

ANA PAULA NEGRELO NEWTON

**ESTUDO BIOQUÍMICO E ELETROFISIOLÓGICO DOS EFEITOS
DO TRICLOSAN (TRN) E DA CLOREXIDINE (CHX) SOBRE
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS, CÉLULAS DO EPITÉLIO ORAL E
INTERAÇÕES COM MATERIAIS RESTAURADORES
ODONTOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Éva Gunilla Skare Carnieri.

Co-orientadora: Profa Dra. Glaucia Regina Martinez.

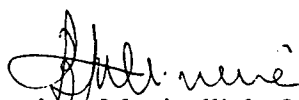
Co-orientadora estrangeira: Dra. Kathleen W. Kinnally

**CURITIBA
2006**

ANA PAULA NEGRELO NEWTON

**ESTUDO BIOQUÍMICO E ELETROFISIOLÓGICO DOS EFEITOS DO
TRICLOSAN (TRN) E DA CLOREXIDINE (CHX) SOBRE
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS, CÉLULAS DO EPITÉLIO ORAL E
INTERAÇÕES COM MATERIAIS RESTAURADORES
ODONTOLÓGICOS**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelas professoras:



Dr^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira - Orientadora
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



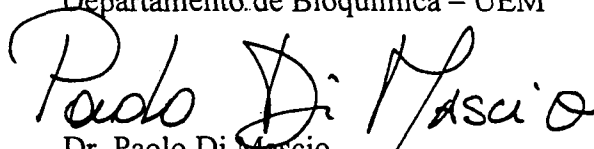
Dr^a Elaine Machado Benelli
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Dr. Silvio Marques Zanata
Departamento de Patologia Básica - UFPR



Dr. Adelar Bracht
Departamento de Bioquímica - UEM



Dr. Paolo Di Mascio
Departamento de Bioquímica - USP

Curitiba, 17 de Fevereiro de 2006

Meus Amados Pais....

Aos meus pais, Maria Marlene e Afonso, dedico a conclusão deste trabalho.

A dedicação, o carinho, o amor e o apoio recebidos de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Sem vocês, sem dúvida, eu teria desistido no meio do caminho.....

O desenvolvimento de uma tese de doutorado nunca é fácil. Às vezes, problemas de dentro e de fora do laboratório tornam o dia-a-dia do doutorando ainda mais difícil. Mas vocês conseguiram me fazer enxergar que precisamos sempre lutar por nossos objetivos. Ser vitorioso envolve não apenas ganhar batalhas, mas principalmente saber aprender com as derrotas e não desistir. Aprendi muito nestes últimos quatro anos. Não desisti e hoje me considero uma vitoriosa!
OBRIGADA POR TUDO. AMO MUITO VOCÊS!!

To My Love.....

To my love; Bernard, I dedicate this work. I'll always be proud of and thankful to this thesis, because it enabled our meeting.

That was meant to be....

I love you with all of my heart.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à minha Santa Rita de Cássia, minha santa protetora, por sempre iluminarem meu caminho e possibilitarem que eu tenha tantas pessoas a quem agradecer.

A toda minha família, pelo respeito, admiração e amor, por ter me dado carinho e apoio durante toda a minha vida. É muito bom se sentir amada assim.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela confiança, estímulo, apoio e carinho.

Às minhas co-orientadoras, Profa. Dra. Eva G. S. Carnieri e Profa. Dra. Gláucia Martinez, que sempre contribuíram com excelentes sugestões e ensinamentos.

To my foreign mentor, Dr. Kathleen W. Kinnally, for having accepted me in her lab, being always respectful and kind. To you, my gratitude, admiration and love.

Às minhas amigas do coração Ana Carolina Musse, Michele T. Delazari e Vanessa K. Ferreira, que estão ao meu lado há muito tempo, sempre me ajudando com sua amizade e carinho. Com certeza minha vida é mais alegre e descontraída graças a vocês!

À minha querida amiga Sandra Woranovicz, que sempre esteve ao meu lado, indo me visitar mesmo quando eu estava em New York.

À minha querida amiga Karin Sukrow, que tendo me dado a oportunidade de orienta-la durante sua faculdade, me deu oportunidade de aprender várias coisas, relacionadas ou não com nossos trabalhos.

À minha querida amiga Gerusa Halila, pela convivência extremamente agradável dentro e fora do laboratório, pelas conversas, pelas saídas, pela amizade e por compartilhar experiências muitas vezes tão parecidas.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas, Profa. Guilhermina Noletto, Maria Eliane Rocha e Silvia Cadena, pela amizade e ajuda dentro e fora do laboratório.

À querida amiga Profa. Dra. Juliana Menestrina, pela amizade e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório, André Mariano e Wellington Braguini, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

Às minhas amigas de laboratório, Tatiana, Carolina, Rosilene, Silvia Prado, Silvia Romão e Lívia, pela amizade e apoio, dentro e fora do laboratório.

To my friends Cindy Hughes, Laurent Dejean, Sonia Martinez-Caballero and Sergey Grigoriev, for their friendship and their precious help, during my staying at NYU.

To Dr. Peter Sacks, for helping me and for the cells used in this study.

To my dear Patricia and Bernard Hoffman Jr., which gave me love and all the necessary support when I was away from my parents. I'm proud and very happy for having you as my second parents.

Aos meus queridos amigos Ana Helena, Fernandinha, Ricardo Wagner, Rodrigo Vassoler, Gracieli, Paulinha, Marco e Elaine, pela amizade, pela ajuda e pelas interessantes conversas na sala do espectrofotômetro.

Ao meu querido amigo Alan Gonçalves, que me deu grande ajuda e apoio para meu projeto de doutorado com estágio no exterior.

À amiga Carolina Galvão, pela amizade e pela grande ajuda no início do doutorado.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pelo precioso auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao grupo de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelo uso do equipamento para análises do HPLC.

Ao grupo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelo uso do equipamento para análises do MALDI-TOF.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da USP-SP, pelo uso do equipamento para análises de ESI-MS.

Ao Prof. Dr. Phillip A. J. Gorin, pelas sugestões e ajuda na correção dos manuscritos.

À Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo auxílio durante todo este trabalho.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, principalmente por ter aprovado meu projeto de estágio no exterior e assim, ter me permitido essa incrível experiência.

À Sra. Marilza Doroti Lamour e à Srta. Nanci P. C. de Albuquerque, pelo auxílio sempre prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PRONEX, pelo suporte financeiro.

Àqueles aos quais eu possa ter esquecido de mencionar pelo nome nesta lista, que perdoem minha falha e recebam meu carinho.

