



**KARINA IMACULADA ROSA TEIXEIRA**

**Estudo comparativo dos efeitos dos complexos de  
inclusão de Clorexidina em ciclodextrinas em células  
bacterianas e eucariotas**

**BELO HORIZONTE**

**2012**

KARINA IMACULADA ROSA TEIXEIRA

**Estudo comparativo dos efeitos dos complexos de inclusão de  
Clorexidina em ciclodextrinas em células bacterianas e eucariotas**

Tese/Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia – área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura (UFMG)

Co-orientador: Rubén Dario Sinisterra (UFMG)

Co-orientadora: Maria José Alonso Fernandez (USC)

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Dedicatória

**Dedico a minha família pelo apoio incondicional a todas as minhas escolhas.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE DONTOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "*Estudo comparativo dos efeitos dos complexos de inclusão de Clorexidina em ciclodextrinas em células bacterianas e eucariotas*", área de concentração em **Clínica Odontológica**, apresentada por **Karina Imaculada Rosa Teixeira**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
Dra. Maria Esperanza Cortés Segura  
FO-UFMG - Orientadora


  
Dr. Ruben Dario Sinisterra  
ICEX-UFMG - Co-Orientador

  
Dra. Tamara Lobaina Rodriguez  
BIOCEN-CUBA

  
Dra. Eliete Marçal Guimarães Raso  
PUC-MG

  
Dra. Célia Regina Moreira Lanza  
FO-UFMG

  
Dr. José Bento Alves  
FO-UFMG

  
Prof. Dr. Saul Martins de Paiva  
Coordenador do Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 04 de junho de 2012.

## **Agradecimentos**

A Deus.

Aos meus pais Elizabeth e Valtair pela dedicação constante, o carinho e o apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Caca e Natalia presentes em todos os momentos, vocês são praticamente meus co-autores.

Aos meus professores Maria Esperanza Cortés e Rubén Dario Sinisterra pelo apoio durante toda a minha formação, por todas as oportunidades, todos os ensinamentos durante estes 11 anos.

Ao Professor Vagner Rodrigues Santos (Laboratório de Microbiologia Oral- FOUFMG) e Prof Luis Thadeu Abreu Poletto também por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao Professor Gustavo Batista de Menezes do Depto. de Morfologia do ICB-UFMG pela ajuda com a Microscopia Confocal e por sua disponibilidade.

À Professora Maria José Alonso Fernandez e sua equipe da Faculdade de Farmacia da Universidad de Santiago de Compostela- Espanha por terem me recebido tão bem e por tudo que aprendi durante o estagio na Espanha.

Ao professor Angelo Marcio Leite Denadai (CEFET-MG, Timoteo) pela valiosa ajuda e sugestões para a dissertação.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação da FO-UFMG

Aos colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais e Laboratório de Dentística pela ajuda e companheirismo em todas as fases de todos os projetos.

Aos meus amigos em geral especialmente os de Santiago de Compostela ( Geovana, Rami, Susi, Nada, Anita, Andrea, Donato, Ester, Antonela, Valentina, Adrian, David, Sisco, Alvaro,

Roberto, Leo, Daniele, Mohammad, Abdulah, Mohammad e todos os outros...) que fizeram da minha experiência em Santiago de Compostela um período inesquecível.

À CAPES pela bolsa de pós-graduação.

À FAPEMIG pelo apoio ao projeto.

Ao INCT NANobiofar por custear o projeto.

“Uma mente que se expande em busca de novas experiências nunca volta a suas velhas dimensões”

(autor desconhecido)



## Resumo

Este trabalho tem como objetivo avaliar a interação de complexos supramoleculares de clorexidina (CX): ciclodextrinas (Cd) com células eucarióticas e procarióticas, especificamente patógenos orais. Para estudar a influência na atividade antimicrobiana da CX após a adição de alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -Cd), beta-ciclodextrina ( $\beta$ -Cd) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Hp- $\beta$ -Cd) foram realizados estudos in vitro aumentando a razão molar da ciclodextrina (1:1 a 1:4). As nanopartículas resultantes estavam na gama de tamanho de 265-1451 nm, e com potencial zeta variando de -2 a 18 mV. A associação destes compostos conduziu a um aumento do tamanho das nanopartículas (493-1451 nm), com alteração significativa dos potenciais zeta após a formação dos mesmos. Os testes de atividade antimicrobiana dos mostraram que complexos de CX:  $\alpha$ -Cd foram mais eficientes para inibir o crescimento de *Candida albicans* (Ca); CX:  $\beta$ -Cd para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e CX: Hp- $\beta$ -Cd para *Streptococcus mutans* (Sm). A análise revelou valores de solubilização do ergosterol mais elevados com complexos  $\alpha$ -Cd 1:3 e 1:4. Através dos ensaios de proliferação celular pode-se observar que, os complexos supramoleculares de Hp- $\beta$ -Cd foram os menos citotóxicos para fibroblastos quando comparados à clorexidina pura. Os complexos de  $\alpha$ -Cd mostraram maior toxicidade para osteoblastos e fibroblastos quando comparados aos complexos Hp- $\beta$ -Cd. Dentre os compostos testados para células Caco-2 os de Hp- $\beta$ -Cd foram mais citotóxicos porém nenhum dos grupos mostrou-se severamente citotóxico. Os ensaios de fosfatase alcalina revelaram uma inibição severa na atividade desta enzima a 0,1% enquanto  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd foram capazes de estimular a liberação de fosfatase alcalina a 0,001%. Por estudos de microscopia de imunofluorescência confocal, observou-se que o tratamento com clorexidina afeta de forma intensa tanto o fluxo de cálcio como a organização do citoesqueleto celular. Os efeitos foram mais leves para complexos de CX: $\beta$ -Cd 1:3 e 1:4 Hp- $\beta$ -Cd foi capaz de estimular o fluxo de cálcio intracelular. A ciclodextrina proporcionar uma ferramenta única para modular a quantidade de esterol nas membranas celulares e citotoxicidade de fármacos. Esta característica pode ser utilizada para diferentes formulações com ciclodextrina destinadas favorecendo a atividade seletiva. Em geral, o  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd aumentam a atividade antimicrobiana da CX e apresentam efeitos específicos sobre células, diminuindo a citotoxicidade destes sistemas em células eucariotas.

**Palavras Chave:** Ciclodextrina, Clorexidina, Atividade antimicrobiana, Efeitos Citotóxicos

## **Effects of the chlorhexidine-cyclodextrin inclusion compounds on bacterial and eukaryotic cells: A comparative study**

The current study was designed to assess the ability of chlorhexidine (CX): cyclodextrins (Cd) complexes to target specifically the eukaryotic and prokaryotic membrane. To further explore the influence of the addition of  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd of the complexes in the specificity, *in vitro* studies were conducted increasing cyclodextrin molar rate against oral pathogens and the solubilization of ergosterol was also investigated. The particles measurement and zeta potential were evaluate by by photon correlation spectroscopy and laser Doppler anemometry using a Zetasizer 3000 HS. The resulting nanoparticles were in the size range of 265–1451 nm and showed a zeta potential ranging from -2 to +18 mV. The association of these compounds led to an variable increase of the size of the nanoparticles (493–1451 nm), with significant modification of their zeta potentials. The antimicrobial activity of the complexes showed that CX: $\alpha$ -Cd complex was more efficient to inhibit *C.a*; CX: $\beta$ -Cd for *A.a* and CX:Hp- $\beta$ -Cd for *S.m*. The ergosterol solubilization analysis revealed highest values with 1:3 and 1:4  $\alpha$ -Cd complexes. The viability assays of different cells were used to assess *in vitro* cytotoxicity. The inclusion complexes also decreased selectively the cytotoxicity of CX been  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd less cytotoxic in a dose dependent manner in fibroblast than  $\alpha$ -Cd, whereas Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes had no effect to high cytotoxic effects on Caco-2 cells in a dose-dependent. To study the effects of these compounds in the calcium metabolism was performed an alkaline phosphates assay. Supramolecular complexes inhibited alkaline phosphatase delivery at 0.1%.  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd increase the alkaline phosphatase delivery at 0.001%. In general the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd increase the CX antimicrobial activity and has specific-cells effect. The effects of supramolecular complex in the cellular cytoskelet and Calcium transient levels were studied by confocal immunofluorescence microscopy. The results show dramatic alterations in the both parameters for chlorhexidine control. The alterations caused by supramolecular complexes treatment decreasing in 1:3 and 1:4 molar ratio. Hp- $\beta$ -Cd showed the biggest concentration of calcium in the cells. Cyclodextrin provide a unique tool to modulate cellular cholesterol in membranes and cytotoxicity, this characteristic could be used for designed different formulations with cyclodextrin favoring a selective activity. The inclusion of chlorhexidine in cyclodextrin enhanced this antimicrobial effect and attenuated the cytotoxic effects.

**KEYWORDS:** cyclodextrin; chlorhexidine; antimicrobial; toxicological; cytotoxicity

## Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do Cloridrato Clorexidina	1
Figura 2. Desenho esquemático da estrutura da membrana celular (Modelo Mosaico fluido)	10
Figura 3. Representação esquemática da estrutura do citoesqueleto em células eucariotas	12
Figura 4. Formação de complexos supramoleculares com ciclodextrinas mostrando diferentes organizações	17
Figura 5. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional	18
Figura 6. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$	19
Figura 7. Representação esquemática da solubilização de colesterol presente em membranas	23
Figura 8. Gráfico- Medida do potencial Zeta (mV) das partículas dos compostos formados	40
Figura 9. Gráfico- Medida do potencial zeta das partículas dos compostos na presença de osteoblastos.	41
Figura 10. Gráfico- Efeitos dos compostos estudados na solubilização de Ergosterol	44
Figura 11. Gráfico: Efeitos dos compostos estudados na proliferação celular de osteoblastos	45
Figura 12. Gráfico: Efeitos dos compostos estudados na proliferação celular de fibroblastos	47
Figura 13. Gráfico: Efeitos dos compostos estudados na proliferação celular de Células Caco-2	49
Figura 14. Gráfico: Efeitos dos compostos estudados na liberação da fosfatase alcalina	51

Figura 15. Gráfico: Efeitos dos compostos estudados no aumento do cálcio intracelular 53

Figura 16. Imagens de Microscopia- Efeitos dos compostos de CX: $\beta$ -Cd no aumento do cálcio intracelular 54

Figura 17. Imagens de Microscopia- Efeitos das ciclodextrinas sobre a organização do citoesqueleto celular 56

Figura 18. Imagens de Microscopia- Efeitos dos compostos de CX: $\beta$ -Cd sobre a organização do citoesqueleto celular. 57

## Lista de tabelas

Tabela 1. Descrição dos estudos dos efeitos da clorexidina em diferentes tipos celulares	15
Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais	30
Tabela 3. Medida de partículas de CX: $\beta$ -Cd 1:1 a 1:4 na presença ou ausência de osteoblastos	39
Tabela 4. Concentração inibitória da CX e complexos supramoleculares de CX (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) contra <i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	42

## Lista de abreviaturas

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Ac	anticorpo
<i>α-cd</i>	alfa-ciclodextrina
ADN	acido desoxirribonucléico
ATCC	american type culture collection
ATP	adenosil tri-fosfato
$\beta$ -cd	beta-ciclodextrina
BHI	brain heart infusion
$\beta$ -cd	beta-ciclodextrina
BSA	albumina de soro bovino
<i>C.a</i>	<i>Candida albicans</i>
Cd	ciclodextrina
CI	concentração inibitória
CX	clorexidina
DMEM	dubbeco modified eagle's medium
DMSO	dimetil sulfóxido
DP	desvio padrão
EDTA	acido diamino tetracético
F.A.	fosfatase alcalina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hepes	n-2-hidroxietilpiperazina, n-2- ácido etanosulfônico
Hp- $\beta$ -cd	hidroxipropil-beta-ciclodextrina
IgG	imunoglobulina g
ITC	calorimetria isotérmica de titulação
LPS	lipopolissacarídeos
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MFA	microscopia eletrônica de força atômica
Mm	massa molar
MQE	método de quantificação do esteroide

NBT/BCIP	nitro tetrazólio azul /5-bromo-4-cloro- indolil-fosfato
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
Pi	fosfato inorganico
PPi	pirofosfato inorgânico
RMN	ressonância magnética nuclear
RPM	rotações por minuto
SDS	duodecil sulfato de sodio
<i>S.m</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SFB	soro fetal bovino
S.sanguis	<i>Streptococcus sanguis</i>
UFC	unidades formadoras de colônia
ζ	zeta

## Sumário

1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	05
2.1. A estrutura da clorexidina e mecanismos de ação	05
2.2. Efeitos citotóxicos	09
2.3. Estrutura e propriedades das ciclodextrinas	17
2.4. A ciclodextrina como acceptor de esteróis	22
2.5. Testes de citotoxicidade	24
3. Objetivo geral	27
3.1. Objetivos específicos	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1. Equipamentos	29
4.2. Métodos	30
4.2.1. Preparação dos compostos	30
4.2.2. Medida das partículas e Potencial Zeta	31
4.2.3. Determinação da atividade antimicrobiana	31
4.2.4. Dosagem de lipídeos	32
4.2.5. Cultura de células	34
4.2.5.1. Osteoblastos	34
4.2.5.2. Fibroblastos e Células Caco-2	35
4.3. Testes de citotoxicidade	36
4.4. Ensaio da fosfatase alcalina	37
4.5. Microscopia de imunofluorescencia confocal	37
4.5.1. Determinação da concentração de cálcio	37
4.5.2. Analise das alterações no citoesqueleto celular	38
4.6. Analise estatística	38
5. Resultados	39
5.1. Medida de partículas e Potencial zeta	39
5.2. Determinação da atividade antimicrobiana	41
5.3. Extração de lipídeos	43
5.4. Testes de proliferação celular	44



5.5. Ensaio da fosfatase alcalina	50
5.6. Microscopia de imunofluorescencia confocal	52
5.6.1. Análise da concentração do cálcio intracelular livre	52
5.6.2 Evidenciação do Citoesqueleto	55
6. Discussão	58
7. Conclusões	67
8. Perspectivas futuras	69
9. Referências bibliográficas	70
Situação atual do projeto	84
Atividades desenvolvidas relacionadas à tese	85
Produção científica	86
Anexos	91

## 1- INTRODUÇÃO

A clorexidina é hoje o antisséptico mais utilizado em odontologia, porém apresenta algumas desvantagens como: atividade por um período de tempo curto, citotoxicidade, pouco solúvel em água, sabor ruim. A inclusão de clorexidina em ciclodextrina propicia melhora em suas propriedades antimicrobianas bem como a liberação prolongada da mesma. Levando-se em consideração a importância deste fármaco e a mudança nas propriedades propiciada pela inclusão molecular entende-se que é importante estudar os efeitos da interação entre composto clorexidina: ciclodextrina em microrganismos e também em células alvo, neste caso, as células eucariotas.

A complexação de fármacos com ciclodextrinas (Cds) é uma estratégia efetiva para promover maior estabilidade, evitando a desnaturação e degradação térmica dos mesmos (LOFTSSON *et al.*, 2004; LOFTSSON *et al.*, 2007). Os compostos assim formados são denominados macromoleculares os quais podem ser parcialmente complexados por ciclodextrinas através de sítios hidrofóbicos e podem adicionalmente aumentar a solubilidade dos fármacos incorporados agindo como um promotor de permeabilidade para estes (LOFTSSON *et al.*, 2004; LIU e GUO, 2002). Entretanto a explicação para os efeitos das ciclodextrinas tem sido restrita a sua capacidade de perturbar a fluidez das membranas diminuindo sua função de barreira (KISS *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2001; ABDELWAHED *et al.*, 2008).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem uma superfície externa hidrofílica e um núcleo hidrofóbico interno, assim elas podem formar complexos de inclusão através da ligação com pequenas moléculas anfífilas em seu núcleo. A inclusão é utilizada para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas dos fármacos incluídos (LOFTSSON *et al.*, 2004; LIU e GUO, 2002; ZHENG *et al.*, 2001).

Os complexos formados por fármacos e ciclodextrina podem se autoassociar formando nanoagregados hidrossolúveis ou microagregados de inúmeros complexos fármaco-ciclodextrina (LOFTSSON *et al.*, 2002). Estas estruturas são capazes de solubilizar fármacos lipofílicos insolúveis em água através da complexação sem que necessariamente haja inclusão (LOFTSSON *et al.*, 2003).

As moléculas de ciclodextrina têm um potencial efeito catalítico para o transporte de lipídeos. A alta eficiência terapêutica de complexos formados com a ciclodextrina é provavelmente em função do seu pequeno tamanho relativo quando comparada com as membranas celulares, o que permite que um grande número de moléculas de ciclodextrina possa interagir diretamente com estas estruturas (MESMIN *et al.*, 2009). A localização das moléculas de ciclodextrina perto da superfície da célula permite solubilização do colesterol presente na membrana que adsorve diretamente na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina sem entrar na fase aquosa (ATGER *et al.*, 1997; BESENICAR *et al.*, 2008).

Por outro lado, os efeitos toxicológicos das Cds estão associados principalmente à complexação com o colesterol e lipídeos de membrana (OHVO-REKILA *et al.*, 1997). Diferentes Cds podem conferir diversas ações e diferentes propriedades toxicológicas (CLEJAN e BITTMAN, 1984; OHVO-REKILA *et al.*, 1997).

A Clorexidina (CX) é considerada o agente de padrão-ouro entre os antimicrobianos (JONES, 1997) porque possui largo espectro de ação contra microrganismos gram positivos, gram negativos, fungos alguns tipos de vírus e protozoários (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001; ELLEPOLA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2001; NUNEZ *et al.*, 2007). O mecanismo de ação de CX foi bem descrito sendo o alvo principal a membrana bacteriana (HUGO e LONGWORTH, 1964; BARMAN *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012b).

Visando melhorar as propriedades físico-químicas e/ou biológicas da CX estão sendo desenvolvidos os complexos de inclusão com ciclodextrinas. Os complexos supramoleculares formados pela interação entre a clorexidina e a beta-ciclodextrina apresentam grande potencial para o controle químico do biofilme bacteriano em concentrações menores que aquelas já usadas em soluções, bochechos e géis de clorexidina pura (CORTÉS *et al.*, 2001).

Estudos prévios de nosso grupo incluindo testes microbiológicos envolvendo complexos supramoleculares de clorexidina-beta-ciclodextrina, assim como de outros antibióticos incluídos tais como a tetraciclina, mostraram que esses sistemas podem se apresentar até quatro vezes mais efetivos que o fármaco

livre (CORTÉS *et al.*, 2001; PATARO *et al.*, 2003; DINIZ , 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2012a).

Considerando os aspectos físico-químicos, os autores encontraram uma forte correlação da atividade antimicrobiana com a estrutura supramolecular fornecida pelas diferentes razões molares dos compostos sintetizados (DINIZ, 2007; DENADAI *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2012a). Nestes estudos observou-se que o aumento da razão molar dos complexos supramoleculares em ciclodextrina independente do antimicrobiano incluído levou a potencialização dos efeitos citotóxicos dos mesmos sobre as células bacterianas e fúngicas (DENADAI *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2012 a, TEIXEIRA *et al.*, 2012 b).

Teixeira *et al.* (2012a) estudaram a interação de complexos supramoleculares de clorexidina e  $\beta$ - Cd através de um estudo incluindo testes de atividade antimicrobiana contra *A.a* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e caracterização morfológica da interação deste microrganismo e os compostos por microscopia (MEV, MET e MFA) . Os resultados dos testes antimicrobianos mostraram que complexos supramoleculares de CX:  $\beta$ - Cd são capazes de inibir o crescimento de *A.a* em concentrações mais baixas que a clorexidina pura. Além disso, as razões molares mais elevadas 1:3 e 1:4 foram capazes de inibir o crescimento de *A.a* em concentrações mais baixas que os complexos de menor razão molar 1:1. Por microscopia de varredura e microscopia de força atômica (MFA) pudemos observar que com o aumento da concentração de ciclodextrina nestes sistemas, além do aumento da atividade antimicrobiana ocorreu a formação de uma matriz capaz de reter tanto células vivas quanto mortas, e o nível de agregação dessas estruturas se tornava maior à medida que se aumentava a concentração de ciclodextrina. Sendo que o composto de inclusão CX:  $\beta$ -Cd 1:3 apresentou melhores propriedades antimicrobianas (TEIXEIRA *et al.*, 2012 a) e também foi um dos grupos que apresentou a formação da matriz de agregação retendo os microrganismos .

Em outro trabalho foram realizados testes antifúngicos com complexos supramoleculares de CX:  $\beta$ -Cd em diferentes razões molares, utilizou-se como modelo o microrganismo leveduriforme *C. a*. Este trabalho teve como objetivo

estudar os efeitos destes compostos em fungos, utilizando a *C.a* que é uma levedura extensivamente estudada e de grande importância em patologias da cavidade oral. Teixeira *et al.* (2012b) observaram que além do aumento da atividade antimicrobiana da clorexidina quando incluída em ciclodextrina, também voltamos a observar que as razões molares 1:3 e 1:4 foram capazes de inibir o crescimento de *C.a* em concentrações mais baixas que os complexos de menor razão molar 1:1. Também se tentou relacionar a citotoxicidade destes fármacos para fungos à capacidade de solubilização de esteróis, já descrita para ciclodextrinas. Observou-se então que as razões molares 1:3 e 1:4 apresentavam maior capacidade de solubilização de esteróis em *C.a*, correspondendo aos grupos de melhor atividade antimicrobiana. A agregação entre microrganismos, compostos, restos celulares também foi observada de forma mais intensa nos grupos 1:3 e 1:4. Estes dados reforçam a hipótese de que a formação de uma matriz de agregação bem como a maior capacidade de solubilização de esteróis são fatores importantes para a boa atividade antimicrobiana de complexos supramoleculares de Clorexidina e ciclodextrina. A solubilização aumentada de ergosterol poderia levar a desorganização da membrana do microrganismo bem como torná-la mais permeável à entrada de substâncias (TEIXEIRA *et al.*, 2012b)

Com base nestes resultados tornou-se fundamental o estudo da interação destes compostos com células eucariotas através da determinação da citotoxicidade. Nestes estudos ficou evidenciada a capacidade da ciclodextrina em modificar a propriedade do fármaco incluído, sugerindo que as interações entre células sejam estas procariotas ou eucariotas e os compostos também possam ser modificadas. Estudou-se a interação célula-fármaco focando principalmente nas células afetadas de forma direta pelos complexos supramoleculares no caso de uso oral: osteoblastos e fibroblastos, bem como estudar a capacidade de estímulo para o crescimento de células tumorais.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. A estrutura da clorexidina e mecanismos de ação

A clorexidina é o antimicrobiano mais utilizado em odontologia e também para desinfecção em nível hospitalar, o seu sucesso pode ser atribuído a duas propriedades principais: a substantividade e seu largo espectro de atividade (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001). A substantividade consiste na capacidade de se adsorver a superfícies e de ser retida por algumas estruturas da cavidade oral como a hidroxiapatita, proteínas salivares e polissacarídeos extracelulares bacterianos. Liga-se fortemente a grupos negativamente carregados (BAKER *et al.*, 1979; MARTINDALE, 1982; TROMBELLI *et al.*, 1994, BUDTZ-JORGENSEN e LOMBARDI, 1996; KOMOROWSKI *et al.*, 2000, ELLEPOLA e SARAMANAYAKE, 2001; PATEL *et al.*, 2001; TEIXEIRA e CORTÉS, 2005).

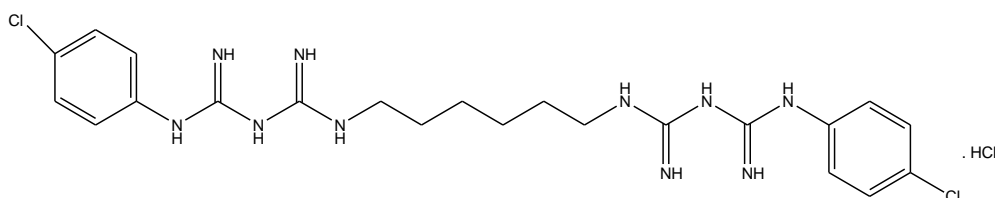


Figura 1. Representação esquemática do Cloridrato de Clorexidina (Fórmula estrutural)

A clorexidina apresenta a maioria das propriedades desejáveis para um bom antisséptico: alta efetividade no controle do biofilme dental, atividade antibacteriana ocorre em pH fisiológico, segurança de utilização, poucos efeitos adversos sobre organismos não patogênicos, largo espectro de atividade (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001, KADIR *et al.*, 2007; GRAP *et al.*, 2011). O uso de formulações de liberação controlada consiste nestes casos em uma tentativa de prolongar o efeito dos antimicrobianos bem como minimizar a toxicidade celular (TEIXEIRA e CORTÉS, 2005).

A estrutura molecular da CX consiste em duas bisguanidas, com extremidades polares ligadas por uma cadeia, e dois grupos cloro-metilenos como o núcleo hidrofóbico (Figura 1) (HUGO e LONGWORTH, 1964). Estes complexos catiônicos iniciam a sua interação com a membrana citoplasmática por

ligação aos fosfolípidos de membrana através de interações electrostáticas (HUGO e LONGWORTH, 1964; DENYER, 1995; SHEPPARD *et al.*, 1997; MCDONELL e RUSSEL, 1999). Para que um fármaco seja considerado um bom antisséptico ela deve apresentar algumas propriedades relacionadas à efetividade e microrganismos afetados pela mesma (NUNEZ e MORETTON, 2007). Idealmente, os antissépticos devem ter um amplo espectro microbicida e atividade germicida potente com rápido início e longa duração. Não devem ser tóxicas para os tecidos / células de acordo com o conceito de biocompatibilidade, e também não devem prejudicar os processos de regeneração tecidual (REDMERSKI *et al.*, 2007; NUNEZ e MORETTON, 2007).

As abordagens quimioterápicas para o tratamento da doença periodontal e peri-implantar podem incluir a aplicação tópica de agentes anti-sépticos para liberação controlada de antimicrobianos, como a clorexidina, tetraciclina, minociclina, doxiciclina e metronidazol (DRISKO *et al.*, 1995; JEFFCOAT *et al.*, 1998; BUCHTER *et al.*, 2004; RENVERT *et al.*, 2006) e estes agentes são capazes de aumentar os benefícios obtidos pelo tratamento mecânico convencional. Estudos clínicos consideram a aplicação de clorexidina (CX) como agente químico padrão-ouro, uma vez que é um dos mais utilizados e testados (DRISKO *et al.*, 1995), a escolha é justificada pela sua atividade bactericida, capacidade de inibir as atividades proteolíticas e glicosídicas além de reduzir as metaloproteinases de uma grande variedade de bactérias orais (GENDRON *et al.*, 1999; CRONAN *et al.*, 2006; QUIRYNEN *et al.*, 1995; PITTEN e KRAMER, 1999).

Apesar das vantagens dos antimicrobianos como a clorexidina, sabe-se que estes também podem ter efeitos adversos sobre os tecidos orais e células nas concentrações utilizadas clinicamente. As investigações iniciais sobre a eficácia da CX como um agente bactericida surgiram há mais de 40 anos com os estudos de Hugo e Longworth (1964), que observaram a absorção do fármaco por bactérias era muito rápida, e sua eficácia era dependente da concentração da CX e do pH do meio. A absorção da CX pelas bactérias e leveduras pode ocorrer dentro de segundos, e o efeito máximo do fármaco ocorrer em menos de 20 segundos (FITZGERALD *et al.*, 1989).

Os mecanismos da captação da CX pelas células é de interesse, uma vez que podem revelar o modo de ação deste antimicrobiano. Por estudos de hidrofobicidade e testes de sensibilidade antibacteriana descobriu-se que o fármaco inicialmente causa um dano considerável para a parede celular de bactérias e leveduras (HUGO e LONGWORTH, 1964). No entanto, este dano não foi avaliado como a única causa de morte celular, já que há contínua interação com a membrana citoplasmática das bactérias e também das leveduras. Após estudos sobre mudanças na viabilidade, na densidade óptica, observou-se o vazamento de componentes intracelulares por espectrofotometria, e resíduos de CX na membrana plasmática e citoplasma das células (KOMLJENOVIC *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012 a).

Por estes estudos, sabe-se que o efeito antimicrobiano da clorexidina é mediado por diversos mecanismos. As evidências apontam a adsorção à parede celular bacteriana, propriedades catiônicas da clorexidina como principais fatores para o sucesso da atividade destes compostos (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001). Sabe-se que 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 propiciando a substantividade que é a principal propriedade da clorexidina (HUGO e LONGWORTH, 1964).

Lang e Brex, (1986); Bonesvoll e Gjermo (1978) demonstraram ainda que com base em suas propriedades catiônicas já descritas a CX é capaz de se ligar aos tecidos, mudando seu campo elétrico para competir com a ligação bacteriana. Para Gjermo (1989) esse mecanismo pode estar envolvido na aderência das bactérias à superfície por competição com íons cálcio. Analisando de uma forma mais ampla podemos associar essa propriedade tanto a eficácia antimicrobiana (GIULIANA *et al.*, 1999; GRAP *et al.*, 2011; FITZGERALD *et al.*, 1989) quanto a sua reconhecida citotoxicidade em células eucariotas (GIANELLI *et al.*, 2007, FARIA *et al.*, 2007, FARIA *et al.*, 2009).

Outro mecanismo para o efeito antimicrobiano da clorexidina foi descrito por Rye e Wiseman (1966) no qual a interação da clorexidina com membranas interferiria com os mecanismos de transporte da mesma produzindo um desequilíbrio osmótico, estimulando a saída de substâncias citoplasmáticas de



baixo peso molecular, a precipitação e/ou coagulação das proteínas, e em casos mais drásticos provocando a lise celular. Esta propriedade pode estar relacionada com o efeito dose-dependente deste fármaco já que em baixas concentrações é bacteriostático e em concentrações mais altas apresenta atividade bactericida.

A CX é capaz de provocar a desorganização da membrana bacteriana, com indução de defeitos locais (LANG e BRECX, 1986). Ela também é capaz de estimular um aumento da permeabilidade celular com aumento do efluxo de substâncias para dentro da célula, aumentando também a concentração do antimicrobiano dentro da célula e também permite que moléculas polares e íons metálicos entrem nas células (LANG e BRECX, 1986; BONESVOLL e GJERMO; 1978).

Existem muitos fatores envolvidos no efeito bactericida da clorexidina e mecanismos de forma isolada não seriam capazes de causar a morte celular e principalmente de um largo espectro de microrganismos. Sabe-se que as bactérias podem suportar grandes mudanças na fluidez de sua membrana sem afetar o crescimento, e mesmo a movimentação de alguns íons pode ser compatível com a vida bacteriana e algumas vezes até prolongar as condições de sobrevivência destes microrganismos (LANG e BRECX, 1986; BONESVOLL e GJERMO, 1978). Um dos efeitos mais conhecidos da clorexidina é sobre o microrganismo *S. m*, a CX é descrita como o mais potente agente quimioterápico contra *S.m*. Seu efeito contra *S.m* é maior do que contra o *S. s. e lactobacilos* (AGARWALL e NAGESH, 2011).

Estudando o mecanismo específico de interação entre *S. m* e clorexidina Marsh *et al.* (1983) afirmaram que baixas concentrações (menores que 0,24 mM) de clorexidina inibem o metabolismo dos açúcares via sistema fosfoenol-piruvato-fosfotransferase em microrganismos do grupo *Streptococcus* que poderia contribuir para alterações metabólicas que levariam a morte celular. De acordo com resultados de Iwami *et al.* (1995) a produção de ácido láctico e ácido acético decresce à medida que aumenta a concentração de clorexidina, tendo uma forte diminuição na concentração do ácido láctico quando eram utilizadas concentrações de 0,1 a 0,15 mM de clorexidina. Evidenciando o efeito da clorexidina sobre os metabólitos intracelulares.

A inibição da glicólise nos *S. m.*, sugere que ocorrem variações na ação da clorexidina nas bactérias de acordo com características próprias do metabolismo celular de cada grupo de microrganismos. Iwami et al (1995), ainda relataram que as bactérias Gram positivas são um grupo mais susceptível a ação da clorexidina porvavelmente pelas alterações metabólicas causadas pela CX neste grupo de microrganismos.

## **2.2 Efeitos Citotóxicos da clorexidina**

A inter-relação clorexidina-membrana está fortemente implicada tanto com as propriedades antimicrobianas quanto com os efeitos adversos. Com base nestas informações é de grande importância conhecer a estrutura das membranas das células alvo deste fármaco. Neste momento o nosso objeto de estudo são as células eucariotas, alvo dos efeitos adversos da clorexidina.

A estrutura biológica básica da membrana eucariota é uma bicamada lipídica (Figura 2), composta por camada dupla de fosfolípides, representados como estruturas azuis na figura, com aproximadamente 4 µm de comprimento, com proteínas ocasionalmente inseridas com a função de formar canais iônicos (LOPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008; PANKOV *et al.*, 2006). Moléculas de água se ligam a 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 (LOFTSSON *et al.*, 2007; KOMLJENOVIC *et al.*, 2010).

Em geral compostos hidrofílicos na superfície da membrana são fortemente afetados pela capacidade da superfície da membrana em formar ligações de hidrogênio com a água (LOFTSSON e BREWSTER, 2007). A auto-associação de moléculas de água e outras interações mais fortes com superfícies hidrofóbicas são fenômenos análogos ao efeito hidrofóbico observado quando solutos não polares são dissolvidos em água (LOFTSSON *et al.*, 2004).

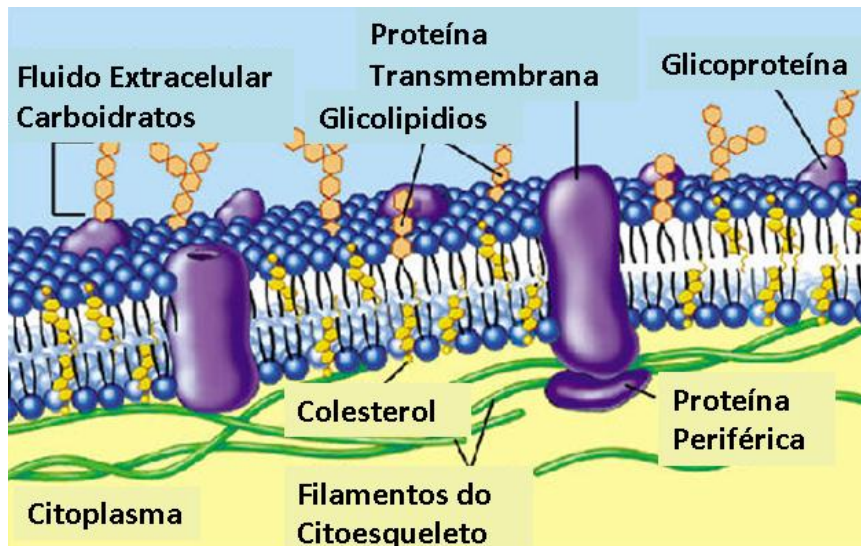


Figura 2. Desenho esquemático da estrutura da membrana celular (Modelo Mosaico fluido) ([www.ficharioonline.com-imagens](http://www.ficharioonline.com-imagens)). Consultado em 07 02.2012.

Uma série de efeitos adversos já foi descrita para a clorexidina. Esses efeitos podem ser derivados da ação da clorexidina sobre membranas ou ainda surgir da interação intracelular que poderia ocorrer de uma forma direta ou indireta. Abordando os efeitos intracelulares, Gendron et al. (1999) provaram que a clorexidina inibi a atividade de matrizes de metaloproteinases bem como a proliferação celular, principalmente de células mononucleares. A clorexidina também é capaz de diminuir 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 os estudos de 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. Essas propriedades em conjunto podem levar a morte celular.

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

(FARIA *et al.*, 2009; GIANELLI *et al.*, 2008). Em cultura de osteoblastos a exposição à clorexidina 0,12% provocou lise em 80% das células, com danos incluindo a fragmentação do ADN (ácido desoxiribonucléico) (GIANELLI *et al.*, 2008).

De acordo com estudos de Bonacorsi *et al.* (2004) a clorexidina pode ter um efeito imunossupressor sobre os macrófagos expostos, o que está relacionado a estímulos receptor-dependente de partículas. Os produtos do stress oxidativo são considerados citotóxicos e e podem ser usados para matar agentes patogênicos fagocitados e também para a destruição de outras células. Mutações genéticas também foram induzidas pelos produtos de degradação da clorexidina nos microorganismos. Após a administração, a clorexidina é absorvida pela mucosa oral e também no trato gastrointestinal.

Em uma célula eucariota saudável toda a sustentação e morfologia celular é dada por um citoesqueleto que se distribui de forma tridimensional por toda a área celular (Figura 3). Este citoesqueleto é composto principalmente por fibras de actina e miosina. Os filamentos de actina estão organizados como uma rede ancorada na membrana plasmática através de forças de adesão de sítio que contém vinculina (GIANELLI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2009).

Quando células aparentemente saudáveis são expostas a compostos contendo clorexidina, os filamentos parecem se dispersar e se distribuir de forma irregular no citoplasma. Estas alterações sobre o citoesqueleto podem ser mais ou menos intensas de acordo com a concentração empregada (GOURLAY e AYSCOUGH, 2006). O dano ao citoesqueleto provoca progressiva liberação do substrato celular, sugerindo a capacidade destes compostos em induzir dano celular irreversível (GIANELLI *et al.*, 2008). Essa progressiva 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 que são as células que apresentam contato direto com o sistema estudado (ANURADHA *et al.*, 2007; GIANELLI *et al.*, 2008).

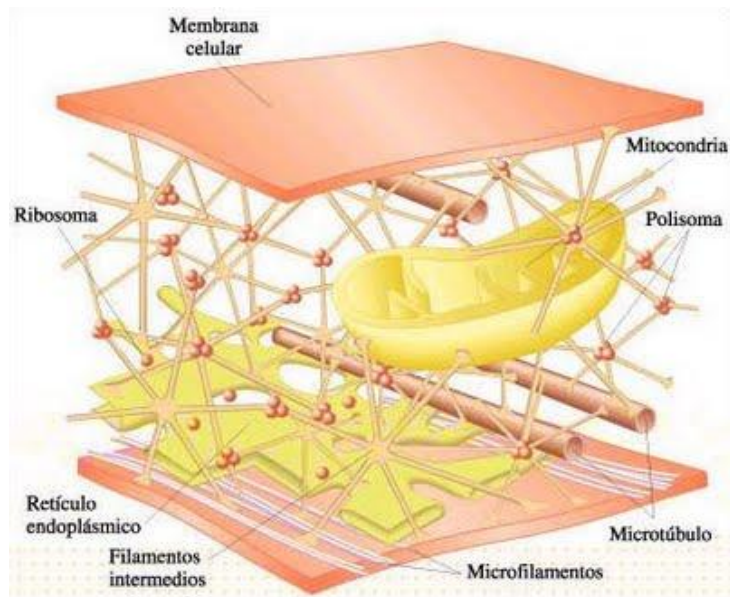


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do citoesqueleto em células eucariotas (<http://www.edukativos.com/preparatoria/el-citoplasma-y-el-citoesqueleto.html>). Consultado em 07 04.2012.

Uma ação adversa importante da clorexidina já descrita é sobre a respiração celular, esse efeito estende a atividade citotóxica para todo o metabolismo celular. A interferência na atividade mitocondrial envolve a peroxidação lipídica que é um processo natural de dano oxidativo que acontece em todas as células e aumenta progressivamente ao longo da vida (KROEMER *et al.*, 1998). Um aumento na taxa de peroxidação leva a conseqüências deletérias para membranas biológicas e mudanças na permeabilidade mitocondrial com dano progressivo ao metabolismo e proliferação celular (CROMPTON *et al.*, 1999; FARIA *et al.*, 2007; GIANELLI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2009).

Para entender melhor todo esse processo, devemos levar em consideração que as mitocôndrias são organelas essenciais para a vida e morte da célula (KROEMER *et al.*, 1998). Elas realizam uma variedade de importantes funções celulares, incluindo a produção da maior parte da energia celular na forma de ATP, que é necessário para todos os processos endotérmicos e a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (CROMPTON, 1999). Além disso, as mitocôndrias têm um papel crucial no processo de apoptose, ou morte celular programado (KOTERSKI *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2006; GOURLAY e AYSCOUGH, 2006). A morfologia mitocondrial varia em células vivas e pode variar de estruturas pontuais a redes tubulares de acordo com a localização e atividade funcional. Sua distribuição pode

ser surpreendentemente heterogênea: são frequentemente concentradas em locais onde a demanda de energia celular é maior, ou onde sua função metabólica é necessária, como em nível do botão sináptico. Isto implica que as mitocôndrias são (i) móveis; (ii) utilizam proteínas do citoesqueleto como pistas para seu movimento direcional, (iii) podem estar temporariamente ou permanentemente paradas onde a sua presença é requerida onde vão estabelecer interações com estruturas celulares especializadas (CROMPTON, 1999).

As mitocôndrias se relacionam diretamente a apoptose através do fenômeno da permeabilidade celular. O fenômeno da transição da permeabilidade celular consiste em alterações da permeabilidade mitocondrial que ocorrem em resposta a matrizes com concentrações suprafisiológicas de cálcio, aumentando a permeabilidade não seletiva para pequenas moléculas (GOURLAY e AYSCOUGH, 2006). Este fenômeno é um mediador da morte celular através da liberação do citocromo C e outras proteínas que induzem a apoptose como as procaspases 6 e 9 (GIANELI *et al.*, 2008; CROMPTON, 1999; JIANG *et al.*, 2006). A perturbação do  $Ca^{2+}$  citosólico tem como consequência 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 (GIANELLI *et al.*, 2008). A ativação do  $Ca^{2+}$ / Calmodulina óxido nítrico sintase e geração de óxido nítrico provocam um stress oxidativo na célula com consequências para biomoléculas em todas as células ADN, proteínas e lipídios. O impacto destes eventos sobre a morte celular depende do grau da disfunção mitocondrial e do balanço eletrolítico, sendo que a necrose é a consequência mais provável da depleção do ATP (adenosil-trifosfato) (GIANELLI *et al.*, 2008; NEWTON *et al.*, 2004).

Em um estudo abordando a citotoxicidade da clorexidina, Faria et al (2007) observaram que CX injetada no espaço subplantar da pata de ratos induziu alterações necróticas na epiderme, derme e tecido subcutâneo em associação com a resposta inflamatória reativa. Além disso, CX adicionado ao cultivo de fibroblastos L929 induzia apoptose em concentrações mais baixas e necrose em concentrações mais elevadas (FARIA *et al.*, 2009) bem como um aumento na expressão da proteína Hsp70, um indicador de estresse celular, evidenciando mais

uma vez a alteração do metabolismo celular , consequência do dano mitocondrial (NEWTON *et al.*, 2004).

Vários estudos têm relatado que CX: (i) tem atividade citotóxica em cultura de osteoblastos provenientes de ossos alveolares (CABRAL e FERNANDES, 2007) e células epiteliais gengivais (BABICH *et al.*, 1995); (ii) induz a uma redução dose-dependente da proliferação de fibroblastos e colágeno em tecidos periodontais de humanos (MARIOTTI e RUMPF, 1999; FLEMINGSON *et al.*, 2008), (iii) impede a adesão de fibroblastos em superfícies de raiz e interfere com a regeneração periodontal (ALLEYN *et al.*, 1991.); (iv) é capaz de induzir danos ao ADN primário em leucócitos e células da mucosa bucal de ratos tratados diariamente com o composto (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Alguns estudos demonstraram que apenas concentrações muito elevadas de CX (0,2-2%) apresentam efeito bactericida substancial contra patógenos periodontais (COSYN e SABZEVAR, 2005; COUSIDO *et al.*, 2008;. TOMÁS *et al.*, 2009). Elsen (2002) observou que a lavagem com CX 0,12%, duas vezes por dia durante 18 dias, causou alterações do ADN em células epiteliais e linfócitos. Além disso, é relatado que CX é capaz de induzir danos ao ADN primário em leucócitos e em células da mucosa oral, em ratos tratados com CX 0,12% duas vezes ao dia durante 8 dias. Abaixo estão apresentados em uma tabela de forma resumida dados de estudos mostrando o efeito da clorexidina em diferentes tipos celulares (Tabela 1)

Tabela 1. Descrição dos estudos dos efeitos da clorexidina em diferentes tipos celulares

<b>Referência</b>	<b>Células estudadas</b>	<b>Conclusões</b>
<b>Gianelli et al., 2008</b>	Fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos de linhagem imortalizadas. In vitro	Efeito tóxico severo em todos os tipos celulares estudados, sendo mais intensos em osteoblastos 0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12%.
<b>Almazin, 2009</b>	Osteoblastos humanos de linhagem primária. In vitro	CX inibiu a proliferação de osteoblastos in vitro (0.5mg/mL)
<b>Babich e Tipton, 2002</b>	Células gengivais humanas. In vitro	Efeito citotóxico para células epiteliais (0.01mmol/L), porém afetou de forma positiva a migração e adesão celular.
<b>Faria et al., 2007</b>	Fibroblastos de camundondos. In vivo	Efeitos citotóxicos severos e alterações necróticas na epiderme e tecido subcutâneo (0,05 e 1%). Estímulo a apoptose e necrose em cultura de fibroblastos.
<b>Faria et al., 2009</b>	Fibroblastos de ratos. In vitro	Efeito citotóxico dose-dependente. Inibição da taxa de proliferação de fibroblastos na concentração de 0.001%. Vacuolização e rompimento mitocondrial (0.001-0.002%). 0.004% Necrose de fibroblastos. Desorganização dos filamentos de actina.
<b>Cabral e</b>	Osteoblastos humanos. In vitro	Efeito citotóxico dose-dependente



<b>Fernandes, 2007</b>		Dano celular nas concentrações: 1.2 e 2mg/ml. Estímulo de resposta inflamatória não-específica. Inibição da adesão e proliferação celular (0.5-2mg/mL)
<b>Müller e Kramer, 2008</b>	Fibroblastos de ratos. In vitro	Inibição da proliferação celular (0.05-0.5%)

## 2.3. Estrutura e Propriedades das ciclodextrinas

### 2.3.1 Sistemas de Liberação Lenta de Fármacos

O emprego da liberação controlada para antibioticoterapia adquire uma conotação maior em função dos grandes problemas causados pela resistência bacteriana. Assim poderia diminuir a concentração do medicamento, e o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico (RAJEWSKI e STELLA, 1996). Os principais carreadores utilizados para liberação controlada de antimicrobianos são as ciclodextrinas e lipossomas (Figura 4).

