismos escolhidos, uma das vantagens é que apesar desta técnica fornecer dados mais limitados, detendo-se à morfologia superficial, esta apresenta um baixo custo em relação às demais. Já a Microscopia de Força Atômica (MFA) é um importante aditivo no arsenal de técnicas microscópicas possibilitando a caracterização de membranas de nano filtração, possibilitar a visualização das superfícies em três dimensões. Além disso, testes estatísticos específicos podem ser aplicados para fornecer dados de distância, altura, picos, rugosidade média quantitativa (Cahill et al, 2008). Com MFA foi possível estudar não só as propriedades físicas dos compostos em imagens em três dimensões como as interações entre estes compostos e os microrganismos em condições muito próximas das condições naturais. Pela facilidade no preparo das amostras diminuindo assim a influência da técnica de preparo das amostras nos resultados.

De acordo com a caracterização espacial por microscopia, em todos os grupos parece ocorrer um colapso da membrana externa, deixando evidentes os debris originados do periplasma. Li et al (2007) estudou os efeitos antimicrobianos de peptídeos presentes no “sushi” em bactérias gram negativas por microscopia de força atômica e observou que estes peptídeos agem sobre a membrana celular e

inicialmente o dano concentra-se nos pólos bacterianos, percorrendo toda área da membrana para em seguida causar danos às faces mais internas, que seriam letais. Esse fenômeno da ruptura da membrana bacteriana na MFA também já foi observado por Du et al (2007) de forma semelhante para compostos nano particulados de “Chitosan”. Estas mudanças sugerem que a ação do chitosan ocorreu na parede celular bacteriana com alteração do fluxo de íons do meio intra para o extracelular, fenômeno esse que provavelmente causou a morte da bactéria como resultado da ruptura da membrana. Em nosso estudo também foi possível observar imagens semelhantes sugerindo que os compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina apresentam mecanismos de interação com a membrana celular semelhantes aos observados em peptídeos e chitosan.

A associação destes complexos supramoleculares com a parede celular bacteriana, a qual se ligaria em inúmeros pontos no mesmo microrganismo parece causar morte celular e extravasamento de líquidos. Em seguida debris citoplasmáticos tóxicos que poderiam agir como matriz auto-agregação para restos celulares e dos compostos que formam grandes agregados mistos, chegando a alguns casos a englobar bactérias viáveis. Nestes casos sugere-se um papel decisivo das ciclodextrinas na interação com membranas uma vez que a intensidade do fenômeno parece aumentar com o aumento da razão molar dos compostos.

O extravasamento de fluido celular posterior ao tratamento de *Candida albicans* com fármacos antimicrobianos de acordo com Gianelli et al (2008) pode ser consequência da desestruturação do cito esqueleto celular, que passa a se distribuir de forma desorganizada no citoplasma possibilitando o extravasamento de líquido, também pode colaborar para a ruptura da membrana celular

Os compostos de inclusão apresentaram excelente atividade antimicrobiana *in vitro* e valores de CIM menores que os encontrados na literatura para clorexidina pura (Traboulsi et al, 2008; Cortés et al, 2001). As CIM observadas para *A.a.* e *C.a.* foram até oito vezes menores no caso Cx: β -cd 1:3 e 1:4 que as relatadas na literatura. Em seus estudos Traboulsi et al (2008) encontraram MIC em torno de 8 μ g/ml para *C.a.* enquanto para *A.a.* a CIM normalmente encontrado é de 8-10 μ g/mL (Haase et al, 2006) Sugere-se que esse efeito bactericida aumentado em razões molares maiores possa estar associado ao efeito destes compostos sobre a parede celular bacteriana e também sobre a fúngica, porém são necessários novos estudos para elucidar o efeito de compostos de liberação controlada sobre as células.