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Triclosan.....	3
2.1.1. Efeitos bioquímicos do triclosan.....	4
2.1.2. Estudos clínicos sobre o triclosan.....	5
2.2. Clorexidine.....	9
2.2.1. Efeitos bioquímicos da clorexidine.....	10
2.2.2. Estudos clínicos sobre a clorexidine.....	11
2.2.3. Efeitos colaterais do uso da clorexidine.....	13
2.3. Materiais restauradores odontológicos.....	15
2.3.1. Amálgama dental.....	16
2.3.1.1. Composição do amálgama dental.....	16
2.3.1.2. Ligas convencionais para amálgama.....	16
2.3.1.3. Ligas para amálgama com alto teor de cobre.....	17
2.3.1.4. Composição após trituração (mistura com Hg).....	18
2.3.1.5. Mecanismo de reação de presa do amálgama dental.....	18
2.3.1.5.1. Amálgamas convencionais.....	18
2.3.1.5.2. Amálgamas com alto teor de cobre.....	19
2.3.1.6. Evidências da liberação de Hg de amálgama dental.....	19
2.3.2. Resinas compostas.....	22
2.3.2.1. Estudos clínicos das resinas compostas e de seus componentes.....	23
2.4. Lipoperoxidação.....	25
2.4.1. Importância do ferro na lipoperoxidação.....	28

2.4.2.	Efeitos deletérios da lipoperoxidação.....	28
2.5.	Transição de permeabilidade mitocondrial.....	30
3.	Justificativa e Objetivos.....	33
3.1.	Justificativa dos objetivos.....	33
3.2.	Objetivo geral.....	34
3.3.	Objetivos específicos.....	34
4.	Materiais e Métodos.....	36
4.1.	Materiais.....	36
4.1.1.	Materiais e reagentes.....	36
4.1.2.	Preparo da solução de triclosan.....	36
4.1.3.	Preparo da solução de clorexidine.....	37
4.1.4.	Equipamentos.....	37
4.1.5.	Equipamentos para técnica de pinçamento de membranas.....	38
4.1.6.	Suporte de informática.....	39
4.2.	Métodos.....	39
4.2.1.	Métodos para ensaios de metabolismo energético mitocondrial, lipoperoxidação e MPT.....	39
4.2.1.1.	Isolamento de mitocôndrias.....	39
4.2.1.2.	Determinação da concentração de proteínas.....	40
4.2.1.3.	Determinação do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas, cálculo do coeficiente respiratório e razão ADP/O.....	40
4.2.1.4.	Obtenção de mitocôndrias de fígado de rato rompidas por congelamento, para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória.....	41
4.2.1.5.	Determinação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em mitocôndrias rompidas por congelamento.....	41
4.2.1.5.1.	NADH oxidase (NADH: oxigênio óxido- redutase).....	42
4.2.1.5.2.	NADH desidrogenase (NADH: ferricianeto óxido- redutase).....	42
4.2.1.5.3.	NADH citocromo c redutase (NADH: citocromo c óxido- redutase).....	42
4.2.1.5.4.	Succinato oxidase (Succinato: oxigênio óxido redutase)....	43
4.2.1.5.5.	Succinato citocromo c redutase (Succinato: ferrocitocromo c óxido- redutase).....	43
4.2.1.5.6.	Succinato desidrogenase (Succinato: fenazina metasulfato óxido- redutase).....	43

4.2.1.5.7.	Obtenção do ferrocitocromo c.....	44
4.2.1.5.8.	Citocromo c oxidase (Ferrocitocromo c: oxigênio óxido reductase).....	44
4.2.1.5.9.	Determinação da atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias rompidas.....	45
4.2.1.5.10.	Determinação da atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias intactas.....	45
4.2.1.6.	Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).....	46
4.2.1.7.	Determinação do inchamento mitocondrial (<i>swelling</i>).....	46
4.2.1.7.1.	Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas.....	46
4.2.1.7.2.	Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas.....	47
4.2.1.8.	Transição de permeabilidade mitocondrial.....	47
4.2.1.9.	Liberação de ferro de ferritina.....	47
4.2.1.10.	Lipoperoxidação mitocondrial.....	48
4.2.1.11.	Interação entre triclosan e clorexidine com íons ferro.....	49
4.2.1.11.1.	Estudos espectrofotométricos da ligação do triclosan e da clorexidine com íons ferro.....	49
4.2.1.11.1.A.	Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro.....	49
4.2.1.11.1.B.	Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro – ensaio preparado sob atmosfera inerte.....	49
4.2.1.11.2.	Ensaio da ferrozina.....	50
4.2.1.12.	Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável difenil picril hidrazila (DPPH).....	50
4.2.2.	Métodos para ensaios de pinçamento de membranas (eletrofisiologia).....	50
4.2.2.1.	Isolamento de mitocôndrias.....	51
4.2.2.2.	Obtenção de mitoplastos e purificação de membranas mitocondriais.....	51
4.2.2.3.	Preparação de lipossomos.....	53
4.2.2.3.1.	Purificação da L- α - fosfatidil colina.....	53
4.2.2.3.2.	Obtenção de lipossomos.....	54
4.2.2.4.	Obtenção de proteolipossomos.....	54
4.2.2.5.	Determinação da concentração de proteínas.....	55
4.2.2.6.	Eletrofisiologia.....	55
4.2.2.6.1.	Obtenção de micropipetas e preparação de microeletrodos.....	55

4.2.2.6.2.	Circuito elétrico de medida e pinçamento de voltagem.....	56
4.2.2.6.3.	Obtenção dos gigaselos.....	58
4.2.2.6.4.	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre a atividade dos canais iônicos mitocôndrias.....	59
4.2.2.6.5.	Obtenção e análise dos dados.....	60
4.2.3.	Métodos para ensaios de cultivo celular e microscopia.....	60
4.2.3.1.	Células e condições de crescimento.....	61
4.2.3.2.	Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀) nas três linhagens celulares.....	61
4.2.3.3.	Microscopia de fluorescência.....	63
4.2.3.4.	Microscopia de lapso de tempo.....	64
4.2.4.	Métodos para ensaios de interação com materiais restauradores odontológicos.....	65
4.2.4.1.	Ensaio de interação com amálgama dental.....	65
4.2.4.1.1.	Confecção dos corpos de prova de amálgama dental.....	65
4.2.4.1.2.	Liberação de mercúrio (Hg) de corpos de prova de amálgama dental pela ação do triclosan.....	66
4.2.4.2.	Ensaio de interação com resinas compostas.....	67
4.2.4.2.1.	Confecção dos corpos de prova de resina composta.....	67
4.2.4.2.2.	Liberação de monômeros de corpos de prova de resina composta pela ação do triclosan e da clorexidine, avaliada por HPLC.....	68
4.2.4.2.3.	Espectrometria de massas (ESI-MS) correspondente aos produtos liberados na incubação de resinas compostas com triclosan ou clorexidine.....	69
4.2.5.	Análises estatísticas.....	70
5.	Resultados e Discussão.....	71
5.1.	Efeito do triclosan sobre o consumo de oxigênio, em presença de glutamato.....	71
5.2.	Efeito do triclosan sobre o consumo de oxigênio, em presença de succinato.....	73
5.3.	Efeito do triclosan sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória.....	75
5.4.	Efeito do triclosan sobre a atividade da F ₁ F ₀ ATPase.....	78
5.5.	Efeito do triclosan sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).....	82
5.6.	Efeito do triclosan sobre o inchamento mitocondrial (<i>swelling</i>).....	84
5.7.	Efeito do triclosan sobre a liberação de ferro de ferritina... ..	87
5.8.	Efeito do triclosan sobre a lipoperoxidação mitocondrial....	89