Em estudos prévios foi demonstrado que o encapsulamento e a liberação de complexos inorgânicos a partir de microesferas poliméricas biodegradáveis podem ser controlados pela formação de complexos com ciclodextrinas (SINISTERRA *et al.*, 1999). Outros 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).

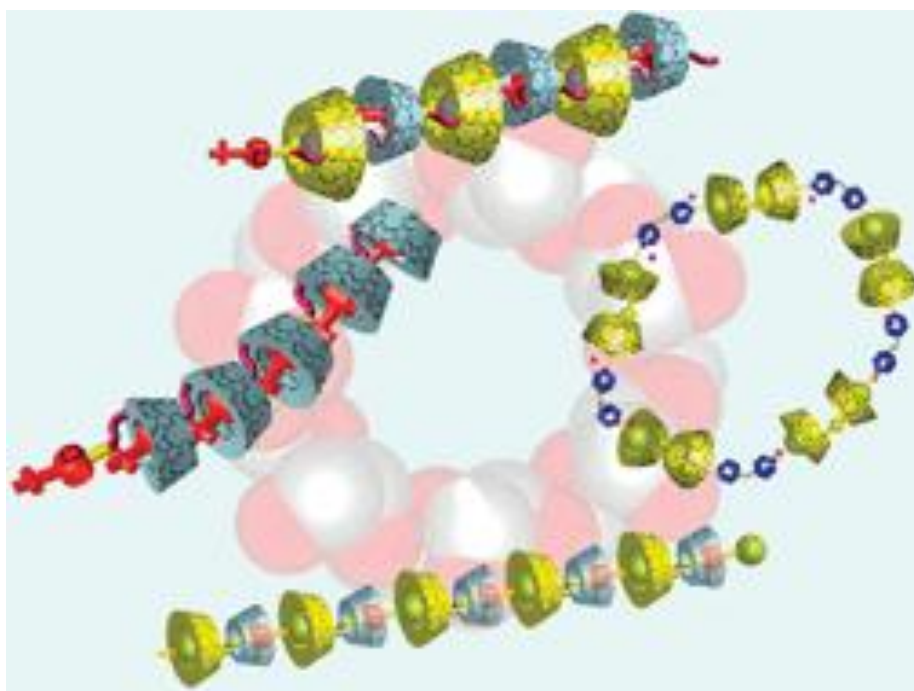


Figura 4: Formação de complexos supramoleculares com ciclodextrinas mostrando diferentes organizações. Fonte: HARADA *et al.*, 2009.

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. Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, assim é mais eficaz do que as formas convencionais (BORGMAN, 1986; HIRAYAMA *et al.*, 2002) (Figura 5).

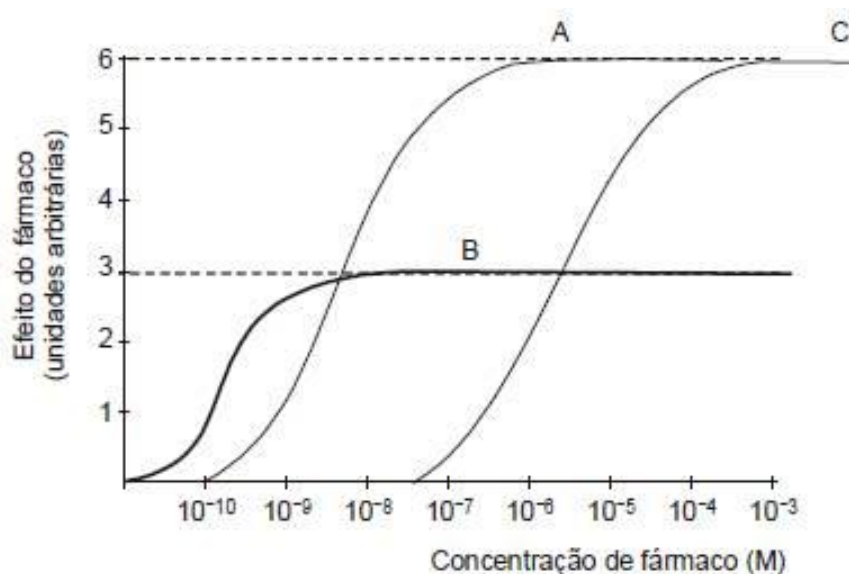


Figura 5. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional ([www.gerbras.com.br](http://www.gerbras.com.br)). Consultado em 07.02.2012.

Os transportadores mais conhecidos para preparar estes dispositivos 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). Estas moléculas são capazes incluir moléculas em seu interior ou associar-se a outras. Os compostos formados são parte de estratégias terapêuticas para melhorar propriedades de medicamentos pré-existentes (LANGER, 1990; MIRTH, 1987).

Neste trabalho foram utilizadas como carreadores para clorexidina as ciclodextrinas, que são biomoléculas, produzidas na natureza por várias espécies bacterianas. A forma do macrocíclica da Cd pode ser descrita como um cone

truncado com uma cavidade cônica 8 A ° profunda (LOFTSSON *et al.*, 2004; LIU e GUO, 2002; ZHENG *et al.*, 2001) (Figura 6).

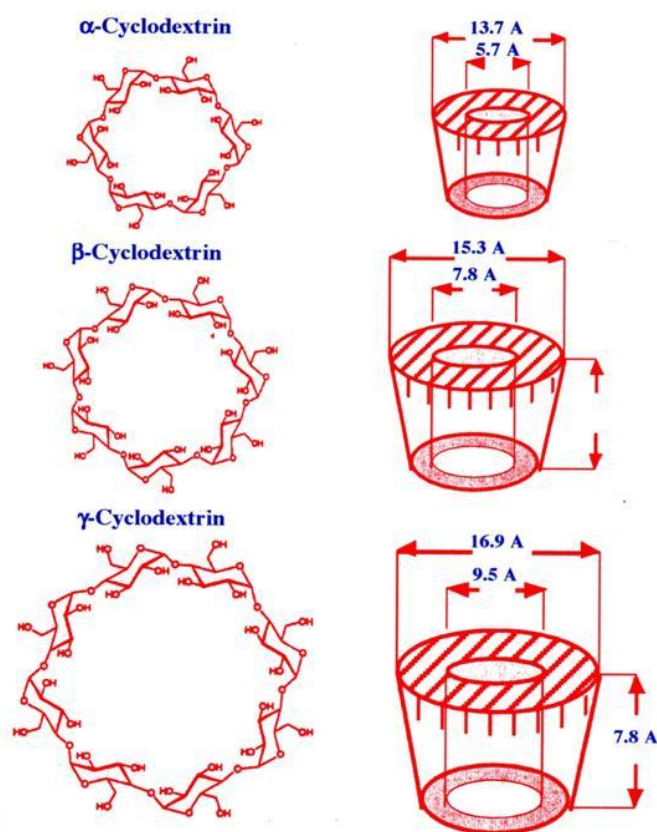


Figura 6. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Szejtli, 1990). Consultado em 07.02.2012.

Os complexos supramoleculares formados com ciclodextrinas apresentam eficácia terapêutica comprovada (TEIXEIRA *et al.*, 2012a; RASO *et al.*, 2010, DENADAI *et al.*, 2007,).

As principais vantagens do uso das ciclodextrinas são baixa toxicidade e atividade farmacológica e possuir solubilidade em água; com a capacidade de formar complexos supramoleculares (UEKAMA *et al.*, 1998; SZEJTLI, 1988). Estes complexos são mais estáveis em relação à decomposição por luz, calor e liberação de oxigênio. (MÁSSON *et al.*, 1998; LOFTSSON e MASSON, 2001).

O encapsulamento de uma substância nestas moléculas pode levar à mudança em propriedades da substância em questão: solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade. A ciclodextrina natural tem vinte e um grupos hidroxila, todos esses grupos podem ser considerados pontos iniciais

para modificações estruturais, e vários grupos funcionais tem sido introduzidos neste anel macrocíclico. (HIRAYAMA *et al.*, 2002) além de uma superfície externa hidrofílica e um núcleo hidrofóbico interno, assim elas podem formar complexos de inclusão através da ligação com pequenas moléculas anfifílicas em seu núcleo (ZHENG *et al.*, 2001; LIU e GUO, 2002). Beta-ciclodextrinas são conhecidas por serem eficientes moléculas aceptoras de esterol (OHVO e SLOTTE, 1996; CLEJAN e BITTMAN, 1984; MESMIN *et al.*, 2009).

Devido a facilidade de interação com esteróis, as ciclodextrinas (Cds) são usadas como ferramentas para manipular a composição lipídica das membranas biológicas (OHVO-REKILA e SLOTTE, 1996). Pensa-se que os efeitos toxicológicos das Cds estão associados principalmente à complexação com o colesterol e lipídios de membrana. Substituintes diferentes no anel da Cd podem conferir diversas ações e diversas propriedades toxicológicas (KISS *et al.*, 2007; CLEJAN e BITTMAN, 1984; MESMIN *et al.*, 2009).

As ciclodextrinas (Cds) naturais são:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Figura 6) e seus derivados sintéticos como a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina vêm sendo estudados pela sua capacidade de formar complexos supramoleculares com moléculas alojadas em sua estrutura (UEKAMA *et al.*, 1998; YUE *et al.*, 2004).

As ciclodextrinas naturais apresentam diferentes diâmetros que permitem a inclusão de diferentes princípios ativos, sendo a gama-ciclodextrina a que apresenta maior cavidade. Em relação à solubilidade em água, a menos solúvel em água é a beta-ciclodextrina. A gama-ciclodextrina seria a mais interessante para o uso farmacêutico, mas seu alto custo inviabiliza seu uso em escala industrial. Existem alguns derivados sintéticos das ciclodextrinas que em sua maioria são obtidos a partir da beta- ciclodextrina por adição de radicais como propil, sulfatados, carboxilados, metilados e outros. (SZEJTLI, 1988; LOFTSSON e MÁSSON, 2001).

As ciclodextrinas sintéticas aumentam ainda mais absorção das substâncias complexadas a elas, e não são tão boas aceptoras de esteróis. O uso combinado dessas diferentes ciclodextrinas e seus aditivos farmacêuticos pode aperfeiçoar as propriedades do fármaco e sua eficácia terapêutica (HIRAYAMA *et al.*, 2002).

Em estudos comparativos, com glicose marcada, observou-se que as

ciclodextrinas apresentam menor velocidade de absorção e distribuição semelhante de radioatividade nos tecidos orgânicos e excreção mais lenta pelos pulmões. Sua biotransformação pode ser comparada à do amido, contudo a velocidade é menor. As ciclodextrinas são excretadas pelas fezes em sua forma inalterada (SZEJTLI, 1988).

Estudando a eficácia de sistemas de liberação controlada de clorexidina no controle de bactérias de amostras coletadas de pacientes com doença periodontal e cepas referência. Cortés et al (2001) observaram uma maior eficácia destes compostos comparados à clorexidina pura. Os resultados deste estudo poderiam ser explicados pela interação da clorexidina com as células: aderência destes compostos à parede celular bacteriana e segundo pela principal propriedade do sistema empregado: a capacidade da ciclodextrina em retardar a liberação da clorexidina.

Ainda abordando estudos prévios de sistemas de liberação controlada empregando clorexidina e ciclodextrina, Denadai *et al.*, (2007) encontraram resultados que reforçam as observações de Cortés et al (2001) em relação à eficácia desta associação e ainda estudaram a diferença entre diferentes razões molares de ciclodextrina nos complexos supramoleculares. Através de análise físico-química estes autores concluíram que a estrutura de complexos supramoleculares de clorexidina: beta ciclodextrina é dependente da razão molar empregada. As propriedades químicas dos complexos em diferentes proporções molares foram estudadas por espectrometria de massas, ITC (Calorimetria Isotérmica de Titulação) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) ressonância magnética nuclear. Os resultados sugerem que complexos supramoleculares de clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes razões molares, principalmente as maiores apresentavam um arranjo molecular diferenciado.

Denadai et al. (2007) demonstraram que compostos de Clorexina:beta-ciclodextrina apresentaram maior eficácia antimicrobiana em relação a clorexidina pura. Com base nestes resultados podemos hipotetizar que arranjos moleculares distintos levariam a modificações na interação do sistema com a célula alvo. Os autores ainda discutem que as moléculas de clorexidina não se ligariam apenas ao interior da ciclodextrina e também em outros pontos de ligação

e provavelmente 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.

O aumento da atividade da clorexidina após inclusão em ciclodextrinas e também a melhora da atividade com o aumento da concentração de ciclodextrina empregada pode estar associada à capacidade das ciclodextrinas em remover o colesterol da membrana, bem como alterar a distribuição de colesterol entre o plasma e membranas intracelulares. Além disso, moléculas hidrofóbicas, tais como fosfolipídios também podem ser extraídos de membranas por ciclodextrinas (ZIDOVETZKI *et al.*, 2007). Também devemos levar em consideração a possibilidade da formação de complexos supramoleculares com diferentes arranjos alterarem de forma significativa a atividade do composto (DENADAI *et al.*, 2007).

A alta afinidade de ciclodextrinas metiladas com o colesterol foi demonstrada e atualmente elas são utilizadas também como agentes aceptores de colesterol para modificar a estrutura lipídica da membrana celular (HAYNES *et al.*, 2000; OHTANI *et al.*, 1988). Dependendo da concentração os agentes aceptores de esteróis podem ser correlacionados com a solubilização do colesterol e com a citotoxicidade (KISS *et al.*, 2010; YANCEY *et al.*, 1996).

#### **2.4. A ciclodextrina comoceptor de esteróis e sua importância**

Para entender a importância da interação ciclodextrinas- esterol celular para estes sistemas é indispensável conhecer um pouco sobre função e distribuição dos esteróis no organismo. Esteróides são os principais constituintes das membranas plasmáticas de células eucariotas, estas moléculas reduzem a permeabilidade da membrana, aumentam sua resistência mecânica e ajudam a organizar seus constituintes lateralmente em domínios conhecidos como “rafts” e “caveolae” (STECK *et al.*, 2002; OHVO-REKILA e SLOTTE, 1996). Apesar dos repetidos estudos, alguma característica básica a respeito da disposição dos esteróides nas membranas plasmáticas permanece desconhecida (ZIDOVETZKI e LEVITAN, 2007).

O mecanismo pelo qual o colesterol é passivamente transferido das membranas para as partículasceptoras não é bem definido (Figura 7). Este

fenômeno se torna cada vez mais relevante para o entendimento da fisiologia das lipoproteínas plasmáticas e patofisiologia da aterosclerose (STECK *et al.*, 2002). Sabe-se que os complexos fármaco-ciclodextrina se ligam seletivamente a esteróis para formar complexos hidrossolúveis. Estes complexos tem se mostrado excelentes veículos para a extração e liberação rápida de esteróis de membrana e também para estudo sobre o movimento do colesterol intra e intermembrana (MÜLLER e HERMANN, 2002; HAYNES *et al.*, 2000).

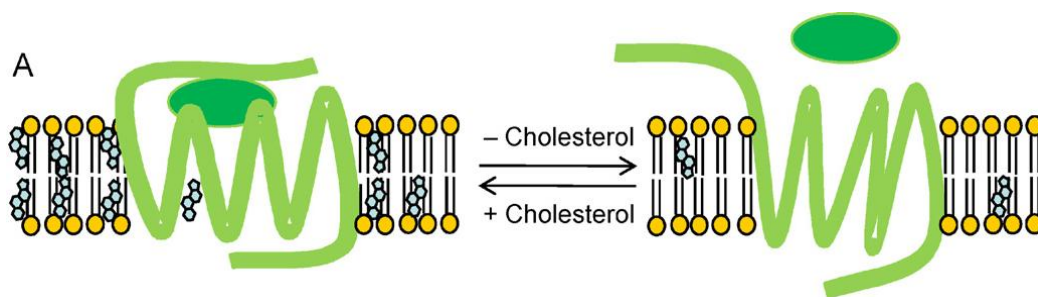


Figura 7. Representação esquemática da solubilização de colesterol presente em membranas (GIMPL e GEHRIG-BURGER, 2011).

O metabolismo do esterol também assume grande relevância devido a sua presença em membranas de leveduras de interesse médico como espécies de *Cândida*. O metabolismo de esterol nestes microrganismos é grande interesse devido à complexidade da bioquímica e por sua importância no desenvolvimento de compostos antifúngicos (PARKS e CASEY, 1995). A maioria dos agentes usados afeta a biossíntese ou função dos esteróis. Inúmeros aspectos interessantes da síntese de colesterol em leveduras são diferentes da síntese de esteróis em animais e isto deve ser considerado para o desenvolvimento de agentes antifúngicos que discriminem entre a biossíntese de colesterol e esteróis dos fungos (MESMIN *et al.*, 2009).

Os esteróis são transportados entre organelas de membrana como componentes da bicamada lipídica em vesículas de transporte e estas vesículas podem se mover entre membrana por processos não vesiculares, mecanismos desconhecidos que envolvem proteínas carreadoras (STECK *et al.*, 2002). O transporte de grandes quantidades de esterol entre organelas pode ser muito rápido



(ex. reequilíbrio entre duas organelas em poucos minutos) (OHVO-REKILA *et al.*, 1996; MULLER e HERMAN, 2002).

O colesterol pode ser removido a partir de células de extração em pequenas vesículas unilamelares. Ciclodextrinas ligam-se seletivamente a esteróis para formar complexos solúveis em água (MESMIN *et al.*, 2009). Diferentes ciclodextrinas apresentam níveis diferentes de afinidade com esteróis. A metil- $\beta$ -Cd mostrou ser o mais eficiente acceptor de colesterol celular, quando comparado ao 2-hidroxipropil, carboximetil e  $\beta$ -ciclodextrinas tetradecasulfatadas que são comumente utilizadas. Quando as células são expostas à alta concentração de Metil- $\beta$ -Cd (5-10 mM) por um período de tempo prolongado (2 h) de 80-90% de colesterol celular total pode ser removido. Sob essas condições, as células normalmente perdem sua morfologia e em casos extremos se tornam inviáveis. De fato, a hemólise foi um dos efeitos mais cedo notável de ciclodextrinas. (ZIDOVETZKI *et al.*, 2007; OHVO e SLOTTE, 1996; CLEJAN e BITTMAN, 1984; MESMIN *et al.*, 2009).

## **2.5. Testes de citotoxicidade**

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al.*, 2000; CIAPETTI *et al.*, 1996).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a proliferação celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal (ROGERO *et al.*, 2000). Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro.

Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI *et al.*, 1996)

As propriedades citotóxicas de derivados de ciclodextrinas e algumas relações estrutura-atividade já foram demonstradas. Grupos iônicos na molécula Cd podem diminuir significativamente o efeito citotóxico, em comparação com moléculas neutras metiladas. No que diz respeito à substituintes iônicos a introdução de cargas negativas (carboximetilada) ou positivas (amina-quaternária) na molécula podem evitar efeitos citotóxicos (KISS *et al.*, 2010).

### **2.5.1 Fosfatase Alcalina**

A fosfatase alcalina (F. A.) é uma enzima classificada como fosfo-hidrólase de mono-ésteres ortofosfóricos, com atividade ótima, *in vitro*, em pH alcalino. Esta enzima está presente em todas as espécies desde as bactérias ao Homem, o que sugere o seu envolvimento em processos bioquímicos fundamentais. No Homem, é uma glicoproteína tetramérica predominantemente ancorada à membrana citoplasmática. No Homem, a F.A. é codificada por 4 genes diferentes e possui as seguintes isoformas: Fosfatase alcalina tecidual não específica (TNE); Fosfatase alcalina intestinal (I); Fosfatase alcalina das células germinais (CG); Fosfatase alcalina placentária (P) (KIM *et al.*, 1991)

A fosfatase alcalina sofre um acabamento diferente de acordo com o tecido em que é sintetizada. Diferentes padrões de glicosilação dão origem a diferentes isoformas. As isoformas mais abundantes são a óssea, a renal e a hepática. No osso, a fosfatase TNS localiza-se, sobretudo nas membranas plasmáticas dos osteoblastos e nas vesículas da matriz óssea (KIM *et al.*, 1991)

Diversas funções têm sido atribuídas à fosfatase alcalina: intervém na sinalização celular (regula a fosforilação/desfosforilação); modula sistemas de transporte em diversos tecidos; é indispensável à propagação da mineralização óssea; favorece o desenvolvimento gastrointestinal e diminui a absorção de gorduras no intestino; reduz a atividade secretora biliar; parece participar em atividades reguladoras do funcionamento do miocárdio; promove o desenvolvimento fetal e assegura a imunidade passiva do feto; parece estar

envolvida na defesa do organismo durante processos inflamatórios; conduz à acumulação intracelular de triacilglicerídeos, estimulando a adipogênese; está associada à transmissão neuronal, à maturação da transmissão sináptica e da condução axonal e participa na síntese de neurotransmissores; a sua expressão está intimamente associada à diferenciação celular (FISHMAN, 1990; SEIFFERT *et al.*, 1984; ALI *et al.*, 2005)

A fosfatase alcalina intervém na mineralização, produzindo fosfato inorgânico (Pi); facilitando a acumulação de cálcio e Pi e a sua deposição na matriz óssea (o local de ligação da fosfatase ao cálcio parece ser fundamental); facilitando a nucleação e a orientação dos cristais de hidroxiapatita recém-formados, por ligação de um domínio específico da F.A. ao colágeno extracelular; hidrolisando o pirofosfato inorgânico (PPi), um conhecido inibidor da calcificação (DIMAI *et al.*, 1998; MAGNUSSON *et al.*, 2002).

A dosagem desta enzima é uma informação importante ainda para avaliação dos efeitos do arsenal terapêutico utilizado. A dosagem de fosfatase alcalina não só evidencia a concentração desta enzima nas células expostas ao medicamento bem como se houve ou não dano funcional à célula exposta a determinado arsenal terapêutico. No caso de tecidos onde a regeneração óssea é esperada, torna-se de fundamental importância saber se o fármaco causa inibição à liberação desta enzima (DIMAI *et al.*, 1998; MAGNUSSON *et al.*, 2002).

### 3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho se propõe a fazer um estudo comparativo das alterações provocadas nos microrganismos *Cândida albicans* (*C.a.*), *Streptococcus mutans* (*S.m.*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) e em células eucariotas (osteoblastos, fibroblastos, Caco-2) após tratamento com complexos supramoleculares de clorexidina e ciclodextrinas.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a medida de partículas e potencial zeta por anemometria e espalhamento de luz;

Avaliar a atividade antimicrobiana destes complexos supramoleculares sobre *Cândida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através da determinação da concentração inibitória;

Avaliar a capacidade de solubilização de ergosterol *in vitro* por complexos supramoleculares de CX:  $\alpha$ -Cd, CX:  $\beta$ -Cd e CX:Hp- $\beta$ -Cd em diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) comparativamente, utilizando-se como modelo *Cândida albicans*.

Avaliar a citotoxicidade de compostos de CX:  $\alpha$ -Cd, CX:  $\beta$ -Cd e CX: Hp- $\beta$ -Cd em diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) em testes de proliferação celular para osteoblastos, fibroblastos e Caco-2;

Avaliar a secreção de fosfatase alcalina em cultura celular de osteoblastos tratadas com CX:  $\alpha$ -Cd, CX:  $\beta$ -Cd e CX: Hp- $\beta$ -Cd em diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3, 1:4);

Avaliar os efeitos da clorexidina:  $\beta$ -ciclodextrina em diferentes razões molares no nível de cálcio intracelular e danos ao citoesqueleto em cultura celular de osteoblastos *in vitro* por microscopia de imunofluorescência confocal;

#### 4. MATERIAIS e METODOS

As ciclodextrinas  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd foram obtidas respectivamente da Waker Biochem<sup>®</sup>, Co (EUA) e as duas ultimas da Cerestar<sup>®</sup> (Hammond, Indiana, EUA). O cloridrato de clorexidina (CX) da Ecadil<sup>®</sup> Indústria Química S.A ( São Paulo, SP, Brasil). O caldo BHI (Brain Heart Infusion) da Biobrás S. A. (Minas Gerais, Brasil)

O caldo Sabouraud dextrosado, Ágar Müller Hinton, Ágar sangue e Sabouraud dextrosado foram obtidos da Biobrás S.A. (Minas Gerais, Brasil);

As cepas de *A.a* (ATCC 29522), *Ca*(ATCC 18804) e *Sm* (ATCC 25175) foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os osteoblastos foram obtidos a partir da cultura primárias de calvária de ratos da linhagem Winstar, fibroblastos e Caco-2 de linhagem L929 gentilmente cedidos pelo Departamento de Odontologia Restauradora da USP.

Para cultura celular foram utilizados os seguintes materiais: MEM da LGC<sup>®</sup>, São Paulo. SP. Bra, DMEM (Dubbeco Modified Eagle's Medium) e DMEM hiperglicosado da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, SFB (Soro Fetal Bovino), L-glutamina, Hepes (n-2-hidroxiethylpiperazina, n-2-ácido etanosulfônico), Aminoácidos não essenciais, Penicilina e Estreptomicina da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Vermelho Neutro Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e NBT/BCIP Reagent Kit, Invitrogen<sup>®</sup>, n6547, BSA (Albumina de soro bovino) da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Kit Alexa 488 IgG 1:100, Antifade Mounting Medium, TRITC-labeled phalloidin 1:, Fluo-3 acetoximetil ester, Plurônico F-127 todos adquiridos da Molecular Probes, Eugene, OR, USA

#### **4.1. Equipamentos**

O processo de liofilização dos compostos foi realizado empregando-se o equipamento Savant Modulo D-Freeze Dryer da Thermo-Electron Corporation<sup>®</sup>.

As Centrífugas utilizadas foram: Centrifuge 5702 e Centrifuge 5415 D, da Eppendorf<sup>®</sup>.

Todos os estudos com células foram realizados em capela de Fluxo Laminar de Segurança, Labconco<sup>®</sup>.

Os materiais utilizados para testes em células foram esterilizados em Autoclave Vitale Plus, Cristófoli<sup>®</sup>, Brasil.

As células foram mantidas em uma Incubadora Revco Elite II<sup>®</sup>, RC03000T-5-VBC, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, USA

Para monitorar a proliferação celular utilizou-se um Microscópio de luz invertida, Bel Photonics<sup>®</sup>, BEL Equipamentos Ltda., SP, Brazil.

O equipamento de banho maria utilizado em todos os experimentos foi o TE-0541, Tecnal<sup>®</sup>, SP, Brazil.

Para o preparo de amostras e meios de cultura utilizou-se água Milli-Q obtida de um equipamento SIMPAKR 1<sup>®</sup>, Millipore.

A espectrofotometria por UV-visível foi feita em um Espectrofotômetro Multiskan Spectrum Thermo Scientific<sup>®</sup>, Finland.

As imagens de Microscopia Confocal foram obtidas em Microscópio de Imunofluorescência Leika<sup>®</sup>.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1 Preparação dos compostos

A preparação dos complexos supramoleculares clorexidina: alfa-ciclodextrina (CX:  $\alpha$ -Cd), clorexidina: beta-ciclodextrina (CX:  $\beta$ -Cd) e clorexidina: hidroximetilpropil beta-ciclodextrina (CX: Hp- $\beta$ -Cd) foi feita pelo método de liofilização de suspensões aquosas de cloridrato de clorexidina, ciclodextrinas ( $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd ou Hp- $\beta$ -Cd) em diferentes razões molares (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) ou, tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (CORTÉS *et al.*, 2001, TEIXEIRA *et al.*, 2012a). 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  $\alpha$ -Cd (Mm: 973 g/mol)  $\beta$ -Cd (Mm: 1135g/mol) ou Hp-  $\beta$ -Cd (Mm 1480 g/mol) na concentração indicada para se obter as quatro razões molares de Clorexidina: ciclodextrina (1:1; 1:2; 1:3; 1:4). A seguir as soluções resultantes foram distribuídas em tubos Falcon, congeladas em N<sub>2</sub> e levadas à sublimação. Esse método de liofilização tem o propósito de preservar a integridade, estrutura, atividade biológica e química dos fármacos (KASPER e FRIESS, 2011).

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais

Grupos		Proporções Molares
<b>CX:<math>\alpha</math>-Cd</b>	1:1, 1:2, 1:3, 1:4	Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina.
<b>CX:<math>\beta</math>-Cd</b>	1:1, 1:2, 1:3, 1:4	Medida de partículas, potencial Zeta, Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina, microscopia confocal.
<b>CX:Hp-<math>\beta</math>-Cd</b>	1:1, 1:2, 1:3, 1:4	Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina.
<b>CX (Controle)</b>		Medida de partículas, potencial zeta, Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina,

		microscopia confocal)
<b><math>\alpha</math>-Cd (Controle)</b>		Medida de partículas, potencial zeta, Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina, microscopia confocal)
<b><math>\beta</math>-Cd (Controle)</b>		Medida de partículas, potencial zeta, Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina, microscopia confocal)
<b>Hp-<math>\beta</math>-Cd (Controle)</b>		Medida de partículas, potencial zeta, Testes antimicrobianos, Solubilização de ergosterol, proliferação celular, fosfatase alcalina, microscopia confocal)

#### 4.2.2. Medida das partículas

O tamanho médio das partículas e a sua distribuição de tamanho foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), utilizando um Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments W, Malvern, UK). A determinação do potencial  $\zeta$  foi realizada por anemometria laser Doppler (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, Malvern, UK), após a diluição com KCl 1 mM. Foram aferidas medidas das partículas e potencial zeta em solução aquosa e na presença de osteoblastos.

#### 4.2.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana

O *A.a*, *S.m*, *C.a* foram selecionados por serem microrganismos pertencentes à microbiota residente da cavidade oral (GASPARETTO *et al.*, 2000). Os osteoblastos e fibroblastos serão estudados já que fazem parte do grupo de células mais sensíveis aos efeitos tóxicos da clorexidina juntamente com células mucosas e epiteliais, além de sua importância fundamental na regeneração periodontal (GIANELLI *et al.*, 2008). As células Caco-2 constituem o padrão ouro para estudos em células tumorais (RHOAD *et al.*, 2010), a partir do momento que observou-se que estes compostos interagem de maneira distintas com células podendo provocar tanto efeitos antimicrobianos mais intensos como um estímulo tornou-se essencial o estudo de sua capacidade de estimular a proliferação de células tumorais.



Para o cultivo inicial do *A.a.* foram usados caldo BHI suplementado e ágar sangue em condições de anaerobiose (90% de Nitrogênio, 10% CO<sub>2</sub>) em estufa a 37° C. Para cultivo do *S.m.* foram utilizados caldo BHI (Brain Heart Infusion) e ágar Mitis Salivarius em condições de microaerofilia a 37° C. Para *C.a.* foram usados caldo e ágar Sabouraud Dextrosado e cultivado em 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, *S.m.* é um dos principais microrganismos associados à etiologia da Carie dental 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 CLSI , M27-A2 (NCCLS). A faixa do IC (concentração inibitória) foi definida como a menor concentração na qual 100% do crescimento celular de *A.a.*, *S.m.* ou *C.a.* eram inibidos, quando comparados aos grupos-controle. Os grupos-controle constam das culturas crescidas na ausência dos compostos antimicrobianos 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 inóculo foi preparado baseando-se na densidade óptica usando o espectrofotômetro ajustado a 580 nm, correspondendo a 0.5 na escala de turbidez de McFarland, o que indica a presença de 1-2 x10<sup>8</sup> UFC/mL (UFC, unidades formadoras de colônias). Os experimentos foram preparados pipetando-se 50 µL do inóculo em 3.95 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion), acrescentando-se à solução compostos de clorexidina. Os experimentos foram realizados em triplicata (GIULIANA *et al.*, 1999).

Para efeito de comparação alíquotas de 5 µL dos resultados obtidos em caldo foram então semeados em Agar Müller Hinton e os resultados observados após 24 horas.

#### **4.2.4 Dosagem de Lipídeos (Esterol e Ergosterol)**

Os grupos teste para este estudo foram os mesmos utilizados para os testes microbiológicos.

O ergosterol foi extraído a partir de amostras de *C.a* conforme o Método de Quantificação de Esterol (MQE) descrito por Vieira et al (2008) e Arthington-Skaggs (1999) com algumas modificações. As colônias de *C.a* retiradas da cultura cultivada em ágar Sabouraud Dextrosado foram inoculadas em 2 mL de caldo Sabouraud Dextrosado na presença da clorexidina, fluconazol e complexos supramoleculares em estudo na concentração 1µg/mL 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 os sedimentos secos foram adicionados à solução de KOH etanólico de tal forma a se ter a mesma concentração determinada pela turbidez (verificada com espectrofotômetro) em todas as amostras. As suspensões das células foram 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 extraído foi diluído em etanol P.A. e analisado espectrofotometricamente a 365 nm. O conteúdo de ergosterol foi calculado como porcentagem do peso do pelet conforme descrito por Arthington- Skaggs (1999), Vieira et al (2008) 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.

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

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

$$\% \text{ ergosterol} = [ \% \text{ ergosterol } 1\% \text{ 24(28) DHE} ] 2\% \text{ 24(28) DHE}$$

#### **4.2.5 Cultura de células**

Com o objetivo de avaliar o nível de citotoxicidade das ciclodextrinas e respectivos complexos supramoleculares com clorexidina foram realizados testes de cultura celular de osteoblastos, fibroblastos e Caco-2.

##### **4.2.5.1 Osteoblastos**

Foram utilizados osteoblastos provenientes de cultura primária. Para a captação destas células foram sacrificados 6 ratos neonatos da linhagem *Wistar* (3 a 5 dias). Foram feitos escalpos para a exposição das calvárias e limpeza dos ossos parietais e todos os tecidos aderidos. Os ossos dissecados foram colocados em tubos falcon (15 ml) contendo PBS estéril à temperatura ambiente. Após a Limpeza os ossos foram picados em uma placa de petri. Os fragmentos foram então deixados por 15 minutos em solução 1 % de tripsina / 0,5 % EDTA (ácido diaminotetracético) em PBS (pH 7.2) a 37 °C em estufa, para remoção de células sanguíneas e restos de tecido.

A extração dos osteoblastos foi realizada após o descarte da tripsina e colocação dos fragmentos ósseos em colagenase 0,2 % por 20 minutos a 37 °C. Este passo é repetido por aproximadamente 5 vezes para remoção das células presentes nos fragmentos ósseos. A colagenase proveniente de cada banho é recolhida, centrifugada por 10 minutos a 1400 rpm. O pellet obtido contém as células que são ressuspensas em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% e gentamicina 1% e transferidas para garrafas de cultura celular. As células provenientes de cada banho de colagenase são incubadas e mantidas em estufa a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub>. As células são mantidas em cultivo até a confluência para que possam ser replicadas.

As células indicadas para cultivo "*in vitro*" são as originadas do crescimento da primeira confluência, isto é, células da passagem 2 e 3 (P2 e P3). A repicagem, conseqüentemente, aumenta também o nº de células disponíveis para o experimento. Esta replicagem é feita removendo-se o meio das garrafas com células em confluência. Então as células são lavadas com PBS para remoção do SFB presente. A estas garrafas adiciona-se 2-4 mL de solução de 1 % de tripsina / 0,5 % EDTA em PBS, agita-se

levemente, o controle do destacamento das células da garrafa é feito visualmente ao microscópio de fase invertida. Quando as células se destacam acrescenta-se a cultura meio DMEM suplementado com SFB 10% para interromper a ação enzimática da tripsina. As amostras são centrifugadas a 1400 rpm durante 10 minutos, o pelete obtido é suspenso em DMEM suplementado com SFB 10% e as células distribuídas em novas garrafas.

Após a confluência das células nesta etapa, faz-se o plaqueamento e semeadura em poços de cultura (96 poços) com densidade celular de  $1 \times 10^5$  cel / $\mu$ L quantificadas em hemocítômetro. A placa de cultura é então incubada por 48 horas até a confluência. Os testes foram realizados em hexaplicata (WONG e COHN, 1975; ZHANG *et al.*, 2010).

#### **4.2.5.2 Fibroblastos e Caco-2 (Linhagens imortalizadas)**

Os fibroblastos L929 e as células e Caco-2 de linhagem ATCC CCL-1 NCTC clone 929 foram descongelados isoladamente através de banho-maria a 37 °C por 2 minutos. Para remover a substância crioprotetora (dimetil-sulfóxido – DMSO) das células em suspensão, estas foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 mL de meio de Eagle modificado (MEM) (Meio Essencial Eagle Modificado) (LGC Biotecnologia<sup>®</sup>, SP, Brasil) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) e DMEM (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% aminoácidos não essenciais, 1% glutamina, 1% HEPES respectivamente para fibroblastos e células Caco-2. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuscitado em 1 mL de MEM fresco. A suspensão das células foi transferida para um frasco de 25 cm<sup>3</sup> contendo 5 mL de MEM com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA), que em seguida foi mantida em cultivo a 37 °C, atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a esterilização dos materiais, suplementos e meios de cultura. O monitoramento do crescimento celular foi realizado diariamente, utilizando-se

microscópio de fase invertida, sendo o meio trocado três vezes por semana, de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70 % da área cultivável do frasco, processo denominado subconfluência, as células foram ampliadas. Para isso, o meio do frasco foi aspirado, reservado em um tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS) (phosphate buffered saline), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 2 mL de solução de tripsina a 0,25 % (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) em PBS, durante 3 minutos, à temperatura de 37 °C.

Para a inativação da tripsina, foi adicionado o meio de cultura reservado anteriormente contendo soro fetal bovino e as células em suspensão transferidas para um tubo e centrifugadas a 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura fresco.

Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento que deu origem a novas passagens da cultura (GIANELLI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2009; RHOADS *et al.*, 2010).

### **4.3. Testes de Citotoxicidade- Ensaio Vermelho Neutro**

Volumes de 0,2 ml de uma suspensão, com  $1 \times 10^5$  células foram distribuídas nos poços da microplaca com 96 orifícios. A placa foi incubada por 48 h a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> para a formação da monocamada celular. O meio de cultura foi substituído pelas diluições 0,1; 0,01 e 0,001% das amostras testadas e dos respectivos controles, em hexaplicata. A microplaca foi novamente incubada a 37 °C.

Após 24 h o meio contendo os fármacos testados foi substituído por 0,2 ml de meio DMEM contendo 50 mg de vermelho neutro/mL. A incorporação do vermelho neutro pelas células vivas foi verificada após 3 h, incubadas a 37 °C. O meio foi removido e as células lavadas com PBS, seguido de fixação em formaldeído (formaldeído 0,5% em tampão fosfato). Após descarte, cada poço recebeu 0,2 ml da solução de ácido acético em metanol (1% ácido acético glacial em metanol 50%). A placa foi mantida em agitação durante 20 min e a leitura das densidades ópticas foi

realizada num espectrofotômetro Multiskan Spectrum<sup>®</sup>, Thermo Scientific em 492 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de proliferação celular em relação ao controle de células (100%) (DE SOUZA *et al.*, 2011, ROGERO *et al.*, 2003).

A citotoxicidade é classificada de acordo com a proliferação relativa com base nos controles (KONG *et al.*, 2009):

- Não citotóxico >90% proliferação celular;
- Levemente citotóxico = 60–90% proliferação celular;
- Moderadamente citotóxico = 30–59% proliferação celular;
- Severamente citotóxico ≤30% proliferação celular.

#### **4.4. Ensaio de fosfatase alcalina**

O ensaio de fosfatase alcalina (Invitrogen<sup>®</sup>, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) foi realizado com o objetivo de se avaliar a possível interferência de complexos supramoleculares de clorexidina na atividade desta enzima. A dosagem de fosfatase alcalina foi realizada em osteoblastos provenientes de ratos neonatos. As células foram colocadas em contato com os compostos testados por 24 horas, em seguida aspirou-se todo o meio e reservou-se em um eppendorf. A amostra em placa foi lavada com PBS e então se colocou 200 µL da solução de BCIP (5-bromo-4-cloro- indolil-fosfato) / NBT (nitro tetrazólio azul) na placa em contato com as células e incubou-se por 2 horas em estufa a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Após este período observou-se a formação de cristais ao microscópio e acrescenta-se 200 µL da solução de SDS – 10 % HCl e incubou-se a placa *overnight* em estufa a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Após a solubilização dos cristais retirou-se 100 µL de cada poço para leitura a 595 nm O controle negativo consistia de 100 µL NBT /BCIP + 105 µL SDS.

#### **4.5. Microscopia de Imunofluorescencia Confocal**

##### **4.5.1 Determinação da concentração de cálcio intracelular livre**

Este ensaio é capaz de revelar variações na concentração de cálcio intracelular, evidenciando o metabolismo de cálcio em osteoblastos provenientes de cultura primária. Para estudar alterações na concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup> livre, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, utilizou-se

a microscopia confocal. Inicialmente todo o meio de cultura da amostra cultivada foi removido, e as células lavadas com PBS. Os osteoblastos foram incubados com uma solução de BSA (Albumina de Soro Bovino) 0.1%, Flúor-3, DMSO e Plurônico F-127 preparada no momento do teste e incubada por 10 minutos ao abrigo da luz. Uma vez no citoplasma as ligações éster do FLUO-3 são clivadas por esterases intracelulares, expondo cinco cargas negativas que dificultam a saída do indicador para o meio extracelular, favorecendo a sua acumulação intracelular (GIANELLI *et al.*, 2008).

Após este período de incubação, que consistiu no tempo necessário para a hidrólise da ligação éster da sonda pelas esterases intracelulares, o FLUO-3 que não foi internalizado era eliminado por lavagem em 1 ml de PBS. As imagens foram captadas em comprimento de onda de 488nm, zoom de 2 vezes, utilizando-se objetiva 20 com ganho de 1:3. PNT 7.5 a uma voltagem 1.

#### **4.5.2 Análise das alterações no citoesqueleto celular**

Inicialmente foi removido todo o meio da cultura de osteoblastos das amostras expostas aos compostos por 24 horas. As amostras foram lavadas em PBS (pH 7.2) e então fixadas em glutaraldeído 0.5% durante 10 minutos e lavadas em PBS para remoção do excesso do agente fixador. Em seguida as amostras foram desidratadas em acetona por 3 minutos e neutralizadas por uma solução de BSA 0.5% e glicerol 3% em PBS. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-vinculina 1 parte de Ac para 100 de solubilizante durante 1 hora e em seguida lavadas em PBS. Então foi feita a exposição ao anticorpo secundário ALEXA 488 IgG e lavadas em antifade mounting medium. A quantificação foi feita pela marcação das amostras com TRITC- labeled phalloidin com incubação durante 1 hora e sucessiva lavagem. As imagens foram obtidas a um intervalo de 0.4µm com laser de 15 mW.

#### **4.6. Análise estatística dos resultados**

Os resultados dos ensaios de proliferação celular e fosfatase alcalina estão apresentados como a média  $\pm$  erro padrão do número de experiências indicado, em preparações diferentes. A análise estatística dos resultados foi efetuada usando o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

## 5. Resultados

### 5.1. Medida das partículas e potencial zeta

No presente trabalho, o emprego da ciclodextrina tinha como objetivo melhorar as propriedades da clorexidina. As propriedades físico-químicas apresentadas pelas nanopartículas de clorexidina, beta ciclodextrina e complexos supramoleculares formados pelas mesmas são descritos na Tabela 3. O tamanho médio dos complexos supramoleculares permaneceu na faixa de ~ 493,9 a ~ 539,5 nm, observando-se que no grupo CX:β-Cd 1:4 houve agregação dos compostos. Estes valores foram acima da faixa observada para os demais grupos (~ 1451,10 nm).

Tabela 3- Medida de partículas de CX: β-Cd 1:1 a 1:4 na presença ou ausência de osteoblastos

<b>Grupos</b>	<b>Medida das partículas dos complexos supramoleculares (nm) ± dv</b>	<b>Medida dos osteoblastos tratados com complexos supramoleculares (nm) ± dv</b>
CX	265,06 ± 32	444,00 ± 5,21
β-Cd	623,16 ± 3,36	644,06 ± 38
CX:β-Cd 1:1	493,90 ± 28	2440,06 ± 80,5
CX:β-Cd 1:2	576,60 ± 5,04	1277,00 ± 57,1
CX:β-Cd 1:3	539,70 ± 37,40	1137,66 ± 54
CX:β-Cd 1:4	1451,10 ± 37,15	5030,30 ± 105
Osteoblastos	---	398,20 ± 24,06

O potencia zeta observado para os complexos de inclusão (Figura 9) foi sempre próximo a neutralidade, variando de baixas cargas positivas (β-Cd, CX:β-Cd 1:2 e 1:3) ou negativas (CX:β-Cd 1:1 e 1:4) enquanto o potencia da clorexidina pura foi positivo (~ 17 mV).