A maior efetividade dos compostos de maior razão molar observado tanto nos valores de CIM quanto em microscopia eletrônica nos quais se pode observar maior interação dos compostos com a membrana bacteriana, também pode ser explicado pela mudança de solubilidade dos complexos com a adição de ciclodextrinas. De acordo com Loftsson e Brewster (2007) existe uma resistência natural das membranas em relação ao fluxo de fármacos e esta resistência afeta a bioavaliabilidade do fármaco. Já se sabe que ciclodextrinas são hidrofílicas e podem aumentar a liberação e disponibilidade dos fármacos associados a ela, aumentando o gradiente destes fármacos rapidamente para valores que superem a resistência natural das membranas

Outro aspecto relevante em relação ao emprego destes compostos é que a inclusão em ciclodextrina além de propiciar a liberação controlada, atenua a citotoxicidade, bem como, sabor desagradável e o manchamento dental da Cx, possibilitando o seu uso por um período mais prolongado e em baixas

concentrações. De acordo com Gianelli et al (2008) que estudaram o efeito da clorexidina em diferentes linhagens celulares concluíram que a clorexidina em altas dosagens causa redução na proliferação de fibroblastos humanos bem como a produção de proteínas colágenas e não-colágenas, é capaz de induzir danos ao DNA dos leucócitos de células da mucosa oral, interagir com a actina do citoesqueleto celular, estimular apoptose e morte celular.

Os resultados dos testes de extração de ergosterol pelo Método de Quantificação do esterol (MQE) reforçam a hipótese da importância da ciclodextrina no aumento da atividade bactericida destes compostos. Nas razões molares 1:3 e 1:4 a extração de lipídios da parede celular for maior que 200%, quando comparados ao cloridrato de clorexidina, sugerindo quantitativamente a interação aumentada destes compostos com a parede celular bacteriana e fúngica em relação à clorexidina pura. Como a ciclodextrina apresenta maior afinidade para solubilização de lipídeos pode ser um dos motivos que justifique a elevada solubilização de esteróides pelos compostos de inclusão de clorexidina nas razões molares 1:3 e 1:4 e mesmo as razões molares 1:1 e 1:2 propiciaram uma solubilização de ergosterol significativamente superior ao cloridrato de clorexidina que possui uma menor solubilidade. O efeito de Cx sobre *Candida albicans* ocorre em nível de parede celular, além de poder ser explicado por todos os mecanismos já discutidos para células bacterianas, e ainda no caso das leveduras a clorexidina mesmo em concentrações sub-terapêuticas tem ação sobre um de seus principais mecanismos de virulência a produção de fosfolipases (Kadir et al, 2007).

Antibióticos tradicionais empregados em baixas concentrações poderiam levar ao aumento da resistência bacteriana. Assim, existe a necessidade de uma nova família de fármacos antimicrobianos. Peptídeos antimicrobianos apresentam

bons prospectos com mecanismos de ação descritos como diferentes dos antibióticos tradicionais. No entanto, postulou-se que estes peptídeos provavelmente possuem várias semelhanças com mecanismos de ação antimicrobiana, com alguma ação específica à membrana bacteriana. Dessa forma, antimicrobianos com ação sobre a membrana celular seriam mais desejáveis uma vez que teriam um impacto menor a longo prazo em relação à resistência bacteriana. Antimicrobianos deste grupo, são agentes biocidas, provocam morte celular imediata e quando empregados nas concentrações adequadas possibilitam menor chance de seleção e sobrevivência de microrganismos mais resistentes.

Entre os agentes biocidas, a clorexidina é provavelmente o agente anti-séptico biocida mais largamente empregado e embora seja utilizada em altas concentrações com objetivo bactericida, baixas concentrações residuais poderiam atuar sobre os microrganismos sobreviventes causando modificações físico-químicas nos mesmos alterando a relação microrganismo-hospedeiro e fatores de virulência. De acordo com Galice et al (2006), ao contrário da maioria dos antimicrobianos onde o uso de concentrações sub-inibitórias poderia favorecer a resistência microbiana (Akova, 2006) em seus estudos o emprego de concentrações sub-inibitórias de clorexidina inibiu a síntese de exotoxinas em *Streptococcus agalactiae*