5.9.	Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável DPPH.....	91
5.10.	Interação do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro.....	92
5.11.	Efeito do triclosan sobre a transição de permeabilidade mitocondrial.....	98
5.12.	Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons cálcio.....	102
5.13.	Ensaio de eletrofisiologia.....	105
5.13.1.	Caracterização eletrofisiológica da atividade do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.....	105
5.13.2.	Efeito do triclosan sobre a atividade e perfil eletrofisiológico do PTP.....	111
5.13.3.	Efeito da clorexidine sobre a atividade e perfil eletrofisiológico do PTP.....	114
5.14.	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células do epitélio bucal.....	118
5.15.	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre mitocôndrias e material nuclear de células NOE, MSK Leuk1 e MDA: Microscopia de fluorescência.....	123
5.16.	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células NOE, MSK Leuk1 e MDA: Microscopia de lapso de tempo.....	128
5.17.	Ensaio de interação com materiais restauradores odontológicos.....	133
5.17.1.	Interação "in vitro" do triclosan com corpos de prova de amálgama dental.....	133
5.17.2.	Espectro de absorção da clorexidine em presença de HgCl ₂	134
5.17.3.	Interação "in vitro" do triclosan e da clorexidine com corpos de prova de resina composta.....	137
5.17.3.1.	Avaliação de produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta, por HPLC.....	137
5.17.3.2.	Análise por UVVIS dos produtos coletados por HPLC.....	149
5.17.3.3.	Análise por espectrometria de massas dos produtos coletados por HPLC.....	150
6.	Discussão Final.....	156
6.1.	Metabolismo mitocondrial.....	156
6.2.	Cultivo celular.....	159
6.3.	Interação com materiais restauradores odontológicos.....	162
7.	Conclusões.....	166
8.	Referências Bibliográficas.....	168
	ANEXOS.....	204

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural do triclosan.....	3
Figura 2	Fórmula estrutural da clorexidine.....	9
Figura 3	Formação de radicais lipídicos.....	26
Figura 4	Formação de dienos conjugados.....	26
Figura 5	Formação de hidroperóxido ou endoperóxido lipídico.....	27
Figura 6	Formação do malondialdeído.....	27
Figura 7	Representação esquemática detalhada da montagem das placas de 96 poços para ensaios de determinação da DL ₅₀	62
Figura 8	Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de amálgama dental e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais.....	66
Figura 9	Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de resina composta e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais.....	68
Figura 10	Efeito do triclosan sobre mitocôndrias energizadas com glutamato.....	72
Figura 11	Efeito do triclosan sobre mitocôndrias energizadas com succinato.....	75
Figura 12	Efeito do triclosan sobre a atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias intactas.....	81
Figura 13	Efeito do triclosan sobre a atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias rompidas.....	81
Figura 14	Efeito do triclosan sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias de fígado de rato.....	83
Figura 15	Efeito do triclosan sobre a amplitude e a velocidade do inchamento mitocondrial energizado com glutamato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	85
Figura 16	Efeito do triclosan sobre o inchamento mitocondrial desenergizado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	87
Figura 17	Efeito do triclosan sobre a liberação de ferro de ferritina.....	88
Figura 18	Efeito do triclosan sobre a lipoperoxidação mitocondrial.....	90
Figura 19	Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável DPPH.....	92
Figura 20	Espectros de absorção do triclosan em presença de íons ferro	93
Figura 21	Espectros de absorção da clorexidine em presença de íons ferro.....	94
Figura 22	Espectro de absorção do triclosan em presença de íons ferro, sob atmosfera inerte.....	95
Figura 23	Espectro de absorção da clorexidine em presença de íons ferro, sob atmosfera inerte.....	96

Figura 24	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre a formação do complexo Fe ²⁺ -ferrozina.....	97
Figura 25	Efeito do triclosan sobre a MPT em presença de Ca ²⁺ (100 μmol. L ⁻¹).....	100
Figura 26	Efeito do triclosan sobre a MPT em presença de Ca ²⁺ (200 μmol. L ⁻¹).....	101
Figura 27	Espectros de absorção do triclosan em presença de íons cálcio.....	103
Figura 28	Espectros de absorção da clorexidine em presença de íons cálcio.....	104
Figura 29	Histograma de amplitude da atividade do PTP.....	106
Figura 30	Relação corrente – voltagem na atividade do PTP.....	108
Figura 31	Registros de corrente e respectivos histogramas de amplitude do PTP na ausência de drogas (controle).....	110
Figura 32	Efeito do triclosan sobre o PTP.....	112
Figura 33	Relação corrente – voltagem na atividade do PTP em presença de triclosan.....	113
Figura 34	Efeito da clorexidine sobre o PTP.....	115
Figura 35	Relação corrente – voltagem na atividade do PTP em presença de clorexidine.....	116
Figura 36	Resumo dos resultados de eletrofisiologia.....	117
Figura 37	Determinação da DL ₅₀ da CHX para as células do epitélio oral	119
Figura 38	Determinação da DL ₅₀ do TRN para as células do epitélio oral	122
Figura 39	Efeitos do triclosan e da clorexidine sobre núcleo e mitocôndrias de células do epitélio oral – linhagem normal (NOE).....	125
Figura 40	Efeitos do triclosan e da clorexidine sobre núcleo e mitocôndrias de células do epitélio oral – linhagem pré maligna (MSK Leuk1).....	126
Figura 41	Efeitos do triclosan e da clorexidine sobre núcleo e mitocôndrias de células do epitélio oral – linhagem maligna (MDA).....	127
Figura 42	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células NOE.....	130
Figura 43	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células MSK Leuk1...	131
Figura 44	Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células MDA.....	132
Figura 45	Efeito do triclosan na liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama.....	134
Figura 46	Espectro de absorção da clorexidine em presença de HgCl ₂	136
Figura 47	Cromatogramas representativos do triclosan e da clorexidine...	137
Figura 48	Cromatogramas representativos dos monômeros de resina composta.....	139
Figura 49	Cromatogramas representativos dos produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta	