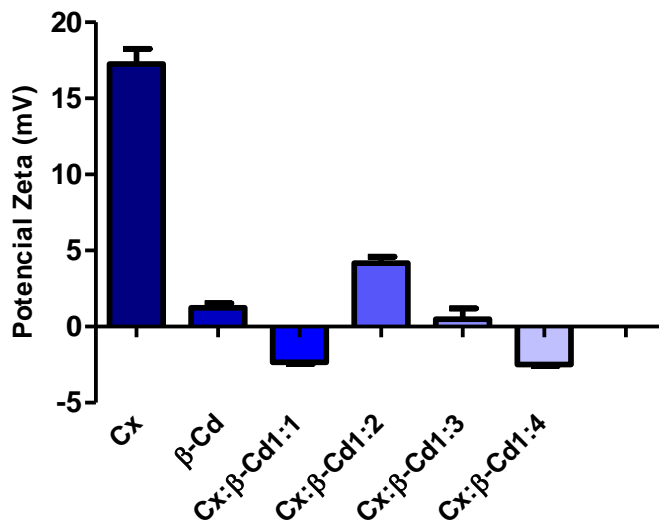


Figura 8. Medida do potencial Zeta (mV) das partículas de Clorexidina (Controle), Beta-ciclodextrina (Controle), Clorexidina:beta-ciclodextrina 1:1, 1:2, 1:3, 1:4.

Quando os mesmos complexos foram avaliados na presença de células (Figura 9) observamos o predomínio de potenciais positivos em todos os grupos avaliados. Os potenciais zeta mais altos foram observados para CX (33,5 mV), β-Cd (28,95 mV), CX:β-Cd 1:3 (27,7 mV) respectivamente. Os grupos osteoblastos sem tratamento (23,45 mV) e CX:β-Cd 1:2 (23,3 mV) apresentaram resultados semelhantes, enquanto os menores potenciais foram observados para CX:β-Cd 1:1(19,5 mV) e 1:4 (19,9 mV) .

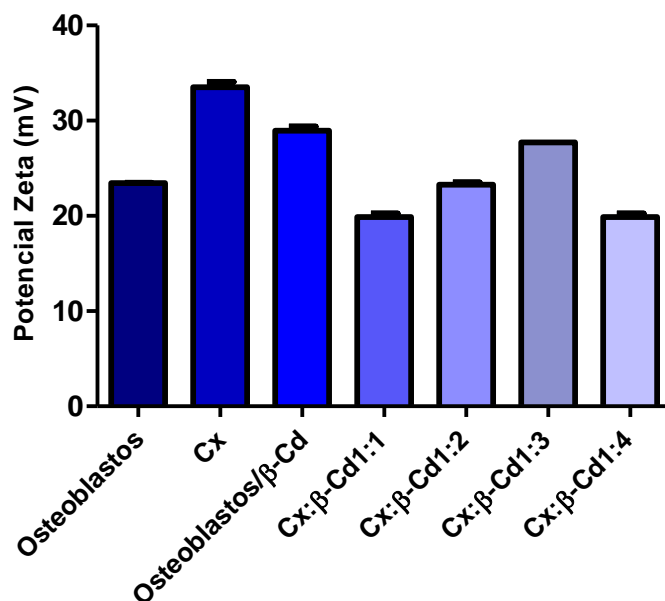


Figura 9. Medida do potencial Zeta das partículas de osteoblastos (controle), Clorexidina (Controle), Beta-ciclodextrina (Controle), Clorexidina:beta-ciclodextrina 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 em contato com amostras de osteoblastos.

## 5.2. Determinação da Atividade Antimicrobiana in vitro

Os dados referentes à Concentração Inibitória (IC) estão apresentados na Tabela 4. O grupo controle positivo para este estudo foi o cloridrato de clorexidina que exibiu atividade anti-fúngica e bactericida para *C.a*, *S.m.* e *A.a* respectivamente, apresentando efeito anti-fúngico em concentrações mais baixas que para efeito antibacteriano. Os valores de concentração inibitória variaram de 0.25 a 16µg para todos os grupos testados. Os complexos supramoleculares de alfa-ciclodextrina apresentaram melhores resultados para *C.a* enquanto os grupos de beta-ciclodextrina foram mais eficazes no controle do *A.a* e os complexos supramoleculares de hidroximetilpropil-beta:ciclodextrina foram mais eficazes no controle de *S.m.*

A concentração inibitória mínima variou tanto entre os complexos supramoleculares de diferentes ciclodextrinas quanto entre as razões molares para os microrganismos testados (Tabela 4), evidenciando que estes compostos apesar de possuírem o mesmo agente antimicrobiano comportam-se de forma distinta.

Tabela 4. Concentração inibitória da CX e complexos supramoleculares de CX (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) contra *C.a*, *S. m*, *A.a*.

<i>Grupos</i>	<i>CI em µg/mL para C.a</i>	<i>CI em µg/mL para S.m.</i>	<i>CI em µg/mL para A.a</i>
<b>Cloridrato de Clorexidina</b>	4,0	16,0	8,0
<b>CX:α-Cd 1:1</b>	0,25	8,0	8,0
<b>CX:α-Cd 1:2</b>	0,25	8,0	4,0
<b>CX:α-Cd 1:3</b>	1,0	8,0	4,0
<b>CX:α-Cd 1:4</b>	2,0	8,0	4,0
<b>CX:β-Cd 1:1</b>	2,0 **	16,0	1,0 *
<b>CX:β-Cd 1:2</b>	1,0 **	8,0	1,0 *
<b>CX:β-Cd 1:3</b>	1,0 **	8,0	0,5 *
<b>CX:β-Cd 1:4</b>	0,5 **	8,0	0,5 *
<b>CX:Hp-β-Cd 1:1</b>	2,0	8,0	8,0
<b>CX:Hp-β-Cd 1:2</b>	4,0	8,0	2,0
<b>CX:Hp-β-Cd 1:3</b>	4,0	4,0	4,0
<b>CX:Hp-β-Cd 1:4</b>	2,0	2,0	2,0
<b>Fluconazol</b>	8,0	-----	----

$P < 0.01$  nível de significância

**Teixeira et al., 2012a \***

**Teixeira et al., 2012b \*\***

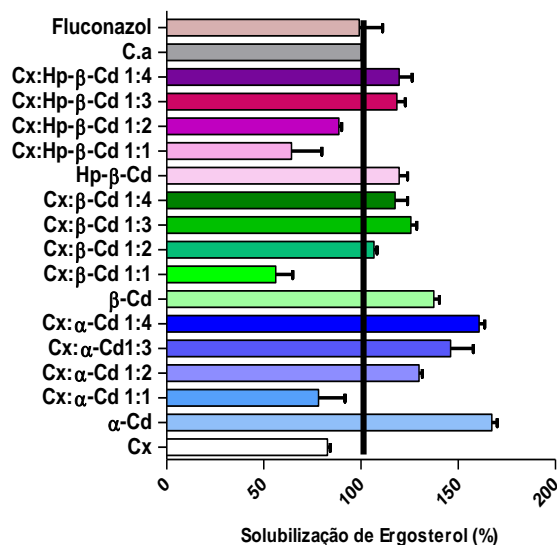
### 5.3. Extração de Lipídeos (Método de Quantificação de Esteróis)

Com o objetivo de caracterizar a interação entre complexos supramoleculares de ciclodextrinas e membranas celulares neste trabalho foram estudados os efeitos destes compostos sobre a solubilização de ergosterol presente na membrana do microrganismo leveduriforme *Candida albicans*. Amostras de *C.a* foram expostas durante 24 horas aos compostos analisados em concentrações equivalentes aos valores de IC<sub>90</sub>. A quantidade de ergosterol presente nas amostras foi quantificada por análise espectrofotométrica no comprimento de onda 230-330nm e os resultados estão apresentados na Figura 10.

Os resultados deste experimento indicaram que a exposição das amostras aos complexos supramoleculares de ciclodextrinas e clorexidina levaram a solubilização de ergosterol presente na membrana de *C.a*, alcançando níveis mais elevados nas razões molares 1:3 e 1:4 independente da ciclodextrina empregada (Figura 10).

Comparando-se as ciclodextrinas estudadas podemos observar que compostos de alfa-ciclodextrina nas razões molares 1:3 e 1:4 apresentam maior capacidade de solubilização de ergosterol enquanto complexos supramoleculares de hidroximetilpropil-beta: ciclodextrina 1:1 apresentam menor capacidade de solubilização de ergosterol.

Células expostas aos complexos supramoleculares de  $\alpha$ -Cd e CX: $\alpha$ -Cd (1:3 e 1:4) supostamente tiveram significativamente mais danos à membrana causados pela solubilização de ergosterol em relação a amostras de *C.a* não expostas aos fármacos (Figura 10). Para complexos supramoleculares de clorexidina e  $\beta$ -Cd (1:2, 1:3, 1:4) e Hp- $\beta$ -Cd observamos níveis intermediários de solubilização entre as ciclodextrinas e os menores níveis de solubilização para compostos derivados de CX: $\beta$ -Cd 1:1 e CX:Hp- $\beta$ -Cd (1:1 e 1:2). Não houve diferença estatística entre as proporções molares 1:3 e 1:4 para compostos de alfa ciclodextrina bem como para  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd.

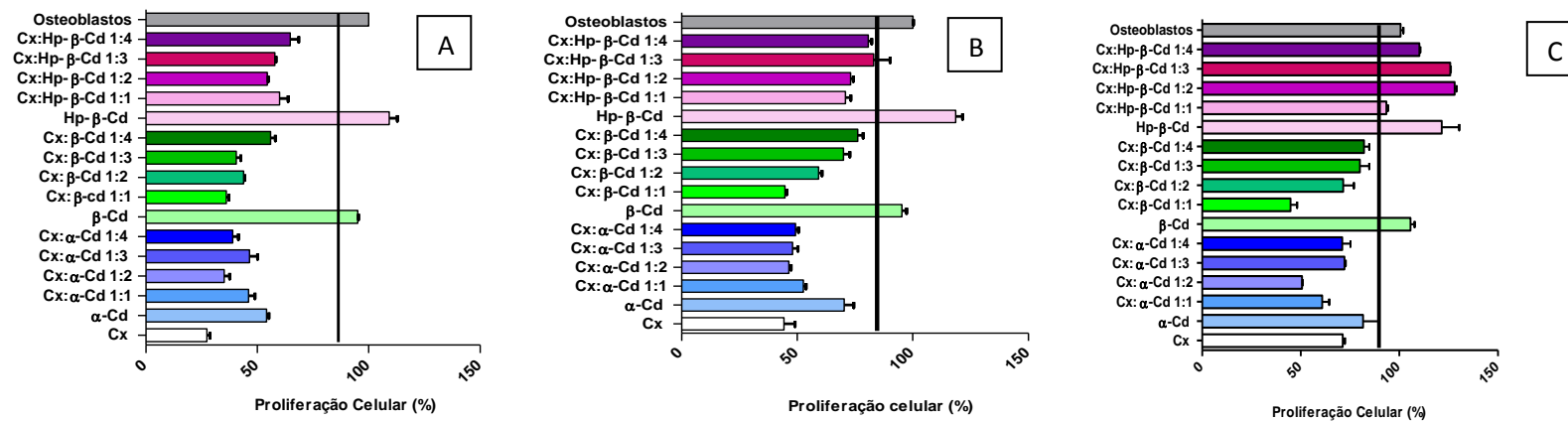


**Figura 10** Porcentagem de solubilização de ergosterol a partir de amostras de *Candida albicans* tratadas com complexos supramoleculares de CX e  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd, Hp- $\beta$ -Cd e Fluconazol. A linha azul indica a solubilização de 100%.

#### 5.4 Testes de Proliferação Celular

Dentre as células expostas aos complexos supramoleculares de clorexidina e ciclodextrina, os osteoblastos mostraram-se mais sensíveis, foram observados resultados de citotoxicidade severa após exposição a estes fármacos na concentração 0.1% ao controle clorexidina pura, como mostrado na **Figura 11**. Com a diminuição da concentração do agente antisséptico (0,1 até 0,001%) houve um aumento da proliferação celular para osteoblastos (mais de 80% a 0,001%) atingindo níveis de citotoxicidade leve para CX: $\beta$ -Cd e ausente nos grupos CX:Hp- $\beta$ -Cd que em proporções molares de 1:2, 1:3 e 1:4 estimularam a proliferação celular.

Em nenhum dos grupos de complexos supramoleculares observou-se citotoxicidade severa nas concentrações testadas. A 0.1% (**Figura 11 A**) os complexos de CX: $\alpha$ -Cd e CX: $\beta$ -Cd nas razões molares testadas, bem como a  $\alpha$ -Cd apresentaram citotoxicidade moderada enquanto para os compostos de CX: Hp- $\beta$ -Cd a citotoxicidade variou de moderada para 1:2 e 1:3 e leve para 1:1 e 1:4. Os controles  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd não foram citotóxicos para as células testadas.



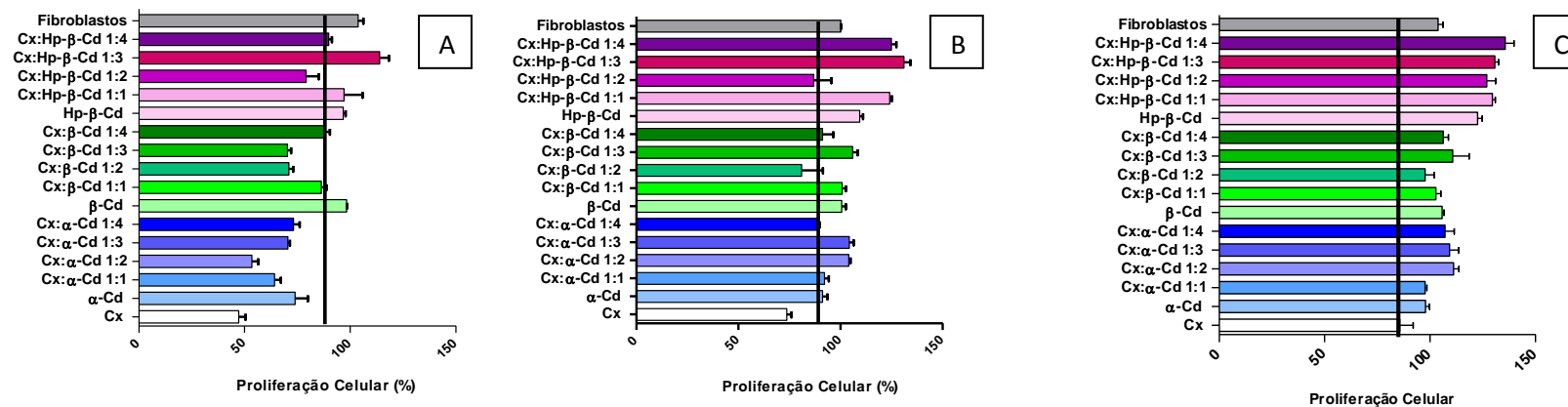
**Figura 11-** Proliferação celular de osteoblastos. Resposta a concentrações de 0.1% (A), 0.01 (B) e 0.001% (C) respectivamente pelo ensaio do vermelho neutro. As células foram expostas às concentrações indicadas de CX e complexos supramoleculares de CX em α-Cd, β-Cd, Hpβ-Cd durante 24 h. Os valores estão expressos em porcentagem e desvio padrão considerando-se 3 experimentos independentes em hexaplicata.

Em contraste, os fibroblastos (**Figura 12 A, B e C**) mostraram-se mais resistentes à mesma exposição, apresentando pouca redução na proliferação celular quando tratados com concentrações de 0,1 (**Figura 12 A**) a 0,001% (**Figura 12 C**). A clorexidina pura induziu efeitos citotóxicos de forma moderada a 0,1% e leve a 0,01 (**Figura 12 B**) e 0,001%.

Os complexos supramoleculares em  $\alpha$ -Cd em geral foram os mais citotóxicos para fibroblastos quando comparados às ciclodextrinas testadas, uma vez que a 0,1% (**Figura 12 A**) CX:  $\alpha$ -Cd 1:2 e 1:4 provocaram uma toxicidade moderada na cultura de células para os demais grupos observou-se uma citotoxicidade leve ou ausente. Em alguns grupos pode se observar um estímulo à proliferação celular, sendo este efeito mais intenso para CX: Hp- $\beta$ -Cd, que foi capaz de estimular a proliferação celular em todas as razões molares testadas. O efeito citotóxico dose-dependente foi observado tanto para os testes em osteoblastos quanto em fibroblastos.

Nas concentrações testadas CX:  $\alpha$ -Cd apresentou toxicidade que variou de moderada (0,1%) a ausente (0,01 e 0,001%) em todas as razões molares testadas, sendo que a 0,001% CX: $\alpha$ -Cd 1:2, 1:3, 1:4 foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos. Os compostos de CX:  $\beta$ -Cd 1:1 a 1:4 apresentaram toxicidade leve a 0,1%, ausente a 0,01 e a 0,001% foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos enquanto compostos de Hp $\beta$ -Cd não apresentaram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas e a 0,001% foram capazes de estimular a proliferação celular a 0,01% (1:1, 1:3, 1:4) e 0,001% (1:1 a 1:4).

Dentre os compostos de CX:  $\alpha$ -Cd 1:1 e 1:2 foram estatisticamente semelhantes quando testados em fibroblastos, sendo o controle  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd, Hp- $\beta$ -Cd menos citotóxico que os complexos supramoleculares. O controle CX apresentou-se mais citotóxico que os complexos supramoleculares nas concentrações testadas.



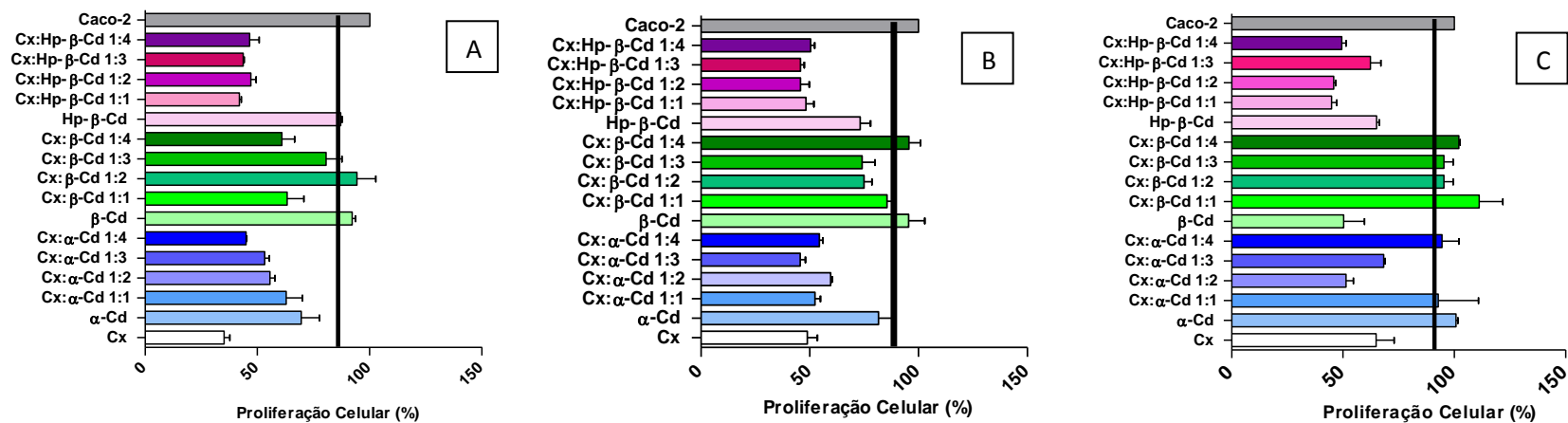
**Figura 12-** Proliferação celular de fibroblastos. Resposta a concentrações de 0.1% (A), 0.01 (B) e 0.001% (C) respectivamente pelo ensaio do vermelho neutro. As células foram expostas às concentrações indicadas de CX e complexos supramoleculares de CX em  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd, Hp $\beta$ -Cd durante 24 h. Os valores estão expressos em porcentagem e desvio padrão considerando-se 3 experimentos independentes em hexaplicata.



Em relação aos testes de proliferação celular de células Caco-2 (**Figura 13**), nenhum dos complexos supramoleculares testados foi capaz de estimular a proliferação celular. Em nenhuma das concentrações testadas foram observados efeitos citotóxicos severos seja para clorexidina ou **Figura 12** Proliferação celular de fibroblastos. Resposta a concentrações de 0.1% (A), 0.01 (B) e 0.001% (C) respectivamente pelo ensaio do vermelho neutro. As células foram expostas às concentrações indicadas de CX e complexos supramoleculares de CX em  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd, Hp- $\beta$ -Cd durante 24 h. Os valores estão expressos em porcentagem e desvio padrão considerando-se 3 experimentos independentes em hexaplicata.

Em relação aos testes de proliferação celular de células Caco-2 complexos supramoleculares, os maiores níveis de citotoxicidade foram observados na concentração 0.1% (**Figura 13 A**) para compostos de CX:Hp- $\beta$ -Cd e CX:  $\alpha$ -Cd (1:3 e 1:4), não houve diferença entre as razões molares testadas. Os compostos de CX: $\beta$ -Cd em geral não foram citotóxicos para células Caco-2 em nenhuma das concentrações, Então, observou-se que os complexos supramoleculares formados por clorexidina e ciclodextrinas não são capazes de estimular a proliferação de células tumorais do tipo Caco-2.

A Clorexidina pura induziu morte celular em todos os grupos de células testadas nas mesmas concentrações enquanto que os complexos supramoleculares em ciclodextrina em geral atenuaram os efeitos citotóxicos da clorexidina sendo os compostos em Hp- $\beta$ -Cd os mais biocompatíveis para osteoblastos e fibroblastos. Entre as ciclodextrinas testadas as proporções molares a 1:3 e 1:4 apresentaram-se como alternativas com menor citotoxicidade.

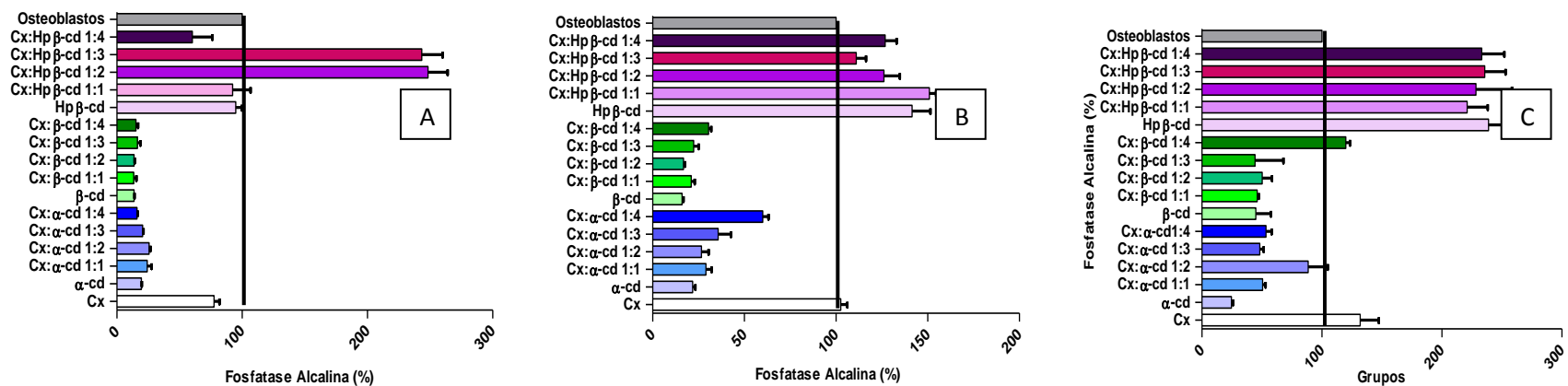


**Figura 13** Proliferação celular de células Caco-2 ( $\lambda=630$  nm). Resposta a concentrações de 0.1% (A), 0.01 (B) e 0.001% (C) respectivamente pelo ensaio do vermelho neutro. As células foram expostas às concentrações indicadas de CX e complexos supramoleculares de CX em  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd, Hp  $\beta$ -Cd durante 24 h. Os valores estão expressos em porcentagem e desvio padrão considerando-se 3 experimentos independentes em hexaplicata.

## 5.5. Ensaio de Fosfatase Alcalina

Com o objetivo de se conhecer o efeito dos complexos supramoleculares de ciclodextrina e clorexidina sobre a liberação de fosfatase alcalina e indiretamente sobre a viabilidade funcional dos osteoblastos foi realizado ensaio da fosfatase alcalina. Complexos supramoleculares a 0.1% (**Figura 14 A**) CX: $\alpha$ -Cd 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4; a 0.01% 1:1 e 1:2 . e o controle de  $\alpha$ -Cd nas três concentrações (0,1; 0,01 e 0,001%) inibiram de forma severa a liberação de fosfatase alcalina em osteoblastos.

Complexos de CX:  $\beta$ -Cd foram capazes de inibir de forma severa a liberação de fosfatase alcalina a 0.1% e 0.01% (**Figura 14 B**) em todas as razões molares, sugerindo a habilidade da  $\alpha$ -Cd e  $\beta$ -Cd em concentrações altas de induzir danos irreversíveis às células e ao seu metabolismo. Na concentração 0.001% (**Figura 14 C**) os mesmo compostos inibiram de forma moderada a liberação de fosfatase alcalina, porém o grupo de razão molar 1:4 foi capaz de estimular a liberação da fosfatase alcalina. Para os compostos de CX:Hp- $\beta$ -Cd observou-se uma inibição moderada apenas para o o grupo 1:4 a 0.1% todos os demais foram capazes de estimular a liberação de fosfatase alcalina. As células não tratadas apresentaram níveis normais de fosfatase alcalina bem como o controle Hp- $\beta$ -Cd a 0.1% (**Figura 14 A**), esta ciclodextrina não parece estar associada à citotoxicidade mesmo em concentrações mais altas.



**Figura 14-** Efeito dos compostos de inclusão de CX e  $\alpha$ ,  $\beta$  and Hp- $\beta$ -ciclodextrina (0,1; 0,01 e 0,001%) sobre a secreção de fosfatase alcalina em osteoblastos pelo ensaio BCIP/NBT após 24 horas de exposição. Os valores apresentados foram obtidos em três experimentos independentes em hexaplicata e os resultados expressos em porcentagem (%) com desvio  $\pm$  DP.

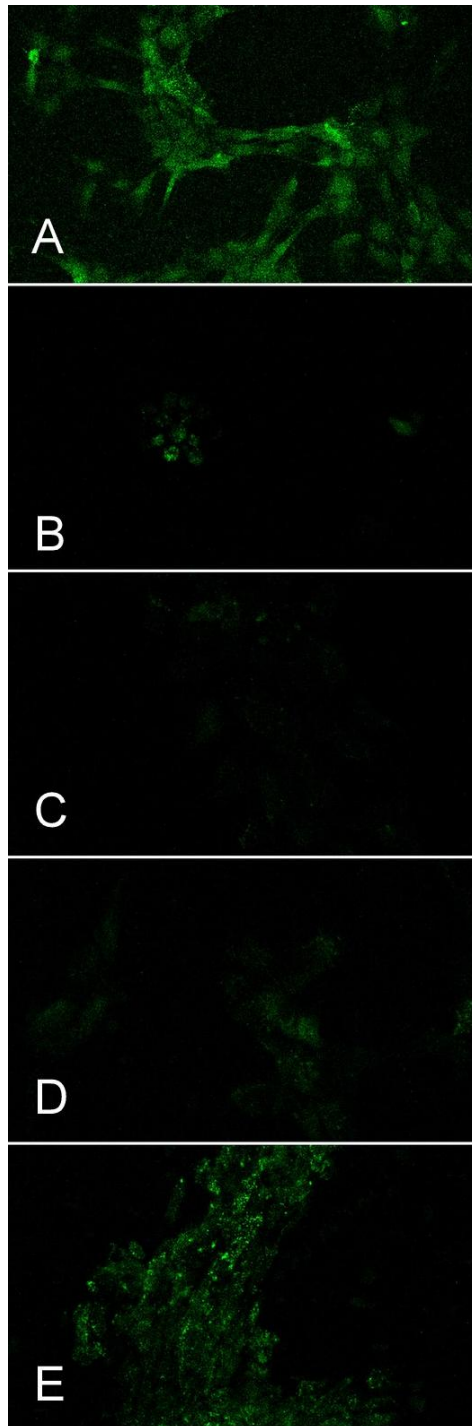
## 5.6. Imunofluorescência Confocal

### 5.6.1 Análise da concentração do cálcio intracelular livre

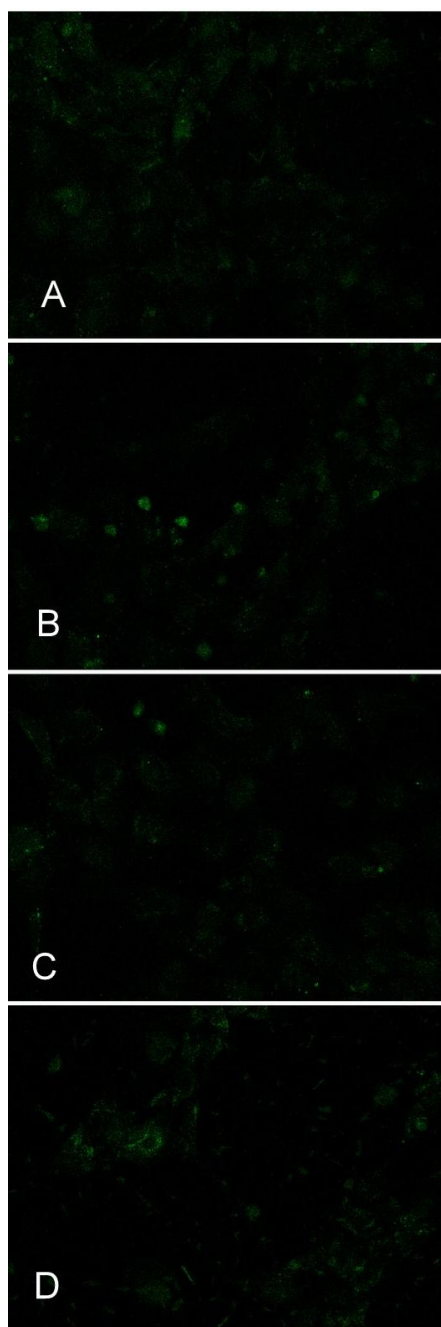
Para avaliar indícios possíveis da sinalização celular, foi feito um ensaio para observação do fluxo de cálcio celular, uma vez que fármacos citotóxicos têm a capacidade de induzir o acúmulo de cálcio intracelular e estimular a formação de radicais mitocondriais oxidativos em células osteoblásticas. Para evidenciar o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , células vivas foram observadas em microscópio confocal utilizando-se FLUO-3 como marcador.

Quando observamos as amostras de CX: $\alpha$ -Cd e seus complexos supramoleculares foram encontrados poucos indícios da presença de cálcio intracelular, sugerindo um efeito citotóxico dos fármacos testados e seu efeito sobre o transporte e metabolismo de cálcio a nível intracelular.

Os maiores níveis de cálcio intracelular foi observado para amostras de Hp- $\beta$ -Cd (**Figura 15**), seguidas pelos compostos de CX: Hp- $\beta$ -Cd 1:4, 1:3, 1:2 e 1:1 (**Figura 16**) respectivamente. Os resultados para  $\beta$ -Cd (**Figura 15**) foram intermediários as demais ciclodextrinas tanto em relação as amostras de Cds quanto em relação aos complexos supramoleculares.



**Figura 15** Efeitos da Cx no aumento do cálcio intracelular de amostras de osteoblastos tratados com ciclodextrinas 0,01% por 24 horas por Microscopia de Imunofluorescência Confocal. Para revelar sinais de cálcio os osteoblastos foram pré-tratados com FLUO-3 Am. (A) Osteoblastos; Clorexidina (B); Osteoblastos tratados com  $\alpha$ -Cd (C); com  $\beta$ -Cd (D); com Hp- $\beta$ -Cd (E).



**Figura 16** Efeitos da Cx no aumento do cálcio intracelular de amostras de osteoblastos tratados com CX:β-Cd 0,01% por 24 horas por Microscopia de Imunofluorescência Confocal. Para revelar sinais de cálcio os osteoblastos foram pré-tratados com FLUO-3 Am. CX:β-Cd 1:1 (A); 1:2 (B); 1:3 (C); 1:4 (D).

### 5.6.2 Evidenciação do Citoesqueleto

Com o objetivo de visualizar possíveis danos intracelulares causados pela exposição de osteoblastos às ciclodextrinas foram realizados experimentos em imunofluorescência confocal onde se observa alterações no citoesqueleto celular e concentração de cálcio intracelular.

No grupo controle de osteoblastos não expostos às ciclodextrinas, os filamentos de actina são observados de forma bem organizada em bandas com fibras mais espessas. Estas fibras se estendem da superfície celular até o citoplasma onde os microtúbulos parecem formar uma rede densa igualmente distribuída ao redor do núcleo por toda a extensão das células. Nos grupos  $\alpha$ -Cd e  $\beta$ -Cd os filamentos de actina e microtúbulos não aparecem evidentes nas células, sendo possível visualizar somente filamentos difusos e pouco espessos. No caso das células expostas a  $\alpha$ -Cd 0.01%, os filamentos de actina e microtúbulos aparecem rompidos e desorganizados em arranjos circulares ao redor do núcleo sendo que o dano maior é observado nas proporções 1:1 e 1:2. A forma normal alongada das células não é observada neste grupo, onde as mesmas apresentam morfologia ovalada e parece não apresentar nenhum arranjo de actina e microtúbulos.

As amostras de  $\alpha$ -Cd e  $\beta$ -Cd (**Figura 17**) mostraram-se colapsadas; não foram observadas imagens de feixes que foram substituídos por imagens de actina difusa e  $\alpha$ -tubulina, o mesmo se observa nos complexos supramoleculares derivados destas ciclodextrinas, sendo que os efeitos mais adversos foram observados para complexos de CX: $\alpha$ -Cd (**Figura 18**). Em amostras de Hp- $\beta$ -Cd (**Figura 17**) filamentos de actina estavam dispostos em uma estrutura semelhante a uma rede que aparece ancorada à membrana plasmática através de adesão focal



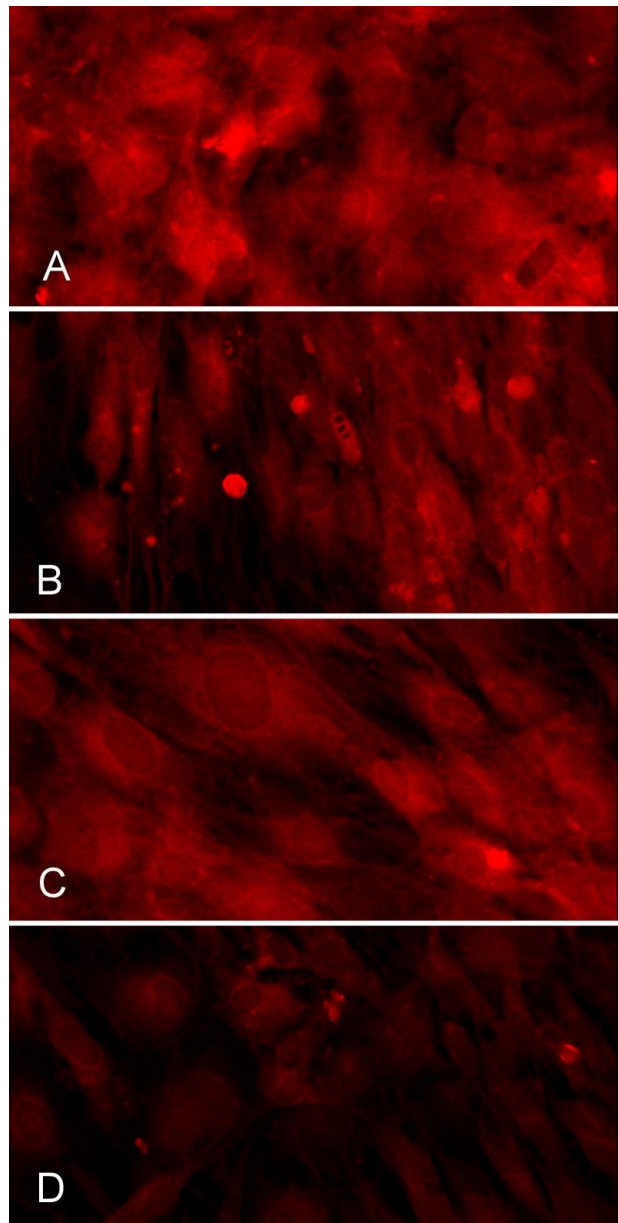


Figura 17- Micrografia: Efeitos de ciclodextrinas a 0.01% por 24h sobre a organização do citoesqueleto celular. Os osteoblastos provenientes de cultura primária foram fixados e corados com faloídina vermelha TRITC para revelar os filamentos de actina. (A) Osteoblastos; Osteoblastos tratados com  $\alpha$ -Cd (B); com  $\beta$ -Cd; com Hp- $\beta$ -Cd.

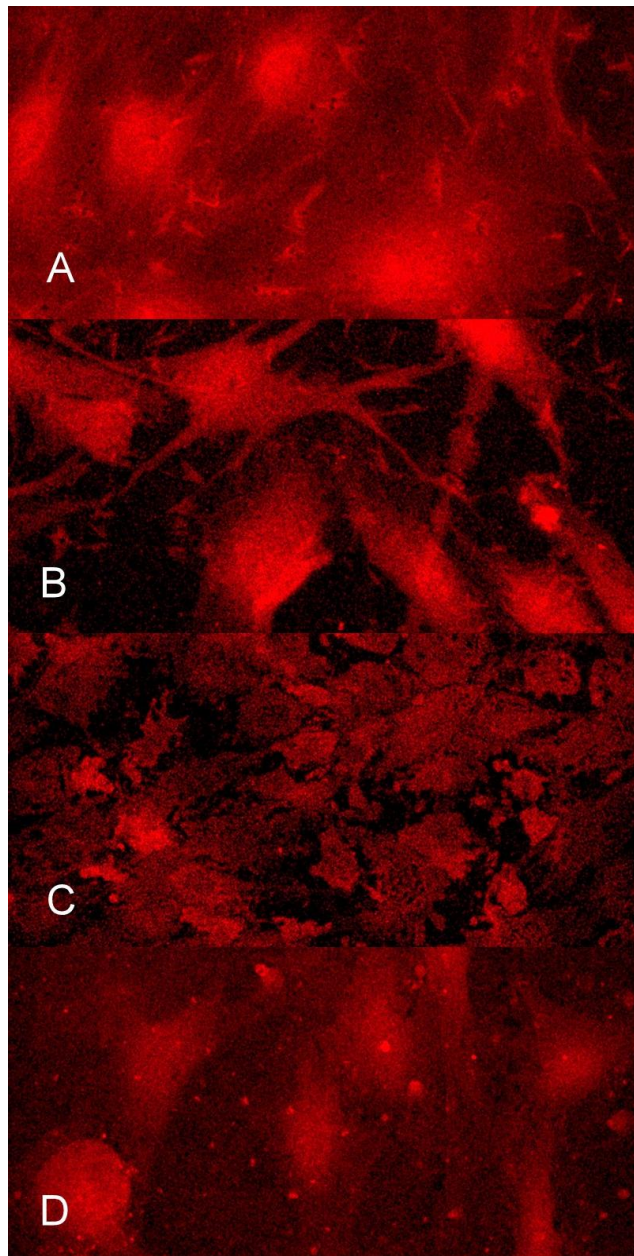


Figura 18- Efeitos de complexos supramoleculares de 0.01% por 24h sobre a organização do citoesqueleto celular. Os osteoblastos provenientes de cultura primária foram fixados e corados com faloídina vermelha TRITC para revelar os filamentos de actina por Microscopia de Imunofluorescencia Confocal. CX:β-Cd 1:1 (A); 1:2 (B); 1:3 (C); 1:4 (D).

## 6. DISCUSSÃO

O potencial zeta ( $\zeta$ ), indicativo das características de superfície, é grandemente afetado pela natureza do revestimento como mostrado nas Figuras 8 e 9. Nos grupos onde a mensuração foi feita na ausência das células prevaleceu o potencial próximo a neutralidade refletindo a carga da ciclodextrina que aparece externamente nas partículas dos compostos. O potencial zeta com valores positivos foi observado para os compostos na presença da célula eucariota refletindo o excesso de carga positiva expostas na superfície das partículas analisadas, neste caso poderíamos atribuir essa carga predominantemente positiva da clorexidina liberada e de grupo catiônicos presentes na membrana da célula.

O metabolismo normal dos fármacos produz metabólitos que possuem reatividade química e afinidade com moléculas celulares, e tem potencial para alterar funções biológicas e iniciar reações adversas sérias. As reações adversas às drogas são a principal complicação das terapias com fármacos e também um impedimento no desenvolvimento de fármacos e uso clínico. Toxicidade, dose excessiva, acúmulo de fármacos no organismo, formação de metabólitos quimicamente reativos são os principais problemas associados a terapias com fármacos. Sendo assim é de fundamental importância estudar a citotoxicidade dos fármacos em desenvolvimento (PARK *et al.*, 2011).

Atualmente as ciclodextrinas são empregadas entre outras funções já citadas, para manipular a composição de membranas biológicas através de seus lípidos e estudos em modelos de membrana. Os esteróis podem ser removidos das células por extração em vesículas unilamelares (SHAW *et al.*, 2008).

Neste estudo os resultados sugerem que há diferença significativa no efeito inibitório de complexos supramoleculares de clorexidina em baixas concentrações sobre *C.a.* Aumentando a quantidade de ciclodextrina nos complexos supramoleculares observa-se um aumento significativo em sua atividade antimicrobiana exceto para Cx: $\alpha$ -cd 1:4 que é pior que 1:2. A atividade antimicrobiana mais potente foi observada na proporção molar 1:4 que pode ser explicado pela maior interação destes compostos com membranas quando comparados à clorexidina pura ou a outros complexos supramoleculares ( $\alpha$ ,  $\beta$ , Hp- $\beta$ :Cd) de menor proporção.

A clorexidina também induz mudanças na fluidez da membrana de microrganismos, justificando a maior eficácia dos complexos supramoleculares CX-Cd nas soluções analisadas. As moléculas de CX competem com fosfolípides para interagir com colesterol e formam poros na membrana, em humanos a toxicidade destes antibióticos é menor (THATI *et al.*, 2007).

As variações na composição lipídica das membranas podem ser consideradas como um fator de modulação da capacidade fusogênica das membranas e afeta sua fisiologia e patologia. Estudos recentes evidenciaram que lipídes de membrana podem servir como sítios de ligação para um grande número de patógenos, incluindo vírus e bactérias. (BESENICAR *et al.*, 2008, STECK *et al.*, 2002). Estas observações justificam o melhor efeito antimicrobiano dos complexos supramoleculares em beta ciclodextrina bem como os efeitos citotóxicos dos compostos de alfa-ciclodextrina, uma vez que nestes grupos ocorre uma solubilização muito maior de lípides e conseqüentemente leva a danos irreversíveis na membrana das células em contato.

Os mecanismos de extração do ergosterol por ciclodextrinas ainda não são bem entendidos. A maioria dos autores observou que ocorre interação das mesmas com as membranas sem inserção do agente na membrana. Hipotetizou-se então que o efluxo de esterol das membranas ocorre primariamente pelo mecanismo de difusão aquosa no qual moléculas saem da célula ou vesículas de membrana e são incorporadas por lipoproteínas ou por moléculas de ciclodextrinas após difusão em solução aquosa. Atualmente o mais aceito é que os esteróis são removidos das células em pequenas vesículas unilamelares, utilizando-se as ciclodextrinas como aceptores de colesterol podendo esta extração ser rápida e eficiente (BESENICAR *et al.*, 2008; OHVO-REKILA *et al.*, 2000; OHVO-REKILA *et al.*, 1997).

A exposição das células de *C.a* às ciclodextrinas provavelmente provocou desorganização nas membranas celulares principalmente em maiores concentrações de ciclodextrina ( 3 e 4 µg/mL) como relatado por Ohvo- Rekila *et al.*, (2000). A solubilização de ergosterol por ciclodextrinas apresentou indício de saturação a 3 µg/mL, onde foram observados os maiores valores de solubilização, observações que também já foram feitas por Ohvo-Rekila *et al.* (2000). Neste estudo os autores observaram que níveis de saturação para extração de ergosterol por ciclodextrinas a 2.5mM, assim a extração de ergosterol de

membrana por ciclodextrinas apresenta um limite, e não se sabe a que porcentagem de esteróis da membrana corresponde esse limite.