Bactérias Gram negativas contêm duas membranas discretas com diferentes composições. Ao contrário das bactérias Gram positivas, as bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa assimétrica com glicolípidos lipopolissacarídeos (LPS) fechando mais de 90% da superfície celular e fosfolípidos com composição similar à membrana plasmática. A membrana interna de bactérias Gram negativas e a membrana citoplasmática da bactéria Gram positiva são carregadas negativamente. Então a carga positiva é a propriedade mais decisiva dos

fármacos antimicrobianos permitindo que eles se liguem preferencialmente a membranas bacterianas negativamente carregadas. A maioria dos patógenos incluindo bactérias, fungos e leveduras são envoltos por uma barreira externa contendo principalmente componentes polissacarídeos (Papo e Shai, 2003).

A clorexidina precisa percorrer a parede celular que é uma barreira externa, e se ligar a esta, antes de reagir com a membrana citoplasmática e este processo é dependente de diversas propriedades como o estado oligomérico dos canais de membrana. Assim de acordo com Li et al (2007) que estudou o efeito de peptídeos do sushi em *Escherichia coli* a é possível que a porção apical da célula bacteriana seja o primeiro sítio de ligação do fármaco e ai o dano é concentrado, porque nessa região se localiza o domínio da cardiolipina (um fosfolípide negativamente carregado). Porém em nossos estudos não se observou nenhum dado ou imagem que nos levasse a pensar que exista uma região específica na membrana bacteriana onde a clorexidina se ligue preferencialmente.

A maioria dos antimicrobianos permeia a membrana celular, o que resulta em dano irreversível à mesma. A permeabilização da membrana interna parece ser o evento letal. Neutrófilos humanos através das defensinas estão associados à permeabilização da membrana interna (Papo & Shai, 2003). A ruptura da membrana bacteriana pela interação com os compostos de clorexidina: beta-ciclodextrina leva a formação de fragmentos de membrana menores de acordo com Shaw et al (2007) estes domínios se transformam em domínios na forma de gel descritos em função da altura destas regiões em microscopia de força atômica que é intermediária em relação à membrana intacta e aos domínios fluidos, podendo também ocorrer mudanças dramáticas na estrutura da membrana com separação da bicamada lipídica, neste caso os pequenos domínios coalescem em estruturas

maiores neste estudo as imagens sugestivas de rompimento da bicamada lipídica foram observadas mais claramente nos compostos de razão molar 1:4, onde os domínios eram observados de forma desorganizada envolvendo a agregação de diferentes estruturas no estado sol-gel e líquidos. A rugosidade superficial observada em todos os grupos em diferentes graus também já foi observada por Li et al (2007) e Braga et al (1998) como resultado do tratamento destes microrganismos com antimicrobianos e parece ser uma das mudanças morfológicas iniciais, observadas pelo aparecimento de indentações na superfície de algumas células. O aparecimento de micelas e resíduos perto da membrana externa é o primeiro indicativo em microscopia de que houve a disrupção da membrana externa que ocorre provavelmente pela interação direta com o LPS (Li et al, 2007).

Espécies de *Candida sp* são consideradas importantes agentes patogênicos oportunistas devido ao aumento na freqüência das infecções que causam em grupos de pacientes sistemicamente comprometidos, tais como os submetidos à quimioterapia oncológica, amplo espectro de antibióticos, e indivíduos infectados por HIV. Biofilmes de *Candida* também pode desenvolver nas superfícies das próteses e dispositivos médicos, e apresentam resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro, quando comparados com outras espécies planctônicas. O efeito dos açúcares da dieta sobre a formação dos biofilmes de *Candida* foi também estudado a partir de um ponto de vista dos carboidratos da dieta modularem a colonização microbiana. Dois monossacarídeos, glicose e galactose, têm sido extensivamente investigados por seus efeitos sobre a aderência das espécies de *Candida*. O efeito da saliva não estimulada sobre a aderência da *Candida sp* e a formação do biofilme varia dependendo se estes fluidos biológicos estão em suspensão ou imobilizados. A complexidade da composição e as variações

individuais na qualidade da saliva humana podem complicar ainda mais o estudo destes fenômenos (Jin et al, 2004).