	partir de corpos de prova de resina composta.....	141
Figura 50	Cromatogramas representativos de produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta polimerizada e não polimerizada.....	143
Figura 51	Integração da área do pico 1.....	145
Figura 52	Integração da área do pico 2.....	146
Figura 53	Integração da área do pico 3.....	147
Figura 54	Espectros de UV/VIS dos picos 1 e 3 coletados por HPLC.....	150
Figura 55	Fórmula estrutural dos monômeros BisGMA,e TEGDMA.....	150
Figura 56	Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI ⁺ com potencial do cone em 24V do pico 1 (R.T. 3,2 min.).....	152
Figura 57	Fórmula estrutural do TEGMA.....	153
Figura 58	Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI ⁺ com potencial do cone em 24V do pico 3 (R.T. 7,9 min.).....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental.....	16
Tabela II	Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental com alto teor de cobre.....	18
Tabela III	Programa para fabricação de micropipetas.....	56
Tabela IV	Efeito do triclosan nas atividades enzimáticas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial.....	77
Tabela V	Relação entre a concentração de triclosan utilizada e o fechamento do PTP.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ADA	Associação Dentária Americana
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butilhidróxi tolueno
BisDMA	Bisfenol A dimetacrilato
BisGMA	Bisfenol A glicidil metacrilato
BPA	Bisfenol A
BSA	Soro albumina bovina
CHX	Clorexidine
CPC	Cloreto de cetil piridíneo
CsA	Ciclosporina A
DCPIP	2,6 diclorofenolindofenol
dp	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N'tetracético
FCS	Soro bovino fetal
GC	Cromatografia gasosa
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HEPES	N- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HEX	Hexetidine
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ID ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IL-1	Interleucina 1
md	Média
MDIA	Malondialdeído

MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MS	Espectrometria de massas
mtDNA	DNA mitocondrial
MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzida
OSPC	Proteína que confere sensibilidade à oligomicina
PEP	Fosfoenol piruvato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
P _i	Fosfato inorgânico
PMS	Fenazina metassulfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
R.T.	Tempo de retenção
SNG	Sanguinarina
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TEGMA	Trietilenoglicol dimetacrilato hidrolisada de uma ligação éster
TRN	Triclosan

RESUMO

Triclosan (TRN) e clorexidina (CHX) são dois agentes antissépticos largamente utilizados em odontologia. O presente estudo avaliou os efeitos do TRN sobre o metabolismo energético mitocondrial e sobre importantes processos biológicos, tais como lipoperoxidação e transição de permeabilidade mitocondrial (MPT). Além disso, os efeitos destes dois agentes foram avaliados em relação à sua habilidade de interagir com materiais restauradores odontológicos, tais como amálgama e compósitos. Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato oxidando glutamato, o estado III da respiração foi significativamente ($p < 0,05$) reduzido na presença de TRN, alcançando uma inibição de 31% com 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína, enquanto o estado IV da respiração foi significativamente induzido, alcançando um estímulo máximo de 452% com 30 nmol TRN. mg^{-1} proteína. Análises da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória identificaram significativa inibição entre os complexos II e III. Entre os parâmetros avaliados, as atividades da ATPase em mitocôndrias isoladas e rompidas foram mais afetadas, sendo estimulada em ~600% em mitocôndrias intactas e inibida em 40% em mitocôndrias rompidas. O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), estimado por espectrofluorimetria, foi completamente colapsado na presença de 15 nmols TRN. mg^{-1} proteína. Este agente (10 nmols TRN. mg^{-1} proteína) inibiu completamente o inchamento mitocondrial energizado. O TRN estimulou a liberação de ferro de ferritina de forma dose-dependente, mas inibiu a lipoperoxidação mitocondrial ferro-dependente. Análises de UV/VIS do TRN em presença de íons ferro mostraram mudanças significativas, sugerindo que uma interação deste agente com tais íons não pode ser descartada, o que justificaria os resultados obtidos com a lipoperoxidação. Por outro lado, a CHX também mostrou diferenças no seu espectro UV/VIS em presença de íons ferro, mas este agente estimulou a lipoperoxidação mitocondrial ferro-dependente, mostrando um mecanismo de ação diferente do TRN. TRN e CHX também mostraram efeitos opostos na MPT: enquanto a CHX estimulou este processo (dados não mostrados), o TRN o inibiu de forma dose-dependente. Estes resultados foram confirmados por ensaios de pinçamento de membranas, os quais mostraram que o TRN inibe/fecha o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), enquanto a CHX o estimula/abre. Os efeitos citotóxicos do TRN e da CHX foram também avaliados, utilizando-se três diferentes linhagens celulares do epitélio bucal: normal (NOE), pré maligna (MSK Leuk1) e maligna (MDA 886Ln). Mais uma vez, a CHX e o TRN mostraram efeitos opostos: enquanto a CHX foi mais citotóxica contra células malignas ($DL_{50} = 1,16 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$), comparada às células pré malignas e normais ($DL_{50} = 7,72 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ e $6,37 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente), o TRN foi mais citotóxico contra células normais ($DL_{50} = 2,93 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$), comparado às células pré malignas e malignas ($DL_{50} = 10,7 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ e $11,7 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente). Os resultados obtidos por análise de fluorescência da Rodamina123 e do Hoechst confirmaram que o TRN e a CHX interferem com o $\Delta\psi$ mitocondrial e induzem apoptose. A possibilidade de uma interação entre o TRN e o amálgama dental, estimada através da liberação de Hg, foi descartada, e nenhum dos agentes (TRN ou CHX) afeta a estrutura dos compósitos dentais, visto que a sua incubação com espécimens de compósitos polimerizados e não polimerizados não mostrou nenhuma diferença, quando comparados ao controle na ausência de drogas, como verificado por análises de HPLC sob as condições experimentais utilizadas. O extenso uso destes agentes deve ser analisado e revisado com cuidado, desde que eles podem desencadear vários efeitos colaterais, como mostrado no presente estudo.