Os esteróis são os principais constituintes de membranas plasmáticas de células eucariotas, eles são capazes de reduzir a permeabilidade da membrana, aumentar sua resistência mecânica e ajudar na organização de seus constituintes lateralmente de acordo com o modelo do mosaico fluido. Sabe-se que as ciclodextrinas são capazes de se ligar seletivamente aos esteróis formando complexos hidrossolúveis. As ciclodextrinas tem se mostrado excelentes veículos para o transporte rápido de fármacos ou para extração de esteróis de membrana e frequentemente são utilizadas em estudos para observar o movimento do colesterol intra e intermembrana (OHTANI *et al.*, 1988).

A remoção do colesterol de membranas celulares é observada como uma das causas de rompimento de membranas e alteração dos domínios membranares e pode ser considerada uma estratégia para o rompimento de membranas, alterando domínios membranares e conseqüentemente a sinalização celular, entrada de patógenos ou partículas no meio intracelular (PUCADYIL e CHATTOPADHYAY, 2007).

Todos esses efeitos são observados de forma mais intensa nos grupos tratados com as razões molares 1:3 e 1:4. Assim, podemos afirmar que o dano à membrana é um dos mecanismos de inibição da CX:  $\beta$ -Cd contra o *A. a*, mas estes compostos causam outras alterações celulares a nível citoplasmático (TEIXEIRA *et al.*, 2012 a). Estes efeitos celulares foram observados com mais intensidade nos grupos CX:  $\beta$ -Cd 1:3 e 1:4, todavia a clorexidina é capaz de atuar sobre outros mecanismos celulares principalmente em nível citoplasmático como podemos observar neste estudo de acordo com resultados de imunofluorescência confocal.

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.

As ciclodextrinas são consideradas “excipientes farmacêuticos de alto desempenho” (IRIE *et al.*, 1992), sua citotoxicidade tem sido avaliada de acordo com a forma de administração, tamanho da cavidade ( $\alpha, \beta, \delta$ ) e modificações químicas ( Hp $\beta$ -d, Cds

randomicamente metiladas, Cds sulfatadas). Neste estudo realizamos uma série de experimentos utilizando-se complexos supramoleculares de  $\alpha$ ,  $\beta$  e Hp- $\beta$ -Cd em osteoblastos, fibroblastos e células Caco-2 com diferentes ciclodextrinas em diferentes concentrações.

Com o ensaio colorimétrico do vermelho neutro pode-se observar que o tratamento de células eucariotas com clorexidina e complexos supramoleculares de clorexidina:beta-ciclodextrina afetam a proliferação celular de uma forma dose dependente.

Comparando-se os efeitos das ciclodextrinas em fibroblastos, os compostos derivados da  $\alpha$ -Cd foram os grupos mais citotóxicos independente da concentração empregada para osteoblastos e fibroblastos enquanto para células Caco-2 a maior citotoxicidade foi observada para complexos supramoleculares de CX:Hp- $\beta$ -Cd. Os resultados para osteoblastos e fibroblastos estão de acordo com os resultados de extração de ergosterol explicitando a relação da maior citotoxicidade com maiores níveis de extração de ergosterol. A citotoxicidade mais severa destes compostos pode estar associada com o aumento da permeabilidade celular e desorganização da membrana causada pela solubilização de esteróis presentes na membrana. Para células Caco-2 não observamos o mesmo padrão de resultados, sendo os compostos de CX: Hp- $\beta$ -Cd os mais citotóxicos.

De acordo de Gianelli et al (2008) que realizaram testes de citotoxicidade celular em células SAOS e fibroblastos com a clorexidina, o tratamento com CX afeta a proliferação celular de maneira dose e tempo-dependente. O aumento progressivo da concentração do agente antisséptico (de 0,03% para 0,12%) esteve correlacionado com um aumento paralelo na morte de células osteoblásticas (até 80%). Os Tratamentos de longo prazo realizados neste estudo (5, 15 min) induziram uma morte celular generalizada em todos os tipos de células, em qualquer concentração. À microscopia confocal, o tratamento das células SAOS osteoblásticas-2 com CX 0,01% causou uma alteração drástica na organização do citoesqueleto seguido de arredondamento das células e desapego progressivo do substrato, o que sugere a capacidade do composto para induzir danos celulares irreversíveis.

Estudos anteriores, mostram que a desorganização da actina leva a alterações na taxa de crescimento celular e apoptose (GOURLAY e AYSCOUGH, 2006; ANURADHA *et al.*, 2007). Estudos previos mostraram que a apoptose não foi o único tipo de morte celular

induzida pelo tratamento com CX (GIANELLI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2009). De fato, após o tratamento com CX 0,01% para 1 min, osteoblastos mostraram sinais típicos de apoptose, incluindo cromatina nuclear condensada, o ADN fragmentado, vacuolização citoplasmática extensa e necrose.

Embora o significado clínico desses achados ainda não tenha sido determinado, supomos que a aplicação direta de CX durante a terapia regenerativa para o tratamento de doenças periodontais e peri-implante poderia ter graves efeitos tóxicos sobre fibroblastos gengivais, células endoteliais e, especialmente, sobre os osteoblastos alveolares, assim interferiria negativamente com a fase de cicatrização precoce destas doenças bucais.

Em nosso estudo, o melhor agente para solubilização de ergosterol corresponde a complexos supramoleculares de  $\alpha$ -Cd e entre eles as razões molares com maior efeito sobre a solubilização de esteróis foram 1:3 e 1:4 que também correspondeu à ciclodextrina com maior toxicidade dentre as estudadas. As outras ciclodextrinas com menor toxicidade foram também menos eficientes para solubilização de ergosterol.

O aumento da razão molar de CX: $\alpha$ -Cd 1:2 e 1:3 além de apresentar maior solubilização de ergosterol também demonstrou ter melhores propriedades antimicrobianas principalmente para *C.a*, CX: $\beta$ -Cd para *A.a* e CX:Hp $\beta$ -Cd para *S.m*, evidenciando a capacidade das ciclodextrinas em interagir de forma específica com membranas dependendo de sua composição, e com base nesta interação modular a atividade do composto de inclusão utilizado. Este efeito permite que a escolha da ciclodextrina empregada seja feita de acordo com as suas propriedades em relação com o tecido alvo e efeito desejado.

Almazin *et al.*, (2009) que também testaram a clorexidina em cultura de células, neste caso comparada à doxiciclina e à minociclina em várias concentrações para osteoblastos, observou que a CX e, em menor extensão, a minociclina tem efeitos citotóxicos sobre os osteoblastos *in vitro*. De acordo com o teste de citotoxicidade todos os três agentes em sistemas de liberação controlada apresentaram efeitos citotóxicos, porém apenas o grupo CX atingiu a citotoxicidade de 50%. Estes autores concluíram que as altas concentrações dos antibacterianos em bolsas periodontais podem ter um efeito direto e indireto sobre as células viáveis do tecido de suporte periodontal, especialmente na formação de células ósseas (osteoblastos) (ALMAZIN *et al.*, 2009).

Em concentrações mais baixas (0.001%) em geral ocorre um aumento da proliferação celular para todas as ciclodextrinas evidenciando o efeito dose dependente descrito para clorexidina (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001), que foi verificado no presente estudo mesmo com a clorexidina incluída em ciclodextrina. A porção externa da molécula de ciclodextrina contém domínios hidrofílicos, que provavelmente são o sítio de interação ciclodextrina-célula. Yang et al., (2007) relatou que a introdução de alfa-ciclodextrina diminuía a citotoxicidade do polieter-amida (PEI) e hipotetizou que a alta densidade de aminas e o alto peso molecular do PEI seriam as razões da alta citotoxicidade do PEI (YANG *et al.*, 2007).

Em nenhum dos ensaios de proliferação celular realizados neste estudo observou-se estímulo à proliferação de células Caco-2 tratadas com ciclodextrinas. Em nenhuma das concentrações testadas foram observados efeitos citotóxicos severos para as mesmas células, os maiores níveis de citotoxicidade foram moderados e observados a 0.1%. Assim pode-se dizer que ciclodextrinas não são capazes de estimular o crescimento tumoral de células Caco-2 *in vitro*.

As ciclodextrinas são quimicamente estáveis e podem ser modificadas de forma completa ou de maneira seletiva em algumas regiões criando análogos com maior solubilidade e melhores propriedades de complexação. Elas podem reagir de várias maneiras que envolvem basicamente a clivagem de ligações OH, CO, CH, CC (COLEMAN, 1992), As ciclodextrinas também podem formar diversos agregados que originam respostas distintas por parte das células e microrganismos expostos. Os mecanismos de extração de ergosterol por ciclodextrinas são muito relatados, mas ainda não são bem explicados. Em experimentos prévios, os autores relataram que não ocorrem ligações significativas ou inserção na membrana pelo agente extrator, neste caso as ciclodextrinas. Hipotetizou-se então que o efluxo de esterol das membranas ocorre principalmente pelo mecanismo de difusão aquosa no qual as moléculas se liberam das células ou vesículas de membrana e são incorporadas por lipoproteínas ou moléculas de ciclodextrinas após difusão em água.

A razão para que o processo mediado por ciclodextrinas seja mais rápido que o mediado por lipoproteínas pode ser justificado pelo tamanho das moléculas, que são incapazes de vedar completamente a membrana celular e então ocorrem interações



reversíveis ou irreversíveis quando expostas a ciclodextrinas. A maioria das ciclodextrinas sintéticas de segunda geração possuem substituições iônicas e grupos metilados que causam diminuição na citotoxicidade das mesmas (KISS *et al.*, 2010, BESENICAR *et al.*, 2008).

Os ensaios para detecção de fosfatase alcalina mostraram inibição severa para maioria dos compostos de  $\alpha$ -Cd e  $\beta$ -Cd a 0.1%, mostrando que apesar dos resultados de maior sobrevivência à exposição aos fármacos observada nos testes de viabilidade ocorre um dano na atividade funcional das células expostas. A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolase responsável pela remoção dos grupos fosfato a partir de diferentes tipos de moléculas, incluindo nucleótidos, proteínas e alcalóides. O processo de remoção do grupo fosfato é chamado desfosforilação. Tal como o nome sugere, fosfatases alcalinas são mais eficazes em um ambiente alcalino. Em humanos, a fosfatase alcalina está presente em todos os tecidos em todo o corpo, mas é particularmente concentrada no fígado, no canal biliar, rim, osso e na placenta (KIM *et al.*, 1991).

O efeito das ciclodextrinas na secreção de fosfatase alcalina reflete sua citotoxicidade e é mais severo em concentrações mais altas (0.1%) e em osteoblastos tratados com  $\alpha$ -Cd que em  $\beta$ -Cd. A Hp- $\beta$ -Cd é capaz de estimular a secreção da fosfatase alcalina. As ciclodextrinas  $\alpha$ -Cd e  $\beta$ -Cd causam uma grande diminuição nos níveis de fosfatase alcalina a valores em torno de 30% para 0.1 e 0.01% (**Figura 14**).

Sugere-se que ocorreu um colapso do citoesqueleto das células tratadas com  $\alpha$  e  $\beta$ -Cd, observando-se apenas feixes de actina difusos sem organização (**Figura 17**). Relatos prévios, também evidenciaram a desorganização dos feixes de actina que ocorrem previamente a apoptose (GOURLAY e AYSCOUGH, 2006; ANURADHA *et al.*, 2007; GIANELLI *et al.*, 2008). No grupo Hp- $\beta$ -Cd foi observado que os filamentos de actina bem organizados e ancorados à membrana celular reforçando a ausência de citotoxicidade evidenciada nos testes de proliferação celular.

Estudos prévios tem demonstrado que alterações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem causar sobrecarga mitocondrial, o que leva a estimulação excessiva do ciclo do ATP com aumento do fluxo de elétrons na cadeia respiratória e geração excessiva de radicais livres mitocondriais. Além disso, a ativação do sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e da sintase de óxido nítrico leva conseqüentemente à formação de óxido nítrico e afetam a respiração

mitocondrial e a síntese de ATP (KOTERSKI *et al.*, 2005; KROEMER *et al.*, 1998; CROMPTON *et al.*, 1999).

Em um estudo *in vitro* sobre a proliferação e atividade funcional de células do osso alveolar expostos a clorexidina, resultou na destruição das células quase imediata. Em adição, a adesão de células do osso alveolar para o substrato de cultura foi prejudicada em concentrações superiores a 0,005 mg / mL, as mudanças morfológicas que ocorreram durante esses eventos correspondem à reorganização do citoesqueleto, a estrutura que desempenha um papel na forma da célula e comportamento. A exposição prolongada das células ósseas aderente ao anti-séptico em doses mais baixas, não resulta em morte celular mas afeta as funções celulares de maneira dose-dependente. Baixas concentrações de CX causam um efeito estimulante na atividade celular, provavelmente refletindo uma resposta geral inespecífica à presença de um estímulo agressivo. Níveis mais elevados resultam em efeitos negativos. CX pareceu causar efeito deletério significativo sobre a proliferação celular mais do que sobre a atividade funcional (GIANELLI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2009).

Grupos iônicos na molécula Cd podem diminuir significativamente o efeito citotóxico, em comparação com as moléculas metiladas. No que diz respeito aos substituintes iônicos a introdução de grupos de carga negativa (carboximetilada) ou positiva (quaternário amino) na molécula pode impedir o desenvolvimento da citotoxicidade na faixa de concentração analisados em nosso estudo. A forte relação entre a atividade hemolítica *in vitro* e a capacidade de colesterol-solubilização dos derivados Cd foi encontrado por outros autores (IRIE e UEKAMA, 1997).

O efeito da solubilização das Cds é diferente do efeito dos detergentes, as Cds formam um compartimento novo na fase aquosa e os componentes lipídicos da membrana celular são reversivelmente extraídos e pode levar à remoção dos componentes lipídicos da membrana (principalmente colesterol) com a consequente lise da célula (OHTANI *et al.*, 1988; KILSDONK *et al.*, 1995). Esta hipótese é fortemente apoiada pelas seguintes observações experimentais porque existe uma correlação significativa entre a citotoxicidade, atividade hemolítica e a capacidade de complexação de compostos de colesterol de diferentes Cds.

Nossos dados confirmam a visão de que a citotoxicidade de derivados de várias Cds depende em parte, da sua capacidade de extração do colesterol da membrana celular.

Baseado em correlações acima apresentados, propomos que a solubilização do colesterol pode ser um fator preditivo da toxicidade celular da Cd que depende da estrutura do derivado e sobre o número e posição dos grupos metil e da presença de grupos iônicos (KISS *et al.*, 2010)

A hipótese da solubilização de ergosterol em diferentes níveis pelas ciclodextrinas foi reforçada pelas demais observações neste estudo: a melhor ciclodextrina para solubilização de ergosterol também corresponde a mais citotóxica ciclodextrina testada, assim sugere-se que a citotoxicidade das ciclodextrinas estudadas esteja diretamente relacionada à sua capacidade de extração de ergosterol da membrana celular e provavelmente a outros mecanismos envolvidos uma vez que não se observa citotoxicidade para Hp- $\beta$ -Cd.

Os resultados clínicos obtidos nos diversos estudos parecem não ser exclusivamente relacionados com a sensibilidade bacteriana, dando origem a questões sobre a importância da escolha do agente antimicrobiano. Parece que outros fatores além da cinética de liberação de fármacos são os principais determinantes dos desfechos clínicos. O efeito celular do agente antimicrobiano é o maior fator no desenvolvimento do reparo periodontal. O efeito antimicrobiano de um medicamento citotóxico, provavelmente, torna-se insuficiente quando a questão é a regeneração (HANES e PURVIS, 2003; SOUTHARD *et al.*, 1998; COSYN e SABZEVAR, 2007; PRESHAW *et al.*, 2005; ABDELLAOUIA *et al.*, 2000).

Se a regeneração não se inicia, a recolonização por microorganismos pode ocorrer rapidamente. A função das células e componentes do tecido que podem ser afetados intensamente por drogas antimicrobianas. A principal função é a proliferação celular, sem ela, não há sucesso em qualquer terapia. Em casos específicos de terapia periodontal, a produção de fosfatase alcalina e colágeno são fatores importantes para a reparação de tecidos e estas funções podem ser afetadas qualitativamente e quantitativamente por fármacos tóxicos.

## 7. CONCLUSÕES

Os complexos supramoleculares de CX:  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd e Hp- $\beta$ -Cd nas razões molares 1:3 e 1:4 foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos estudados *C.a*, *S.m* e *A.a* em concentrações mais baixas que o controle cloridrato de clorexidina;

Os complexos supramoleculares de  $\alpha$ -Cd apresentaram melhores resultados para *C.a* enquanto os grupos de  $\beta$ -Cd foram mais eficazes no controle do *A.a* e aqueles de Hp- $\beta$ -Cd foram mais eficazes no controle de *S.m* quando comparados a CX.

Comparando-se as ciclodextrinas estudadas de acordo com a capacidade de solubilização de ergosterol na membrana de *Candida albicans* podemos observar que complexos de CX: $\alpha$ -Cd (1:3 e 1:4) foram mais eficazes para solubilizar ergosterol quando comparados a CX: $\beta$ -Cd , CX:Hp- $\beta$ -Cd e a CX .

A propriedade de solubilização de ergosterol seja um fator preditivo para citotoxicidade de ciclodextrinas em osteoblastos e fibroblastos. A ciclodextrina sintética Hp- $\beta$ -Cd apresentou menores níveis de citotoxicidade e solubilização de ergosterol. As Cds constituem uma importante ferramenta para modular o colesterol presente nas membranas e esta propriedade permitiria o seu emprego seletivo para o transporte de diferentes fármacos;

O tratamento de osteoblastos e fibroblastos com clorexidina e complexos supramoleculares de clorexidina:ciclodextrina afetou a proliferação celular de uma forma dose dependente. Osteoblastos mostraram-se mais sensíveis à exposição a estes fármacos, quando comparados aos fibroblastos. A inclusão em ciclodextrinas afetou a interação do fármaco com células eucariotas diminuindo sua citotoxicidade, principalmente nas razões molares 1:3 e 1:4 quando comparados a clorexidina pura;

Em osteoblastos tratados com as ciclodextrinas puras e os compostos de CX: Hp- $\beta$ -Cd 1:3 e 1:4 foram capazes de estimular a secreção da fosfatase alcalina quando comparadas a clorexidina pura.

Os complexos supramoleculares formados por clorexidina e ciclodextrinas não foram capazes de estimular o crescimento de células tumorais Caco-2;

As observações da microscopia confocal para cálcio transiente foram compatíveis com os resultados do ensaio de fosfatase alcalina, havendo inibição da atividade desta enzima após exposição dos osteoblastos a CX:  $\beta$ -Cd e estímulo desta por Hp- $\beta$ -Cd quando comparadas a clorexidina pura ;

Células tratadas com  $\alpha$  e  $\beta$ -Cd apresentaram colapso do citoesqueleto, com feixes de actina difusos sem organização, sugerindo que estas células estão em processo de apoptose;

As ciclodextrinas são capazes de modular a atividade antimicrobiana da clorexidina incluída para diferentes microrganismos. As razões molares mais indicadas para uso seria 1:3 que foi capaz de aliar boa atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade nos testes de proliferação celular, enquanto as ciclodextrinas puras foram capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e fibroblastos.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

As pesquisas envolvendo antimicrobianos concentram-se no aumento da resistência dos microrganismos e surgimento de cepas resistentes em relação aos fármacos tradicionais bem como no emprego de baixas dosagens visando atenuar efeitos citotóxicos. Assim o emprego de sistemas de liberação controlada são uma alternativa para emprego de baixas dosagens e sistemas com efeitos apenas locais.

São necessários estudos bioquímicos e de biologia molecular para entender de forma clara sítios de ligação a nível de membrana e intracelulares dos complexos estudados em células. Conhecer a forma pela qual estes complexos moleculares interagem com células eucariotas e procariotas poderia facilitar o desenvolvimento de sistemas de alta especificidade voltados para célula-alvo com baixa citotoxicidade ao organismo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

1. Abdelwahed W, Degobert G, Dubes A, Parrot-Lopez H, Fessi H. Sulfated and non-sulfated amphiphilic- $\beta$ -cyclodextrins: Impact of their structural properties on the physicochemical properties of nanoparticles. *Int J Pharm: Pharmaceutical Nanotechnology* 2008; 351: 289–295.
2. Agarwal P, Nagesh L. Comparative evaluation of efficacy of 0.2% Chlorhexidine, Listerine and Tulsi extract mouth rinses on salivary Streptococcus mutans count of high school children—RCT. *Contemp Clin Trials* 2011, 32: 802-808.
3. Ali A T, Penny C B, Paiker J E, Van Niekerk C, Smit A, Ferris W F, Crowther N J. *Clinica Chimica Acta* 2005; 354: 101-109.
4. Alleyn CD, O'Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Van Dyke TE, McPherson JC. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontol* 1991; 62: 434–438.
5. Almazin SM, Dziak R, Andreana S, Ciancio SG. The Effect of Doxycycline Hyclate, Chlorhexidine Gluconate and Minocycline Hydrochloride on Osteoblastic Proliferation and Differentiation In Vitro. *J Periodontol* 2009; 80: 999-1005.
6. Anuradha A, Annadurai RS, Shashidhara LS. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 37: 627–634.
7. Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison C.J. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3332-3337.
8. Atger V M, Moya M L, Stoudt G W, Rodriguez Wendi V, Phillips M C, George H Rothblat. Cyclodextrins as Catalysts for the Removal of Cholesterol from Macrophage Foam Cells. *J Clin. Invest* 1997; 99:773–780.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

9. Babich H, Wurzbürger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11:79-88.
10. 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.
11. Barman H, Walch M, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Dolder M, Groscurth P, Ziegler U. Cholesterol In negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. *J Membr Biol* 2006; 212: 29-39.
12. Beseničar M P, Bavdek A, Kladnik A, Maček P, Anderluh G. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- $\beta$ - cyclodextrin—A surface plasmon resonance approach. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 175–184.
13. 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.
14. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibition effect in the human mouth after mouth rinse. *Arch Oral Biol* 1978; 23: 289-94.
15. Borgman RJ. Biodisponibilidade, dosagens e novas formas de apresentação. In: Craig RC, Stitzel RE. *Farmacologia Moderna* 4<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Roca Livraria Ltda; 1986. Cap.6.
16. Buchter A, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U. Treatment of severe peri-implant bone loss using autogenous bone and a bioabsorbable polymer that delivered doxycycline (Atridox). *British J Oral Maxillofacial Surg* 2004; 42: 454–456.
17. Budtz-Jorgensen E, Lombardi I. Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontol* 2000 1996; 10: 89-106.



18. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone–iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Invest* 2007; 11: 155–164.
19. Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials* 1996; 17: 1259-1264.
20. Clejan S, Bittman R. Kinetics of cholesterol and phospholipid exchange between *Mycoplasma gallisepticum* cells and lipid vesicles. Alterations in membrane cholesterol and protein content. *J Biol Chem* 1984; 259: 441–448.
21. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Reference method for broth dilution Antifungal susceptibility testing of yeast: Approved standards. Document CLSI M27-A2, CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2005.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Wayne, Pennsylvania USA: 19087-19098, 2005.
23. Coleman AW, Nicolis I, Keller N, Dalbiez JP. Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of  $\beta$ -cyclodextrin. *J Includ Phenom Macrocyc Chem* 1992; 13: 139-143.
24. Cortés ME, Sinisterra RD, Ávila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The chlorhexidine:beta-cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Includ Phenom Macrocyc Chem* 2001; 40: 297-302.
25. Cosyn J, Sabzevar MM. Subgingival chlorhexidine varnish administration as an adjunct to same day full-mouth root planning. II Microbiological Observations. *Journal Periodontol* 2007; 78: 438-445.
26. Cousido MC, Tomás M, Tomás F, Limere J, Garcia-Caballero L, Diz P. Effect of a neutralizing agent on the evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine on the bacterial salivary flora. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 981-984.
27. Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by chlorhexidine: synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 212–217.

28. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-249.
29. Dimai HP, Linkhart TA, Linkhart SG, Donahue LR, Beamer WG, Rosen CJ, Farley JR, Baylink DJ. Alkaline Phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. *Bone* 1998; 22: 211-216.
30. De Souza CAS, Colombo APV, Souto RM, Silva-Boghossian CM, Granjeiro JM, Alves GG, Rossia AM, Rocha-Leao MHM. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 87: 310– 318.
31. Denadai AML, Teixeira KIR, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortés ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective Carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr Res* 2007; 342: 2286-2296.
32. Denyer SP. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int Biodeterior Biodegradation* 1995; 36: 227–45.
33. 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.
34. Drisko CL, Cobb CM, Killoy WJ, Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Lowenguth RA, Caton JG, Encarnacion M, Knowles M, Goodson JM. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline .bers: clinical response. *J Periodontol* 1995; 66: 692–699.
35. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of a chlorhexidine in oral candidoses: review. *Oral Dis.* 2001; 7: 11-17.
36. Elsen K, Ozmeric N, Sardas S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *J Clin Oral Invest* 2002; 6: 150–154.
37. Faria G, Celes MRN, De Rossi A, Silva LAB, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. *JOE* 2007; 33: 715-722 .

38. Faria G, Cardoso CRB, Larson RE, Silva JS. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharm* 2009; 234: 256–265.
39. Fishman W H. Alkaline Phosphatase isozymes: recent progress *Clin Biochem* 1990; 23: 99-104.
40. Fitzgerald K, Davies A, Russell A. Uptake of <sup>14</sup>C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 60: 327–332.
41. Flemingson EP, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: Na in vitro study. *Indian J Dent Res* 2008; 19: 29-35.
42. 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: 437-439.
43. Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultra structural investigation. *Toxicol In vitro* 2008; 22: 308-317.
44. Gimpl G, Gehrig-Burger K. Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids* 2011; 76: 216-31.
45. Giuliana G, Pizzo G, Milici M, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1999; 87: 44-49.
46. Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dental Res* 1989; 68: 1602-1608.
47. 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.
48. Gourlay CW, Ayscough KR. Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biol* 2006; 26: 6487–6501.

49. Grap M J, Munro C L, Hamilton V A, Elswick Jr R, Sessler C N, MD, Ward K R. Early, single chlorhexidine application reduces ventilator-associated pneumonia in trauma patients. *Heart Lung* 2011; 40: 115-122.
50. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: Pharmacological Agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 79-98.
51. Harada A, Takashima Y, Yamaguchi H. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Chem Soc Rev* 2009; 38: 875-882.
52. Hashimoto H. Present status of industrial application of cyclodextrins in Japan. *J Incl Phenom Macroc Chem* 2003; 44: 57-62.
53. Haynes M P, Phillips M C and Rothblat G H. Efflux of cholesterol from different cellular pools. *Biochem* 2000; 39: 4508-4517.
54. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanism's underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 271-276.
55. 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- 416.
56. <http://www.edukativos.com/preparatoria/el-citoplasma-y-el-citoesqueleto.html>
57. <http://www.ficharioonline.com-imagens>
58. <http://www.gerbras.com.br>
59. Hugo W, Longworth A. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol* 1964; 16: 655-662.
60. Irie T, Fukunaga K, Pitha J. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: lipid dissolution and effects on lipid transfers in vivo. *J Pharm Sci* 1992; 81: 521-523.
61. Iwami Y, Schachtele CF, Yamada T. Mechanism of inhibition of glycolysis in *Streptococcus mutans* NCIB 11723 by chlorhexidine. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 360-364.
62. Jeffcoat MK, Bray KS, Ciancio SG, Dentino AR, Fine DH, Gordon JM, Gunsolley JC, Killoy WJ, Lowenguth RA, Magnusson NI, Odenbacher S, Palcanis KG, Proskin HM, Finkelman RD, Flashner M. Adjunctive use of a subgingival controlled-release

- chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J Periodontol* 1998; 69: 989–997.
63. Jiang P, Yan PK, Chen JX, Zhu BY, Lei XY, Yin WD et al. High density lipoprotein 3 inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis via promoting cholesterol efflux in RAW264.7 cells. *Acta Pharmacol Sinica* 2006; 27: 151–157.
  64. Jones C. Chlorhexidine: is it still the gold standard. *Periodontol 2000* 1997; 15: 55-62.
  65. Kadir T, Gümrüm B, Uygün-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch. Oral Biol.* 2007; 52: 691-696.
  66. Kasper J C, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European J Pharm Biopharm* 2011; 78: 248-263.
  67. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 1995; 270: 17250–17256.
  68. Kim EE, Wyckoff HW . Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.* 1991; 218: 449–64.
  69. Kiss T, Fenyvesi F, Pasztor N, Feher P, Varadi J, Kocsan R, Szente L, Fenyvesi E, Szabo G, Vecsernyes M, Bacskay I. Cytotoxicity of different types of methylated  $\alpha$ -cyclodextrins and ionic derivatives. *Pharmazie* 2007; 62: 557–558.
  70. Kiss T, Fenyvesi F, Bácskay I, Váradi J, Fenyvesi E, Iványi R, Szente L, Tószak Á, Vecsernyés M. Evaluation of the cytotoxicity of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European J Pharm Sci* 2010; 40: 376–380.
  71. Knuutila M, Söderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol Scand* 1981; 39:285-9.
  72. Komljenovic I, Marquardt D, Harroun TA, Sternin E. Location of chlorhexidine in DMPC model membranes: a neutron diffraction study. *Chem Phys Lipids* 2010; 163: 480-487.

73. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentine. *J Endodontics* 2000; 26: 315-7.
74. Kong N, Jiang T, Zhou Z, Fuc J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dental Materials* 21371-1375.
75. Koterski J F, Nahvi M, Venkatesan M M, Haimovich B. Virulent *Shigella flexneri* causes damage to mitochondria and triggers necrosis in infected human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 2005; 73: 504–513.
76. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Rev Physiol* 1998; 60: 619–642.
77. Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res* 1986; 10:74-86.
78. Langer R. Where a pill won't reach. *Scientific American* 2003; 288:50-57.
79. Langer R. New methods of drugs delivery. *Science* 1990; 249:1527-1533.
80. Lima KC, Neves AA, Beiruth JB, Magalhães FAC, Uzeda M. Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of naf, chlorhexidine and a combined chlorhexidine with naf mouthrinses. *Braz J Microbiol* 2001; 32: 158-161.
81. Loftsson T, Brewster ME. Physicochemical properties of water and its effect on drug delivery: a commentary. *Int J Pharmaceutics* 2008; 354: 248-54.
82. Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádóttir F. Effects of Cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci* 2007; 96: 2532-2546.
83. Loftsson T, M. Masson, and M. E. Brewster. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci* 2004; 93: 1091–1099.
84. Loftsson T, Matthiasson K, Másson M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm* 2003; 262: 101–107.
85. Loftsson T, Magnúsdóttir A, Másson M, Sigurjónsdóttir J F. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Pharm Sci* 2002; 91: 2307–2316.
86. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm* 2001; 225: 15-30.

87. López-Expósito I, Amigo L, Recio I. Identification of the initial binding sites of  $\alpha$ 2-casein f(183–207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 2444–2449.
88. Lucarotti E, White H, Deas J, Silver IA, Leaper DJ. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture and adjuvant to conservation therapy? *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1990; 72: 388-92.
89. Magnusson P, Sharp C A, Farley J R. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. *Clinica Chimica Acta* 2002; 325: 59-70.
90. Mariotti AJ, Rumpf DAH. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblasts collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999; 70: 1443–1448.
91. 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.
92. Martindale W. The extra Pharmacopeia. 28<sup>a</sup> edição, London: The Pharmaceutical Press, 1982.
93. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147–79.
94. Mesmin B, Maxfield F R. Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2009; 1791: 7636-645.
95. Mirth DB. Controlled-release therapeutic systems: Technology applicable to the treatment of oral disease. *Adv Dent Res* 1987; 1:109-18.
96. Muller P and Herrmann A. Rapid Transbilayer Movement of Spin-Labeled Steroids in Human Erythrocytes and in Liposomes. *Biophysical J* 2002; 82:1418–1428.
97. Newton A P N, Cadena S M S C, Rocha M E M, Carnieri E G S, Oliveira M B M. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol Lett* 2004; 151: 407-416.
98. Nunez L, Moreton J. Disinfectant- resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. *Braz J Microbiol* 2007; 38: 644-648.

99. Ohtani H, Wilson R J, Chiang S, Mate C M. Scanning Tunneling Microscopy Observations of Benzene Molecules on the Rh(111)-(3 × 3) (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> + 2CO). *Phys. Rev. Lett.* 1988; 60: 2398–2401.
100. Ohvo-Rekila H, Bjorn A, kerlund J, Slotte P. Cyclodextrin-catalyzed extraction of fluorescent sterols from monolayer membranes and small unilamellar vesicles. *Chem Phys Lipids* 2000; 105: 167–178.
101. Ohvo-Rekila H, Olsio C, Slotte JP. Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1349: 131–141.
102. Ohvo-Rekila H, Slotte JP. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochem* 1996; 35:8018–8024.
103. Pankov R, Markovska T, Antonov P, Ivanova L, Momchilova A. The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 164: 167-173.
104. Park B K, Boobis A, Clarke S, Goldring C E P, Jones D, Kenna J G, Lambert C, Lavery H G, Naisbitt D J, Nelson S, Nicoll-Griffith D A, Obach R. S, Routledge P, Smith D A, Tweedi D J, Vermeulen N, Williams D P, Wilson I D, Thomas A. Baillie. Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nature: Reviews* 2011; 10: 292-306.
105. Parks LW, Casey WM. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 95-116.
106. 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.
107. Patel V F, Liu F, Brown M B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Controll Release* 2011; 153: 106-116.
108. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *European J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95–100.



109. Prabakaran M, Jayakuma R. Chitosan-graft beta-cyclodextrin scaffolds with controlled drug release capability for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2009; 44: 320-325.
110. Preshaw PM, Hefti AF, Bradshaw MH. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 610-616.
111. Pucadyil T J, Chattopadhyay A. Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin1A receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 655–668.
112. Quirynen M, Bollen CML, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eysen H. Full-vs. Partial mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dental Res* 1995; 67: 1456– 1467.
113. Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. *In vivo drug delivery. J Pharm Sci* 1996; 85: 1142-69.
114. Raso EMG, Cortes ME, Teixeira KI, Franco MB, Mohallem NDS, Sinisterra R D. A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine:  $\beta$ -Cd inclusion compounds based on porous silica. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem* 2010; 67: 159-168.
115. Redmerski R, Bulla JR, Moreno T, Garcia LB, Cardoso CL. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine. *Braz J Microbiol* 2007; 38: 649-655.
116. Renvert S, Lessem J, Dahle'n G, Lindahl C, Svensson M. Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 362–369.
117. Ribeiro DA, Bazo AP, Franchi CAS, Marques MEA, Salvatori DMF. Chlorhexidine induces ADN damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodontal Res* 2004; 39: 358–361.

118. Rhoads LS, Silkworth WT, Roppolo ML, Whittingham SM. Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 292–296
119. Rogero S O, Lugão A B, Ikeda T I, Cruz A S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Res* 2003; 6:307-320.
120. Seiffert U B, Siede W H, Welsch G J, Oremek G. Multiple forms of alkaline phosphatases in human liver tissue *Clin Chim Acta* 1984; 144: 17-27.
121. 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 Struct Biol* 2008; 162: 121-38.
122. Sheppard FC, Mason DJ, Bloomfield SF, Gant VA. Flow cytometric analysis of chlorhexidine action. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; 154: 283–8.
123. 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. *J Pharm Sci* 1999; 88: 574-6.
124. Southard GL, Godowski KC. Subgingival controlled release of antimicrobial agents in the treatment of periodontal disease. *Int J Antimicrobial Agents* 1998; 9: 239-253
125. Steck T L, Ye J, Lange Y. Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement with Cyclodextrin. *Biophysical J* 2002; 83: 2118–2125.
126. 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; 61:393-8.
127. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Review* 1998; 98: 1743-53.
128. Teixeira KIR, Cortés ME. Estado actual de la indicación de antimicrobianos para la medicación intracanal. *Acta Odontol. Venez.* 2005; 43: 177-180.
129. Teixeira KIR, Araújo PV, Neves BRA, Mahecha GAB, Sinisterra RD, Cortés ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-

- cyclodextrin chlorhexidine: SEM, MFA, and TEM evaluation. *Pharm Develop Tech* 2012a, DOI: 10.3109/10837450.2011.649853.
130. Teixeira KIR, Araújo PV, Sinisterra RD, Cortés ME. Chlorhexidine: beta-cyclodextrin blocks yeast growth by extraction of ergosterol. *Bra J Microbiol* 2012b; 43: 810-818.
  131. Thati B, Noble A, Rowan R, Criaven BS, Walsh M, McCann M, Egan D, Kavanagh K. Mechanism of action of coumarin and silver (I) -coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol In vitro* 2007; 21: 801-808.
  132. Thomás GW, Rael LT, Bar- Or R, Shimonkevitz R, Mains CW, Slone DS, Craun ML, Bar-Or D. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *The Journal of Trauma Injury, Infection and Critical Care* 2009; 66: 82-91.
  133. 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 Periodontol Restorative Dent* 1994; 14: 461-70.
  134. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev* 1998; 98: 2045-76.
  135. Vieira FT, Menezes DC, De Lima GM, Wardell JL, Cortés ME, Silva GAB, Vilas-Boas A, Maia JRS. Effect of diorganotin (IV) carboxylate complexes, [*N*-(2-arboxyphenyl) salicylideneiminato] dimethyltin (IV), bis( $\mu_3$ -oxo) bis ( $\mu$ -*O*-aminobenzoato-*O,O'*) bis (*O*-aminobenzoato) tetrakis [dimethyltin (IV)] and bis(*O*-aminobenzoato-*O,O'*) di-*n*-butyltin (IV), on the membrane of *Candida albicans* cells - a mechanistic investigation of the antifungal activity of organotin complexes. *Appl Organomet Chem* 2008; 22: 433 – 439.
  136. Wong GL, Cohn DV. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3167-3171.
  137. Yancey P G, Rodriguez W V, Kilsdonk, E P, Stoudt G W, Johnson W J, Phillips M C, Rothblat, G H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins:

demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux *J Biol Chem* 1996; 271: 16026-16034.

138. Yang C, Li H, Goh S H, Li J. Cationic star polymers consisting of alphacyclodextrin core and oligoethylenimine arms as non-viral gene delivery vectors. *Biomaterials* 2007; 28: 3245–3254.
139. 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.
140. Zhang W , Swearingen E B , Jun J, Rigney T, Tribble G D. Porphyromonas gingivalis invades osteoblasts and inhibits bone formation. *Microbes Infect* 2010; 12: 838-845.
141. Zheng XM, Lu WM, Sun DZ. Enthalpy and entropy criterion for the molecular recognize of some organic compounds with beta cyclodextrin. *Acta Phys-Chim Sin* 2001; 17:343–347.
142. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 1311–1324.

## SITUAÇÃO ATUAL DO PROJETO

Abaixo, os títulos e situação atual dos artigos.

ARTIGO I: Chlorhexidine: beta-cyclodextrin blocks yeast growth by extraction of ergosterol. **Journal of Brazilian Microbiology**, 2012; 43: 810-818

ARTIGO II: Ultrastructural changes in bacterial membrane induced by beta-cyclodextrin inclusion of chlorhexidine: SEM, MFA and TEM evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2012. *In Press*

ARTIGO III: Selective Toxicological and antimicrobial effect of chlorhexidine by cyclodextrin addition: in vitro. **Toxicology in vitro** (submetido)

ARTIGO IV: Effect of chlorhexidine beta-cyclodextrin inclusion compounds on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. Em andamento.

## **ATIVIDADES DESENVOLVIDAS RELACIONADAS À TESE**

### **Cursos, estágios, participação em eventos:**

- Estágio: Facultad de Farmacia da Universidad de Santiago de Compostela (7 meses)
- International Conference of Antimicrobial Research (ICAR), 2010, Valladolid, Spain.
- XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica (SBPqO), 2010, Aguas de Lindóia/SP.
- Curso de Formulações para a Liberação Controlada de Fármacos de uso odontológico.
- Workshop Nanobiofar, Nov/ 2009, Belo Horizonte/MG.
- XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica (SBPqO), 2009, Aguas de Lindóia/SP.
- IX Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG. Maio, 2009.
- XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica (SBPqO), 2008, Aguas de Lindóia/SP.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 8.1 Artigos completos publicados em periódicos (10)

- Teixeira K I R, Araújo P V, Neves B R A, Mahecha G A B, Sinisterra R D, Cortés M E. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, MFA, and TEM evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2012a. *In Press*
- Teixeira K I R, Araújo P V, Sinisterra R D, Cortés M E. Chlorhexidine:beta-cyclodextrin blocks yeast growth by extraction of ergosterol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012b. *IN PRESS*
- Teixeira K I R, Bueno A C, Cortes M E. Processos físico-químicos no biofilme dentários relacionados à produção da cárie. *Química Nova na Escola*, 32:145-150, 2010.
- Gala-Garcia A, Teixeira K I R, Wykrota F H L, Sinisterra R D, Cortes M E. Bioceramic/Poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue. *Brazilian Oral Research*, 24:8-14, 2010.
- RASO EMG, Teixeira K I R, Franco M B, Mohallem N D S, Sinisterra R D ; Cortes, M E. A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine:β-Cd inclusion compounds based on porous silica. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67:159-168, 2010.
- Norremose R, Teixeira K I R, Munari L, Moreira A N, Magalhães CS. *Manutenção Preventiva na Clínica Integrada de Atenção Primária. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.*
- Araujo P V, Teixeira K I R, Lanza L D, Cortes M E, Poletto L T A. In vitro lethal photosensitization of S. mutans using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 22: 93-97, 2009.
- Lira M C B, Ferraz M S, Silva D G V C, Cortés M E, Teixeira K I R, Caetano N P, Sinisterra R D, Ponchel G, Santos-Magalhães N S..Inclusion complex of usnic acid with beta-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* , 1:387-397, 2009.
- Pretti H, Gala-Garcia A, Araujo P V, Teixeira K I R, Ramos-Jorge, ML, Magalhaes C S, Moreira A N, Sanchez J F . Estúdio de las alteraciones em pacientes adultos com

maloclusão de classe II divisão 1a, tratados com extracções de primeiros premolares superiores. *Revista Española de Ortodoncia*, 48:167-172, 2008.

▪ Tavares WLF, Apolonio ACM, GOMES, R T, Teixeira K I R, Brandão MGL, SANTOS, VR. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29: 257-260, 2008.

## **8.2 Apresentação oral em eventos (4)**

▪ Teixeira K I R, Cortes M E, Santos V R, Sinisterra R D. Modulation of Chlorhexidine antimicrobial activity and cellular cytotoxicity by the inclusion in different cyclodextrin. *International Conference on Antimicrobial Research*, 2010, Valladolid. ICAR 2010. Formatex, 1: 54-54, 2010.

▪ Teixeira K I R, Leite M D, Oliveira-Lopes C, Sinisterra R D, Cortes M E . Inclusão em ciclodextrina como estratégia para diminuição da citotoxicidade da clorexidina em osteoblastos. *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa*, 2010. Brazilian Oral Research. São Paulo: SBPqO, 24: 283-283, 2010.

▪ Teixeira K I R, Neves BRA, Sinisterra RD, Cortes ME. Interações de complexos supramoleculares de clorexidina:beta-ciclodextrina e membranas bacterianas. *X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG*, 2009, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia. Belo Horizonte.

▪ Teixeira K I R, Araújo PV, Souza FB, Sinisterra RD, Cortés ME. Estudo das interações de membrana de microrganismos com compostos de clorexidina:beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares. *25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, 2008. Brazilian Oral Research, 22: 216-216, 2008.

## **8.3 Resumos publicados em anais de congressos (20)**

▪ Teixeira K I R, Morgan L F D, Albuquerque R D, Cortes M E, Poletto L T A. Correlation of self-etching resin-cements on the cell cycle of fibroblasts and degree of conversion. *35<sup>th</sup> Annual Meeting of The Society of Biomaterials: Animating Materials*, Orlando, Flórida, 2011.

▪ Diniz I MA, Teixeira K I R, Araújo P V, Poletto L T A, Cortes M E. The biocompatibility of human pulpal fibroblasts after photodynamic therapy. *35<sup>th</sup> Annual Meeting of The Society of Biomaterials: Animating Materials*, Orlando, Flórida, 2011.