De forma similar este estudo propõe que os compostos de inclusão de clorexidina: beta-ciclodextrina primeiro se ligam aos lipopolissacarides (LPS) negativamente carregados nas bactérias Gram negativas. Esta ligação pode levar à penetração na membrana por uma série de caminhos: (a) leve perturbação na camada de fosfolípidos e passar para a membrana interna (b) criação de canais transmembrana (modelo poro), (c) Dano bilateral ao poro transmembrana e ruptura de micelas lipídicas e vesículas (modelo tapete) (d) criação de acumulação de estruturas semelhantes a micelas na membrana (Modelo agregado lipídico) (Li et al, 2007). Para estudar melhor a passagem pela membrana celular ou não pelos compostos de inclusão e seus possíveis efeitos intracelulares sugere-se estudos que possam detectar a presença destes compostos no interior da célula como Espectroscopia de Massa bem como testes que possam elucidar seus danos ao metabolismo e funcionamento celular como PCR e Estudos do DNA mitocondrial.

8. CONCLUSÃO

Face aos resultados obtidos é possível concluir: a caracterização físico-química e espacial através da difratometria por Raios X, análise térmica e microscopia de força atômica que houve a formação de novos compostos diferenciados entre si, com características físico-químicas próprias, e particularmente, diferentes do cloridrato de clorexidina e da beta-ciclodextrina.

A Ressonância Magnética Nuclear foi a melhor técnica que possibilitou concluir que houve a inclusão da clorexidina na cavidade da beta-ciclodextrina nas diferentes razões molares: 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4, culminando com a formação de novos compostos químicos, confirmando os estudos anteriores.

Os testes de substantividade em dentina bovina permitiram concluir que as novas espécies formadas são capazes de propiciar uma liberação contínua e controlada do fármaco, por até 10 dias.

Os compostos supramoleculares nas razões molares 1:3 e 1:4 nos testes antimicrobianos apresentaram melhor atividade para *A.a* e *C.a*, mesmo havendo a mesma quantidade de clorexidina em todos os compostos, sugerindo que a clorexidina está atuando de forma diferente na presença da beta-ciclodextrina.

A caracterização espacial por microscopia de varredura nos forneceu dados limitados com relação aos efeitos dos compostos de inclusão de clorexidina sobre as membranas bacterianas. Contudo, é possível concluir que os compostos de Cx: β -cd, apresentam uma maior interação com a superfície bacteriana do que a clorexidina pura, sendo quantitativamente maior nas relações molares 1:3 e 1:4 destes complexos supramoleculares.

Em relação à microscopia de força atômica esta técnica confirmou a forte interação dos compostos supramoleculares de clorexidina com a membrana dos microrganismos. Sendo que isso foi muito evidente nos compostos de inclusão 1:3 e 1:4.

Pode-se concluir, ainda, que a interação destes compostos afeta de forma dramática toda a célula bacteriana, a qual se rompe deixando extravasar a conteúdo intracelular, que juntamente com a ciclodextrina serve de matriz de agregação para formação de estruturas micrométricas mistas de ciclodextrina, clorexidina, debris celulares e células mortas.

REFERÊNCIAS ¹

1. Akova M. Emerging problem pathogens: A review of resistance patterns over time. *Int J Infec Disease* 2006; 10(S2):S3-8.
2. Anil S, Ellepola ANB, Samaranayake LP. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Diseases* 2001; 7:119-22.
3. Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Cândida albicans*. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10):3332-7.
4. Baker PJ, Coburnj RA, Genco RJ, Evans RT. Alkyl-bisguanidades an *in vitro* inhibitors of bacterial growth and dental plaque formation. *J Periodontol* 1979; 14:352-60.
5. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endodontics* 2007; 33:966-9.
6. Bonacorsi C, Raddi MSG, Carlos IZ. Citotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Brazilian J Med Biol Res* 2004; 37:207-12.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