ABSTRACT

Triclosan (TRN) and Chlorhexidine (CHX) are two antiseptics largely used in dentistry. The present study evaluated the effects of TRN on the mitochondrial energy metabolism, and on important biological processes, such as lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition (MPT). Besides that, the effects of these two agents were evaluated in respect to their ability to interact with restorative dental materials, such as amalgam and composites. In isolated mitochondria of rat liver oxidizing glutamate, the state III of respiration was significantly ($p < 0.05$) reduced in the presence of TRN, reaching 31% of inhibition with 60 nmols TRN. mg^{-1} protein, while state IV of respiration was significantly induced, reaching 452% stimulus with 30 nmols TRN. mg^{-1} protein. Analysis of the enzymatic activity of the respiratory chain complexes had identified significant inhibition between complexes II and III. Among the evaluated parameters, the ATPase activity in isolated and unbroken mitochondria were more affected, being stimulated by ~600% in intact mitochondria and inhibited by 40% in broken mitochondria. The electric potential of membrane ($\Delta\psi$) of isolated mitochondria, esteemed through spectrofluorimetry, was completely collapsed in the presence of 15 nmols TRN. mg^{-1} protein. This agent at 10 nmols TRN. mg^{-1} protein completely inhibit energized mitochondrial swelling. Although TRN stimulated iron release from ferritin in a dose-dependent manner, it inhibited iron- dependent mitochondrial lipid peroxidation. UV/VIS analysis of TRN in the presence of iron ions showed significant changes, suggesting an interaction of this agent with these ions, and that could explain the results obtained with lipid peroxidation. CHX also showed differenced in its UV/VIS spectrum in the presence of iron ions, but this agent stimulated iron- dependent mitochondrial lipid peroxidation, showing a different action mechanism from TRN. TRN and CHX also showed opposite effects on MPT: while CHX stimulated this process (data not shown), TRN inhibited it in a dose-dependent manner. These results were confirmed with patch clamp assays, which showed that TRN inhibits/closes mitochondrial permeability pore (PTP), while CHX stimulates/ opens it. The cytotoxic effects of these agents were evaluated *in situ*, using three different oral epithelium cell lines: normal (NOE), pre malignant (MSK Leuk1) and malignant (MDA 886Ln). Once again, CHX and TRN showed opposite effects: while CHX was more cytotoxic against malignant cells ($\text{IC}_{50}=1.16 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$), compared to pre malignant and normal ones ($\text{IC}_{50}= 7.72 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ and $6.37 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectively), TRN was more citotoxic against normal cells ($\text{IC}_{50}= 2.93 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$) compared to pre malignant and malignant ones ($\text{IC}_{50}= 10.7 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ and $11.7 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectively). The results obtained with Rhodamine123 and Hoechst fluorescence analysis confirmed that TRN and CHX interfere with the mitochondrial $\Delta\psi$ and induce apoptosis. The possibility of an interaction between TRN and dental amalgam, esteemed through Hg release, was discharged and either agents (TRN or CHX) affect the structure of dental composites, since the incubation of cured and uncured composite specimens with them did not show any difference compared to control in the absence of drugs, in HPLC analysis under experimental conditions used. The extensive use of these agents must be carefully analyzed and reviewed, since they can have so many side effects, as shown in this study.

1. Introdução

A ocorrência da placa dentária é um problema grave em saúde pública (NEWBRUN, 1988; AERTS *et al.*, 2004) e esforços para se evitar a sua formação ou efetivamente removê-la da superfície dos dentes são realizados. Uma das manobras mais comuns é o uso de substâncias antimicrobianas (NEWBRUN, 1988; THYLSTRUP & FEJERSKOV; 1994), dentre as quais as mais freqüentemente utilizadas são o triclosan (TRN) e a clorexidine (CHX). Este provavelmente possui o maior suporte de dados clínicos relatados em odontologia entre os agentes anticáries que não contêm flúor (FORWARD, 1994), enquanto aquele é um agente antimicrobiano encontrado em formulações tão diversas quanto dentifrícios, sabonetes, desodorantes, anti-perspirantes, cremes cosméticos e antimicrobianos, plásticos e brinquedos, entre outros (McMURRY *et al.*, 1998; LEVY *et al.*, 1999). Embora utilizados como agentes de bochecho, uso tópico ou incorporados em outros produtos, estes agentes podem sofrer absorção bucal (CHOW *et al.*, 1977; LIN, 2000), sendo encontrados no plasma sanguíneo, no fígado e na vesícula biliar (HOVANDER *et al.*, 2002), o que indicaria sua excreção biliar e circulação entero-hepática (KANETOSHI *et al.*, 1988). Portanto, efeitos tóxicos sistêmicos não podem ser descartados.

Embora existam vários trabalhos avaliando a eficácia clínica do TRN e da CHX, vários aspectos dos seus efeitos sub-celulares e mecanismo de ação toxicológica ainda não foram elucidados. Considerando-se que ambos os agentes apresentam efeitos sobre membranas, as mitocôndrias representariam um alvo potencial importante, desde que as atividades desta organela são dependentes da integridade de membrana. Além disso, as mitocôndrias têm sido usadas por vários autores como modelo experimental para estudos de citotoxicidade (WALLACE & STARKOV, 2000), estando também envolvidas em mecanismos de morte celular (PARONE *et al.*, 2002). No presente estudo foi avaliado o efeito do TRN sobre alguns parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, utilizando-se para isso mitocôndrias isoladas de fígado de rato, a fim de avaliar um potencial mecanismo através do qual o TRN exerce seus efeitos biológicos.

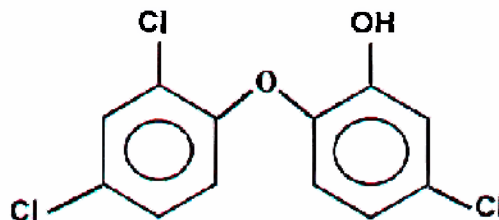
Por outro lado, deve-se levar em consideração que as concentrações de TRN e CHX utilizadas na prática odontológica são elevadas (faixa de milimolar) e, portanto, as células do epitélio bucal também sofrem os efeitos citotóxicos destes agentes. Neste contexto, deve-se considerar também que grande parte da população possui restaurações em seus dentes (MOYSES *et al.*, 2003; AERTS *et al.*, 2004) e, portanto, possíveis interações destes agentes com materiais restauradores não devem ser descartadas. Portanto, no presente estudo, além dos efeitos sobre o metabolismo mitocondrial, foi avaliado o efeito do TRN e da CHX sobre células do epitélio oral, utilizando-se para isso, três linhagens diferentes: normal (NOE), pré-maligna (MSK Leuk1) e maligna (MDA). Além disso, foram desenvolvidos experimentos avaliando possíveis interações entre estes agentes e os materiais restauradores odontológicos, amálgama e resina composta.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Triclosan

Triclosan (TRN) (Figura 1), um derivado de (bis-fenil) difenil éter conhecido como 2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil éter ou 5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenoxi) fenol, tem sido usado por mais de 30 anos como agente antibacteriano e antifúngico (LEVY *et al.*, 1999). Como resultado de sua atividade bacteriostática contra uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, este agente é utilizado em vários produtos de cuidado pessoal (LEVY *et al.*, 1999). Entretanto, colutórios e dentifrícios contendo TRN não são aceitos pela ADA e não estão disponíveis comercialmente nos EUA (CIANCIO, 1992).