- Leite M D, Teixeira K I R, Sinisterra R D, Cortes M E. Modulação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de complexos supramoleculares clorexidina:ciclodextrina. **XI Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG**, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011.
- Lima C F, Teixeira K I R, Santos L F M, Poletto, L T A., Albuquerque, R C, Cortes, M E. Correlação da citotoxicidade de cimentos resinosos auto-condicionantes sobre o ciclo celular de fibroblastos e o grau de conversão. In: CIOMIG 2011, 2011, Belo Horizonte. Congresso Internacional de Odontologia de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
- Teixeira K I R, Cortes M E, Santos V R, Sinisterra R D. Modulation of Chlorhexidine antimicrobial activity and cellular cytotoxicity by the inclusion in different cyclodextrin. *International Conference on Antimicrobial Research*, 2010, Valladolid. ICAR 2010. *Formatex*,1: 54-54, 2010.
- Teixeira L P, Costa KJR ; Teixeira K I R, Cortes M E, Sinisterra R D, Passos, J J, Macedo F A F F. Avaliação celular de compósitos poliméricos biodegradáveis em matriz de biocerâmica com adição de tetraciclina. *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa*, 2010. Brazilian Oral Research. São Paulo, 24: 62-62, 2010.
- Leite M D, Teixeira K I R, Sinisterra R D, Cortes M E. Estimulação da produção de fosfatase alcalina por compostos de clorexidina:beta-ciclodextrina. *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa*, 2010. Brazilian Oral Research. São Paulo : SBPqO, 24: 104-104, 2010.
- Oliveira- lopes C, Segura MEC ; Pretti H, Soares B B M, Teixeira K I R, Leite M D, França E D C. Avaliação clínica e microbiológica de um sistema de liberação controlada de clorexidina em pacientes ortodônticos. *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa*, 2010. Brazilian Oral Research. São Paulo: SBPqO, 24: 155-155, 2010.
- Teixeira K I R, Leite M D, Oliveira-Lopes C, Sinisterra R D, Cortes M E . Inclusão em ciclodextrina como estratégia para diminuição da citotoxicidade da clorexidina em osteoblastos. *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa*, 2010. Brazilian Oral Research. São Paulo: SBPqO, 24: 283-283, 2010.
- Macedo FAFF, Raso EMG, Cortes ME, Sinisterra RD, Teixeira K I R. Determinação da proliferação celular e atividade antimicrobiana de um cimento resinoso contendo sistemas de liberação sílica/clorexidina. *26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, 2009. Brazilian Oral Research. Sao Paulo: SBPqO, 23, 2009.

- Teixeira K I R, Neves BRA, Sinisterra RD, Cortes ME. Interações de complexos supramoleculares de clorexidina:βta-ciclodextrina e membranas bacterianas. *X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG*, 2009, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia. Belo Horizonte.
- Soares BBM, Raso EMG, Teixeira K I R, Cortés ME, Sinisterra RD. Avaliação da atividade antimicrobiana a clorexidina liberada a partir de dispositivos baseados na sílica porosa. *X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG*, 2009, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia. Belo Horizonte.
- Paim LA, Teixeira K I R, Dias FM, Las Casas P, Macedo AFF, Luna HGS, Cortés ME. Estudo da atividade antimicrobiana e eletroquímica de novos complexos de rutênio. *X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG*, 2009, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia. Belo Horizonte.
- Santos VR. Gomes RT, Teixeira K I R, Pretti H, Abras M E, Aguiar EG, Cortes ME . Efficacy of Brazilian propolis extract and gel for the management of denture stomatitis. *57<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal plant and Natural Product Research*, 2009, Geneva. Planta Medica Journal of Medical Plant and Natural Product Research. Geneva. 75: 895-895.
- Gala-Garcia A, Teixeira K I R, Sinisterra RD, Cortes ME. Avaliação da resposta do complexo dentino-pulpar após capeamento com compósitos de biocerâmica-PLGA, in vivo. *V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, 2008, Ouro Preto. Livro de Programa e Resumos. Belo Horizonte: Slabo, 2008: 136-136.
- Cortes ME, Teixeira K I R, Neves BRA, Gomes AD, Sinisterra RD . Effect of clorhexidine:beta-cyclodextrin in membrane of microorganisms by in situ atomic force study *MRS 2008 Fall Meeting. Boston, MA: MRS*, 2008, 8: Z8.11-Z8.11.
- Las Casas P, Teixeira K I R, Oliveira HFD, Souza FB, Sinisterra RD. Avaliação morfológica por MEV e atividade antimicrobiana de clorexidina-beta-ciclodextrina em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG*, 2008, Belo Horizonte. CD-ROM da XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte: UFMG, 2008.
- Cunha V, Teixeira K I R, Oliveira HFD, Souza FB, Sinisterra RD, Cortés ME. Caracterização morfológica e quantificação do esterol de amostras de *Candida albicans* tratadas com complexos supramoleculares de clorexidina. *XVII Semana de Iniciação*

*Científica da UFMG*, 2008, Belo Horizonte. CD-ROM da XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte: UFMG, 2008.

▪ Teixeira K I R, Araújo PV, Souza FB, Sinisterra RD, Cortés ME. Estudo das interações de membrana de microrganismos com compostos de clorexidina:beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares. **25<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**, 2008. Brazilian Oral Research, 22: 216-216.

Araujo PV, Teixeira K I R, Lanza LD, Albuquerque RC, Cortés ME, Poletto, LTA. Susceptibilidade in vitro do Streptococcus mutans à terapia fotodinâmica. **25<sup>a</sup> Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontologica**, 2008. Brazilian Oral Reserach, 22: 255-255.

#### **MENÇÕES HONROSAS**

▪ Leite M D, Teixeira K I R, Sinisterra R D, Cortes M E. Modulação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de complexos supramoleculares clorexidina:ciclodextrina. **XI Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG**, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011. Trajano V C C, Sinisterra, R D, Cortés M E, Teixeira K I R, Diniz H F . Caracterização morfológica e quantitativa do esterol de amostras de Candida albicans tratados com complexos supramoleculares de clorexidina. 2009. **IV Jornada Acadêmica da ABOMG**.

Anexos

NANOFORMULAÇÕES PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CALCITONINA

Projeto realizado em parceria com a Universidad de Santiago de Compostela

## **Calcitonin nanocarriers combining cyclodextrins and chitosan**

**Karina I. R. Teixeira, Ana Gonzalez Paredes, Marcos De la Fuente, Dolores Torres, Maria Esperanza Cortés, Maria José Alonso**

### **Introduction**

The successful delivery of drugs across the oral mucosa represents a continuing challenge, as well as a great opportunity. Oral transmucosal delivery, especially buccal and sublingual delivery, has progressed far beyond the use of traditional dosage forms with novel approaches emerging continuously.

### **Materials and Methods**

#### ***Preparation of NPs***

CS or CS/CD-based NPs were prepared according to the procedure previously developed by our group. *NPs without CDs* were spontaneously formed upon addition of TPP aqueous solution to CS solution under stirring. *CD-containing NPs* were prepared differently depending on the type of CD: CS/SBE- $\beta$ -CD/TPP/ *calcitonin*; CS/CM- $\beta$ -CD/TPP/ *Calcitonin*.

#### ***Physicochemical and morphological characterization of NPs***

The mean particle size and the size distribution of the NPs were determined by photon correlation spectroscopy (PCS). The determination of the  $\zeta$ -potential was performed by laser Doppler anemometry. The morphological examination of NPs was performed by transmission electron microscopy (TEM)

#### ***Stability study in gastric and intestinal medium***

Selected NP formulations were freshly prepared, isolated and resuspended in simulated gastric medium (pH 1.2) and a simulated intestinal medium (USP-XXVI, pH 6.8 without pancreatin). The tested formulations were: blank NPs and the respective formulations with calcitonin. The NPs were incubated at 37 °C under agitation (100 rpm), and samples were collected at time points of 0, 30, 60 and 120 min. Each experiment was performed in triplicate.

#### ***Determination of Calcitonin encapsulation efficiency***

The Encapsulation Efficiency (EE) of the calcitonin to the particles was calculated by an indirect method. CS or CS/CD NPs were isolated from free calcitonin by centrifugation, and free calcitonin in the supernatant was quantified by HPLC.

#### ***In vitro release study***

In vitro release of calcitonin from loaded CS and CS/CD NPs was carried out for 3 h in simulated gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 6.8) medium without enzymes. Freshly prepared CS and CS/CD NPs were isolated in Eppendorf tubes with glycerol bed laid in the bottom of the tube, set to help on NP resuspension. In screw-capped test tubes, each formulation was resuspended in distilled water and the resulting resuspended formulation was mixed with release medium (simulated gastric or intestinal medium) and incubated at 37 °C under mechanical agitation. The supernatant was analyzed for calcitonin content by HPLC.

#### ***Nasal administration of sCT loaded nanoparticles***

All animal experiments will be approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Santiago de Compostela. Male Sprague–Dawley rats (225–275 g) from the Central Animals House of the University of Santiago de Compostela (Spain) were fasted for 12 h before experiments but allowed water ad libitum. Animals were kept conscious during the experiments.

The following formulations were administered via nasal to rats. In all cases the sCT dose administered was 15 UI/kg and the volumes of formulations used were 0.02 ml. Blood samples were collected from the tail vein 30 min prior to the administration of the formulations in order to establish the baseline calcium level. Hypocalcemic effect was determined in serum samples by a colorimetric method at 570 nm (Kit OR-cresolphthalein v/v, Spinreact, Spain). Results are shown as the mean values of serum calcium levels ( $\pm$ S.E.M.) of six animals.

#### ***Statistics***

Data from different experimental groups were compared by a one-way ANOVA (GraphPad Prism v.5.00 GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). Bonferroni tests were used for post-hoc contrast. A significance level of  $\alpha < 0.01$  was considered throughout this study.

**Keywords: Calcitonin, nanoparticles, cyclodextrin, chitosan, slow delivery**

# **Anexos: Publicações**



**Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation**

Journal:	<i>Pharmaceutical Development and Technology</i>
Manuscript ID:	LPDT-2011-0271.R1
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rosa Teixeira, Karina; Universidade Federal de Minas Gerais, Odontologia Restauradora Araújo, Patrícia; Universidade Federal de Minas Gerais, Odontologia Restauradora Neves, Bernardo; Universidade Federal de Minas Gerais, Physics Mahecha, German; Universidade Federal de Minas Gerais, Morphology Department, Biological Science Institute Sinisterra, Rubén; Universidade Federal de Minas Gerais, Chemistry Cortés, Maria; Universidade Federal de Minas Gerais, Odontologia Restauradora
Keywords:	chlorhexidine, bacterial effects, slow delivery, cyclodextrin

SCHOLARONE™  
Manuscripts



**Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation**

Karina Imaculada Rosa TEIXEIRA<sup>1</sup>, Patrícia Valente ARAÚJO<sup>2</sup>, Bernardo Ruegger Almeida NEVES<sup>3</sup>, German Arturo Bohorquéz MAHECHA<sup>4</sup>, Rubén Dario SINISTERRA<sup>5</sup>, Maria Esperanza CORTÉS<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup> Restorative Dentistry Department, Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 –Pampulha, Belo horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-34092437, Fax: 55-31-3409-2430. Email: [karinart\\_2000@yahoo.com.br](mailto:karinart_2000@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Restorative Dentistry Department, Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 –Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-34092437, Fax: 55-31-3409-2430. Email: [patbhz@terra.com.br](mailto:patbhz@terra.com.br)

<sup>3</sup> Physic Department, Exact Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-3409-6602. Email: [bernardo@fisica.ufmg.br](mailto:bernardo@fisica.ufmg.br)

<sup>4</sup> Morphology Department, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil . Tel: 55-31-34092804. Email: [mahecha@icb.ufmg.br](mailto:mahecha@icb.ufmg.br)

<sup>5</sup> Chemistry Department, Exact Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-34095771. Email: [sinisterra@ufmg.br](mailto:sinisterra@ufmg.br)

<sup>6\*</sup> Autor for correspondence: e-mail: [mecortes@ufmg.br](mailto:mecortes@ufmg.br)

1  
2  
3  
4 Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Departamento de  
5  
6 *Odontologia Restauradora*, Universidade Federal de Minas Gerais.  
7

8 CEP: 31270-901 Phone: 55-31-34092437, Fax: 55-31-3409-2430  
9

10 **Keywords:** chlorhexidine, cyclodextrin, bacterial effects, slow delivery  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review Only

**Abstract**

Chemical hosts bind their guests by the same physical mechanisms as biomolecules and often display similarly subtle structure activity relationships. The cyclodextrins have found increasing application as inert, nontoxic carriers of active compounds in drug formulations. The present study was conducted to prepare inclusion complexes of chlorhexidine:beta-cyclodextrin (Cx:β-cd), and evaluate their interactions with bacterial membrane through: scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM); and measuring morphology alterations, roughness values, and cell weights by atomic force microscopy (AFM). It was found that the antimicrobial activity was significantly enhanced by cyclodextrin encapsulation. SEM analysis images demonstrated recognizable cell membrane structural changes and ultrastructural membrane swelling. By TEM, cellular alterations such as vacuolization, cellular leakage, and membrane defects were observed; these effects were enhanced at 1:3 and 1:4 Cx:β-cd. In addition, AFM analysis at these ratios showed substantially more membrane disruption and large aggregates mixing with microorganism remains. In conclusion, nanoaggregates formed by cyclodextrin inclusion compounds create cluster-like structures with the cell membrane, possibly due to a hydrogen rich bonding interaction system with increasing surface roughness and possibly increasing the electrostatic interaction between cationic chlorhexidine with the lipopolysaccharides of Gram negative bacteria.

## 1. Introduction

The field of drug delivery systems (DDS) utilizing cyclodextrin, either by inclusion or by association of guest drugs, has become a new domain for novel drug development for numerous diseases. These cyclodextrin based new drug entities are called “inclusion compounds” and/or macromolecular drugs, and they overlap with the field of nanomedicine that has become popular in recent years <sup>1</sup>. Supramolecular therapeutics or nanomedicines are designed to improve drug performance by utilizing in unique topical applications. These complexes or nanomedicines show improved microbial-selective targeting, improved therapeutic efficacy, and fewer side effects <sup>2-4</sup>.

Chlorhexidine (Cx) is a cationic antimicrobial agent that kills or inhibits the growth of microorganisms such as bacteria, fungi, or protozoa, as well as destroying viruses. The antimicrobial activity of Cx is thought to be due to bacterial membrane disruption, which leads to increased cell permeability and leakage of intracellular ions such as Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. Its efficacy is related to substantivity or the capacity to adsorb to tissues <sup>5-8</sup>. However, cytotoxicity assays in osteoblast, fibroblast, and endothelial cells have shown Cx-induced cell damage in a concentration and time-dependent manner at concentrations far below (about 200-fold) those used in clinical practice <sup>9-10</sup>. Therefore, chlorhexidine:beta-cyclodextrin (Cx:β-cd) inclusion compounds have been developed for controlled release. One of the important advantages of these compounds is their lowest effective antimicrobial concentrations <sup>11-12</sup>. Meanwhile, the potential use of cyclodextrin inclusion complexes to change drug pharmacokinetics and therapeutic efficacy has been reported by Denadai et al <sup>13</sup>. They have also demonstrated nanoaggregate formation between chlorhexidine with cyclodextrin.

1  
2  
3  
4 Currently, cyclodextrins offer high solubilization power towards poorly soluble  
5 pharmaceuticals. On the other hand, cyclodextrins increase the solubility and improve  
6 the bioavailability of guest molecules. They are widely used in medicine and are  
7 harmless to microorganisms and enzymes<sup>14-15</sup>.  
8  
9

10  
11  
12 The interaction of cyclodextrin complexes with biological structures in a slow delivery  
13 system has been poorly documented. Nevertheless, it is postulated that these  
14 antimicrobial inclusion compounds probably possess the same mechanisms as  
15 traditional antimicrobials that act by targeting the bacterial membrane but with an  
16 optimized effect<sup>16</sup>. The cationic molecules first bind to negatively charged  
17 lipopolysaccharides (LPS) of Gram negative bacteria. This binding may cause  
18 membrane penetration in a variety of ways: (a) slight disturbance of the phospholipid  
19 chain order and packing in the outer membrane (self-promoted uptake model); (b)  
20 transmembrane channel creation (barrel-stave or toroidal pore model); (c) damage of the  
21 bilayer via toroidal pores, disruption of lipid micelles and vesicles via the “carpet  
22 model”; or (d) creation of micelle-like accumulation of peptides in the membrane  
23 (peptide-aggregate model). It has been shown that the same mechanism was enhanced  
24 due to the presence of cyclodextrin, which increased the concentration gradient of the  
25 drug carried in the membrane; the increased lipid disruption eventually kills the  
26 bacteria. Some cyclodextrins themselves can have a biological effect; however, it is not  
27 yet clear how cyclodextrins work on the cell membrane<sup>3, 17-20</sup>.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 In this paper, to study the relationship between cyclodextrin and bacterial cell  
49 membranes, different ratios of Cx:β-cd (previously screened for their antimicrobial  
50 activities) were analyzed with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) culture.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 *Agregatibacters actinomycetemcomitans* (*A.a.*) is a facultative anaerobic Gram-negative  
5  
6 rod-shaped organism of the family *Pasteurellaceae* which has been isolated from the  
7  
8 oral cavity of human beings, nonhuman primates, and other animals. Quite early in the  
9  
10 last half of the 20th century, this organism was linked to various extraoral infections,  
11  
12 including endocarditis, meningitis, septicemia, brain abscesses, and osteomyelitis.  
13  
14 However, since the late seventies, it has been more frequently related to periodontal  
15  
16 disease, and in particular localized juvenile periodontitis. *A.a* produces a number of  
17  
18 virulence factors involved in the adhesion to, invasion of, and internalization in the oral  
19  
20 mucosa<sup>21-22</sup>.

21  
22  
23 The present study was conducted to prepare inclusion complexes of chlorhexidine:beta-  
24  
25 cyclodextrin (Cx:β-cd), and evaluate their interactions with bacterial membranes  
26  
27 through: scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy  
28  
29 (TEM); and measuring morphology alterations, roughness values, and cell weights by  
30  
31 atomic force microscopy (AFM).  
32  
33  
34  
35  
36

## 37 **2. Materials and Methods**

### 38 **2.1. Materials**

39  
40 Chlorhydrate of chlorhexidine was obtained from Ecadil<sup>®</sup> (SP, Brazil), and β-  
41  
42 cyclodextrin from Cerestar<sup>®</sup>, Co. (Milwaukee, WI, USA). Brain Heart Infusion Broth  
43  
44 (BHI) was purchased from Biobras S.A<sup>®</sup> (MG, Brazil). All other materials and solvents  
45  
46 were of analytical grade. *Agregatibacter actinomycetemcomitans* Y4-FDC was obtained  
47  
48 from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) RJ, Brazil. All other materials and solvents  
49  
50 were of analytical grade.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 2.2 Preparation of supramolecular complexes

The inclusion compounds were prepared using aqueous solution at different molar ratios of Cx to  $\beta$ -Cd: 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 by using the same methods described elsewhere<sup>11</sup>.

The Cx and  $\beta$ CD were accurately weighed and dissolved in milli-Q water; solutions were mixed and stirred for 24h. After that whole solution were frozen in liquid N<sub>2</sub> and then lyophilized over period of 30 h using freeze drier, Freezone<sup>®</sup> 4.5 at 40±1.0 °C with 50 mbar vacuum. The dried powder was stored in a desiccator until further evaluation.

## 2.3 Bacterial strain and culture conditions

The MIC<sub>90</sub> was determined using the macrodilution method with *A. a.* cells seeded anaerobically in brain heart infusion broth (BHI) supplemented with hemin and menadione 1% at 37°C under 10% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for 48 h. For the experiments, suspensions were prepared at a concentration adjusted into a tube of sterile 0.85% saline 1.5 × 10<sup>9</sup> CFU (colony-forming unit)/mL determined spectrophotometrically, according to the McFarland scale<sup>21</sup>. Aliquots of 500  $\mu$ L at normalized concentrations of Cx of 1:1, 1:2, 1:3, and 1:4 Cx: $\beta$ -cd were added to 3.4 mL of supplemented BHI to obtain the initial concentration of 128  $\mu$ g/mL and successively diluted. In order to detect the stationary phase growth curve experiments were previously done for 72 hours to the microorganism *A.a.* After that, the serial dilutions were inoculated with 100  $\mu$ L of the bacterial suspension, and then the cultures were incubated until reached the stationary phase of growth; they were used for the bacterial cell viability, SEM, TEM, and AFM experiments.

The complexes were dissolved in water and all experiments were carried out sixplicates.

Cx was used as the standard antibiotic for comparison in the antibacterial activity test.

Beta-cyclodextrin served as the negative control. Sample absorbance was measured and

1  
2  
3  
4 compared to the controls at 580 nm by UV spectrometry and the data were analyzed by  
5  
6 the Kruskal-Wallis test at a significance level of  $p < 0.05$  CLSI<sup>22-24</sup>.  
7

#### 8 9 **2.4 Bacterial viability**

10 After the MIC<sub>90</sub> determination, tubes with the bacterial culture previously indicated as  
11 MIC<sub>90</sub>, were centrifuged in a microcentrifuge at 10,000 xg for 3 minutes to pellet the  
12 cells. The supernatant was removed and resuspend one pellet in 1 mL of sterilized water  
13 (phosphate buffers are not recommended because they appear to decrease staining  
14 efficiency). The suspension was vortexes and pelleted against and resuspended in 1 mL  
15 of sterilized water. The cells obtained were diluted in 0.4% trypan blue in a 1:1 ratio for  
16 assessment of viable cells. Calculations involving cell populations were based upon  
17 viable counts<sup>23-24</sup>. For the different test groups, the data were analyzed by  
18 nonparametric one-way and two-way analyses of variance, coefficients of variation  
19 (CVs), and the Tukey's studentized range test. Comparisons were considered significant  
20 at the  $p < 0.05$  level.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

#### 35 **2.5. SEM evaluation**

36 For the SEM analysis, the microorganism suspensions treated with inclusion  
37 compounds were centrifuged at 3000 rpm for 5 min and the pellets were prefixed in  
38 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH: 7.2 at 4°C for 3 h. After fixation, 5  
39 μL aliquots of this dilution were added to a mica substrate and the samples were dried  
40 for 7 days at 37°C. The samples obtained were coated with gold in a Penning sputter  
41 system in a high-vacuum chamber and observed with a field emission SEM.  
42 Micrographs were obtained using secondary electrons (model Zeiss-DSM 950).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

#### 53 **2.6. TEM evaluation**



1  
2  
3  
4 Samples were prepared for TEM as previously described [19]. The samples were  
5  
6 cultured until they reached the MIC<sub>90</sub>. After incubation, the suspension was centrifuged  
7  
8 on a rotary shaker (128 rpm) at 37°C for 24 h. The cells were rinsed twice with 5 mM  
9  
10 sodium phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2) and fixed in 3.0% (v/v) phosphate-  
11  
12 buffered glutaraldehyde (5 mM). The samples were post fixed with 1% (w/v) OsO<sub>4</sub> in  
13  
14 5 mM PBS for 1 h at room temperature, washed three times with the same buffer,  
15  
16 dehydrated separately at 4°C for 10 min each using graded ethanol solutions (70%,  
17  
18 80%, 90%, and 100%; v/v), then embedded in the low-viscosity embedding medium  
19  
20 Epon 812. Thin sections of the specimens were cut with a diamond knife on an Ultracut  
21  
22 Ultramicrotome (Super Nova; Reichert-Jung Optische Werke, Vienna, Austria), and the  
23  
24 sections were double-stained with saturated uranyl acetate and lead citrate. The grids  
25  
26 were examined with a JEM-1230 TEM (Hitachi, Tokyo, Japan) at an operating voltage  
27  
28 of 75 kV. Membrane damage, vacuolization, cellular leakage, membrane defects, and in  
29  
30 cell division were measured by cell counting in 6 fields at 10000 x magnificence and  
31  
32 image analyses<sup>25</sup>.

### 37 2.7. AFM Image analysis

38  
39 AFM image analysis was conducted using the Digital Instruments Nanoscope software  
40  
41 (530r3sr3, Veeco, Santa Barbara, CA, USA). Height images were zero-order flattened  
42  
43 and plane-fit in the X-scan direction, and quantitative height measurements were made  
44  
45 by section analysis. The AFM cantilevers were irradiated with UV light prior to use to  
46  
47 remove any adventitious organic contaminants. A contact/tapping mode fluid cell was  
48  
49 sealed against a freshly cleaved muscovite mica substrate with a silicone O-ring. All  
50  
51 AFM images were captured as 512 × 512 pixel images at scan rates of between 2 and 3  
52  
53 Hz using a tip oscillation frequency of ~100 kHz and analyzed with Nanoscope®  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 v5303sr3 software. Microbial cells obtained from the antimicrobial assay (MIC<sub>90</sub>) at 1x  
5  
6 10<sup>5</sup> after 24 hours of growth diluted to 10<sup>-7</sup>. Aliquots of 5 µL were added into the mica  
7  
8 surface. The samples were air-dried for 7 days at 37°C<sup>26-30</sup>.  
9

### 10 11 12 13 **3. Results and Discussion**

#### 14 15 **3.1. Inhibitory concentrations and bacterial viability**

16  
17 The MIC<sub>90</sub> data for *A. a.* are summarized in Table 1. The range of MIC<sub>90</sub> for the test  
18  
19 compounds was 0.5– 8 µg/mL. The Cx inclusion compound showed excellent activity  
20  
21 against *A. a.* from 0.5– 1 µg/mL, while pure Cx had an MIC<sub>90</sub> of 8 µg/mL. The biocide  
22  
23 activities of 1:3 and 1:4 Cx:β-cd were increased fourfold.  
24  
25

26 The cell counting data also showed significant reduction of viable cells with the highest  
27  
28 concentrations of cyclodextrin in the inclusion compounds, optimizing the antimicrobial  
29  
30 activity. In the Cx group at 0.5 µg/ mL, the number of viable cells was 1.12 × 10<sup>4</sup> and this  
31  
32 number decreased proportionally with increasing amounts of cyclodextrin (Table 1). The cell  
33  
34 viability was especially reduced in the 1:3 Cx:β-cd group, in accordance with the MIC<sub>90</sub>  
35  
36 test results. The antimicrobial were carried out of and then statistically analyzed.  
37  
38

39 The data from the antimicrobial effect and the quantity of viability cell of *A.a* assessed  
40  
41 by cell counting was statistically analyzed by using the Anova and a post-test (Tukey  
42  
43 test), where *P*-values less than 0.05 were considered significant; the results are shown in  
44  
45 Table 1. The Cx: β-Cd 1:3 and 1:4 inclusion compounds showed much better  
46  
47 antibacterial activity and increased cell toxicity than 1:1 and 1:2 Cx: β-Cd inclusion  
48  
49 compounds and free chlorhexidine, indicating that the antibacterial activity was  
50  
51 significantly enhanced by the molecular inclusion and formation of nanoaggregates. As  
52  
53 shown in Table 1, the lower cell counting of the *A.a* cell viability after treated with the  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 1:3 and 1:4 Cx:  $\beta$ -Cd molar ratio inclusion compounds was decreased at least about  
5  
6 twice and four times than those prepared at 1:1 or 1:2 inclusion compounds or free Cx,  
7  
8 respectively. Interesting to note, that there was statistically difference between  
9  
10 chlorhexidine and its inclusion compounds ( $<0.01$ ). In contrast, there was no  
11  
12 statistically difference among the Cx:  $\beta$ -Cd inclusion compound ( $p < 0.05$ ).

13  
14 The higher disruption of the microorganism membrane and the cellular death shown by  
15  
16 1:3 and 1:4 compound could be due not only by the synergistic surfactant effect of  
17  
18 cyclodextrin and chlorhexidine, but also by the highest adhesion force of hydrogen  
19  
20 bound interaction between the microorganism membrane and cyclodextrin.  
21  
22

### 23 24 **Table 1**

#### 25 26 **3.2. SEM Evaluation**

27  
28 The appearance of indentations on the surface of some cells as well as some micelle-like  
29  
30 structures or membrane residues around the cells (Fig. 1A-D) were the initial  
31  
32 morphological changes observed. Cx inclusion at molar ratios of 1:1; 1:2, 1:3, and 1:4  
33  
34 Cx: $\beta$ -cd led to slight changes in the size and various leakage points formed in the  
35  
36 membrane structure (Fig. 1A, B and E). However, domain formation and multiple  
37  
38 leakage points in the 1:2 Cx: $\beta$ -cd (Fig. 1D) were not observed. The addition of 1  $\mu\text{g/mL}$   
39  
40 Cx: $\beta$ -cd led to dramatic changes in membrane structure. In this case, the *A. a.*  
41  
42 membrane domains and inclusion compounds coalesced into larger, less rounded  
43  
44 domains (Fig. 1E-F). After the MEV observation was observed that molar ratio 1:3 and  
45  
46 1:4 cause more leakage in cellular membrane and the best antimicrobial effect.  
47  
48  
49

### 50 51 **Figure 1**

#### 52 53 54 55 **3.3. TEM evaluation**

56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 In the electron micrographs, the control showed an intact and apparent cell membrane  
5 (Fig. 2A). However, Cx:β-cd-treated *A. a.* showed a badly disrupted and altered cell  
6 membrane after 24 h that was the most severe at 1:4 Cx:β-cd, as depicted in Fig. 2B-E.  
7  
8 Cx:β-cd-treated *A. a.* cells had extra- and intracellular changes compared to the non-  
9 treated cells (Fig. 2A), including separation of the cytoplasmic membrane from the cell  
10 envelope and coagulation of the cytosolic components. In addition, disruption of the  
11 intracellular content with membrane sloughing and breaching even disappeared (Fig. 2  
12 E). The cells were irregularly shaped and without membranes or cell walls on one side,  
13 the morphology of the bacteria changed a lot <sup>31</sup>. The bacterial cells were markedly  
14 degraded from bacilliforms to spherical shapes and irregularly condensed masses with  
15 bleb-like structures, with a loss of cell contents. The profile of the bacterial cells became  
16 faint, the surface appeared to burst, their structures turned dim and hollow, and even  
17 perforated and crushed. Thus, membrane damage is the inhibition mechanism of Cx:β-  
18 cd against *A. a.*; the cellular effects were the most severe at 1:3 and 1:4 Cx:β-cd (Fig. 2  
19 E-F) but qualitatively showed the same effects as the lower concentrations with  
20 consequent bacterial death. In concordancy of MEV in this study the molar ratio 1:3  
21 caused more leakage to cell structure.

### Figure 2

22  
23  
24 In all groups, the major change was cellular vacuolization. This was highest with 1:4  
25 Cx:β-cd treatment (31.5%) (Fig. 2 F), in which the lowest number of cells in division  
26 (2.7%) was also observed. There were still many cells with cellular wall defects  
27 observed with 1:3 Cx:β-cd (Fig. 2 E) treatment (21%). The number of cells with  
28 condensed content was higher in control groups Cx (Fig. 2 B) and *A. a.* (14.9% and  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 11.4%, respectively), which were also the groups with larger numbers of apparently  
5  
6 healthy cells (47.6% and 33%, respectively).  
7

## 8 **Table 2**

9  
10 The higher vacuolated cell effects of the inclusion compounds were observed in  
11  
12 comparison with the free chlorhexidine. These results could be explained as  
13  
14 consequence of the chlorhexidine bactericide effect. The higher cellular and membrane  
15  
16 leakage was also observed for the inclusion compounds in comparison with the free Cx  
17  
18 as a consequence of the higher cytotoxic of these compounds due to the higher adhesion  
19  
20 force and surfactant activity with the membrane cells as discuss above. Thus lower  
21  
22 viable cells were observed when in contact with Cx:cyclodextrin compounds.  
23  
24 Interestingly higher viable cells were observed with the 1:3 inclusion compound  
25  
26 suggesting the best antimicrobial agent option among the compounds.  
27  
28  
29

### 30 **3.4. AFM analysis**

31  
32 AFM images of compounds and cells no exposed to inclusion compounds (untreated)  
33  
34 samples clearly showed the bacillary shape of the bacteria. Its moiety length ranged  
35  
36 from 1.5 to 2.5  $\mu\text{m}$ , the width was approximately 1.5  $\mu\text{m}$ , and the average height was  
37  
38 450 nm. However, the Cx: $\beta$ -cd-treated samples had crystalline structures with two  
39  
40 different regions in the moiety with different heights as shown by the color alterations in  
41  
42 the images. Cx only-treated cells had a height of 30.95 nm, beta-cyclodextrin only-  
43  
44 treated cells were 9.6 nm, and the inclusion compounds presented increasing heights,  
45  
46 although not linear. The roughness values had the same tendencies as the heights with  
47  
48 the 1:3 Cx: $\beta$ -cd treatment having the highest roughness value. The bond quality of the  
49  
50 samples decreased with an increase of the roughness surface.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 Increasing the amount of cyclodextrin in the Cx inclusion compound molar ratio (1:1;  
5 1:2; 1:3, 1:4) led to slight changes in the size and shape of the taller liquid-ordered  
6 domain and a slight change in the membrane structure with various leakage points (Fig.  
7 3D). However, domain formation and multiple leakage points with the positive control  
8 Cx were not observed (Fig. 3A).

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15 The addition of Cx inclusion compounds at 1 µg/mL caused severe alterations in  
16 membrane structure. In this case, the *A. a.* membrane domains and the inclusion  
17 compounds coalesced into larger, less rounded cluster-like domains (Fig. 3D-F).

### 21 22 **Figure 3**

23  
24 The AFM images of freshly prepared with inclusion compounds and untreated *A. a.*  
25 (Fig. 3A) showed a characteristic coco-bacillus shape with distinctive peritrichous  
26 flagella. *A. a.* showed a regular rod shape with an average size 4-5 µm. Because of the  
27 AFM spatial resolution, multiple flagella could be clearly seen on most of the cells. A  
28 typical image of an isolated cell attached to a glass surface is shown in Fig. 3 A. In Fig.  
29 3B, Cx appears surrounding the bacteria. The compounds were typically 20–70 nm  
30 above the lowest point in the adjacent bacteria. Cx was found only on top of the  
31 bacteria.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

### 42 43 **Table 3**

44 Structures suggestive of the compounds could be seen around the bacterial membrane,  
45 generally being one or two break points in the cellular membrane. Thus, the cell starts to  
46 lose its characteristic shape and allows the leakage of intracellular exudates (Fig. 3B,C  
47 and E) <sup>28</sup>.

48  
49  
50  
51  
52  
53 Comparison between AFM images of no exposed and exposed bacteria to inclusion  
54 compounds highlights the morphological alterations. Cx:β-cd treatment induced evident  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 surface corrugation; the external surface was marked by ruptures and bulging<sup>19, 20, 28</sup>.

5  
6 This dramatic change in morphology differs from the alteration of surface roughness  
7  
8 that was progressive with enhanced  $\beta$ -cyclodextrin. In the treated samples, the  
9  
10 roughness values increased with increasing amounts of  $\beta$ -cyclodextrin (Table 3). These  
11  
12 features first appeared at 1:1 Cx: $\beta$ -cd and became more evident at 1:3 and 1:4 Cx: $\beta$ -cd  
13  
14 (Table 3). The same effects were evident in the SEM images (Fig. 1E-F).

15  
16 These morphological alterations were coupled to an average height (H) decrease.  
17  
18 Indeed, as indicated in Table 3, the compound height was significantly reduced with 1:3  
19  
20 Cx: $\beta$ -cd treatment, which was shorter (18.84 nm) than cells only treated with Cx (58.6).  
21  
22 Rosseto *et al*<sup>28</sup> have shown that decreasing height corresponds to a loss of cell volume,  
23  
24 which may be due to a higher loss of cytoplasmic material during the sample  
25  
26 dehydration steps. In addition, it is mediated by the increased permeability of the  
27  
28 disrupted membranes of treated bacteria. This sounds reasonable and supports the  
29  
30 morphological observations.  
31  
32  
33

34  
35 The initial morphological changes observed were the appearance of indentations on the  
36  
37 surface of some cells or outer membrane residues found around the cells (Fig. 3C and  
38  
39 F). This indicates that the bacterial outer membrane was disrupted, probably due to a  
40  
41 direct interaction between the cellular membrane and Cx inclusion compounds.  
42  
43

44  
45 The cell surface displayed enhanced roughness. This suggests that LPS accumulates in  
46  
47 the cell surface and enhances the aggregation of viable and nonviable bacterial cells,  
48  
49 inclusion compound, and intracellular liquids in a process similar to biofilm formation  
50  
51 (Fig. 3C)<sup>32-33</sup>.

52  
53 In the SEM studies (Fig. 1E-F), the outer membrane collapsed while the inner part of  
54  
55 the cell still remained intact. This fact could be explained by the possible Cx inclusion  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 compounds binding to negatively charged receptors, which enables penetration into the  
5  
6 bacterial outer membrane and hence releases periplasmic material <sup>17, 31, 32, 33</sup>. Thus, it is  
7  
8 possible that the apical side is where the bacteria are being targeted first, or where the  
9  
10 damage is initially concentrated. Also, leakage of fluid was found to be at the poles of  
11  
12 the bacteria. This result was expected since the domains of cardiolipin (a negatively  
13  
14 charged phospholipids) reside at the apical ends of the inner membrane (other than the  
15  
16 septal regions) <sup>17</sup>.

17  
18  
19 Cx is highly cationic and has a great affinity for negatively charged phospholipids <sup>19-20</sup>.  
20  
21 Therefore, it is probable that the Cx included in cyclodextrin concentrated at the apical  
22  
23 ends would create a considerable change in the outer membrane and lead to cell  
24  
25 leakage. When exposed to a high molar ratio of Cx:β-cd (Fig. 3E-F), a copious amount  
26  
27 of cytoplasmic fluid exuded from the bacteria. These bacteria appeared either severely  
28  
29 damaged or their membrane fully collapsed (Fig. 3D). According to Li *et al.*, <sup>20</sup> this  
30  
31 indicates drastic permeabilization of the inner membrane. In this study, they suspected  
32  
33 that drug binds to the LPS on the outer cell wall. However, at a higher concentration,  
34  
35 there appears to be a speeding up of events as the peptides are known to show binding  
36  
37 cooperatively with their target ligand that result in aggregation of the bacteria. This was  
38  
39 observed in the images of the interaction of Cx inclusion compounds and *A. a.* (Fig. 3B-  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
C).

Section analysis revealed that the heights of the supramolecular complexes were  
variable. In this case, coalescence of the taller planar bilayer containing domains  
occurred with concurrent aggregate association on the surrounding liquid-disordered  
domains (Fig. 3D-E) <sup>34-36</sup>. The lower liquid-disordered domains were completely  
covered by the amorphous aggregates.



1  
2  
3  
4 Lofsson *et al* [2] and Loftsson & Brewster<sup>3</sup> compared the effects of cyclodextrins on  
5 drug delivery through biological membranes by evaluating the density using AFM.  
6 They showed that cyclodextrins increased drug uptake through biological membranes. It  
7 was observed that the particle density increased in the 1:3 and 1:4 Cx:β-cd treated *A. a.*  
8 samples, despite having fewer bacterial cells in these samples due to stronger  
9 antimicrobial activity than the others at 2 μg/mL. However, the enhanced densities were  
10 not linear; 1:3 Cx:β-cd presented higher height and roughness analyses results than did  
11 1:4 Cx:β-cd.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

#### 22 **Figure 4**

23  
24 In this study, it was hypothesized that the number of particles found is derived from the  
25 sum of the number of cells and drug particles. Consequently, there is a greater  
26 concentration of drug blended with cells in other samples. The particle density found  
27 supported that the roughness of the drug-cyclodextrin complex interaction of *A. a.*  
28 membranes and compounds increased with higher amounts of β-cyclodextrin.  
29  
30  
31  
32

33 The roughness and density values found were inversely proportional to the height values  
34 of the particles, with highest values for 1:3 and 1:4 Cx:β-cd. Over time, a strong  
35 structure surrounded the microorganisms; the sample height was reduced with  
36 increasing amounts of β-cyclodextrin, suggesting a volume loss of the samples after  
37 Cx:β-cd treatment. This shows that cytoplasm fluid leakage occurred in these samples,  
38 which was verified by SEM and AFM images and the highest antimicrobial activity  
39 results of these compounds (1:3 and 1:4 Cx:β-cd).  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

#### 50 **4. Conclusion**

51  
52 Chlorhexidine:beta-cyclodextrin nanoaggregates showed distinct antibacterial  
53 advantages compare to simple chlorhexidine, forming cluster-like structures with the  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 cell membrane. In addition, the increased electrostatic interaction between cationic  
5 chlorhexidine and lipopolysaccharides of Gram negative bacteria may contribute to  
6 increase its antimicrobial activity. The inclusion in cyclodextrin enhanced the  
7 chlorhexidine interaction with the bacterial membranes and the Cx:β-cd had the best  
8 performance for antimicrobial activity.  
9  
10  
11  
12  
13

### 14 **Acknowledgements**

15 We are grateful for CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT/Nanobiofar that support this  
16 investigation.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

### 27 **References**

- 28 1. Davis M E, Brewster M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and  
29 future. *Nature Reviews: Drug Discover* 2004; 3: 1023-1035.  
30  
31
- 32 2. Brittain H G. Excipient development for pharmaceutical, biotechnology and drug  
33 delivery systems. *Pharmaceutical Development and Technology* 2007; 12: 109-110.  
34  
35
- 36 3. Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádóttir F. Effects of Cyclodextrins  
37 on drug delivry through biological membranes. *J Pharm Sci* 2007; 96: 2532-2546.  
38  
39
- 40 4. Yang L, Zhang H, Tan T, Rahman AV. Thermodynamic and NMR investigations  
41 on the adsorption mechanism of puerarin with oligo β-cyclodextrin-coupled  
42 polystyrene-based matrix. *J Chem Tech & Biotech* 2009; 84:611-617.  
43  
44
- 45 5. Komljenovic I, Marquardt D, Harroun TA, Sternin E. Location of chlorhexidine  
46 in DMPC model membranes: a neutron diffraction study. *Chem Phys Lipids* 2010;  
47 163: 480-487.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 6. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of a chlorhexidine in oral  
5  
6 candidoses: review. *Oral Dis* 2001; **7**: 11-17.  
7
- 8  
9 7. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanism's underlying chlorhexidine-induced  
10  
11 citotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001; 15:271-6.  
12
- 13  
14 8. Lima KC, Neves AA, Beiruth JB, Magalhães FAC, Uzeda M. Levels of infection  
15  
16 and colonization of some oral bacteria after use of naf, chlorhexidine and a  
17  
18 combined chlorhexidine with naf mouthrinses. *Braz J Microbiol* 2001; 32:158-  
19  
20 161.  
21
- 22  
23 9. Faria G, Cardoso CRB, Larson RE, Silva JS. Chlorhexidine-induced apoptosis or  
24  
25 necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol*  
26  
27 *Appl Pharm* 2009; 234: 256–265.  
28
- 29  
30 10. Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine  
31  
32 digluconate on different cell types: A molecular and ultra structural investigation.  
33  
34 *Toxicol In vitro* 2008; 22: 308-317.  
35
- 36  
37 11. Cortés ME, Sinisterra RD, Ávila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The  
38  
39 chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization  
40  
41 and microbiological evaluation. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem* 2001; 40:297-  
42  
43 302.  
44
- 45  
46 12. Raso EMG, Cortes ME, Teixeira KI, Franco MB, Mohallem NDS, Sinisterra R D.  
47  
48 A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine:β-cd inclusion  
49  
50 compounds based on porous silica. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem* 2010; 67:  
51  
52 159-168.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 13. Denadai AML, Teixeira KIR, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortés ME, Sinisterra  
5  
6 RD. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective Carrier of the  
7  
8 antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr Res* 2007; 342: 2286-2296.  
9
- 10  
11 14. Thatiparti TR, Shoffstall AJ, Recum HAV. Cyclodextrin-based device coatings for  
12  
13 affinity-based release of antibiotics. *Biomaterials* 2010; 31: 2335–2347.  
14  
15
- 16 15. Irie T, Fukunaga K, Pitha J. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: lipid  
17  
18 dissolution and effects on lipid transfers in vivo. *J Pharm Sci* 1992; 81: 521-523.  
19
- 20  
21 16. Mileykovskaya E, Dowhan W. Visualization of phospholipid domains in  
22  
23 *Escherichia coli* by using cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine  
24  
25 orange. *J Bacteriol* 2000; 182: 1172-75.  
26
- 27  
28 17. Da Silva Jr A, Techke O. Effects of the antimicrobial peptide PGLa on live  
29  
30 *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1643: 95-103.  
31  
32
- 33 18. Jiang P, Yan PK, Chen JX, Zhu BY, Lei XY, Yin WD et al. High density  
34  
35 lipoprotein 3 inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis via  
36  
37 promoting cholesterol efflux in RAW264.7 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006;  
38  
39 27: 151–157.  
40  
41
- 42 19. Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic Force Microscopy study of the  
43  
44 antimicrobial action of sushi peptides on gram negative bacteria. *Biochim et*  
45  
46 *Biophysica Acta* 2007; 1768:411-8.  
47  
48
- 49 20. Li P, Wohland T, Ho B, Ding JL. Perturbation of lipopolysaccharide (LPS) micelles  
50  
51 by sushi 3 (S3) antimicrobial peptide. The importance of an intermolecular disulfide  
52  
53 bond in S3 dimer for binding, disruption, and neutralization of LPS. *J Biol Chem*  
54  
55 2004; 279: 50150-50156.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 21. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas*  
5  
6 *gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol*  
7  
8 2000 1999; 20: 82–121.  
9  
10  
11 22. Olsen I, Shan HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of  
12  
13 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol*  
14  
15 2000 1999; 20: 14–52.  
16  
17  
18 23. Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. Multicenter evaluation of four  
19  
20 methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1437-1441.  
21  
22  
23 24. Ruan S, Young E, Luce M J, Reiser J, Kolls J K, Shellito J E. Conditional  
24  
25 expression of interferon- $\gamma$  to enhance host responses to pulmonary bacterial  
26  
27 infection. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2006; 19: 251–257.  
28  
29  
30 25. López-Expósito I, Amigo L, Recio I. Identification of the initial binding sites of  
31  
32  $\alpha$ 2-casein f(183–207) and effect on bacterial membranes and cell morphology.  
33  
34 *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1778: 2444–2449.  
35  
36  
37 26. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, Szeliga J, Mitura S, Mitura K, Grodzik M,  
38  
39 Orłowski P Sokolowska A. Visualization of interaction between inorganic  
40  
41 nanoparticles and bacteria or fungi. *Int J Nanomed* 2010; 5: 1085–1094.  
42  
43  
44 27. Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement  
45  
46 of cell mechanics. *Int J Nanomed* 2010; 5: 137–145.  
47  
48  
49 28. Rosseto G, Bergese P, Colombi P, Depero L, Giuliani A, Nicoletto SF et al,  
50  
51 Atomic Force Microscopy evaluation of the effects of a novel antimicrobial  
52  
53 multimeric peptide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine: Nanotechnology,*  
54  
55 *Biology and Medicine* 2007; 3:198-207.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 29. Deupree SM, Schoenfisch MH. Morphological analysis of the antimicrobial action  
5 of nitric oxide on gram negative pathogens using atomic force microscopy. Acta  
6 Biomaterialia 2009; 5: 1405-15.  
7  
8  
9  
10  
11 30. Vandepitte J, Engback K, Piot P, Heuck C C. Basic microbiology procedures in  
12 clinical bacteriology: World Health Organization Geneva, 1991:85.  
13  
14 31. Li XF, Feng XQ, Yang S, Fu GQ, Wang TP, Su ZX. Chitosan kills *Escherichia coli*  
15 through damage to be of cell membrane mechanism. Carbohydrate Polym 2010; 79:  
16 493-499.  
17  
18  
19  
20  
21 32. Gaboriaud F, Dufrene YF. Atomic force microscopy of microbial cells: Application  
22 to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces.  
23 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007; 54: 10–19.  
24  
25  
26  
27 33. Kolenbrander PE, Eglund PG, Diaz PI, Palmer RJ. Genome–genome interactions:  
28 bacterial communities in initial dental plaque. TRENDS in Microbiol. 2005; 13:11-  
29 5.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36 34. Johansen C, Gill T, Gram L. Changes in cell morphology of *Listeria*  
37 *monocytogenes* and *Shewanella putrefaciens* resulting from the action of protamine.  
38 Appl. Environ. Microbiol 1996; 62:1058-64.  
39  
40  
41  
42  
43 35. Dennison SR, Morton LHG, Frederick H, Phoenix DA. The impact of membrane  
44 lipid composition on antimicrobial function of a  $\alpha$ -helical peptide. Chem Phys  
45 Lipids 2008; 151: 92-102.  
46  
47  
48  
49  
50 36. Shaw JE, Epand RF, Hsu JCY, Mo GCH, Epand RM, Yip CM. Cationic peptide-  
51 induced remodeling of model membranes: Direct visualization by *in situ* atomic  
52 force microscopy. J Struct Biol 2008; 162: 121-38.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Inhibitory concentration of Chlorhexidine chlorhydrate and Chlorhexidine:beta-cyclodextrin at different molar ratio (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) in  $\mu\text{g/mL}$  and Viable Cell Counting on hemocytometer.