7. Borgman R.J. Biodisponibilidade, dosagens e novas formas de apresentação. In: Craig RC, Stitzel RE. Farmacologia Moderna 4ª Ed. São Paulo: Roca Livraria Ltda; 1986. Cap.6.
8. Braga PC, Ricci D. Atomic Force Microscopy: application to investigation of *Escherichia coli*. Biochim Biophys. Acta 2003; 1643: 95-103.
9. Budtz-Jorgensen E, Lombardi I. Antifungal therapy in the oral cavity. Periodontol 2000 1996; 10:89-106.
10. Cahill DG, Freger V, Kwak SY. Microscopy and microanalysis of reverse-osmosis and nanofiltration membranes. MRS Bulletin 2008; 33:27-32.
11. Chen ZY, Guo XP, Huang JY, Hong YL, Zhang Q. AFM study of the effect of metronidazole on surface structures of sulfate-reducing bacteria. Anaerobe 2006; 12:106-9.
12. Cortés ME, Sinisterra RD, Ávila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha R G .The chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. J Inclusion Phen Macrocylic Chem 2001; 40:297-302.
13. Cortés ME. Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β -ciclodextrina: Avaliação *in vitro* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.
14. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as na endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99:768-72.

15. Daneshmand N, Jorgensen MG, Nowzari H, Morrison JL, Slots J. Initial effect of controlled release chlorhexidine on subgingival microorganisms. *J Periodont Res* 2002; 37:375-9.
16. Denadai AML, Teixeira KIR, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortés ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydrate Res.* 2007; 342(15): 2286-96.
17. Diniz HF. Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana. [Tese de Mestrado]. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG; 2007.
18. Domingues ZR, Cortés ME, Gomes TA, Diniz HF, Freitas CS, Gomes JB, Faria AMC, Sinisterra RD. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with beta-cyclodextrin. *Biomaterials* 2004; 25:327-33.
19. Du WL, Xu YL, Xu ZR, Fan CL. Preparation, characterization and antibacterial properties against *E. coli* K₈₈ of chitosan nanoparticle loaded copper ions. *Nanotechnology* 2008; 19:1-5.
20. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of a chlorhexidine in oral candidoses: review. *Oral Diseases* 2001; 7:11-7.
21. Ercan E, Dalli M, Dülgergil T. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Oral Endod.* 2006; 102(2): 27-31.

22. Fine DH, Goncharoff P, Schereiner H, Chang KM, Furgang D, Figurski D. Colonization and persistence of rough and smooth colony variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the mouth rats. Arch Oral Biol 2001; 46:1065-78.
23. Franco CF, Pataro AL, Ribeiro e Souza LC, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. *In vitro* effects of a chlorhexidine controlled delivery system. Artificial Organs 2003; 27(5):474-9.
24. Galice DM, Bonacorsi C, Soares VCG, Raddi MSG, Fonseca LM. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. Int J Antimicrobial Agents 2006; 28:143-6.
25. Gasparetto A, Arana-Chavez VE, Avila-Campos MJ. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. Pesquisa Odontológica Brasileira 2000; 14(4): 311-8.
26. Gendron D, Grenier T, Sorsa D, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by Chlorhexidine; Clin Diagnostic Lab Immunol. 1999; 6:437-9.
27. Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. Toxicol *In vitro* 2008; 22:308-17.
28. Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. J Dental Res 1989; 68 (Special Issue): 1602-8.
29. Goodson JM, Cugini MA, Kent GC, Kent RL, Armitage C M. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. II. Clinical response, J Periodont Res 1991; 26: 371-7.

30. Gu F, Lux R, Du-Thumm L, Stokes I, Kreth J, Anderson MH, Wong DT, Wolinsky L, Sullivan R, Shi W. In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *J Microbiol Methods* 2005; 62:145-60.
31. Haase EM, Bonstein T, Palmer Jr RJ, Scannapieco FA. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 299-314.
32. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001; 15:271-6.
33. Hilal N, Bowen WR, Alkhatib L, Ogunbiyi O. A review of Atomic Force Microscopy applied to cell interactions with membranes. *Chem Engineering Res design* 2006; 84(A4):282-92.
34. Hirayama F, Uekama K, Kamada M, Udo K, Yano H, Arima H. cyclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. *J Control Release* 2002; 82:407-16.
35. <http://www.biblioteca.org.ar-libros> (acessado em 11/03/2008).
36. <http://www.ficharioonline.com-imagens> (acessado em 11/03/2008).
37. <http://www.gerbras.com.br> (acessado em 11/03/2008).
38. <http://www.scielo.org.ve> (acessado em 11/03/2008).
39. <http://www.superfund.pharmacy.arizona.edu> (acessado em 11/03/2008).
40. <http://unicamp.br> (acessado em 11/03/2008)
41. <http://www.upload.wikipedia.org> (acessado em 11/03/2008).

42. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of Chlorhexidine. *J Pharmaceutics Pharmacol* 1964; 16:655-62.
43. Iwami Y, Schachtele CF, Yamada T. Mechanism of inhibition of glycolysis in *Streptococcus mutans* NCIB 11723 by chlorhexidine. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10:360-4.
44. Jabbour A, Srebnik M, Zaks B, Dembitsky V, Steinberg D. Evaluation of oxazaborolidine activity on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrobial Agents* 2005; 26: 491–6.
45. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *Microbiol Letters* 2004; 236:163-73.
46. Kadir T, Gümrüm B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of *Cândida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch of Oral Biol* 2007; 52:691-6.
47. Knuuttila M, Söderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol scand* 1981; 39:285-9.
48. Komorowski R, Grad H, Wu XY ,Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentine. *J Endodontics* 2000; 26(6):315-7.
49. Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation; *J Periodontal Res* 1986; 10:74-86.
50. Langer R. Where a pill won't reach. *Scientific American*. 2003; 288(4):50-7.
51. Langer R. New methods of drugs delivery. *Science* 1990; 249:1527-33.

52. Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic Force Microscopy study of the antimicrobial action of sushi peptides on gram negative bacteria. *Biochim et Biophysica Acta* 2007; 1768:411-8.
53. Lin DM, Kalachandra S, Yaliyaparambil J, Offenbacher S. A polymeric device for delivery of antimicrobial and anti-fungal drugs in the oral environment: effect of temperature and médium on the rate of drug release. *Dental Materials* 2003; 19:589-96.
54. Loftsson T, Brewster ME. Physicochemical properties of water and its effect on drug delivery: a commentary. *Int J Pharmaceutics*. (2007), doi: 101016/ijpharm.2007.08.049.
55. Loftsson T, Masson MM. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. *Int J Pharmaceutics* 2001; 225:15-30.
56. Lucarotti E, White H, Deas J, Silver IA, Leaper DJ. Antiseptic toxicity to breatt carcinoma in tissue culture and adjuvant to conservation therapy? *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1990; 72(9):388-92.
57. Marsh PD, Keevil CW, McDermid AS, Williamson MI, Ellwood DC. Inhibition by the antimicrobial agent chlorhexidine of acid production and sugar transport in oral streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 1983; 28:233-40.
58. Martin MV, Nind D. Use of chlorhexidine gluconate for pre-operative disinfection of apicectomy sites. *Oral Hygiene* 1987; 162(6):459-61.
59. Martindale W. *The extra Pharmacopeia*. 28^a edição, London: The Pharmaceutical Press, 1982.

60. Masson M, Loftsson T, Jónsdóttir RS, Fridriksdóttir H, Petersen DS. Stabilization of ionic drugs through complexation with non ionic and ionic cyclodextrins. *Int J Pharmaceutics* 1998; 164(1-2):45-55.
61. Mirth DB. Controlled-release therapeutic systems: technology applicable to the treatment of oral disease. *Adv Dent Res* 1987; 1(1):109-18.
62. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A2 United States 2002; 22(15).
63. Netuschil L, Hoffmann T, Brex M. How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part I. Test systems and clinical investigations. *Int J Dent Hyg* 2003; 1(3):143-50.
64. Newton APN, Cadena SMSC, Rocha MEM, Carnieri EGS, Oliveira MBM. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol letters* 2004; 151:407-16.
65. Papo N, Shai Y. Exploring Peptide Membrane Interaction Using Surface Plasmon Resonance: Differentiation between Pore Formation versus Membrane Disruption by Lytic Peptides. *Biochemistry* 2003; 42: 458-66.
66. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication *in vivo*. *JOE* 2007; 33: 788-95.
67. Pataro AL, Franco CF, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials* 2003; 24:1075-80.