Figura 1: Fórmula estrutural do triclosan



Estruturalmente, o TRN relaciona-se com compostos bis-fenil policlorados e bis-fenil clorofenol e, devido principalmente à síntese química de policloro difenil éters e fenoxi fenóis, há o potencial para a formação de pequenas quantidades de produtos de degradação que devem ser considerados. Desde o início da década de 70, até a metade da década de 80, pesquisas revelaram que os herbicidas fenoxi tais como 2,4-D e 2,4,5-T, os principais componentes do agente laranja, o herbicida hexaclorofeno, vários clorofenóis (como pentacloro fenol, usado no tratamento de madeira), certos policloro fenoxi fenóis e policloro difenil éters e herbicidas difenil éter continham baixos, porém significativos, níveis de dioxinas policloradas e furanos policlorados. Conseqüentemente, sendo o TRN um policloro fenoxi fenol, a possibilidade de ocorrência de policloro dibenzo -p- dioxinas (dioxinas) e

policloro-dibenzofuranos (dibenzofuranos) como impurezas de sua síntese não pode ser descartada. A presença ou ausência destes compostos é dependente do tipo e pureza dos materiais usados no início da síntese do TRN, bem como as condições de reação tais como temperatura, pressão, entre outras. Se presentes, suas concentrações relativas como impurezas podem variar de lote para lote. Isso deve ser levado em conta devido à toxicidade das dioxinas e dibenzofuranos, que varia com a posição e o número de átomos de cloro ligados aos anéis aromáticos. Em geral, sua toxicidade aumenta com substituições crescentes de cloretos. As dioxinas e dibenzofuranos que possuem átomos de cloro nas posições 2, 3 e 7 são particularmente tóxicas (MENOUTIS & PARISI, 2002).

2.1.1. Efeitos bioquímicos do triclosan

O agente fenólico não carregado TRN age primariamente na membrana citoplasmática, interagindo com fosfolipídeos de células procarióticas e eucarióticas (VILLALAIN *et al.*, 2001; LYGRE *et al.*, 2003; GUILLEN *et al.*, 2004) e interferindo com o transporte de membranas e, em concentrações elevadas, causando a liberação de constituintes citoplasmáticos (van der HOEVEN *et al.*, 1993). Sendo lipossolúvel, o TRN pode atravessar facilmente membranas biológicas. Em bactérias e fungos, o TRN inibe o sítio ativo da ENR (enoil-acyl carrier protein reductase) (LEVY *et al.*, 1999), também chamada de FabI (pois é codificada pelo gene *fabI* (McMURRY *et al.*, 1998)). A inibição ocorre em concentrações picomolares e é irreversível (HEATH *et al.*, 1999). A ENR catalisa o passo final, regulatório, no ciclo da ácido graxo sintase: a redução da dupla ligação carbono-carbono em uma espécie enoil, que está covalentemente ligada à proteína carreadora de acil (LEVY *et al.*, 1999). Assim, o TRN impede as bactérias de metabolizar ácidos graxos necessários às membranas celulares e outras funções bacterianas vitais. Uma molécula de TRN inibe permanentemente uma molécula de FabI, o que explica como o TRN tem potente ação antibiótica em baixas concentrações (LEVY *et al.*, 1999). A inibição da ENR por TRN foi também demonstrada para *Plasmodium falciparum*, caracterizando-se como um potente inibidor do

desenvolvimento do parasita tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SUROLIA & SUROLIA, 2001).

O TRN apresenta aproximadamente 65% da efetividade da CHX, porém diferentemente deste agente, é um composto não iônico, compatível com os ingredientes dos dentífricos. Por si só, o TRN não possui boa retenção na cavidade bucal, mas quando adicionado em formulações especiais, sua retenção é aumentada (CIANCIO, 1992). A fim de incrementar sua atividade antiplaca, duas estratégias têm sido usadas: TRN tem sido combinado com: a) um co-polímero (ácido polivinil metil éter maléico), o qual aumenta sua retenção na cavidade bucal (MARSH, 1992; MORAN *et al.*, 1994) ou b) outro agente antimicrobiano, o citrato de zinco (MARSH, 1992).

Os dentífricos que combinam TRN/citrato baseiam-se na premissa de que interações aditivas ou sinérgicas podem ser obtidas com concentrações relativamente baixas de ambos os agentes. TRN e citrato parecem ter modos complementares de ação: este é mais efetivo sobre a placa existente enquanto que aquele inibe a formação de placa sobre superfícies limpas (MARSH, 1992). TRN e zinco têm efeitos inibitórios aditivos nas atividades enzimáticas tais como a protease semelhante à tripsina de *Porphiromonas gingivalis* (MARSH, 1991), na taxa de captação de glicose por estreptococos (CUMMINS, 1991) e no crescimento das bactérias da flora bucal (BRADSHAW *et al.*, 1993).

O TRN é capaz de bloquear a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em culturas de fibroblastos gengivais humanos previamente estimulados com interleucina 1β (IL-1β). Isso sugere que o efeito do TRN sobre a inflamação gengival pode ser devido a um efeito inibidor pronunciado na produção de mediadores específicos da inflamação, como as prostaglandinas (GAFFAR *et al.*, 1995).

2.1.2. Estudos clínicos sobre o triclosan

A maior parte dos estudos disponíveis para o TRN tem como enfoque sua ação antimicrobiana e antiinflamatória. Atualmente, existem vários dentífricos e colutórios disponíveis comercialmente que contêm agentes antimicrobianos para controle de placa e gengivite. Esses produtos precisam

ser desenvolvidos com base em dois requerimentos microbiológicos conflitantes: os agentes devem ser liberados em concentrações suficientes para que o benefício clínico seja alcançado, mas ao mesmo tempo, não podem romper o equilíbrio da ecologia natural do local (MARSH, 1992).

Estudos clínicos utilizando TRN por períodos de seis meses ou mais mostram redução na placa bacteriana de até 30% e redução da gengivite entre 20-75% dos casos. Redução de cálculo dental e ausência de efeitos adversos significantes resultantes do uso de colutórios contendo TRN também são descritos (CIANCIO, 1992). Estudos com TRN têm mostrado que o uso em longo prazo deste agente não levou à ruptura da ecologia da placa nem ao desenvolvimento de resistência bacteriana (MARSH, 1992).

Vários autores demonstraram os efeitos do TRN sobre a placa bacteriana mostrando que este agente, além de causar declínio no metabolismo basal da placa, observado pela diminuição na produção de acetato (Van der HOEVEN *et al.*, 1993), exerce também um efeito redutor de placa bacteriana (WAALER *et al.*, 1993), que é dose-dependente, porém inferior àquele exercido pela CHX (KJAERHEIM *et al.*, 1994). Os autores destacam ainda a importância do pH na ação do TRN visto que em pH alcalino (7,9), o composto apresenta carga negativa, maior solubilidade, porém menor eficácia (KJAERHEIM *et al.*, 1994).