Groups	<i>MIC<sub>90</sub> against A.a</i>		<i>Cell counting</i>
	$\mu\text{g/mL}$	mol/L	
Chlorhexidine chlorhydrate	8	$(13.8 \times 10^{-6})$	$1.12 \times 10^4$ (a)
Cx: $\beta$ -cd 1:1	1	$(1.73 \times 10^{-6})$	$0.52 \times 10^4$ (b)
Cx: $\beta$ -cd 1:2	1	$(1.73 \times 10^{-6})$	$0.52 \times 10^4$ (b)
Cx: $\beta$ -cd 1:3	0.5	$(0.86 \times 10^{-6})$	$0.31 \times 10^4$ (b)
Cx: $\beta$ -cd 1:4	0.5	$(0.86 \times 10^{-6})$	$0.24 \times 10^4$ (b)
Beta-cyclodextrin	--	--	$11.3 \times 10^4$ (a)

Significance level (a) $p < 0.01$ ; (b) $p < 0.05$

Table 2. Cellular morphology of *A.a* after treatment with chlorhexidine:β-cyclodextrin (Cx:β-cd) at 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 molar ratio evaluated by TEM

Groups	Vacuolated cells	Cellular leakage	Membrane leakage	Cells in division	Condensed content	Healthy cells
<i>A.a</i>	21.7%	13.3%	5.3%	4%	14.9%	47.6%
Cx	28.5%	14.1%	8.5%	4.5%	11.4%	33%
Cx:β-cd 1:1	35.3%	14.2%	9.4%	7.6%	8.6%	24.7%
Cx:β-cd 1:2	30%	16.7%	15.7%	4.8%	3.2%	28.7%
Cx:β-cd 1:3	21.9%	14.6%	21%	6.8%	4.4%	31.2%
Cx:β-cd 1:4	31.5%	16.8%	13.1%	2.7%	5.6%	27.8%



Table 3. Quantitatively AFM analysis: bacterial heights (H) and roughness for Cx and Cx:β-cd (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) inclusion compounds

Groups	Quantitatively AFM Analysis			
	Non treated samples		Treated samples	
	Height	Roughness	Height	Roughness
Cx	30.9 ± 2.7	30.9 ± 1.47	58.6 ± 0.48	70.6 ± 11.26
β-cd	9.6 ± 2.1	17.5 ± 1.6	25.3 ± 2.2	58.3 ± 4.9
Cx: β-cd 1:1	10.9 ± 4.6	23.8 ± 1.89	36.2 ± 5.45	84.4 ± 7.13
Cx: β-cd 1:2	12.0 ± 1.7	67.8 ± 1.88	38.3 ± 1.0	172.0 ± 21.91
Cx: β-cd 1:3	21.9 ± 3.1	157.2 ± 32.24	102.7 ± 2.22	232.7 ± 19.38
Cx: β-cd 1:4	14.9 ± 5.7	78.4 ± 2.51	63.3 ± 6.35	222.5 ± 13.74
<i>A.a</i>	192.2 ± 4.7	366.4 ± 43.78	---	---

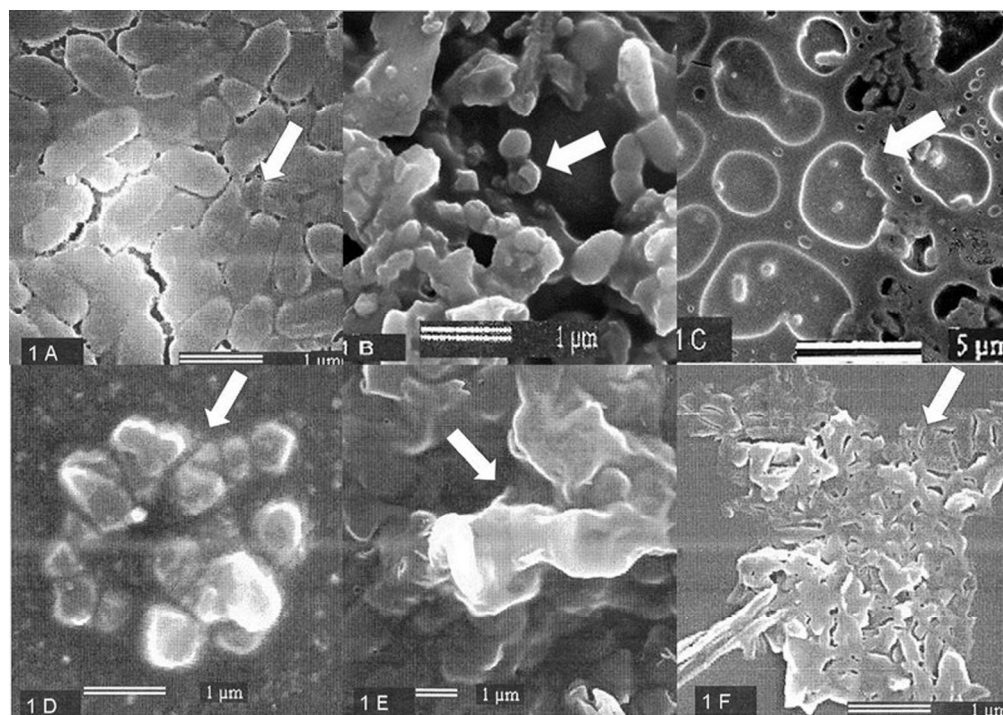


Figure 1 SEM micrographs of A.a cells non threatened(A), cells treated with Chlorhexidine Chlorhidrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E), 1:4 (F).  
282x199mm (300 x 300 DPI)

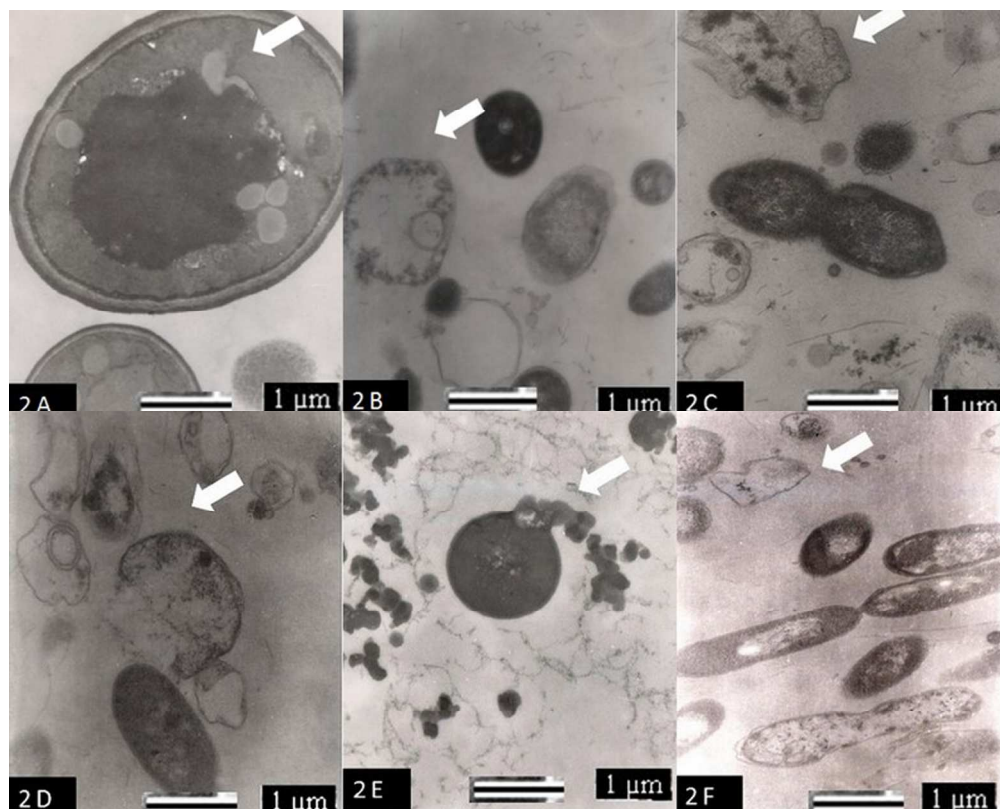


Figure 2 TEM micrographs of A.a cells non threated(A), cells treated with Chlorhexidine Chlorhydrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E), 1:4 (F). The microscopy magnificence was adapted to the structure analyzed.  
282x225mm (300 x 300 DPI)

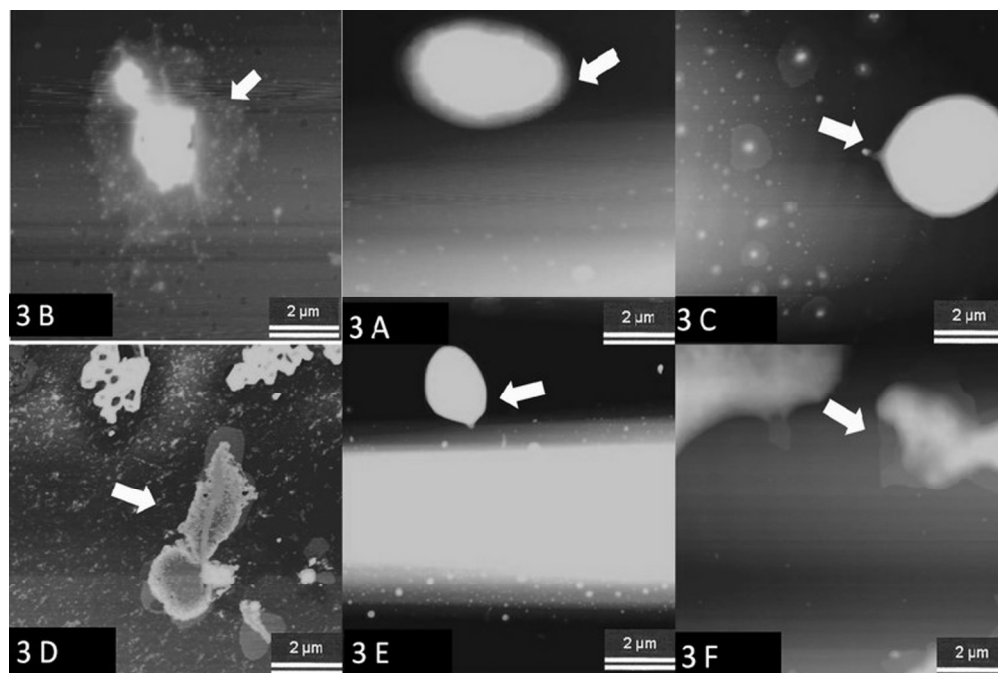
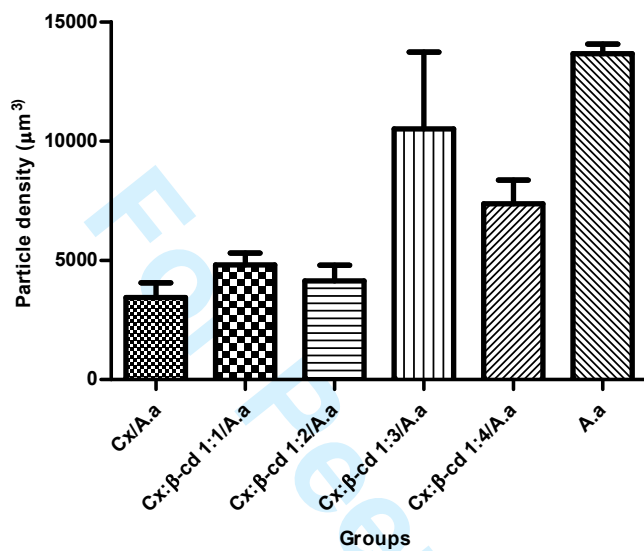


Figure 3 AFM images of A.a cells non threated(A), cells treated with Chlorhexidine Chlorhidrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E), 1:4 (F). The microscopy magnicence was adapted to the structure analyzed.  
282x188mm (300 x 300 DPI)

Figure 4 Average particle density of the *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* treated with Cx, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 Cx:β-cd samples by AFM.



**AUTHORS AGREEMENT**

The undersigned author(s) state(s) that the article being submitted is original, does not infringe copyright laws or any other third-party property rights, has not been previously published, and is not being considered for publication elsewhere. The author(s) confirm(s) that the final version of the manuscript has been reviewed and approved by all authors. All manuscripts published become the permanent property of the **Pharmaceutical Development and Technology** and cannot be published without authorization in writing from its Editors. There are no interest conflicts. Title of the article: "Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by beta-cyclodextrin inclusion of chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation"

Name(s) of the author(s)

Karina Imaculada Rosa Teixeira

Bernardo Ruegger A Neves

German Arturo B Mahecha

Rubén Dario Sinisterra

Maria Esperanza Cortés

Patrícia Valente Araújo

Signature(s)

Karina Imaculada Rosa Teixeira  
Bernardo Ruegger A Neves  
German Arturo B Mahecha  
Rubén Dario Sinisterra  
Maria Esperanza Cortés  
  
P. Valente Araújo

Date: 09-15-2011

1  
2  
3 Figure 1 SEM micrographs of *A.a* cells non threated(A), cells treated with  
4 Chlorhexidine Chlorhidrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E),  
5  
6  
7 1:4 (F).  
8

9  
10 Figure 2 TEM micrographs of *A.a* cells non threated(A), cells treated with  
11 Chlorhexidine Chlorhidrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E),  
12  
13  
14 1:4 (F). The microscopy magnicence was adapted to the structure analyzed.  
15

16  
17  
18 Figure 3 AFM images of *A.a* cells non threated(A), cells treated with Chlorhexidine  
19 Chlorhidrate (B) , Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1 (C), 1:2 (D), 1:3 (E), 1:4 (F). The  
20  
21  
22 microscopy magnicence was adapted to the structure analyzed.  
23

24  
25  
26  
27 Figure 4 Average particle density of the *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*  
28 treated with Cx, Cx:β-cd 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 and no treated sample by AFM.  
29  
30  
31

32  
33  
34 Table 1. Inhibitory concentration of Chlorhexidine chlorhidrate and Chlorhexidine:beta-  
35 cyclodextrin at 1:1; 1:2; 1:3; 1: molar ratio in μg/mL and Viable Cell Counting on  
36  
37  
38 hemocytometer.  
39

40  
41 Table 2. Results of cellular alterations on cells treated with chlorhexidine: beta-  
42 cyclodextrin at 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 molar ratio by Transmission Electron Microscopy.  
43  
44

45  
46  
47 Table 3. Average bacterial heights (H) and roughness for each analyzed sample: Cx  
48 and Cx:β-cd inclusion compounds (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) and interaction *A.a* – inclusion  
49  
50  
51 compounds by AFM.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## TRANSFER OF COPYRIGHT AGREEMENT

*Must be signed and returned to the editor-in-chief of the journal before the manuscript can be considered for publication*

The transfer of copyright from author to publisher must be clearly stated in writing to enable the publisher to assure maximum dissemination of the author's work. Therefore, the following agreement, executed and signed by the author, is required with each manuscript submission. (If the article is a "work made for hire" it must be signed by the employer.)

The article entitled  
is herewith submitted for publication in  
It has not been published before, and it is not under consideration for publication in any other journals. It contains no matter that is scandalous, obscene, libelous, or otherwise contrary to law. When the article is accepted for publication, I, as the author (U.S. Government employees: see bottom of page), hereby agree to transfer to Informa Healthcare all rights, including those pertaining to electronic forms and transmissions, under existing copyright laws, except for the following, which the author(s) specifically retain(s):

1. The right to make further copies of all or part of the published article for my use in classroom teaching;
2. The right to reuse all or part of this material in a compilation of my own works or in a textbook of which I am the author;
3. The right to make copies of the published work for internal distribution within the institution that employs me.

I agree that copies made under these circumstances will continue to carry the copyright notice that appeared in the original published work. I agree to inform my co-authors, if any, of the above terms. I certify that I have obtained written permission for the use of text, tables, and/or illustrations from any copyrighted source(s), and I agree to supply such written permission(s) to Informa Healthcare upon request.

*Karina Imaculada Rosa Teixeira*

(1) (Karina Imaculada Rosa Teixeira  
Phd student

Universidade Federal de Minas Gerais

*Maria Esperanza Cortés*

(2) Maria Esperanza Cortés  
Phd

Universidade Federal de Minas Gerais

November, 21, 2011

### Government Copyright

I certify that the above article has been written in the course of the author's employment by the United States Government, so that it is not subject to U.S. copyright laws, or that it has been written in the course of the author's employment by the United Kingdom Government (Crown Copyright).  
Signature Date Title

### Note to U.S. Government Employees:

' If the above article was not prepared as part of the employee's duties, it is not a U.S. Government work.

' If the above article was prepared jointly, and any co-author is not a U.S. Government employee, it is not a U.S. Government work.



1 **Chlorhexidine:beta-cyclodextrin blocks yeast growth by extraction of ergosterol**

2 K. I. R. Teixeira<sup>1</sup>, P. V. Araújo<sup>1</sup>, R. D. Sinisterra<sup>2</sup>, M. E. Cortés<sup>1\*</sup>.

3 <sup>1</sup>Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

4 <sup>2</sup> Chemistry Department, Exact Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais  
5 (UFMG)

6 \*Autor for correspondence: e-mail: [mecortes@ufmg.br](mailto:mecortes@ufmg.br)

7 Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Departamento de  
8 *Odontologia Restauradora*, Universidade Federal de Minas Gerais. CEP: 31270-901,  
9 Phone: 55-31-34092437, Fax: 55-31-3409-2430

10 **Abstract**

11 Chlorhexidine inclusion compounds in cyclodextrin have been developed for use as  
12 antiseptic agents. The aim of this study was to prepare Cx:β-cd compounds and to  
13 examinant their interactions with sterol and yeast membranes. The inhibitory  
14 concentration (IC) of the yeast *Candida albicans* (C.a.) was determined for each  
15 compound, and varied between 0.5 and 2 µg/mL for the inclusion compounds. To  
16 confirm results from IC value, quantitative analysis of the viable cells was performed  
17 using trypan blue staining. Mechanism characterization of the interaction between these  
18 compounds with the yeast membrane and assessment of membrane morphology were  
19 performed using SQM (Sterol Quantification Method) analysis and scanning electron  
20 microscopy (SEM). SQM revealed that sterol extraction increased with increasing  
21 cyclodextrin concentrations (1.71 x 10<sup>3</sup>; 1.4 x 10<sup>3</sup>; 3.45 x 10<sup>3</sup>, and 3.74 x 10<sup>3</sup> CFU for  
22 1:1, 1:2, 1:3, and 1:4 respectively), likely as a consequence of membrane ergosterol  
23 solubilization. SEM images demonstrated that cell membrane damage is a visible and

1 significant mechanism that contributes to the antimicrobial effects of Cx:β-cd  
2 compounds. Cell disorganization was significantly higher increased with the proportion  
3 of β-cyclodextrin present in the compounds. Morphology of compounds consisting of  
4 1:3 and 1:4 molar ratios of Cx:β-cd shown large aggregates mixed with yeast remains,  
5 representing more membrane disruption than that observed in cells treated with Cx  
6 alone. In conclusion, nanoaggregates of chlorhexidine-cyclodextrin inclusion  
7 compounds act blocking yeast growth by extraction of ergosterol permeabilizing the  
8 membrane by creating cluster-like structures with the cell membrane, possibly due to  
9 high amounts of hydrogen bonding.

10 **Keywords:** Chlorhexidine, β-cyclodextrin, membrane-drug interactions

## 11 **Introduction**

12 Chlorhexidine (Cx) is an effective chemical antiseptic that has a bactericidal effect at  
13 high concentrations (2-5%) and a bacteriostatic effect at low concentrations (0.6%). The  
14 antimicrobial activity of Cx is thought to be due to bacterial membrane disruption,  
15 which leads to increased cell permeability and leakage of intracellular ions (Na<sup>+</sup>, K)(15,  
16 22, 32). Products containing high concentrations of Cx have been used in periodontic  
17 and endodontic clinical practice. Cx has also been safely used at very low  
18 concentrations in several commercial products for dental hygiene, including  
19 mouthwash, gels, and sprays. However transitory effects of Cx have been shown to  
20 cause deleterious effects on cells *in vitro* (13, 15, 35).

21 In order to reduce the toxicity caused by high concentrations of Cx, chlorhexidine:beta-  
22 cyclodextrin (Cx:β-cd) inclusion compounds have been developed for use as antiseptic  
23 agents. These compounds offer advantages in effectiveness, long-term activity, and low  
24 effective antimicrobial concentrations (9). The key component of the inclusion

1 compounds is  $\beta$ -cyclodextrin, which creates a hydrophobic cavity that surrounds Cx.  
2 Gels containing a Cx: $\beta$ -cd inclusion compounds were shown to exhibit higher  
3 antimicrobial activity against oral microorganismal pathogens than free Cx in a long-  
4 term *in vitro* study (9). However, previous studies characterizing Cx activity provide  
5 little information regarding the mechanisms underlying microorganism-drug  
6 interactions on a nanometer scale. Understanding the structure and properties of  
7 microbial surfaces at the nanometer level is of great importance for the development of  
8 novel antimicrobial compounds.

9 *Candida* species, including *Candida albicans* (*C.a.*), are commensal organisms that  
10 proliferate when the body is out of homeostasis, leading to the development of disease.  
11 *C.a.* is almost universally described as 'dimorphic,' yet its cell morphology actually lies  
12 on a pleomorphic continuum, ranging from ovoid yeast cells to filamentous hyphae (1,  
13 11, 12, 23, 37). This yeast has developed specific mechanisms of virulence that allow  
14 them to colonize epithelial cells of the host for the purpose of invading deeper layers or  
15 influencing the body's defenses. Interestingly, exposure of *C.a.* to 0.1% Cx has been  
16 shown to cause changes in the cell wall, leading to a loss of intracellular components  
17 and aggregation of nuclear proteins (1, 12, 14, 17, 19).

18 Loftsson and Brewster (20) have shown that molecular envelopment of Cx with  $\beta$ -  
19 cyclodextrin increases the gradient concentration at the membrane site. This increase  
20 most likely occurs due to a stronger interaction between Cx:  $\beta$ -cd and the cell  
21 membrane than between Cx and the membrane. Therefore, inclusion compounds  
22 containing Cx may represent more effective microbicidal agents than pure Cx. Although  
23 data regarding the interactions between Cx inclusion compounds and biological  
24 membranes are limited, these compounds have attracted interest in many fields, as they

1 could be used to release biologically-active drugs through membrane contact in diverse  
2 tissues (31). The aim of this study was to investigate the anti-fungal activity of  
3 chlorhexidine inclusion compounds comprised of different Cx:β-cd molar ratios and to  
4 characterize the interactions of these compounds with yeast membranes using a *C.a.* as  
5 an experimental model.

## 6 **Materials and Methods**

### 7 ***Chemicals and yeast stocks***

8 Chloridrate of chlorhexidine was obtained from Ecadil<sup>®</sup> (SP, Brazil), and β-cyclodextrin  
9 from Cerestar<sup>®</sup>, Co. (Milwaukee, WI, USA). Fluconazole was obtained from Pfizer<sup>®</sup>  
10 Pharmaceuticals Group (New York, NY, USA). Sabouraud dextrose agar (SDA) and  
11 broth (SDB) were purchased from Biobras S.A<sup>®</sup> (MG, Brazil). All other materials and  
12 solvents were of analytical grade.

### 13 ***Preparation of supramolecular complexes***

14 Cx:β-cd inclusion compounds were prepared by freeze-drying of aqueous solutions of  
15 β-cyclodextrin and chlorhexidine present at different molar ratios (Cx:β-cd: 1:1, 1:2,  
16 1:3, and 1:4) following a previous report (8).

### 17 ***Antimicrobial assay***

18 Yeast cultures were grown and maintained in Sabouraud dextrose broth (SDB) and  
19 Sabouraud dextrose agar. Prior to the assay, *C.a* cells were cultured for 24 h at 34°C  
20 under aerobic conditions in SDB. Yeast cultures were then further diluted to obtain a  
21 density of  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL for inoculums. Inhibitory concentrations (IC) were  
22 determined using the macrodilution method (7). Briefly, aliquots containing 500 μL of  
23 128 μg/mL Cx or 1:1; 1:2; 1:3, 1:4 chlorhexidine:beta-cyclodextrin (Cx:β-cd) solutions

1 were serially diluted in 3.4 mL of SDB. Normalized Cx or Cx:β-cd dilutions were then  
2 inoculated with 100μL of *C.a.* inoculums . Cx alone and fluconazole (FLZ) were used  
3 as standard antimicrobial positive controls and β-cd was used as a negative control (7).  
4 Sample absorbance was measured using a standard spectrophotometer (Spectrumlamb  
5 22PC<sup>®</sup>) set to 580nm, and sample data were analyzed and compared to controls. Six  
6 replicates were analyzed for each condition, and IC values were recorded and evaluated  
7 using the non-parametric Kruskal-Wallis test. *P*-values less than 0.05 were considered  
8 significant.

### 9 ***Yeast viability assay***

10 The concentration of cells in a 0.5 μg/mL suspension was determined using a standard  
11 hemocytometer. The yeast suspension was diluted 100-fold with sterile water. Cells  
12 were then diluted in an equal volume of 0.4% trypan blue to assess the number of viable  
13 cells. Total cell counts were also performed with a hemocytometer. Calculations  
14 involving cell populations were based on viable cell counts (29).

### 15 ***SQM (Sterol Quantification Method)***

16 Total intracellular sterols were extracted using the method reported by Arthington-  
17 Skaggs et al. (2) with slight modifications. Briefly, a single *C.a.* colony from an SBD  
18 agar plate incubated overnight was used to inoculate SBD broth containing 0, 1, 2, 4, or  
19 8 μg/mL of Cx or Cx:β-cd inclusion compounds (1:1, 1:2, 1:3, 1:4). The cultures were  
20 incubated with agitation for 16 h at 34 °C. Stationary-phase cells were harvested by  
21 centrifugation at 2700 rpm in a centrifuge for 5 min and washed once with sterile  
22 distilled water. The net wet weight of the cell pellet was determined. To each pellet was  
23 added 3 mL of a 25% alcoholic potassium hydroxide solution, followed by vortexing  
24 for 1 min. Cell suspensions were incubated at 85 °C in a water bath for 1 h. Following

1 this incubation, the tubes were allowed to cool to room temperature. Sterols were then  
2 extracted by the addition of a mixture of 1 ml sterile distilled water and 3 mL *n*-heptane,  
3 followed by vigorous vortexing for 3 min. The heptane layer was transferred to a clean  
4 tube and stored at 20 °C for 24 h. Prior to analysis, a 20 µl aliquot of sterol extract was  
5 diluted five times in 100% ethanol and spectroscopically analyzed over a range of  
6 wavelengths from 240 to 300 nm. The presence of ergosterol and the late sterol  
7 intermediate 24 (28) DHE in the extracted sample resulted in a characteristic four-  
8 peaked curve. A dose-dependent decrease in the height of the absorbance peaks was  
9 evident, corresponding to decreased ergosterol concentration. Ergosterol content was  
10 calculated as a percentage of the wet weight of the cells using the following equations:

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

12  $\% 24(28) \text{ DHE} = [(A_{230} / 518) \times F] / \text{pellet weight}$

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

14 Where: *F* is the factor for dilution in ethanol and 290 and 518 are the *E* values (% / cm)  
15 determined for crystalline ergosterol and 24(28)DHE, respectively.

### 16 ***Scanning electron microscopy (SEM)***

17 SEM was used to assess cellular membrane integrity and morphologic changes caused  
18 by drug treatment. Yeast suspensions (1 mL) treated with inclusion compounds were  
19 centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and the resulting pellets were pre-fixed at 4 °C for 3  
20 h in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH: 7.2. After fixation, 5 µl  
21 aliquots of this dilution were added to a solid substrate made of mica. A contact tapping  
22 mode fluid cell was sealed against a freshly cleaved muscovite mica substrate using a  
23 silicone O-ring. Samples were dried for 7 d at 37 °C. Samples were then coated with

1 gold in a Penning sputter system in a high-vacuum chamber and observed in a field  
2 emission scanning electron microscope (model Zeiss-DSM 950). Micrographs were  
3 obtained using secondary electrons.

#### 4 **Results**

##### 5 *Antifungal activity of chlorhexidine inclusion compounds*

6 The Inhibitory Concentration (IC) data are summarized in Table 1. Cx alone exhibited  
7 robust fungicidal activity against *C.a.* with an IC value of of 2 µg/ml. However,  
8 significant differences of the 1:4 Cx inclusion compounds were found 0.5µg/mL.  
9 Similar pattern was found to 1:2 and 1:3 in the exhibited IC values of 1 µg/mL.

10 Results from cell counts of viable cells obtained using a hemocytometer were in  
11 agreement with the IC values(Table 1).. For cells treated with 0.5µg/mL Cx alone, the  
12 number of viable cells after treatment was  $3.55 \times 10^3$ . Increasing concentrations of β-  
13 cyclodextrin (Cx: β-cd 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4) led to concomitant decreases in cell  
14 viability.

##### 15 *Effects of Cx-containing compounds on sterols*

16 In order to characterize the interaction between the inclusion compounds and cellular  
17 membranes, we next explored the effects of these compounds on ergosterol synthesis.  
18 Yeast was treated for 24 hours with the compounds analyzed at concentrations  
19 equivalent to IC<sub>90</sub> values. The amount of ergosterol was quantified by  
20 spectrophotometric analysis performed by scanning over a wavelength range of 240–  
21 330 nm. Results from these experiments indicated that treatment with Cx and its  
22 inclusion compounds leads to significant reduction in ergosterol levels that was highest  
23 in the Cx: β-cyclodextrin 1:3 and 1:4 molar ratio (Fig. 1). Exposure of cells to each of

1 Cx:β-cd derivatives significantly increased this membrane leakage with greater  
2 concentrations of cyclodextrin (1:2, 1:3, 1:4). For the SQM test, groups 1:3 and 1:4  
3 showed a significant increase in ergosterol, 100% ( $3.15$  to  $3.74 \times 10^3$ ).

4 ***Scanning electron microscopy (SEM) analysis of Cx:β-cd inclusion compounds***  
5 ***interactions with membranes.***

6 SEM micrograph of Cx reveals the presence of a crystalline structure in some regions of  
7 the image (Fig. 2A). A control containing β-cyclodextrin alone (Fig.2B) also exhibited a  
8 crystalline structure. The Cx:β-cd inclusion compounds (Fig.2 C-E) with increasing  
9 ratios of cyclodextrin (1:1, 1:2, 1:3 Cx:β-cd) appeared to exhibit a gradual decreasing  
10 in crystalline character up to the 1:4 Cx:β-cd compound. The crystalline character  
11 likely predominated due to the higher β-cyclodextrin concentrations at higher ratios  
12 (Fig.2F).

13 SEM images of *C.a.* treated with Cx-containing compounds were also analyzed by  
14 SEM. Untreated *C.a.* was used as a control to assess normal yeast membrane  
15 morphology (Fig.3A). For yeast treated with Cx alone, Cx appeared to surround the  
16 yeast, binding only a membrane point (Fig. 3B). Structures resembling compounds were  
17 visualized around the yeast cellular membrane, generally near one or two break points  
18 in the membrane. Initial morphological changes in Cx-treated cells included the  
19 appearance of indentations on the surface of some cells and the presence of micelle-like  
20 structures or membrane residues found close to the cells (Fig.3C-D). Changes in the Cx  
21 inclusion compound molar ratio (1:1, 1:3, 1:4) led to slight changes in the size and  
22 shape of the taller liquid-ordered domain and the formation of various leakage points in  
23 the membrane structure (Fig. 3 C-F). In contrast, we did not observe the formations of  
24 these domains or multiple leakage points in the positive control treated with Cx alone



1 (Fig. 3B). Addition of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cx:  $\beta$ -cd compounds to *C.a.* led to dramatic changes in  
2 membrane structure. In these samples, the *C.a* membrane domains and inclusion  
3 compounds coalesced into larger, less rounded domains (Fig. 3E-F). These observations  
4 suggest that the cell begins to lose its characteristic shape, allowing leakage of  
5 intracellular exudates following treatment with Cx: $\beta$ -cd inclusion compounds (Fig. 3 C-  
6 F) ( 10, 18, 33).

## 7 **Discussion**

8 In recent years, cyclodextrins (CD) have been used as tools to manipulate the lipid  
9 composition of biological and model membranes (25). The CD molecules have a  
10 hydrophilic outer surface and a hydrophobic inner core, thus they can form inclusion  
11 complexes by binding small amphiphilic molecules into their core.  $\beta$ -cyclodextrins are  
12 known to be very efficient sterol acceptor molecules, apparently because their inner  
13 hydrophobic cavity matches the size of the sterol molecule (16, 24, 26, 30). Cholesterol  
14 can be removed from cells by extraction into small unilamellar vesicles (4, 5, 6).

15 In this study the results indicate that there are significant differences in the inhibitory  
16 effect on *C.a* of the tested lowly concentrated chlorhexidine inclusion compounds  
17 solutions. Increasing amounts of  $\beta$ -cyclodextrin in the inclusion compound molar ratio  
18 led to an augment in antifungal activity. The more potent activity of 1:4 Cx: $\beta$ -cd can be  
19 explained by the observed more efficient adhesion from these compound with the  
20 membrane than from corresponding free Cx or  $\beta$ -cd cyclodextrin.

21 The 1:4 inclusion compound solutions lead to a distinct reduction of four-fold on *C.a*  
22 growth (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). This effect could not be achieved with the Cx alone in present  
23 study. Moreover, results from cell counts of viable cells were in agreement with the IC  
24 values. It has been shown that *C.a* can be suppressed effectively for Cx: $\beta$ -cd 1:4 after

1 treatment with lowly concentrated solutions. The observed antifungal activity of Cx  
2 alone on *C.a.* was consistent with previous reports (14), which related that Cx was able  
3 to inhibit *C.a.* at 2.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

4 The effects of these compounds on ergosterol extraction shown a greatest reduction in  
5 ergosterol was observed in cells treated with Cx: $\beta$ -cd 1:4, suggesting that this  
6 compound may represent the most potent of all of the solutions analyzed. The antibiotic  
7 molecules must compete with phospholipids in order to interact with cholesterol and  
8 form pores. Thus, the toxicity of these antibiotics is decreased in human cells (21, 28).

9 The SEM images shown the exposure of cells to Cx: $\beta$ -cd compounds containing  
10 increasing amounts of  $\beta$ -cyclodextrin led to significant increases in *C. albicans*  
11 membrane leakage. These results indicate that addition of  $\beta$ -cyclodextrin would likely  
12 increase leakage of ergosterol from *C.a.*, a phenomenon which may lead to depletion of  
13 cellular amino acids and render the membrane unstable (28, 36). The binding energy  
14 originates from the intrinsic chemical affinity, primarily due to hydrophobic interactions  
15 and electrostatic contributions (19, 21, 33, 34).

16 In general, water structures found at membrane surfaces are strongly affected by the  
17 ability of the surface to form hydrogen bonds (20, 33). Moreover, hydrophilic  
18 cyclodextrins can only enhance drug delivery although cyclodextrins can act as  
19 structure breaker; their main effect is to increase the concentration gradient of drug  
20 leading to more rapid drug delivery to the membrane surface.

21 Dennison et al (10) found that differences among membrane bonding mechanisms  
22 appear to depend upon the relative composition, stability and lipid-packing  
23 characteristics of the target yeast membrane. The activity of the inclusion compound

1 was demonstrated in previous studies (8, 9). The work presented here indicates that  
2 compounds derived from Cx: $\beta$ -cd exhibit antifungal activity.

3 We have shown that extraction of sterol increased with rising concentrations of  
4 cyclodextrin. The cholesterol content of the host cell membrane plays a particularly  
5 important role in the potential of agents to perturb the membrane, the eukaryotic  
6 membrane contain cholesterol and can therefore not be permeabilized, whereas drugs is  
7 able to bind to lipid rafts from where the protein is taken up via endocytosis (2, 3). The  
8 cholesterol-free composition of the prokaryotic membrane is crucial integrity of yeast  
9 leading to permeabilization. This observation provides important information for  
10 understanding the function and mechanism of action of positively-charged antimicrobial  
11 agents and how they interact with eukaryotic and prokaryotic cell membranes.

12 Modifications of the plasma membrane lipid composition can affect the capacity of cells  
13 to fuse with model membranes to different degrees. Potentially, variations in membrane  
14 lipid composition could be revealed as a factor that modulates membrane fusogenic  
15 capacity and affects membrane and cellular pathology. Recent evidence suggests that  
16 lipid rafts can serve as docking sites for a broad range of pathogens, including viruses  
17 and bacteria (27).

18 Release of Cx from Cx: $\beta$ -cd could induce lipid damage through intracellular exudation,  
19 resulting in deleterious effects on the microorganism membrane. In this study we found,  
20 however, that the  $\beta$ -cyclodextrin has an important effect on the interaction mechanism  
21 between *C.a* and Cx: $\beta$ -cd nanoaggregates, which form a cluster-like structure with the  
22 yeast cell membrane. These novel results demonstrate that  $\beta$ -cyclodextrin increases the  
23 interaction between Cx and the yeast membrane due to enlarged molecular affinity for  
24 the membrane.

1 In conclusion, nanoaggregates of chlorhexidine-cyclodextrin inclusion compounds act  
2 blocking yeast growth by extraction of ergosterol permeabilizing the membrane.

### 3 **Acknowledgements**

4 We are grateful for CAPES, FAPEMIG, INCT/Nanobiofar that support this research.

### 5 **References**

- 6 1. Anil, S.; Ellepola, A.N.B; Samaranayake, L.P. (2001). The impact of chlorhexidine  
7 gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis.*  
8 7 (2), 119-122.
- 9 2. Arthington-Skaggs, B.A.; Jradi, H.; Desai, T.; Morrison, C.J. (1999). Quantitation of  
10 ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of  
11 *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 37 (10), 3332-3337.
- 12 3. Barman, H.; Walch, M.; Latinovic-Golic, S.; Dumrese, C.; Dolder, M.; Groscurth, P.;  
13 Ziegler, U. (2006). Cholesterol In negatively charged lipid bilayers modulates the effect  
14 of the antimicrobial protein granulysin. *J. Membr. Biol.* 212 (1), 29-39.
- 15 4. Bittman, R.; Clejan, S.; Hui, SW. (1990). Increased rates of lipid exchange between  
16 *Mycoplasma capricolum* membranes and vesicles in relation to the propensity of  
17 forming nonbilayer lipid structures. *J. Biol. Chem.* 265(25):15110-7.
- 18 5. Clejan, S.; Bittman, R. (1984a). Kinetics of cholesterol and phospholipid exchange  
19 between *Mycoplasma gallisepticum* cells and lipid vesicles. Alterations in membrane  
20 cholesterol and protein content. *J. Biol. Chem.* 259(1):441-448.
- 21 6. Clejan, S.; Bittman R. (1984). Decreases in rates of lipid exchange between  
22 *Mycoplasma gallisepticum* cells and unilamellar vesicles by incorporation of  
23 sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* 259(17):10823-10826.

- 1 7. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). (2005). Reference method for  
2 broth dilution Antifungal susceptibility testing of yeast: Approved standards. Document  
3 CLSI M27-A2, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 4 8. Cortés, M.E.; Sinisterra, R.D.; Ávila-Campos, M.J.; Tortamano, N.; Rocha, R.G.  
5 (2001). The chlorhexidine:beta-cyclodextrin inclusion compound: preparation,  
6 characterization and microbiological evaluation. *J. Inclus. Phenom. Macrocyc. Chem.*  
7 40 (15), 297-302.
- 8 9. Denadai, A.M.L.; Teixeira, K.I.R.; Santoro, M.M.; Pimenta, A.M.C; Cortés, M.E.;  
9 Sinisterra, R.D. (2007). Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective  
10 Carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr. Res.* 342 (15), 2286-2296.
- 11 10. Dennison, S.R.; Morton, L.H.G.; Frederick, H.; Phoenix, D.A. (2008). The  
12 impact of membrane lipid composition on antimicrobial function of an  $\alpha$ -helical  
13 peptide. *Chem. Phys. Lipids.* 151 (2), 92-102.
- 14 11. Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. (2003). Management of Candida species  
15 infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* 3 (12), 772-785.
- 16 12. Ellepola, A.N.B; Samaranayake, L.P. (2001). Adjunctive use of a chlorhexidine in  
17 oral candidoses: review. *Oral Dis.* 7 (1), 11-17.
- 18 13. Gianelli, M.; Chellini, F.; Margheri, M.; Tonelli, P.; Tani, A. (2008). Effect of  
19 chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultra structural  
20 investigation. *Toxicol. In vitro.* 22 (2), 308-317.
- 21 14. Giuliana, G.; Pizzo, G.; Milici, M.; Giangreco, R. (1999). In vitro activities of  
22 antimicrobial agents against Candida species. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral*  
23 *Radiol. Endod.* 87 (1), 44-49.

- 1 15. Hidalgo, E.; Dominguez, C. (2001). Mechanisms underlying chlorhexidine-induced  
2 citotoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 15(4-5), 271-276.
- 3 16. Irie, T.; Fukunaga, K.; Pitha, J. (1992). Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral  
4 use. I: lipid dissolution and effects on lipid transfers in vivo. *J. Pharm. Sci.* 81 (6): 521-  
5 523.
- 6 17. Kadir, T.; Gümrüm, B.; Uygun-Can, B. (2007). Phospholipase activity of *Candida*  
7 *albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine  
8 gluconate on phospholipase production. *Arch. Oral Biol.* 52 (7), 691-696.
- 9 18. Komljenovic, I.; Marquardt, D.; Harroun, T.A.; Sternin, E. (2010). Location of  
10 chlorhexidine in DMPC model membranes: a neutron diffraction study. *Chem. Phys.*  
11 *Lipids.* 163 (6), 480-487.
- 12 19. Lin, D.M.; Kalachandra, S.; Yaliyaparambil, J.; Offenbacher, S. (2003). A  
13 polymeric device for delivery of antimicrobial and anti-fungal drugs in the oral  
14 environment: effect of temperature and medium on the rate of drug release. *Dent.*  
15 *Mater.* 19 (7), 589-596.
- 16 20. Loftsson, T.; Brewster, M.E. (2008). Physicochemical properties of water and its  
17 effect on drug delivery: a commentary. *Int. J. Pharm.* 354 (1-2), 248-54.
- 18 21. Miñones-Jr, J.; Pais, S.; Miñones, J.; Conde, O.; Latka, P.D. (2009). Interactions  
19 between membrane and phospholipids in model mammalian and fungi cellular  
20 membranes- a Langmuir monolayer study. *Biophys. Chem.* 140 (1-3), 69-77.
- 21 22. Nunez, L.; Moretton, J. (2007). Disinfectant- resistant bacteria in Buenos Aires city  
22 hospital wastewater. *Braz. J. Microbiol.* 38 (4), 644-648.