68. Patel MP; Cruchley AT; Coleman DC, Swai H, Braden M, Willians D M. A polymeric system for the intra oral delivery of an antifungal agent. *Biomaterials* 2001; 22:2319-24.
69. Patil C, Rossa JR C, Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:392-8.
70. Piovano S. Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. *Anaerobe* 1999; 5:221-7.
71. Radvar M, Pourtaghi N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol* 1996; 67(9):860-5.
72. Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. *In vivo drug delivery. J Pharm Sciences* 1996; 85(11):1142-69.
73. Rasmussen EG, Gibbons RJ, Socransky SS. A taxonomic study of fifty gram positive anaerobic *diphtheroids* isolated from the oral cavity of man. *Arch Oral Biol* 1966; 11(6):573-8.
74. Rye RM, Wiseman D. Effects of chlorhexidine upon ³²P release and cell viability in *Escherichia coli*. *J Pharm Pharmacol* 1966; 18(Suppl 114s).
75. Shaw JE, Epanand RF, Hsu JCY, Mo GCH, Epanand RM, Yip CM. Cationic peptide-induced remodeling of model membranes: Direct visualization by in situ Atomic Force Microscopy. *J Structural Biol.* (2007), doi 10.1016/j.jsb.2007.11.003.
76. Sinisterra RD, Shastri VP, Najjar R, Langer R. Encapsulation and Release of Rhodium(II) Citrate and its Association complex with Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin from Biodegradable Polymer Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999; 88: 574-6.

77. Sinisterra RD, Alves Carvalho CA, Alves OL, Santos OS, Najjar R, Conde da Silva AC. Preparation and characterization of the inclusion compound Rhodium (II) α -methyl cynamate: β -cyclodextrin. *J Inclusion Phenomen* 1995; 22(2): 91-8.
78. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57: 1539-50.
79. Stabhoz A, Soskolne A, Friedman M, Sela MM. The use of sustained release delivery of Chlorhexidine for the maintenance of periodontal pockets: 2 years clinical trial. *J Periodontol* 1991; 62:429-33.
80. Steinberg D, Friedman M, Soskolne A, Sela M.N. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: *in vitro* release study. *J Periodontol* 1990; 61(7):393-8.
81. Summanen PH, McTeague M, Väisänen ML, Strong CA, Finegold SM. Comparison of recovery of anaerobic bacteria using the Anoxomat[®], Anaerobic Chamber and GasPak[®] Jar Systems. *Anaerobe* 1999; 5(1):5-9.
82. Sutter VL, Wexler H, Finegold SM. Comparative activity of SCH 34343 against anaerobic bacteria. *Diagnostic Microbiol Infectious Disease* 1986; 4(4): 341-4.
83. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Review* 1998; 98(5): 1743-53.
84. Szejtli J. Cyclodextrins in industrial process and products. *J Mat Chem* 1996; 7(4): 575.

85. Szejtli J. Cyclodextrin Technology. Netherland: Kluwer, 1988. p.1-170
86. Teixeira KIR, Cortés ME. Estado actual de la indicación de antimicrobianos para la medicación intracanal. Acta Odontol Venez 2005; 43(2): 177-80.
87. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Cândida spp* isolated from the oral cavity of HIV infected patients. Int J Antimicrobial Agents 2008; 31:272-6.
88. Trombelli L, Scabbia A, Calura G. Non diseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. Int J of Periodont Rest Dent 1994; 14(5):461-70.
89. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. Chem Rev 1998; 98(5):2045-76.
90. Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C. Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. FEMS Microbiol Ecology 2002; 39:239-44.
91. Yue IC, Poff J, Cortés ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, Langer R, Shastri P. A novel polymeric delivery device for the treatment of periodontal disease. Biomaterials 2004; 25:3743-50.