Com a finalidade de comparar a eficácia relativa dos colutórios contendo CHX, cloreto de cetil piridíneo (CPC)/óleos essenciais ou TRN/co-polímero, MORAN *et al.* (1994) realizaram um estudo clínico que avaliou o crescimento de placa bacteriana após quatro dias de uso destes colutórios, sem escovação. Estatisticamente, a CHX foi o agente mais efetivo, sendo seguida por CPC/óleos essenciais, TRN/co-polímero e controle negativo (água).

Vários outros estudos foram realizados utilizando diferentes combinações entre o TRN com surfactantes (RAMBERG *et al.*, 1995), ou dentifrícios e colutórios disponíveis comercialmente contendo tal agente (BINNEY *et al.*, 1995; BINNEY *et al.*, 1996) e seus resultados sugerem que além da ação antiplaca, o TRN exerce um efeito antigengivite. Neste aspecto, GAFFAR *et al.* (1995) observaram que o TRN tem um efeito inibitório direto nas

enzimas primárias (ciclooxigenase e 5- lipoxigenase) nas vias do metabolismo do ácido araquidônico e que esta ação pode levar à redução na formação de metabólitos pró-inflamatórios tais como PGE₂ e leucotrieno A₄. Isso foi confirmado em estudos em cultura de células nos quais o TRN inibiu a produção de PGE₂ induzida por interleucina 1 (IL-1) em fibroblastos gengivais humanos (GAFFAR *et al.*, 1995). Esse efeito é particularmente relevante desde que o fibroblasto gengival é uma importante célula-alvo para IL-1 durante o processo de inflamação gengival. IL-1 β é produzida nos tecidos gengivais e seu nível tem sido correlacionado com o grau de inflamação gengival (WILTON *et al.*, 1992).

A maior formação de placa *de novo* em superfícies adjacentes a unidades gengivais inflamadas é reconhecida de longa data (HILLAM & HULL, 1977). Foi sugerido por HILLAM & HULL (1977) que o fluido gengival pode conter fatores que favorecem a adesão inicial e o crescimento subsequente de bactérias formadoras de placa em superfícies dentárias que foram limpas mecanicamente. Considerando tal possibilidade, RAMBERG *et al.* (1996) avaliaram o efeito de colutórios contendo TRN (0,06%) ou CHX (0,12%) na modificação da quantidade de placa formada nas superfícies dentais adjacentes a unidades gengivais saudáveis e inflamadas. Verificaram que a formação de placa *de novo* foi mais pronunciada em superfícies dentais adjacentes a unidades gengivais inflamadas que em relação a unidades gengivais saudáveis. Ainda, o grupo usando colutórios com TRN ou CHX recebeu valores de índice de placa inferiores ao grupo tratado com placebo, sendo que os índices médios de placa para o grupo com TRN foram estatisticamente mais altos quando comparados àqueles com CHX em ambas as situações: superfícies dentárias adjacentes a sítios gengivais saudáveis ou inflamados.

Após a avaliação de colutórios disponíveis comercialmente na Inglaterra, RENTON-HARPER *et al.* (1996) observaram que a ordem decrescente de eficácia encontrada foi: Peridex (CHX 0,12%); solução de CPC a 0,05%; Actibrush (TRN 0,03%), C31G dentifrício líquido (fluoreto de sódio) e solução salina (controle negativo), sendo que a CHX foi estatisticamente mais efetiva

que todas as outras soluções. Apesar do TRN e do CPC terem mostrado efeitos bastante similares, o TRN parece ter efeito preventivo de gengivite, quando usado em longo prazo.

SCHAEKEN *et al.* (1996) notaram que bochechos com TRN/zinco ocasionaram diferenças significativas na saúde gengival (avaliada pelo sangramento após sondagem) e na quantidade de placa formada durante todo o período de estudo (até 28 semanas), quando comparados com grupo controle (solução de fluoreto a 0,4%).

Existe pouca informação em relação às propriedades antifúngicas de colutórios contendo CPC, hexetidine (HEX), sanguinarina (SNG) e triclosan (TRN). GIULIANA *et al.* (1997) avaliaram as propriedades destes colutórios, usando, para isso, seis espécies diferentes de levedura (*Candida albicans*; *C. parapsilosis*; *C. krusei*; *C. guilliermondii*; *Torulopsis* e *Saccharomyces cerevisiae*). Como controles negativo e positivo foram utilizados meio de cultura sem inóculo e meio cultura com inóculo, mas sem colutório, respectivamente. Os autores demonstraram que todos os colutórios analisados, com exceção do Dentosan S (SNG 3%), foram efetivos contra todas as espécies testadas em concentrações bem abaixo das existentes em formulações comerciais. A determinação do tempo necessário para ação do agente mostrou que apenas o colutório com CHX e o com CPC foram fungicidas contra os organismos testados dentro de 180 segundos, apesar de que as diferenças no tempo de ação entre os colutórios testados não foram estatisticamente significativas. Por outro lado, Plax 45 (TRN 0,045%) e Oraseptic (HEX 0,1%) não mostraram atividade fungicida sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (GIULIANA *et al.*, 1997).

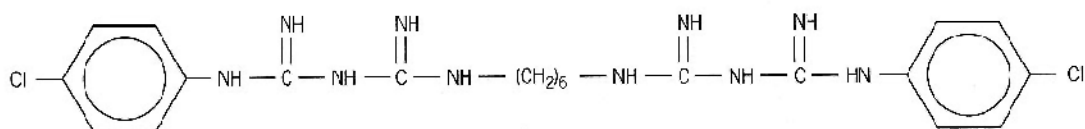
O TRN tem sido encontrado no plasma sanguíneo (HOVANDER *et al.*, 2002). Neste aspecto, absorção bucal significativa parece ocorrer após aplicação tópica como bochechos, bem como a sua retenção sobre a placa dental (LIN, 2000).

Um outro agente antimicrobiano bastante usado na prática odontológica atual é a clorexidina. Como este agente também foi estudado no presente trabalho, uma breve revisão sobre ele será apresentada a seguir.

2.2. Clorexidine

A clorexidine (CHX) (Figura 2) é uma bisbisguanida, que apresenta ação fungicida e bactericida contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A grande disponibilidade de estudos se deve ao fato de ser o agente inibidor de placa bacteriana mais potente até hoje conhecido (CANCRO *et al.*, 1972; SCHIOTT *et al.*, 1976a; KNUUTTILA & SÖDERLING, 1980; NEWBRUN, 1988; JENKINS *et al.*, 1988; PUCHER & DANIEL, 1993; WARNER *et al.*, 1993; LAMBERT *et al.*, 1997; SKÖLD *et al.*, 1998). Este agente consiste de dois anéis de 4-clorofenol e dois grupos bisguanidas, que estão simetricamente ligados a uma cadeia hexametileno (Figura 2), estrutura que lhe confere um caráter anfipático (THYLSTRUP e FEJERSKOV; 1994).