- 1 23. Odds, F.C. (2000). Pathogenic fungi in the 21<sup>st</sup> century. *Trends Microbiol.* 8 (5),  
2 200-201.
- 3 24. Ohtani, H.; Wilson, R. J.; Chiang, S.; Mate C. M. (1988). Scanning Tunneling  
4 Microscopy Observations of Benzene Molecules on the Rh(111)-(3 × 3) (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> + 2CO).  
5 *Phys. Rev. Lett.* 60, 2398–2401.
- 6 25. Ohvo, H.; Olsio, C.; Slotte, J. P. (1997). Effects of sphingomyelin and  
7 phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux from  
8 cultured fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1349:131–141.
- 9 26. Ohvo, H.; Slotte, J. P. (1996). Cyclodextrin-mediated removal of sterols from  
10 monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate.  
11 *Biochemistry.* 35:8018–8024.
- 12 27. Pankov, R.; Markovska, T.; Antonov, P.; Ivanova, L.; Momchilova, A. (2006). The  
13 plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model  
14 membranes. *Chem. Biol. Interact.* 164 (3), 167-173.
- 15 28. Parks, L.W.; Casey, W.M. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis  
16 in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 95-116.
- 17 29. Pfaller, M.A.; Burmeister, L.; Bartlett, M.S.; Rinaldi, M.G. (1988). Multicenter  
18 evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.* 26 (8),  
19 1437-1441.
- 20 30. Pitha, J.; Irie, T.; Sklar, P.B.; Nye, J.S. (1988). Drug solubilizers to aid  
21 pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43(6):493–502.

- 1 31. Prabaharan, M.; Jayakuma, R. (2009). Chitosan-graft beta-cyclodextrin scaffolds  
2 with controlled drug release capability for tissue engineering applications. *Int. J. Biol.*  
3 *Macromol.* 44 (4), 320-325.
- 4 32. Pusateri, C.R.; Monaco, E.A.; Edgerton, M. (2009). Sensitivity of *Candida*  
5 *albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and  
6 chlorhexidine. *Arch. Oral Biol.* 54 (6), 588-594.
- 7 33. Shaw, J.E.; Epand, R.F.; Hsu, J.C.Y.; Mo, G.C.H.; Epand, R.M.; Yip, C.M. (2008).  
8 Cationic peptide-induced remodeling of model membranes: Direct visualization by *in*  
9 *situ* atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 162 (1), 121-38.
- 10 34. Tanida, T.; Okamoto, T.; Ueta, E.; Yamamoto, T.; Osaki, T. (2006). Antimicrobial  
11 peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux  
12 of ATP from *Candida* cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (1), 94-103.
- 13 35. Teixeira, K.I.R.; Cortés, M.E. (2005). Estado actual de la indicación de  
14 antimicrobianos para la medicación intracanal. *Acta Odontol. Venez.* 43(2), 177-180.
- 15 36. Thati, B.; Noble, A.; Rowan, R.; Criaven, B.S.; Walsh, M.; McCann, M.; Egan, D.;  
16 Kavanagh, K. (2007). Mechanism of action of coumarin and silver (I) -coumarin  
17 complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol. in vitro.* 21 (5), 801-  
18 808.
- 19 37. Traboulsi, R.S.; Mukherjee, P.K.; Ghannoum, M.A. (2008). *In vitro* activity of  
20 inexpensive topical alternatives against *Candida spp* isolated from the oral cavity of  
21 HIV infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31(3), 272-276.
- 22



- 1 Table 1. Inhibition concentration of Cx and Cx:β-cd inclusion compounds (1:1; 1:2; 1:3;  
2 1:4) against *Candida albicans* and viable cell counting.

Groups	IC (μg/mL)	IC (mol/L)	Cell viability
<b>Chlorhexidine chlorhydrate</b>	2 μg/mL	(3.46 x 10 <sup>-6</sup> mol/L)	3.55x 10 <sup>3</sup>
<b>Chlorhexidine:β-cd 1:1</b>	2 μg/mL	(3.46 x 10 <sup>-6</sup> mol/L)	0.87 x 10 <sup>3</sup>
<b>Chlorhexidine:β-cd 1:2</b>	1μg/mL	(1.73 x 10 <sup>-6</sup> mol/L)	0.32 x 10 <sup>3</sup>
<b>Chlorhexidine:β-cd 1:3</b>	1 μg/mL	(1.73 x 10 <sup>-6</sup> mol/L)	0.32 x 10 <sup>3</sup>
<b>Chlorhexidine:β-cd 1:4</b>	0.5 μg/mL*	(8.65 x 10 <sup>-7</sup> mol/L)	0.07 x 10 <sup>3</sup>
<b>Fluconazole</b>	19 μg/mL	(3.28 x 10 <sup>-7</sup> mol/L)	4.25x 10 <sup>3</sup>
<b>β-cd</b>			8.88x 10 <sup>3</sup>
<b>C.a</b>			9.30x 10 <sup>3</sup>

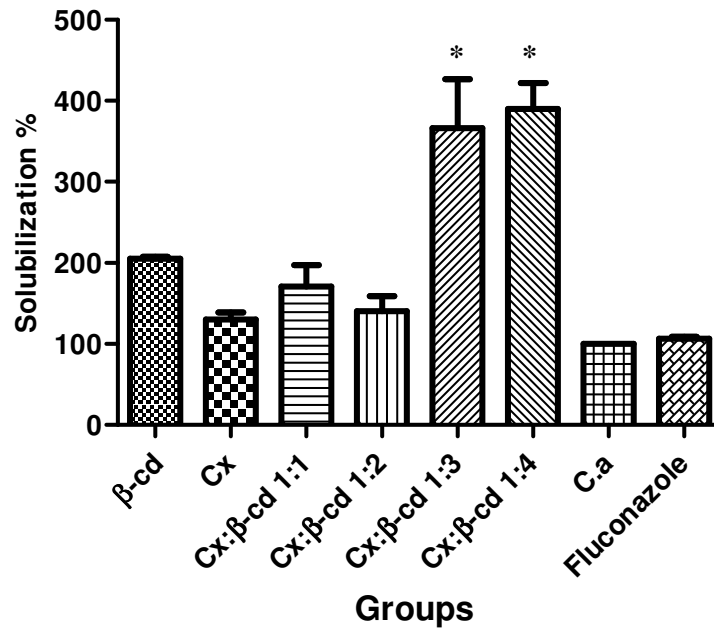
3 *P*<0.01 significance level

4

5

1 Figure 1. Percentage of solubilization of *Candida albicans* membrane treated with  
2 Chlorhydrate of Chlorhexidine, Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1, 1:2, 1:3, 1:4; β-  
3 cyclodextrin and Fluconazole.

4



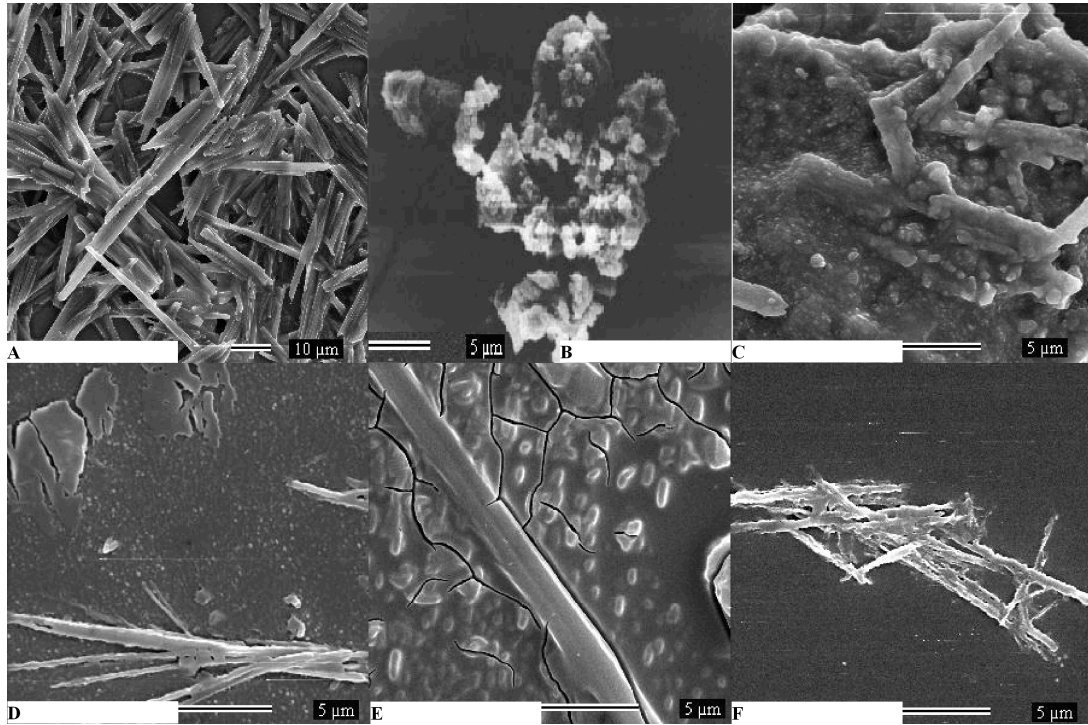
5

6

7

8

9



1

2

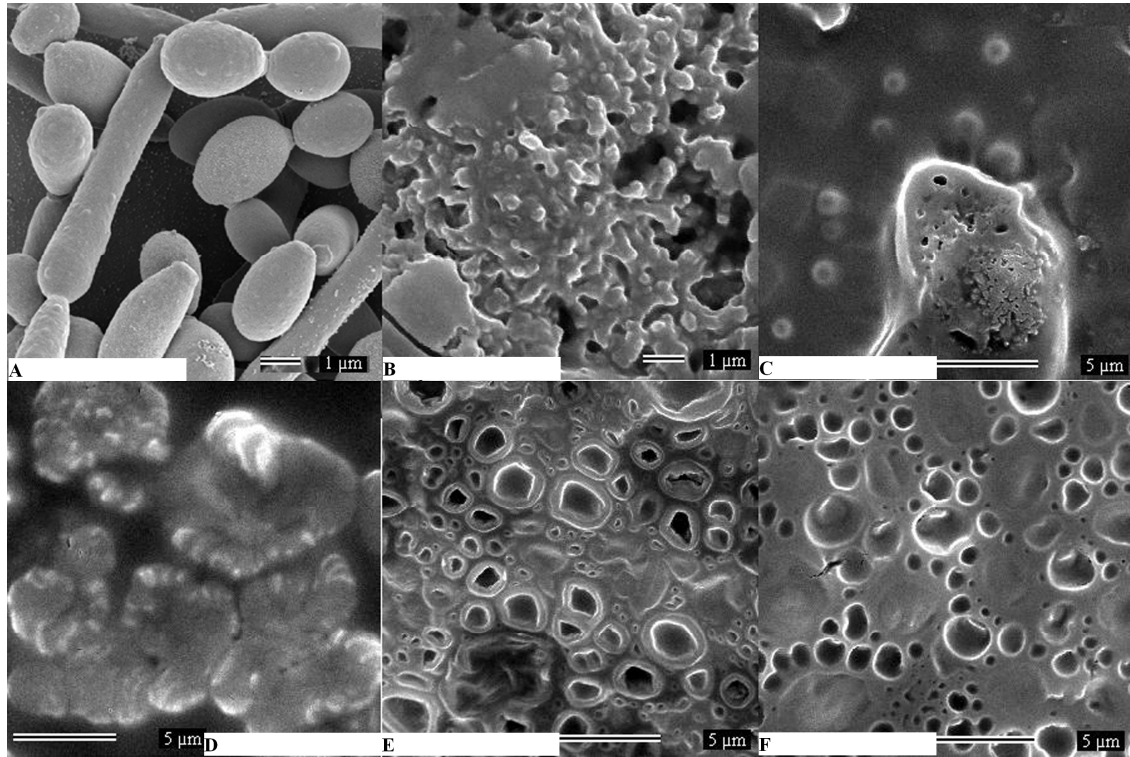
3

4 **Figure 2-** SEM micrographs of Chlorhexidine Chlorhydrate (A), Beta-cyclodextrin (B),

5 Chlorhexidine:beta-cyclodextrin 1:1(C), 1:2 (D), 1:3(E), 1:4(F).

6

7



1

2

3

4 **Figure 3-** SEM micrographs of *Candida albicans* untreated (A) and C.a cells treated  
5 with Chlorhydrate Chlorhexidine (B), Chlorhexidine:β-cyclodextrin 1:1(C), 1:2 (D), 1:3  
6 (E), 1:4 (F).

7

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology in Vitro  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Selective Toxicological and antimicrobial effect of chlorhexidine by cyclodextrin addition: in vitro

Article Type: Research Paper

Section/Category: Mechanisms

Keywords: cyclodextrin; chlorhexidine; antimicrobial; toxicological; cytotoxicity

Corresponding Author: Dr Maria Esperanza Cortés, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Karina I Teixeira, Ph.D student

Order of Authors: Karina I Teixeira, Ph.D student; Angelo M Denadai, Ph.D ; Rubén D Sinisterra, Ph.D ; Maria Esperanza Cortés, Ph.D

**Abstract:** The current study was designed to assess the ability of chlorhexidine (Cx): cyclodextrins (Cd) complexes to target specifically the eukaryotic and prokaryotic membrane. To further explore the influence of the addition of  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd of the complexes in the specificity, in vitro studies were conducted increasing cyclodextrin molar rate against oral pathogens and the solubilization of ergosterol was also investigated. The antimicrobial activity of the complexes showed that Cx: $\alpha$ -Cd complex was more efficient to inhibit C.a; Cx: $\beta$ -Cd for A.a and Cx:Hp- $\beta$ -Cd for S.m. The ergosterol solubilization analysis revealed highest values with 1:3 and 1:4  $\alpha$ -Cd complexes. The viability assays of different cells were used to assess in vitro cytotoxicity. The inclusion complexes also decreased selectively the cytotoxicity of Cx been  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd less cytotoxic in a dose dependent manner in fibroblast than  $\alpha$ -Cd, whereas Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes had no effect to high cytotoxic effects on Caco-2 cells in a dose-dependent. In general the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd increase the Cx antimicrobial activity and has specific-cells effect. Thus, is that cyclodextrin provide a unique tool to modulate cellular cholesterol in membranes and cytotoxicity, this characteristic could be used for designed different formulations with cyclodextrin favoring a selective activity.

April, 09, 2012

**Editor-in-Chief: Daniel Acosta**

**Toxicology in vitro**

Dear Editor,

We are sending an electronic copy of the manuscript "**Selective Toxicological and antimicrobial effect of chlorhexidine by cyclodextrin addition: in vitro**" of Karina Imaculada Rosa Teixeira, Angelo Marcio Leite Denadai, Ruben Darío Sinisterra and Maria Esperanza Cortés. This is a relevant study to know the antimicrobial mechanisms of cyclodextrin slow delivery system. The novel results obtained in the present manuscript suggest that the inclusion in cyclodextrin enhanced the antimicrobial activity of chlorhexidine; our results showed that different cds at different molar ratio were able to interact in distinct forms with cells. When compare the cytotoxicity of different cyclodextrin inclusion compound, we observed that enhanced de concentration of cyclodextrin the compounds were more effective and presents less cytotoxicity. Moreover, many studies related slow delivery system using cyclodextrin, however its important study this interaction with different cellular types.

Kind Regards,

Maria Esperanza Cortés

Associated Professor

Restorative Dentistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais.

Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270901.

Belo Horizonte, Brazil;

phone 55-31-34092437

fax: 55-31-34092430;

e-mail: [mecortes@ufmg.br](mailto:mecortes@ufmg.br)

Toxicology in vitro: < 0887-2333> P-copyright-v17/2010

<COPYRIGHT OWNER>

(hereinafter the “Copyright Owner”)

**JOURNAL PUBLISHING AGREEMENT**

**PLEASE PROVIDE US WITH THE FOLLOWING INFORMATION, REVIEW OUR POLICIES AND THE PUBLISHING AGREEMENT, AND INDICATE YOUR ACCEPTANCE OF THE TERMS**

Article entitled: **Selective Toxicological and antimicrobial effect of chlorhexidine by cyclodextrin addition: in vitro**

Corresponding author: professor, Maria Esperanza Cortés

To be published in the journal: Internatinal Journal of Pharmaceutics

**YOUR STATUS (PLEASE MARK ALL THAT APPLY)**

**I am the sole author of the manuscript**

Please indicate if any of the below also apply to you:

I am a UK Government employee electing to transfer copyright

I am a UK, Canadian or Australian Government employee and Crown Copyright is claimed

I am a US Government employee and there is no copyright to transfer

I am a contractor of the US Government under contract number:

.....

**(X) I am one author signing on behalf of all co-authors of the manuscript**

Please indicate if any of the below also apply to you and your co-authors:

We are all US Government employees and there is no copyright to transfer

I am a US Government employee but some of my co-authors are not

I am not a US Government employee but some of my co-authors are

The work was performed by contractors of the US Government under contract number:

.....

We are all UK Government employees electing to transfer copyright

We are all UK, Canadian or Australian Government employees and Crown Copyright is claimed

I am claiming Crown Copyright but some of my co-authors are not employees of the UK, Canadian or Australian Government

I am not claiming Crown Copyright but some of my co-authors are employees of the UK, Canadian or Australian Government

**The article is a ‘work made for hire’ and I am signing as an authorized representative of my employer**

**Name and job title of assignee if different from Corresponding Author:**

.....

Please indicate if any of the below also apply to you:

The article is authored by US Government employees and there is no copyright to transfer

The work was performed by contractors of the US Government under contract number:

.....

The article is authored by UK, Canadian or Australian Government employees and Crown Copyright is claimed

**DATA PROTECTION & PRIVACY**

I understand that staff of International Journal of Pharmaceutics and the publisher and its affiliated companies worldwide] [if copyright owner = Elsevier: <Name copyright company> and its affiliated companies worldwide] [if copyright owner = joint: <Society name>, <Name copyright company> and its affiliates worldwide] will be contacting me concerning the publishing of the Article and occasionally for marketing purposes (unless, with respect to such marketing, I tick the box below).

I do not wish to receive news, promotions and special offers about products and services of [if copyright owner = society: <Society name> and the publisher and its affiliated companies worldwide] [if copyright owner = Elsevier: <Name copyright company> and its affiliated companies worldwide] [if copyright owner = joint: <Society name>, <Name copyright company> and its affiliates worldwide]

Please tick **one or more** of the above boxes (as appropriate), review the publishing agreement and definitions, and then sign and date the document in black ink.

*Maria Esperanza Cortés*

Name printed: **Maria Esperanza Cortés**

Universidade Federal de Minas Gerais

Dentistry Faculty

Restorative Dentistry Departure

Av: Antonio Carlos, 6627- Belo Horizonte 31270-901

Minas Gerais- Brasil Code: 55

Email: mecortes@ufmg.br

Date: april, 09, 2012



## **THE PUBLISHING AGREEMENT**

### Assignment of publishing rights

I hereby assign to the Copyright Owner the copyright in the manuscript identified above (government authors not electing to transfer agree to assign an exclusive publishing and distribution license) and any supplemental tables, illustrations or other information submitted therewith that are intended for publication as part of the manuscript (the “Article”) in all forms and media (whether now known or hereafter developed), throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, effective when and if the article is accepted for publication. This transfer includes the right to provide the Article in electronic and online forms and systems. With respect to supplemental data that I wish to make accessible through a link in the Article, I hereby grant a non-exclusive license for such linking. If I have agreed with the Copyright Owner to make available such supplemental data on a site or through a service of the Copyright Owner, I hereby grant a non-exclusive license for such publication, posting and making available, and further permit indexing and archiving.

Articles may sometimes be accepted for publication but later rejected in the publication process, even in some cases after public posting in “Articles in Press” form, in which event all rights will revert to the author (see <http://www.elsevier.com/locate/withdrawalpolicy>).

### Revisions and addenda

I understand that no revisions, additional terms or addenda to this Agreement can be accepted without the Copyright Owner’s express written consent.

*Note:* authors at institutions that place restrictions on copyright assignments or that assert an institutional right to distribute or provide access to the works of institutional authors, must obtain an express waiver from those institutions releasing the author from such restrictions to enable the acceptance of this publishing agreement.

### Retention of Rights for Scholarly Purposes(see Definitions below)

I understand that I retain or am hereby granted (without the need to obtain further permission) the Retained Rights (see description below and definitions), and that no rights in patents, trademarks or other intellectual property rights are transferred to the Copyright Owner.

The Retained Rights include:

- the right to use the Preprint or Accepted Author Manuscript for Personal Use, Internal Institutional Use and for Permitted Scholarly Posting; and
- the right to use the Published Journal Article for Personal Use and Internal Institutional Use,

but in each case as noted in the Definitions excluding Commercial Use or Systematic Distribution (unless expressly agreed in writing by the Copyright Owner).

### Author Representations/Ethics and Disclosure

I affirm the Author Representations noted below, and confirm that I have reviewed and complied with the relevant Instructions to Authors, Ethics in Publishing policy, and Conflicts of Interest disclosure. Please note that some journals may require that all co-authors sign and submit Conflicts of Interest disclosure forms. I am also aware of the publisher's policies with respect to retractions and withdrawal (<http://www.elsevier.com/locate/withdrawalpolicy>).

For further information see the publishing ethics page at <http://www.elsevier.com/publishingethics> and the journal home page.

#### *Author representations*

- The article I have submitted to the journal for review is original, has been written by the stated authors and has not been published elsewhere.
- The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under review by this journal.
- The article contains no libellous or other unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights of any other person or entity.
- I have obtained written permission from copyright owners for any excerpts from copyrighted works that are included and have credited the sources in my article.
- If I am using any personal details or images of patients or research subjects, I have obtained written permission or consent from the patient (or, where applicable, the next of kin). See <http://www.elsevier.com/patientphotographs> for further information.
- If the article was prepared jointly with other authors, I have informed the co-author(s) of the terms of this publishing agreement and that I am signing on their behalf as their agent, and I am authorized to do so.

#### Funding agency and sponsorship options

The publisher posts information on funding agencies and arrangements that the publisher has made with such bodies at I understand that documents can be downloaded from this site to help me comply with certain agency requirements. Information can also be found at <http://www.elsevier.com/sponsoredarticles> concerning sponsorship options and rights issues concerning publication-fee model journals (information can also be found on the journal home page). <http://www.elsevier.com/fundingbodyagreements>.

For information on the publisher's copyright and access policies, please see

<http://www.elsevier.com/copyright>. Our reference: <Journal code> <Item nr> P-copyright-v17/2010

## **DEFINITIONS**

### **Accepted Author Manuscript (“AAM”)**

Author’s version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs should not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting and (if relevant) pagination, and should include the Appropriate Bibliographic Citation and a link to the final publication (generally through the relevant DOI).

### **Appropriate Bibliographic Citation**

Authors posting Accepted Author Manuscript online should later add a citation for the Published Journal Article indicating that the Article was subsequently published, and may mention the journal title provided they add the following text at the beginning of the document:

*“NOTICE: this is the author’s version of a work that was accepted for publication in <Journal title>. Changes resulting from the publishing process, such as peer review, editing, corrections, structural formatting, and other quality control mechanisms may not be reflected in this document. Changes may have been made to this work since it was submitted for publication. A definitive version was subsequently published in PUBLICATION, [VOL#, ISSUE#, (DATE)] DOI#”*

### **Commercial Use**

The use or posting of articles for commercial gain or to substitute for the services provided directly by the journal including:

- the posting by companies of their employee-authored works for use by customers of such companies (e.g. pharmaceutical companies and physician-prescribers); and
- commercial exploitation such as directly associating advertising with such posting or the charging of fees for document delivery or access.

### **Internal Institutional Use**

Use by the author’s institution for classroom teaching at the institution (including distribution of copies, paper or electronic, and use in coursepacks and courseware programs) for scholarly purposes. For authors employed by companies, the use by that company for internal training purposes.

### **Personal Use**

Use by an author in the author’s classroom teaching (including distribution of copies, paper or electronic), distribution of copies to research colleagues for their personal use, use in a subsequent compilation of the author’s works, inclusion in a thesis or dissertation, preparation of other derivative works such as extending the article to book-length form, or otherwise using or re-using portions or excerpts in other works (with full acknowledgment of the original publication of the article).

### **Permitted Scholarly Posting**

Voluntary posting of AAMs or Preprints by an author on open Web sites operated by the author or the author’s institution for scholarly purposes, as determined by the author, or (in connection with

Preprints) on preprint servers, but not for Commercial Use or Systematic Distribution. The author should include the Appropriate Bibliographic Citation when posting AAMs. Deposit in or posting to subject-oriented or centralised repositories (such as PubMed Central), or institutional repositories with mandates for systematic postings, is permitted only under specific agreements between the publisher and the repository, agency or institution, and only consistent with the Copyright Owner's policies concerning such repositories. To learn more about the publisher's policies and agreements with such agencies or institutions go to <http://www.elsevier.com/fundingbodyagreements>.

### **Preprint**

Author's own write-up of research results and analysis that has not been refereed, nor had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copy editing, and the like).

### **Published Journal Article**

The definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publisher activities including copy-editing, formatting and (if relevant) pagination.

### **Systematic Distribution**

Policies or other mechanisms designed to aggregate and openly disseminate manuscripts or articles, or to substitute for journal-provided services, including:

- the systematic distribution to others via e-mail lists or listservers (to parties other than known colleagues), whether for a fee or for free;
- the posting of links to sponsored articles by commercial third parties including pharmaceutical companies;
- institutional, funding body or government manuscript posting policies or mandates that aim to aggregate and openly distribute the accepted, peer reviewed manuscripts or published journal articles authored by its researchers or funded researchers; and
- subject repositories that aim to aggregate and openly distribute accepted peer reviewed manuscripts or published journal articles authored

1 **Selective Toxicological and antimicrobial effect of chlorhexidine by cyclodextrin**  
2  
3 **addition: in vitro**  
4

5 K. I. R. Teixeira<sup>1</sup>, A.M.L. Denadai<sup>2</sup>, R. D. Sinisterra<sup>3</sup>, M.E. Cortés<sup>1</sup>  
6

7  
8 <sup>1</sup>Dentistry Faculty, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)  
9

10 <sup>2</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG)  
11

12 <sup>3</sup>Chemistry Department, Exact Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais  
13  
14 (UFMG)  
15  
16  
17  
18  
19

20 \*Autor for correspondence: e-mail: [mecortes@ufmg.br](mailto:mecortes@ufmg.br)  
21

22 Universidade Federal de Minas Gerais  
23

24 Dentistry Faculty, Restorative Dentistry,  
25

26 Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.  
27

28 CEP: 31270-901,  
29

30 Phone: 55-31-34092437, Fax: 55-31-3409-2430  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1       **Abstract**  
2  
3

4       The current study was designed to assess the ability of chlorhexidine (Cx): cyclodextrins (Cd)  
5  
6       complexes to target specifically the eukaryotic and prokaryotic membrane. To further explore  
7  
8       the influence of the addition of  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd of the complexes in the specificity,  
9  
10       in vitro studies were conducted increasing cyclodextrin molar rate against oral pathogens and  
11  
12       the solubilization of ergosterol was also investigated. The antimicrobial activity of the  
13  
14       complexes showed that Cx: $\alpha$ -Cd complex was more efficient to inhibit *C.a*; Cx: $\beta$ -Cd for *A.a*  
15  
16       and Cx:Hp- $\beta$ -Cd for *S.m*. The ergosterol solubilization analysis revealed highest values with  
17  
18       1:3 and 1:4  $\alpha$ -Cd complexes. The viability assays of different cells were used to assess *in vitro*  
19  
20       cytotoxicity. The inclusion complexes also decreased selectively the cytotoxicity of Cx been  
21  
22        $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd less cytotoxic in a dose dependent manner in fibroblast than  $\alpha$ -Cd, whereas  
23  
24       Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes had no effect to high cytotoxic effects on Caco-2 cells in a  
25  
26       dose-dependent. In general the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and Hp- $\beta$ -Cd increase the Cx antimicrobial activity and  
27  
28       has specific-cells effect. Thus, is that cyclodextrin provide a unique tool to modulate cellular  
29  
30       cholesterol in membranes and cytotoxicity, this characteristic could be used for designed  
31  
32       different formulations with cyclodextrin favoring a selective activity.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43       **KEYWORDS:** cyclodextrin; chlorhexidine; antimicrobial; toxicological; cytotoxicity  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1. Introduction

The design of slow delivery systems with cyclodextrin involves selective molecular combination between host and guest. Among all host potential molecules for drug formulations, the cyclodextrins (Cds) seem to be important ones because of their capacity of guest different molecules altering the properties of the drug included (Loftsson et al., 2004). The cyclodextrins molecules have a hydrophilic outer surface and a hydrophobic inner core, which allows forming inclusion complexes by binding small amphiphilic molecules into their core (Abdelwahed et al., 2008; Zheng et al., 2001; Liu & Guo, 2002).

Based on this architecture, the primary hydroxyl groups are located on the narrow side of the torus while the secondary hydroxyl groups are located on the wider edge (Loftsson and Brewstern, 1996). The most common cyclodextrins are  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin, and  $\gamma$ -cyclodextrin, which consist of six, seven, and eight glucopyranose units, respectively. Cyclodextrins, such as (2-hydroxypropyl)-  $\beta$ - cyclodextrin, have been used specially to solubilize the drug in aqueous and as a parenteral (iv) excipient for drugs (Loftsson and Brewstern, 1996).

Cyclodextrin (Cd) complexation represents an effective strategy for improving macromolecular drug therapy by stabilizing them against aggregation, thermal denaturation and degradation. Macromolecular drugs can be partially complexed by Cds via their hydrophobic side chains and Cds' ability to sequester hydrophobic moieties helps in improving the stability of drugs. In forming the complex, the physicochemical and biological properties of the drug can be altered to effect an advantage. Additionally, Cds are known to enhance solubility of the incorporated drug to act as permeation enhancers for macromolecular drugs and to inhibit the activity of certain proteases. However, the clinical exploitation of Cds has been restricted mainly due to perturbing the membrane fluidity to lower the barrier function (Uekama et al, 1999).

1 The toxicities of Cds are dependent on their route of administration (Davis and Brewster,  
2 2004). The renal toxicity of  $\alpha$ -Cd and  $\beta$ -Cd after parenteral administration (Frank et al., 1976)  
3 as well as problems with a number of modified Cds have been well documented (Irie and  
4 Uekama, 1997; Stella and He, 2008). The toxicological effects of Cds are associated mainly to  
5 inclusion complexation with cholesterol and membrane lipids (Ohvo-Rekila et al., 1997).  
6 These molecules have a potential catalytic effect for lipid transport; the coupling of  
7 cyclodextrins with lipid emulsions could enhance lipid transport. For Cds to be  
8 pharmaceutically useful, they must be biocompatible. The high efficiency of the cyclodextrin  
9 is probably a function of its small relative size with compared with cellular membranes, which  
10 allows large numbers of cyclodextrin molecules to directly approach of them (Mesmin &  
11 Maxfield, 2009). The location of cyclodextrin molecules near the surface of the cell allows  
12 solubilization of cholesterol from biological membrane to desorb directly into the  
13 hydrophobic core of the cyclodextrin without entering into the aqueous phase (Atger et al.,  
14 1997; Besenicar et al., 2008).

15 Chlorhexidine (Cx) is considered the gold standard agent among the antimicrobial agents  
16 (Hidalgo & Dominguez, 2001). The Cx is a well-known inactivating agent of many  
17 nonsporulating bacteria, with some sporostatic and mycobacteriostatic action; it is also  
18 effective against yeasts and protozoa, with a minimum inhibitory concentration comparable to  
19 most antiseptics (Hidalgo & Dominguez, 2001). The mechanism of action of Cx has been  
20 well described been its main target the bacterial membrane (Barman et al., 2006; Teixeira et  
21 al., 2012b).

22 Cx possess two biguanides as the polar heads connected by a spacer chain of six methylenes,  
23 and two chloro-phenyl groups as the hydrophobic core. These cationic complexes initiate their  
24 interaction with the cytoplasm membrane by binding to the phospholipids surface through  
25



1 electrostatic force (Hugo & Longworth, 1964; Denyer, 1995; Sheppard et al., 1997; McDonell  
2 & Russel, 1999).

3  
4  
5 In our previous studies was found that solutions of Cx inclusion complexes in  $\beta$ -Cd have a  
6 more strong antimicrobial activity in comparison with pure Cx (Cortes et al., 2001; Teixeira et  
7 al., 2012a), or when used gel formulations (Denadai et al., 2007), or silicate matrix (Raso et  
8 al., 2010). These enhanced antimicrobial activity was more evident at 1:3 and 1:4 molar rate  
9 of drug-cyclodextrin. Also sterol solubilization was also evident when 1:3 and 1:4 Cx:  $\beta$ -Cds  
10 were used in an experimental model with *Candida albicans* (*C.a*) (Teixeira et al., 2012 b).

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20 The approach studied here is especially suited to the characterization of cyclodextrin-cell  
21 interactions which may critically contribute to selective action and toxicological effects. We  
22 determine the cellular viability of three different types of cell: osteoblasts, fibroblasts and  
23 Caco-2 cells treated with different cyclodextrins inclusion complexes and to compare the  
24 ability of  $\alpha$  or hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin cyclodextrin interaction with ergosterol cell  
25 membrane content of *C.a*. Based on the above presented correlations we propose that  
26 cholesterol-solubilizing property and viability/citotoxicity-cells can be predictive factors for  
27 the effect of Cd inclusion complexes which depends on the structure of the derivative and  
28 molar ratio.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

## 45 **2. Materials and Methods**

### 46 47 48 49 **2.1 Chemicals and microorganism stocks**

50  
51  
52 Chlorhexidine chlorhydrate (Cx) was obtained from Ecadil<sup>®</sup> (SP, Brazil),  $\alpha$ -Cd from Wacker  
53 Biochem<sup>®</sup>, Co. (USA),  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd from Cerestar<sup>®</sup>, Co. (Milwaukee, WI, USA).  
54  
55 Fluconazole was obtained from Pfizer<sup>®</sup> Pharmaceuticals Group (New York, NY, USA).  
56  
57 Sabouraud dextrose agar (SDA), broth (SDB), Blood Agar, Brain Heart Infusion (BHI) broth  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 and agar were purchased from Biobras S.A® (MG, Brazil). *Candida albicans* (ATCC 18804),  
2  
3 *Streptococcus mutans* (*S.m*) (ATCC 25175), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*)  
4  
5 (ATCC 29522) were obtained from the American Type Culture Collection from Fio Cruz, RJ,  
6  
7 Brazil. All other materials and solvents were of analytical grade.  
8  
9

## 10 11 12 **2.2 Preparation of supramolecular complexes**

13  
14  
15 For chemical analysis and biological tests at 1:1, 1:2, 1:3, and 1:4 molar ratio complexes of  
16  
17  $\alpha$ -Cd/Cx,  $\beta$ -Cd/Cx and Hp- $\beta$ -Cd/Cx were prepared by freeze-dry method using the same  
18  
19 methods described elsewhere (Cortés et al., 2001; Teixeira et al., 2012a). In briefly, Cx  
20  
21 dichlorhydrate,  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd in the respectively weight were dissolved in milli-Q  
22  
23 water; solutions of Cx with  $\alpha$ -Cd or  $\beta$ -Cd or Hp- $\beta$ -Cd were mixed and stirred for 24h at 50° C.  
24  
25 After that whole solution was frozen in liquid N<sub>2</sub> and then freeze dried over period of 30 h  
26  
27 using freeze dried, Freezone® 4.5 at 40±1.0 °C with 50 mbar vacuum system. The dried  
28  
29 powder was stored in desiccators until further evaluation (Kasper & Friess, 2011).  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

## 37 **2.3 Antimicrobial assay**

38  
39 The activity of Cx:  $\beta$ -Cd inclusion complexes were analyzed determining the minimal  
40  
41 inhibitory concentration against *C.a*; *S.m* and *A.a*., those microorganisms were used as a  
42  
43 model of yeast, gram positive, gram negative pathogens, respectively. Microorganisms  
44  
45 cultures were grown and maintained in their respective media been Sabouraud dextrose broth  
46  
47 for *C.a*.; BHI supplemented with Hemin and Menadione for *S.m*. and *A.a*. Prior to the assay,  
48  
49 *C.a* cells were cultured for 24h at 34°C (Pfaller et al., 1988), under aerobic conditions in  
50  
51 SDB. *S.m*. and *A.a* (Slots & Tings, 1999) were cultured for 48h at 37°C under micro  
52  
53 aerophilic and anaerobic conditions respectively. Cultures were then further diluted to obtain  
54  
55 a density of  $1.5 \times 10^8$  CFU for inoculums. Minimal Inhibitory concentrations (MIC<sub>90</sub>),  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 defined as the concentration required to inhibit the growth of 90% of organisms determined  
2 using the macrodilution method CLSI (2005) compared with that of control (no test  
3 compound). Briefly, aliquots containing 500  $\mu\text{L}$  of 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cx or 1:1; 1:2, 1:3, and 1:4)  
4 solutions were serially diluted in 3.4 mL of SDB. Normalized Cx or Cx:  $\beta$ -Cd dilutions were  
5 then inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of *C.a.* inoculums. Pure Cx and fluconazole (FLZ) were used as  
6 standard antimicrobial positive controls. Cyclodextrins were used as a negative control.  
7 Sample absorbance was measured using a standard spectrophotometer (Spectrumlamb  
8 22PC®) set to 580 nm, and sample data were analyzed and compared to controls and (CLSI,  
9 2005 a,b). Six replicates were analyzed for each condition, and MIC<sub>90</sub> values were recorded  
10 and evaluated using the nonparametric Kruskal-Wallis test. *P*-values less than 0.05 were  
11 considered significant.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

#### 30 **2.4. Sterol Quantitation Method (SQM)**

31 Total sterols were extracted from *C.a.* using the method reported by Vieira et al. (2008) and  
32 Arthington-Skaggs et al. (1999); with slight modifications. Briefly, a single *C.a.* colony from  
33 an SDA plate incubated overnight was used to inoculate SDB broth containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Cx  
34 for  $\alpha$ -Cd;  $\beta$ -Cd and Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes with Cx (CLSI, 2005). The cultures were  
35 incubated for 24 h at 34.0 °C. The cells were harvested by centrifugation at 2700 rpm in a  
36 centrifuge (Herolab Instruments®, Piracicaba, SP, Brazil) for 5 min and washed once with  
37 sterile distilled water. The weight of the cell pellet was determined. To each pellet was added  
38 3 mL of a 25% ethanol KOH solution, followed by vortexing for 1 min. Cell suspensions  
39 were incubated at 85 °C in a water bath for 1 h. Following this incubation, the tubes were  
40 allowed to cool to room temperature. Sterols were then extracted by the addition of a mixture  
41 of 1 ml sterile distilled water and 3.0 mL *n*-heptane, followed by vigorous vortexing for 3  
42 min. The *n*-heptane layer was transferred to a clean tube and stored at 20.0 °C for 24 h. Prior  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 to analysis, a 20  $\mu$ l aliquot of sterol extract was diluted five times in 100% ethanol and  
2  
3 spectroscopically analyzed over a range of wavelengths from 240 to 300 nm with a Gilford  
4  
5 Response Spectrophotometer (Gilford Systems, Oberlin, Ohio, USA). The presence of  
6  
7 ergosterol and the late sterol intermediate 24(28) DHE (di-hydroergosterol) in the extracted  
8  
9 sample resulted in a characteristic four-peaked curve. Absence of detectable ergosterol in  
10  
11 extracts was indicated by a flat line. A dose-dependent decrease in the height of the  
12  
13 absorbance peaks was evident, corresponding to decreased ergosterol concentration.  
14  
15 Ergosterol content was calculated as a percentage of the wet weight of the cells using the  
16  
17 following equations:  
18  
19

$$20 \quad \% \text{ ergo sterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{281.5} / 290) F] / \text{pellet weight}$$

$$21 \quad \% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{230/518}) \times F] / \text{pellet weight}$$

$$22 \quad \% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE}] - \% \text{ 24(28) DHE}$$

23  
24  
25 Where:  $F$  is the factor for dilution in ethanol and 290 and 518 are the  $E$  values (%/cm)  
26  
27 determined for crystalline ergosterol and 24(28) DHE, respectively (Arthington-Skaggs et al.,  
28  
29 1999).  
30  
31

### 32 **2.4.1 Statistical analysis**

33  
34  
35 Data were statistically analyzed using non-parametric one-way analyses of variance  
36  
37 (ANOVA). Differences between the coefficients of variation (CVs) for the different test  
38  
39 groups were analyzed with Tukey's studentized range test.  $P$ -values  $\leq 0.05$  were considered  
40  
41 significant.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 **2.5 Fibroblasts**

52  
53  
54 The mouse fibroblast cell line L929, were cultured in modified eagle's medium (MEM) with  
55  
56 4.5 g/l of glucose, 2.0 mM L-glutamine, 2.2 M of sodium pyruvate, 10.0 mM of N-2-  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 hydroxyethylpiperazine N-2-ethanesulfonic acid (hepes), 2.0 g/L of sodium bicarbonate, and  
2  
3 100 U/ml of anfotericin–gentamicin containing 10% fetal bovine serum (Faria et al., 2009).  
4  
5  
6

## 7 **2.6 Osteoblasts**

8  
9  
10 Primary osteoblasts were isolated from neonate Wistar rats using the method described by  
11  
12 Wong and Cohn (1975). Briefly, calvaria were subjected to four sequential 15-min digestions  
13  
14 in an enzyme mixture containing 0.05% of trypsin-EDTA and 0.1% of collagenase at 37.0 °C.  
15  
16 Cell fractions were pooled and resuspended in dulbecco modified Eagle’s medium (DMEM)  
17  
18 containing 10% FBS, 4.5 g/L of glucose, 2.0 mM of L-glutamine, 2.2 M of sodium pyruvate,  
19  
20 10.0 mM of hepes, 2.0 mM of non essential aminoacids, 2.0 g/L of sodium bicarbonate, 100  
21  
22 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin. Cells were plated at a density of  $1 \times 10^4$   
23  
24 cells/cm<sup>2</sup> and the medium was changed 24 h later. All animal-related experiments were  
25  
26 performed in accordance with the guidelines proposed by the Center for Laboratory Animal  
27  
28 Medicine and Care at the University of Texas Health Science Center at Houston (UTHSCH)  
29  
30 (Wong & Cohn., 1975; Zhang et al., 2010).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

## 40 **2.7 Caco-2**

41  
42 The human colorectal carcinoma cell line Caco-2 (ATCC, Rockville, MD, USA), was  
43  
44 cultured in DMEM high glucose with 4.5 g/L of glucose, 2.0 mM of L-glutamine, 2.2 M of  
45  
46 sodium pyruvate, 10.0 mM of hepes, 2.0 mM of non essential aminoacids, 2.0 g/L of sodium  
47  
48 bicarbonate, 100 U/mL of anfotericin–gentamicin containing 10% fetal bovine serum  
49  
50 (Sigma®). The sub-culturing was done after the cells reached confluence as seen under phase  
51  
52 contrast microscope. Single cell suspension was obtained after trypsinization and the cells  
53  
54 were counted in a hemocytometer (Reichert, Buffalo, NY, USA). Cells were allowed to attach  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 to the plates for 48 h in a humidified atmosphere, 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37.0 °C. Serum free  
2  
3 medium and cyclodextrins were used as control (Rhoads et al., 2010).  
4  
5  
6

## 7 **2.8 Cell viability assay**

8  
9  
10 The Neutral Red (NR) Assay, a colorimetric method for determining the number of viable  
11 cells in cytotoxicity assays was conducted. To this purpose, the cells were plated in 96-well  
12 plates (1.5 x 10<sup>5</sup> cells/well) and, after 48 h of incubation, were treated with the experimental  
13 suspensions prepared as stock concentrations in serum-free DMEM at 37<sup>0</sup>C. The stock  
14 suspension was vortexing to distribute the particles, and then dilutions were made in serum-  
15 free DMEM to achieve final test concentrations. The test concentrations were vortexing  
16 before adding to the cell monolayers. Untreated controls were exposed to serum-free DMEM  
17 only, and processed identical to the exposed cells groups in phenol red-free medium for 24 h.  
18 After cells were exposed to the test suspensions, were rinsed with phosphate buffered saline  
19 (PBS), and then incubated with a Neutral Red solution (100 µg/mL in serum-free DMEM) at  
20 37.0 °C for 2 h. After 2 h of incubation, was added fixing solution for 2 minutes and had been  
21 taken up by the cells was extracted by adding 200 µL of basic methanol (49% v/v methanol in  
22 water and 2% acetic glacial acid) to each well. After 15 min, the plate was analyzed with the  
23 Multi Skan Spectrum (Thermo Scientific<sup>®</sup>) using an excitation wavelength of 540 nm and  
24 emission wavelength of 630 nm. Data is reported as percent of untreated controls.  
25 Cytotoxicity was rated based on cell viability relative to controls as related by Kong et al.  
26 (2009):  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

- 51 • Non-cytotoxic >90% cell viability;
  - 52 • Slightly cytotoxic = 60–90% cell viability;
  - 53 • Moderately cytotoxic = 30–59% cell viability;
  - 54 • Severely cytotoxic ≤30% cell viability.
- 55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### 3. Results

#### 3.1 Antimicrobial assay

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) data are summarized in Table 1. The pure Cx exhibited antifungal and antimicrobial activity against *C.a.*, *S.m.*, and *A.a.* Whereas, significant efficacy was noted to 1:4 Cx inclusion complexes (Table 1). The 1:1 and 1:2 Cx:  $\alpha$ -Cd complexes showed a good antifungal activity against *C. a*, while 1:3 and 1:4 Cx:  $\beta$ -Cd for Gram negative (*A.a*) and Cx: Hp- $\beta$ -Cd complexes showed better performance against Gram-positive (*S.m*) (1:4).

#### 3.2 Sterol Quantitation Method (SQM)

In order to characterize the interaction between the inclusion complexes and cellular membrane, we next explored the effects of these complexes on ergosterol solubilization. Yeast was treated for 24 h with the complexes analyzed at concentrations equivalent to MIC<sub>90</sub> values. The amount of cellular ergosterol resulting from the treatment with Cx and 1:1 Cx: $\alpha$ -Cd; 1:1 Cx: $\beta$ -Cd and 1:1 and 1:2 Cx:Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes leads to significant reduction in ergosterol levels (Fig. 1). The mean increase in ergosterol solubilization to  $\alpha$ -cyclodextrin groups ranged from 130% to 160% after exposure to 1:1 to 1:4 Cx- $\alpha$ -Cd complexes (Fig 1). There was no statistical difference between the 1:3 and 1:2 Cx: $\alpha$ -Cd. The 1:1 molar ratio complexes have shown a cyclodextrin dose-dependent decreasing in ergosterol total solubilization. The highest solubilization of ergosterol take place at 1:3 and 1:4 Cx-Cd complexes of the three cyclodextrins complexes studied and with  $\alpha$ ,  $\beta$ , and Hp- $\beta$ -Cd pure cyclodextrins.

#### 3.3 Cell Viability Assay

1 To explore viability assays were used a colorimetric method based on neutral red (NR)  
2 properties. NR is a weak cationic dye that readily penetrates the cell membrane and  
3 accumulates intracellularly in lysosomes, where it binds to anionic sites of the lysosomal  
4 matrix. We profiled three cell types these consist of osteoblasts of primary culture, fibroblasts  
5 and Caco-2.  
6  
7  
8  
9  
10  
11

12 Neutral Red assay showed that the treatment with Cx and Cx-Cd inclusion complexes affected  
13 cell viability in a dose dependent (Fig. 2). Osteoblasts cells appeared highly sensitive to the  
14 treatment (Fig 2), since their viability was significantly reduced after exposure at 0.1% Cx for  
15 24 h (moderate cytotoxicity). The progressive decrease in the concentration of the antiseptic  
16 agent (from 0.1 to 0.001%) correlated with a parallel increase in the osteoblasts cell survive  
17 (up to 80%). For osteoblasts cytotoxicity assay  $\alpha$ -Cd and  $\beta$ -Cd shown moderate toxic effects.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27 The pure Hp- $\beta$ -Cd at 0.1, 0.01 and 0.001% stimulated proliferation of fibroblasts and  
28 osteoblast cells.  
29  
30  
31

32  
33 As shown in Figure 3, 0.1%  $\alpha$ -Cd was not cytotoxic for fibroblasts and moderate toxicity for  
34 osteoblasts (Fig. 2), and at 0.01%  $\alpha$ -Cd stimulated the fibroblasts proliferation. The  $\beta$ -  
35 cyclodextrin groups not show cytotoxic effects. By contrast, fibroblastic cells appeared to be  
36 more resistant to the treatment (Figure 3), showing a significant cell viability (moderate to  
37 absence cytotoxicity) upon treatment with higher Cx concentrations.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 The  $\alpha$ -Cd inclusion complexes in general were more toxic to osteoblasts than fibroblasts and  
46 these results were supported by Gianelli et al., (2008) results that study the cytotoxicity of Cx  
47 for fibroblasts and osteoblasts en cell culture. The cytotoxic effect showed dose-dependent  
48 pattern with moderate cytotoxicity to osteoblasts and 0.001% for absence of cytotoxic for Hp-  
49  $\beta$ -Cd.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 Comparing the Cx inclusion complexes effect on fibroblasts, 1:2, 1:3 Cx:  $\alpha$ -Cd and Cx: $\beta$ -Cd  
2  
3 1:1 were more cytotoxic when compared with the other groups. Moderate cytotoxicity was  
4  
5 found with 1:4 Cx: $\alpha$ -Cd.  
6

7  
8 The complexes of Cx: $\alpha$ -Cd and Cx: $\beta$ -Cd showed moderate cytotoxicity for osteoblasts and  
9  
10 fibroblast while Cx:Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes are the most compatible for this types of  
11  
12 cells. At 0.1% and 0.01% Cx:  $\alpha$ -Cd and 0.1% Cx: $\beta$ -Cd showed slight citototoxic effects for  
13  
14 fibroblast, but to Cx: Hp- $\beta$ -Cd inclusion complexes is absent at all concentrations. Among the  
15  
16 complexes of  $\alpha$ -Cd 1:2, 1:3 and 1:4 were statistically similar with the  $\alpha$ -Cd control was less  
17  
18 cytotoxic complexes that inclusion in all concentrations. At 0.001% concentration all the  
19  
20 complexes proved to be biocompatible and Cx showed moderate cytotoxic effect.  
21  
22  
23

24  
25 No matter which cyclodextrin used, the inclusion complexes tested were not able to stimulate  
26  
27 the proliferation of Caco-2 cells(Figure 4). In none of the tested concentrations were observed  
28  
29 severe cytotoxic effects, the highest levels of cytotoxicity observed were moderate at 0.1%.  
30  
31

### 32 **Discussion**

33  
34 In all groups 1:3 and 1:4 cyclodextrin molar ratios improved the antimicrobial activity of the  
35  
36 inclusion complexes regardless of cyclodextrin used. In this study the beta-cyclodextrin  
37  
38 inclusion complex groups were tested for best standard and comparison and the effectiveness  
39  
40 of them was verified as previously reported by Teixeira et al., 2012 a, b. Current drug  
41  
42 treatment are largely effective to control gingival disease, but resistant strains and side effect  
43  
44 associated with high concentration of Cx used are emerging fast.  
45  
46

47  
48 The Cx- $\beta$ -Cd inclusion complexes values found in this study allowing the comparison with  $\alpha$   
49  
50 and Hp- $\beta$ -Cd complexes groups and corroborating the preliminary study in relation with Cx-  
51  
52  $\beta$ -Cd alone (Teixeira 2012b). Hp- $\beta$ -Cd and Cx- $\beta$ -Cd complexes showed lower extraction of  
53  
54 ergosterol when compared with the  $\alpha$ -Cd.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Limited specificity for cholesterol and significant membrane disorganization has been  
2 described when cells were exposed to highest concentration of cyclodextrin at previous  
3 studies related (Irie et al., 1992; Haynes et al., 2000; Kiss et al., 2010) and to corroborate the  
4 present results. However, saturation of ergosterol solubilization when used 1:3 or 1:4 Cx: Cd  
5 molar rate was noted (Fig. 1). These observations were confirmed by Ohvo-Rekila et al.,  
6 (2000) which founded that cyclodextrin concentration (2.5 mM) used reach a saturating level,  
7 so that the desorption of sterols from the bilayer membrane of cyclodextrin was rate limiting.  
8 In studies of Atger et al., (1997) they observed that the location of cyclodextrin molecules  
9 near the surface of the cell allows the membrane cholesterol desorbs directly into the  
10 hydrophobic core of the cyclodextrin.  
11

12 In recent years, Cds have been used as tools to manipulate the lipid composition of biological  
13 and model membranes (Ohvo-Rekila et al., 2000). Sterol can be removed from cells by  
14 extraction forming small unilamellar vesicles. Also, chlorhexidine-induces changes in the  
15 membrane fluidity of the yeast membrane (Teixeira et al., 2012 b). The antibiotic molecules  
16 must compete with phospholipids in order to interact with cholesterol and form pores (Clejan  
17 & Bitman, 1984; Shaw et al., 2008).  
18

19 Potentially, variations in membrane lipid composition could be revealed as a factor that  
20 modulates membrane fusogenic capacity and affects membrane and cellular pathology  
21 (Pankov et al., 2006). Recent evidence suggests that lipid rafts can serve as docking sites for a  
22 broad range of pathogens, including viruses and bacteria (Clejan & Bitman, 1984; Yang et al.,  
23 2007; Zhao et al., 2010). Removal of cholesterol from cell membranes is reported to disrupt  
24 the integrity of these domains, and therefore represents a widely used strategy to disrupt  
25 putative functions mediated by these domains. This forms the basis of a number of reports  
26 implicating such domains in important cellular functions such as signal transduction, and  
27 entry of pathogens (Pucadyil & Chattopadhyay, 2007).  
28

1 The cellular cytotoxicity of these materials confirm the results of ergosterol solubilization  
2 where was observed higher cytotoxicity also indicates that the greatest ergosterol  
3 solubilization. The cytotoxicity of inclusion complexes can be associated with increased cell  
4 permeability and membrane disorganization caused by solubilization of membrane sterols.  
5  
6 There are reports that indicate a possible relationship between the toxicity of nanomaterials  
7 and cell type. Changes in the cell surface or the sensitive lysosomal membrane lead to  
8 lysosomal fragility and other changes that gradually become irreversible (Rhoads et al., 2010).  
9  
10 Its results are supported by Gianelli et al., (2008) that studies the chlorhexidine cytotoxicity  
11 by colorimetric assay and microscopy. The external component of Cd, which contains many  
12 hydrophilic hydroxide groups, could improve the interaction between cyclodextrin and the  
13 cells (Loftsson et al., 2007). Yang et al., (2007) reported that the introduction of  $\alpha$ -Cd  
14 decreased the cytotoxicity of polyether-imide (PEI). It is thought that the high amino density  
15 and high molecular weight were the reasons of the high cytotoxicity of PEI.  
16  
17 Considering that osteoblasts and fibroblasts showed proliferation in some cases the possibility  
18 of tumoral effects stimulation experimental groups induced the cytotoxicity on Caco-2 cells  
19 was studied. In previous studies dimethyl- $\beta$ Cd and methyl-  $\beta$ Cd markedly reduced the  
20 viability of Caco-2 cells above 50 mM and mM, respectively (Yunomae et al., 2003). These  
21 cyclodextrins were modified cyclodextrins, in our study the modified cyclodextrin were Hp-  
22  $\beta$ -Cd and this inclusion complexes were more cytotoxic for Caco-2, our results confirm the  
23 results of Yunomae et al., (2003).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 Cx treatments induced a massive cell death in all the cell types at any concentration, but the  
51 cyclodextrin inclusion decrease its toxicity being 1:3 Cx:Hp- $\beta$ -Cd complexes the most  
52 biocompatible at molar. The cytotoxic properties of the best system for cholesterol  
53 solubilization matched to the most “toxic” derivatives ( $\alpha$ -Cd), the other cyclodextrins ( $\beta$ -Cd,  
54 Hp- $\beta$ -Cd) showed significantly lower than the cytotoxic profile. The  $\alpha$ -Cd demonstrated the  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 best activity for *C.a*,  $\beta$ -Cd for *A.a* and Hp- $\beta$ -Cd for *S.m* suggesting the capability of  
2 cyclodextrin in interact in a different maner with membranes and to modulate the activity of  
3 the Cx on different cells, suggesting different indication of cyclodextrins according to the  
4  
5  
6  
7  
8 desired effect in each tissue.  
9

10 The differentiated activity of 1:4 Cx-Cd complexes form the diverse test could be explained  
11 by an efficient adhesion from cyclodextrin with the membrane (Loftsson et al., 2007), than  
12 from corresponding free Cx. The hydrophilic outer surface of Cd molecules forms a weak  
13  
14  
15  
16  
17  
18 interaction with biologic membranes (Abdelwahed et al., 2008).  
19  
20

21 Complexes derived from  $\alpha$ -Cd would be more appropriate for occasions when choose is a  
22  
23  
24  
25 cytotoxic drug (antimicrobials, antitumoral) and the target cells are at high ergosterol content.

26 The Hp- $\beta$ -Cd would be more suitable for formation of complexes where the cytotoxic effects  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
The Hp- $\beta$ -Cd would be more suitable for formation of complexes where the cytotoxic effects should be minimal or absent, such as anti-inflammatories, analgesics, anesthetics or anti depressive drugs; while the presence of  $\beta$ -Cd shows exerts positive influence to Cx antimicrobial activity with mild cytotoxic effects on eukariotic cells, been that 1:2 and 1:3 Cx:  $\beta$ -Cd had the best results.

On the basis of these results, we compared the role of Cx inclusion complex in presence of three different Cd and contrasting results of cytotoxicity were observed. The Cd inclusion complexes showed very toxic effects for microorganisms, and enhanced solubilization of sterol in *C.a* membrane resulting in potent antimicrobial compounds when compared with pure Cx. However, viability on eukariotic cell showed no decreasing cytotoxicity in the presence of these complexes.

These results could be explained in function of variations in biological membranes properties.

Considering that the major membrane components of prokaryotic cells are phospholipids, and their membranes contain higher amounts of anionic lipids than eukaryotic cell membranes but no cholesterol (Barman et al., 2006; Mesmin & Maxfield, 2009). This seems to be of

1 fundamental importance for the membrane interaction, activity and selectivity of  
2 antimicrobial drugs (Haynes et al., 2000). The hydrogen bond is responsible for the tight  
3 packing of lipid rafts but still ensures a high degree of lipid mobility (Ohvo-Rekila et al.,  
4 1997). The acyl chains between the phospholipids are held together by van der Waals  
5 interactions, which are considerably weaker than hydrogen bonds and, therefore, responsible  
6 for a less tight membrane packing of prokaryotic membranes and non-lipid raft parts on the  
7 eukaryotic cell membrane (Irie et al., 1992; Barman et al., 2006).

8 This work suggests that the use of  $\alpha$ ,  $\beta$  and Hp- $\beta$ -Cd cyclodextrins to form inclusion  
9 complexes with selective propose could be promising tool as an alternate to specific activity  
10 of chlorhexidine. Future research about the in vitro/in vivo correlation efficacy, based on  
11 animal models, may resolve these issues.

#### 12 **4. Conclusions**

13 The hypothesis of  $\alpha$ ,  $\beta$  and Hp- $\beta$ -Cd cyclodextrins target specifically is supported by our  
14 following experimental observation: (i) the addition of cyclodextrin to Cx makes this system  
15 less cytotoxic in eukaryotic cells; (ii) the cyclodextrin complexes of Cx were more effective  
16 to inhibit the microorganism growth and causes more ergosterol solubilization in a dose-  
17 dependent with saturation at 1:3 drug/cyclodextrin molar rate; (iii) the pure cyclodextrins  
18 were able to stimulate osteoblasts and fibroblasts proliferation; (iv) All complexes were more  
19 cytotoxic to osteoblasts than fibroblasts and  $\alpha$ -Cd inclusion complexes increased the cytotoxic  
20 effect on Caco-2 cells.

21 Our results showed that  $\alpha$ ,  $\beta$  and Hp- $\beta$ -Cd cyclodextrins were able to modulate the cellular  
22 effects of Cx, but it is not known if a membrane-signaling pathway is involved. Cyclodextrins  
23 provide a unique tool to modulate the activity of Cx and could be used for selective use of the  
24 cyclodextrin.

1  
2  
3 **Acknowledgements**  
4

5 We are grateful for CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT/Nanobiofar that support this  
6  
7 investigation.  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15 **References**  
16

- 17  
18 1. Abdelwahed, W., Degobert, G., Dubes, A., Parrot-Lopez, H., Fessi, H., 2008. Sulfated and  
19 non-sulfated amphiphilic- $\beta$ -cyclodextrins: Impact of their structural properties on the  
20 physicochemical properties of nanoparticles. *Int. J. Pharm.: Pharmaceutical Nanotechnology*.  
21 351, 289–295.  
22  
23  
24  
25  
26  
27 2. Arthington-Skaggs, B.A., Jradi, H., Desai, T., Morrison, C.J., 1999. Quantitation of  
28 ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida*  
29 *albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3332-3337.  
30  
31  
32  
33  
34  
35 3. Atger, V. M., Moya, M. L., Stoudt, G. W., Rodriguez, W. V., Phillips, M. C., 1997.  
36 Cyclodextrins as Catalysts for the Removal of Cholesterol from Macrophage Foam Cells. *J.*  
37 *Clin. Invest.* 99,773–780.  
38  
39  
40  
41  
42 4. Barman, H., Walch, M.I., Latinovic-Golic, S., Dumrese, C., Dolder, M., Groscurth, P.,  
43 Ziegler, U., 2006. Cholesterol in Negatively Charged Lipid Bilayers Modulates the Effect of  
44 the Antimicrobial Protein Granulysin. *J. Membrane Biol.* 212, 29–39.  
45  
46  
47  
48  
49 5. Beseničar, M. P., Bavdek, A., Kladnik, A., Maček, P., Anderluh, G., 2008. Kinetics of  
50 cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- $\beta$ - cyclodextrin - A surface plasmon  
51 resonance approach. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778, 175–184.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 6. Clejan, S., Bittman, R., 1984. Kinetics of cholesterol and phospholipid exchange between  
2 Mycoplasma gallisepticum cells and lipid vesicles. Alterations in membrane cholesterol and  
3 protein content. J. Biol. Chem. 259, 441–448.  
4  
5  
6
- 7 7. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2005a. Performance Standards for  
8 Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS  
9 document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Wayne, Pennsylvania USA, 19087-19098.  
10  
11  
12  
13
- 14 8. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), 2005b. Reference method for broth  
15 dilution Antifungal susceptibility testing of yeast: Approved standards. Document CLSI M27-  
16 A2, CLSI, Wayne, Pennsylvania USA.  
17  
18  
19
- 20 9. Cortés, M.E., Sinisterra, R.D., Ávila-Campos, M.J., Tortamano, N., Rocha, R.G., 2001.  
21 The chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and  
22 microbiological evaluation. J. Inclusion Phen. Macrocyclic Chem. 40, 297-302.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29
- 30 10. Davis, M. E. and Brewster, M.E. 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present  
31 and future. Nature Rev. 3,1023-1035  
32  
33  
34  
35
- 36 11. Denadai, A.M.L., Teixeira, K.I. R, Santoro, M.M., Pimenta, A.M.C, Cortés, M.E.,  
37 Sinisterra, R.D., 2007. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective Carrier  
38 of the antimicrobial agent chlorhexidine. Carbohydr. Res. 342, 2286-2296.  
39  
40  
41  
42  
43
- 44 12. Denyer, S.P., 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. Int. Biodeterior.  
45 Biodegradation. 36, 227–45.  
46  
47  
48
- 49 13. Faria, G., Cardoso, C.R.B., Larson, R.E., Silva, J.S., 2009. Chlorhexidine-induced  
50 apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. Toxicol.  
51 Appl. Pharm. 234, 256–265.  
52  
53  
54  
55  
56
- 57 14. Frank DW, Gray JE, Weaver RN. 1976. Cyclodextrin nephrosis in the rat. Am J Pathol  
58 83:367–82  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 15. Gianelli, M., Chellini, F., Margheri, M., Tonelli, P., Tani, A., 2008. Effect of  
2 chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultra structural  
3 investigation. *Toxicol. In vitro.* 22, 308-317.  
4  
5  
6  
7  
8  
9 16. Haynes, M. P., Phillips, M.C., Rothblat, G. H., 2000. Efflux of cholesterol from different  
10 cellular pools. *Biochemistry.* 39, 4508–4517.  
11  
12  
13 17. Hidalgo, E., Dominguez, C., 2001. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced  
14 cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 15, 271-276.  
15  
16  
17  
18 18. Hugo, W., Longworth, A., 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J.*  
19 *Pharm. Pharmacol.* 16, 655–662.  
20  
21  
22  
23 19. Irie, T., Fukunaga, K., Pitha, J., 1992. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I:  
24 lipid dissolution and effects on lipid transfers in vivo. *J. Pharm. Sci.* 81, 521-523.  
25  
26  
27  
28 20. Kasper, J. C., Friess, W., 2011. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical  
29 fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality  
30 attributes of biopharmaceuticals. *European J. Pharm. and Biopharm.* 78, 248-263.  
31  
32  
33  
34 21. Kiss, T., Fenyvesia, F., Bácskaya, I., Váradia, J., Fenyvesib, E., Iványib, R., Szenteb, L.,  
35 Tósakic, Á., Vecsernyésa, M., 2010. Evaluation of the cytotoxicity of  $\beta$ -cyclodextrin  
36 derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European J. Pharm. Sci.* 40, 376–  
37 380.  
38  
39  
40  
41 22. Kong, N., Jiang, T., Zhou, Z., Fu, J., 2009. Cytotoxicity of polymerized resin cements on  
42 human dental pulp cells in vitro. *Dental Materials.* 25, 1371–1375.  
43  
44  
45  
46 23. Liu, L., Q. X. Guo., 2002. The driving forces in the inclusion complexation of  
47 cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macro.* 42, 1–14.  
48  
49  
50  
51 24. Loftsson, T., Brewster, M. E. 1996. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1.  
52 Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85, 1017–1025.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



- 1 25. Loftsson, T., Masson, M., Brewster, M. E., 2004. Self-association of cyclodextrins and  
2 cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* 93, 1091–1099.  
3  
4  
5 26. Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konrádóttir, F., 2007. Effects of  
6 Cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J. Pharm. Sci.* 96, 2532-2546.  
7  
8  
9  
10 27. McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and  
11 resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147–79.  
12  
13  
14 28. Mesmin, B., Maxfield, F. R., 2009. Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*  
15 1791,636–645.  
16  
17  
18 29. Ohvo-Rekila, H., Bjorn, A., Kerlund, J., Slotte, P., 2000. Cyclodextrin-catalyzed  
19 extraction of fluorescent sterols from monolayer membranes and small unilamellar vesicles.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28 30. Ohvo-Rekila, H., Olsio, C., Slotte, J. P., 1997. Effects of sphingomyelin and  
29 phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux from cultured  
30 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1349, 131–141.  
31  
32  
33  
34  
35  
36 31. Pankov, R., Markovska, T., Antonov, P., Ivanova, L., Momchilova, A., 2006. The plasma  
37 membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes. *Chem. Biol.*  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44 32. Pfaller, M.A., Burmeister, L., Bartlett, M.S., Rinaldi, M.G., 1988. Multicenter evaluation  
45 of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1437-1441.  
46  
47  
48  
49 33. Pucadyil, T. J., Chattopadhyay, A., 2007. Cholesterol depletion induces dynamic  
50 confinement of the G-protein coupled serotonin1A receptor in the plasma membrane of living  
51 cells. *GTP Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 655–668.  
52  
53  
54  
55  
56 34. Raso, E.M.G., Cortes, M.E., Teixeira, K.I., Franco, M.B., Mohallem, N.D.S., Sinisterra,  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 inclusion complexes based on porous silica. J. Inclusion Phen. Macrocyclic Chem. 67, 159-  
2  
3 168.

4  
5  
6 35. Rhoads, L.S., Silkworth, W. T., Roppolo, M. L., Whittingham, M. S., 2010. Cytotoxicity  
7  
8 of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro. Toxicol. in Vitro. 24, 292–296.  
9

10  
11 36. Shaw, J.E., Epand, R.F., Hsu, J.C.Y., Mo, G.C.H., Epand, R.M., Yip, C.M., 2008.  
12  
13 Cationic peptide-induced remodeling of model membranes: Direct visualization by *in situ*  
14  
15 atomic force microscopy. J. Struct. Biol. 162, 121-38.

16  
17  
18 37. Sheppard, F.C., Mason, D.J., Bloomfield, S.F., Gant, V.A., 1997. Flow cytometric  
19  
20 analysis of chlorhexidine action. FEMS Microbiol. Lett. 154, 283–8.

21  
22 38. Slots, J., Ting, M., 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas*  
23  
24 *gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol. 2000. 20, 82–  
25  
26 121.  
27  
28

29  
30 39. Stella, V. J., He Q. 2008 Cyclodextrins Toxicol Pathol. 36: 30-42  
31  
32

33  
34 40. Teixeira, K. I. R., Araújo, P. V., Neves, B. R. A., Mahecha, G. A. B., Sinisterra, R. D.,  
35  
36 Cortés, M. E., 2012a. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-  
37  
38 assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. Pharm.  
39  
40 Develop. Tech. DOI: 10.3109/10837450.2011.649853  
41  
42

43  
44 41. Teixeira, K. I. R., Araújo, P. V., Sinisterra, R. D., Cortés, M. E., 2012b.  
45  
46 Chlorhexidine:beta-cyclodextrin blocks yeast growth by extraction of ergosterol. Bra. J.  
47  
48 Microbiol. *in press*.  
49  
50

51  
52 42. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. Chem Rev 1998;  
53  
54 98(5):2045-76.  
55  
56

57  
58 43. Vieira, F. T., Menezes, D. C., De Lima, G. M., Wardell, J. L., Cortés, M. E., Silva, G. A.  
59  
60 B., Vilas-Boas, A., Maia, J. R. S., 2008. Effect of diorganotin(IV) carboxylate complexes, [N-  
61  
62

1 (2-carboxyphenyl)salicylideneiminato]dimethyltin(IV), bis( $\mu_3$ -oxo)bis( $\mu$ -*O*-aminobenzoato-  
2 *O,O'*) bis(*O*-aminobenzoato)tetrakis[dimethyltin(IV)] and bis(*O*-aminobenzoato-*O,O'*) di-*n*-  
3 butyltin(IV), on the membrane of *Candida albicans* cells - a mechanistic investigation of the  
4 antifungal activity of organotin complexes. Applied Organometallic Chem. 22, 433 – 439.  
5  
6  
7  
8  
9

10 44. Wong, G.L., Cohn, D.V., 1975. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are  
11 different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and  
12 selective adhesion to polymeric surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 72, 3167-3171.  
13  
14  
15

16 45. Yang, C., Li, H., Goh, S. H., Li, J., 2007. Cationic star polymers consisting of  
17 alphacyclodextrin core and oligoethylenimine arms as non-viral gene delivery vectors.  
18 Biomaterials. 28, 3245–3254.  
19  
20  
21  
22

23 46. Yunomae, K., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K., 2003. Involvement of cholesterol in  
24 the inhibitory effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in  
25 Caco-2cells. FEBS Letters. 536, 3225–231.  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 47. Zhang, W., Swearingen, E. B., Jun, J., Rigney, T., Tribble, G. D., 2010. Porphyromonas  
33 gingivalis invades osteoblasts and inhibits bone formation. Microbes and Infection. 12, 838-  
34 845.  
35  
36  
37  
38  
39

40 48. Zhao, M., Wang, H., Yang, B., Tao, H., 2010. Identification of cyclodextrin inclusion  
41 complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. Food Chem. 120, 1138–1142.  
42  
43  
44

45 49. Zheng, X. M., W.M. Lu, Sun, D. Z., 2001. Enthalpy and entropy criterion for the  
46 molecular recognize of some organic complexes with beta cyclodextrin. Acta Phys-Chim. Sin.  
47 17, 343–347.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table I.** Minimal Inhibition concentration in  $\mu\text{g/mL}$  of Chlorhexidine (Cx) and Cx-cyclodextrin inclusion complexes at 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 molar rate against *Candida albicans* (*C.a.*), *Streptococcus mutans* (*S.m.*), and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*).

<i>Groups</i>	<i>C.a.</i>	<i>S.m.</i>	<i>A.a</i>
Cx	4.0	16.0	8.0
Cx: $\alpha$ -Cd 1:1	0.25	8.0	8.0
Cx: $\alpha$ -Cd 1:2	0.25	8.0	4.0
Cx: $\alpha$ -Cd 1:3	1.0	8.0	4.0
Cx: $\alpha$ -Cd 1:4	2.0	8.0	4.0
Cx: $\beta$ -Cd 1:1	2.0 **	16.0	1.0 *
Cx: $\beta$ -Cd 1:2	1.0 **	8.0	1.0 *
Cx: $\beta$ -Cd 1:3	1.0 **	8.0	0.5 *
Cx: $\beta$ -Cd 1:4	0.5 **	8.0	0.5 *
Cx: Hp- $\beta$ -Cd 1:1	2.0	8.0	8.0
Cx: Hp- $\beta$ -Cd 1:2	4.0	8.0	2.0
Cx: Hp- $\beta$ -Cd 1:3	4.0	4.0	4.0
Cx: Hp- $\beta$ -Cd 1:4	2.0	2.0	2.0
<b>Fluconazole</b>	8.0	-----	----

$P < 0.01$  significance level

\*Teixeira et al, 2012 a

\*\*Teixeira et al 2012 b

Figure 1

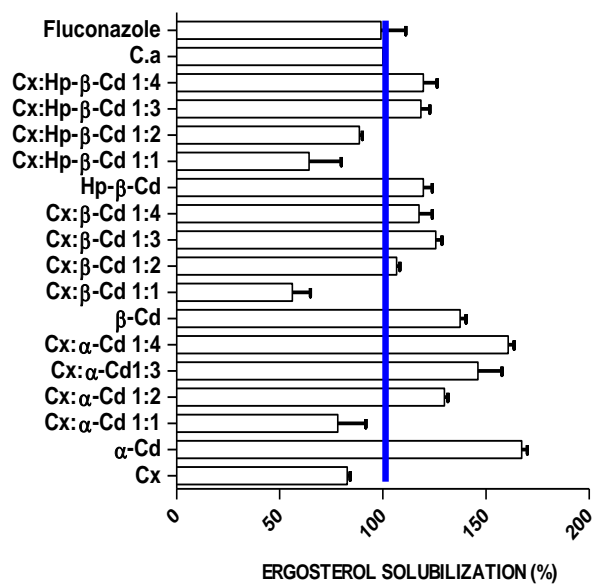


Figure 2

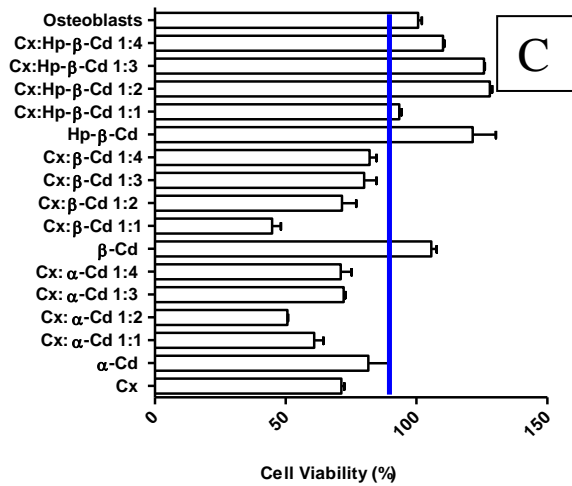
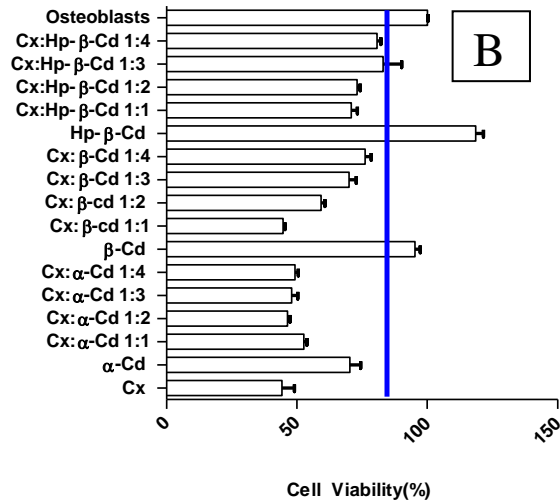
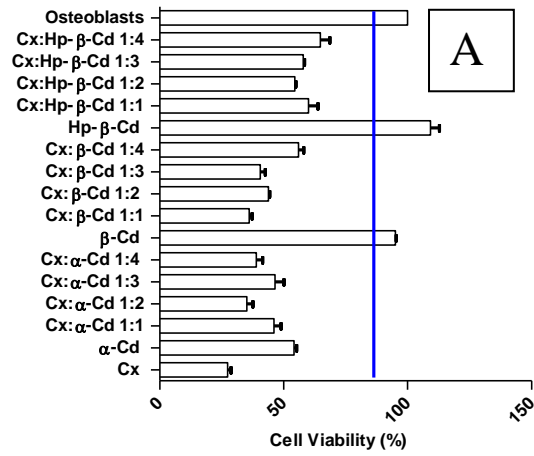


Figure 3

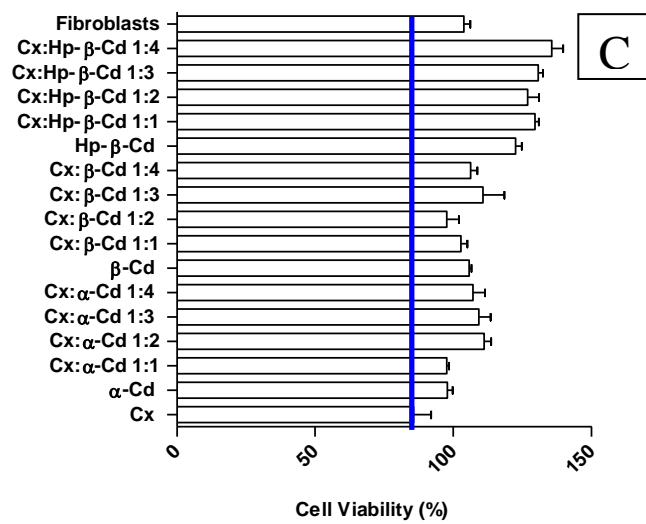
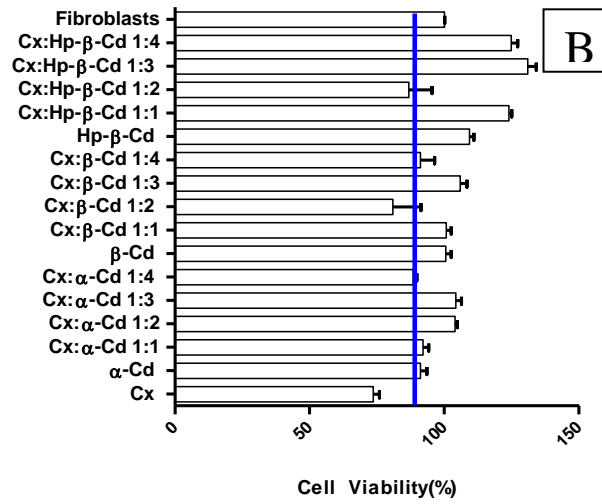
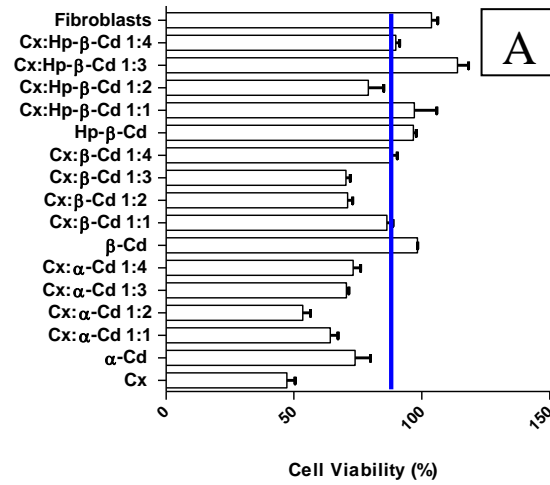
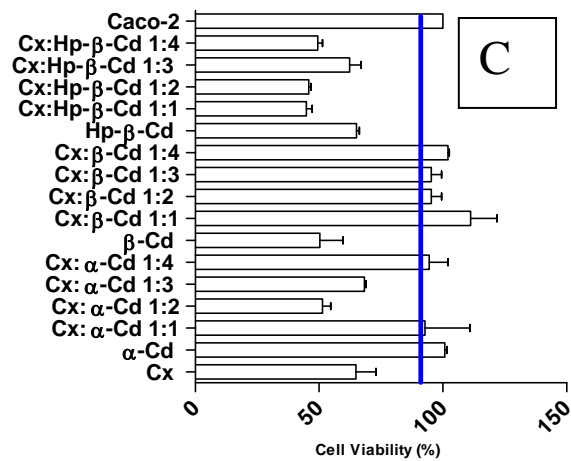
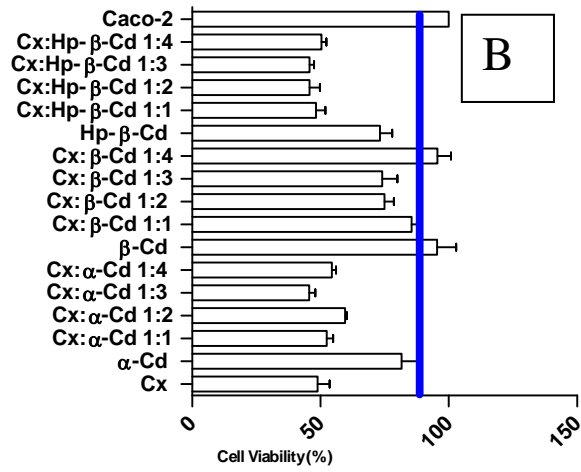
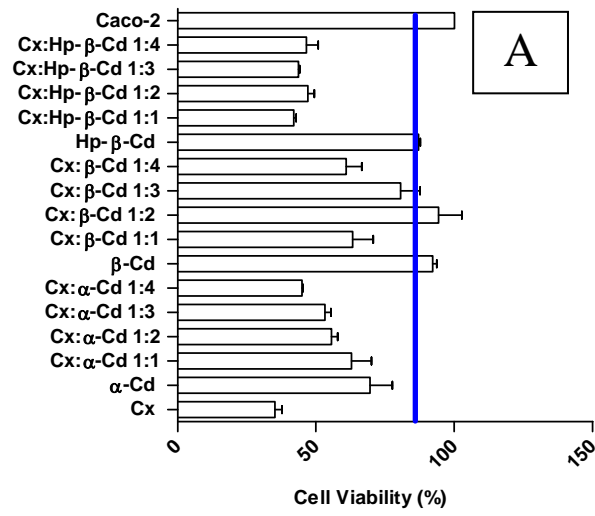


Figure 3

Figure 4





**author check list**

**[Click here to download Supplementary Material: Authors Check List.doc](#)**

**Caption Legend**

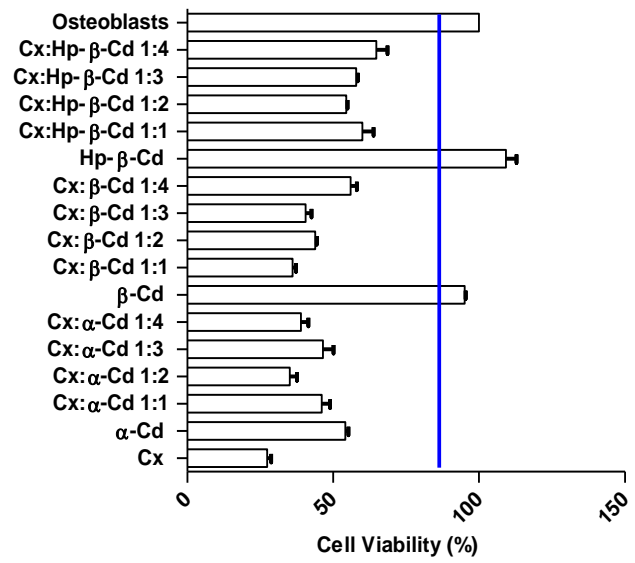
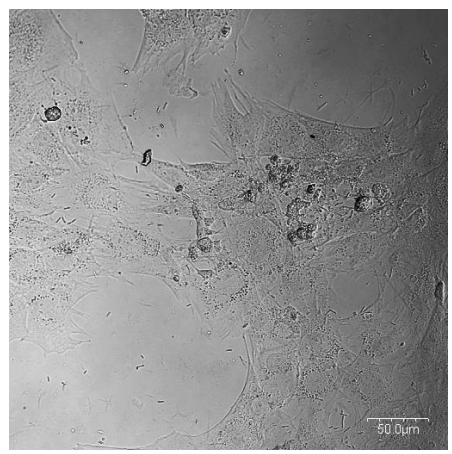
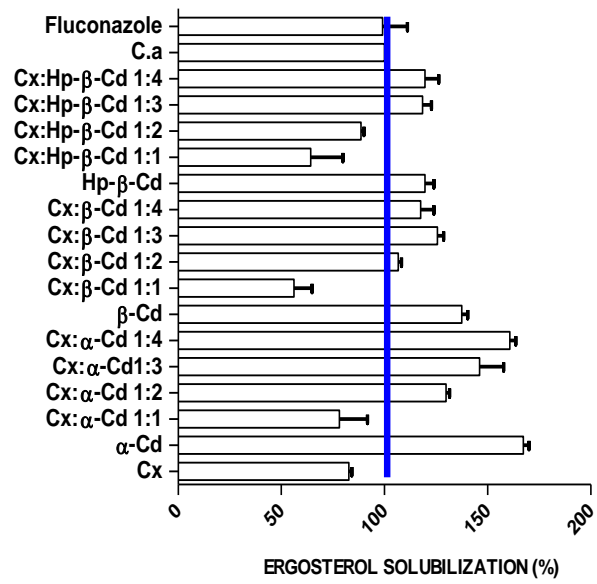
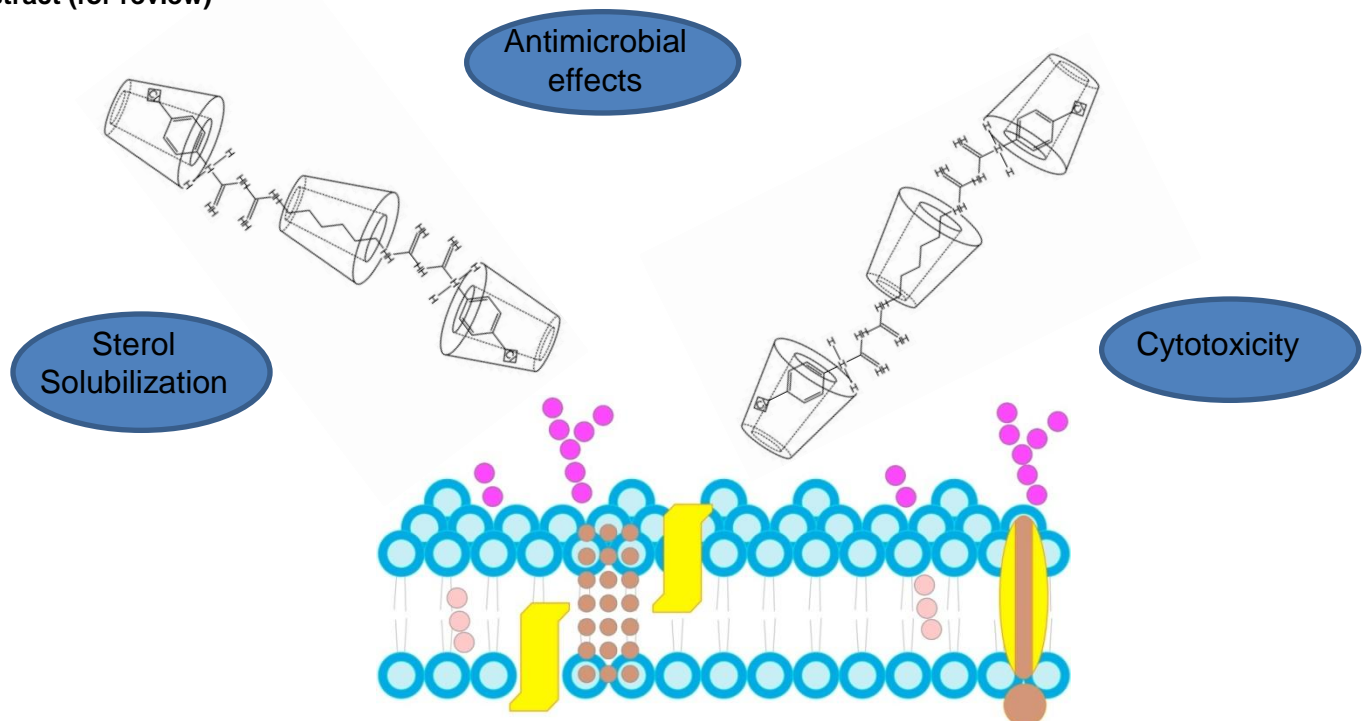
[Click here to download Supplementary Material: Caption legend.doc](#)

**author affiliation and contribution**

**[Click here to download Supplementary Material: AUTHORS Affiliation and contribution.doc](#)**

**Authors agreement**

[Click here to download Supplementary Material: AUTHORS AGREEMENT \(1\).doc](#)



## Highlights

Chlorhexidine is a good standard for antimicrobial therapeutics but yours effects was transitory. The cyclodextrins are a group polycyclic molecules can be transport others molecules, it's generally used to prepare slow delivery systems. The inclusion en different cyclodextrins change de chlorhexidine properties and this interaction with cells. The supramolecular complexes inhibit the microorganisms in lower concentrations and more ergosterol solubilization in a *C. albicans* membrane model. The lower values of cytotoxicity were shown for supramolecular complexes.