Figura 2: Fórmula estrutural da clorexidine



Desde sua introdução no mercado, no início da década de 1950, a CHX tem sido amplamente utilizada na prática médica. Inicialmente, foi usada em situações como: preparo pré-cirúrgico da pele, profilaxia de queimaduras, em alguns procedimentos ginecológicos e obstétricos (WARNER *et al.*, 1988), e ainda como agente conservante de colírios (JAMINET *et al.*, 1970).

Os relatos promissores do uso da CHX para controle de placa bacteriana estimularam, nos anos 70, a publicação de vários trabalhos a respeito de seus efeitos clínicos, que incluíam a inibição da formação de placa, a diminuição da gengivite e da atividade de cáries (DAVIES *et al.*, 1970; LÖE & SCHIOTT; 1970; CANCRO *et al.*, 1972). A observação de diminuição da formação da placa dental e da severidade da inflamação gengival foi confirmada em vários estudos (JOHNSON & KENNEY, 1972; REED *et al.*, 1977). Também foi

observado que a CHX aumenta a velocidade de cicatrização após cirurgias periodontais, quando aplicada dentro da bolsa periodontal recém-operada (ASBOE-JÖRGENSEN *et al.*, 1974).

Atualmente, a CHX é usada tanto no combate às doenças periodontais quanto no combate à cárie, em procedimentos pré-operatórios orais, como extrações dentárias (BONINE, 1995) e implantes dentários (LAMBERT *et al.*, 1997). As formas de aplicação desta substância variam desde bochechos usados em diversas concentrações, géis aplicados em moldeiras individuais, vernizes dentários, e até “chips” introduzidos diretamente no interior da bolsa periodontal (SKÖLD *et al.*, 1998; GREENSTEIN & POLSON, 1998).

HEARD & ASHWORTH (1968) e JAMINET *et al.* (1970) relataram que um dos principais produtos de degradação da CHX é a *p*-cloroanilina, uma substância altamente tóxica que, quando absorvida, leva à meta-hemoglobinemia, podendo levar à cianose quando as concentrações de metahemoglobina são elevadas (JAMINET *et al.*, 1970; LENGHA, 1985; SAX & LEWIS, 1987). A exposição à *p*-cloroanilina pode também causar dano hepático e renal (BREThERICK, 1986; LENGHA, 1985).

2.2.1. Efeitos bioquímicos da clorexidina

Após estudar os efeitos da CHX sobre células intactas e protoplastos de *S. faecalis*, HAROLD *et al.* (1969) demonstraram efeitos inibitórios sobre a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, inibindo processos de transporte dependentes de energia e, assim, inibindo o crescimento bacteriano.

CHRISTENSEN & JENSEN (1974) relataram que a CHX em microsomas é capaz de causar a precipitação de proteínas, converter o citocromo P-450 em sua forma inativa P-420 e, ainda, estimular a atividade da glicose-6-fosfatase. A CHX também promove efeitos sobre o metabolismo mitocondrial: aumenta o consumo de oxigênio em cerca de 2,5 vezes nas concentrações de 10 – 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$; em concentrações até 15 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ causa leve estímulo da $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPase}$, mas em maiores concentrações, até 250 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, inibe esta enzima em até um terço do seu valor controle (CHRISTENSEN *et al.*, 1975). Estes autores observaram que grande parte da atividade da

malato desidrogenase (87%), uma enzima da matriz mitocondrial, foi encontrada no sobrenadante, após a exposição da organela à CHX (25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) e sugeriram que a droga promove mudanças na fluidez e estrutura da membrana mitocondrial.

JENSEN *et al.* (1975) observaram que a CHX interfere na atividade de enzimas peroxissomais e lisossomais, estimulando a atividade da fosfatase alcalina lisossomal e inibindo a da catalase peroxissomal.

KNUUTTILA & SÖDERLING (1981) pesquisaram os efeitos de diferentes concentrações da CHX sobre a viabilidade celular e a liberação de enzimas lisossomais de macrófagos em repouso e em fagocitose. Os autores mostraram que em concentrações de CHX entre 0,005 – 0,01%, houve efeitos citotóxicos para estas células. Em concentrações até 0,01% de CHX, houve uma discreta liberação de lactato desidrogenase.

2.2.2. Estudos clínicos sobre a clorexidine

No final da década de 60 e início da década de 70 surgiram vários trabalhos clínicos com CHX, para mostrar sua eficácia no combate à formação de placa e/ou cálculo dentários (STALLARD *et al.*, 1969; STURZENBERGER & LEONARD, 1969; McNEAL, 1969; SCHIOTT *et al.*, 1970).

O efeito do uso ininterrupto de CHX por dois anos sobre a flora bacteriana salivar humana foi estudado por SCHIOTT *et al.* (1976a). O tratamento com CHX (0,2% por 1 minuto, uma vez ao dia) produziu um decréscimo de 30-50% na população de microrganismos aeróbios e anaeróbios totais, embora com o término do tratamento, a população microbiana voltasse a crescer. Seguindo o mesmo protocolo, outros parâmetros foram analisados, como: a) diferenças de sensibilidade das várias espécies bacterianas ao seu tratamento, sendo, em geral, as Gram-positivas mais sensíveis que as Gram-negativas e os estreptococos mais sensíveis que os estafilococos. (SCHIOTT *et al.*, 1976b); b) realização de provas de função hepática, através da determinação da atividade da aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase e fosfatase alcalina no sangue, as quais mostraram-se dentro da normalidade (SCHIOTT, *et al.*, 1976c); c) aspectos do estrato córneo, o qual

permaneceu inalterado (MACKENZIE *et al.*, 1976); d) atividade das enzimas lactato, malato e glucose 6-fosfato desidrogenases, que permaneceram, sem alteração (NUKI *et al.*, 1976).

JENKINS *et al.* (1988), estudando o efeito da CHX sobre a formação de placa *in vivo*, observaram inibições similares da formação da placa tanto para aplicações tópicas quanto para bochechos, ambas as situações na concentração de 0,2% de CHX. Os autores sugeriram que o efeito prolongado da CHX sobre o crescimento da placa deve-se à sua capacidade de se adsorver ao esmalte dentário, o que ocorre com outros agentes antimicrobianos com efeitos antiplaca semelhantes aos da CHX *in vitro*, mas que exibem pequena atividade antiplaca *in vivo*.

AUDUS *et al.* (1992), considerando que os lipídeos têm papel muito importante na interação levedura - célula epitelial, examinaram a relação entre a capacidade da CHX de impedir a interação da *Candida albicans*, ou sua remoção, das células epiteliais bucais humanas. Estes autores verificaram que a ruptura de regiões hidrofóbicas superficiais das células epiteliais que contêm sítios de ligação para leveduras pode ser um importante mecanismo de ação da CHX impedindo a ligação da *Candida albicans* às células epiteliais. Os autores enfatizam que a CHX não foi removida das células após lavagem (sete vezes), reforçando a proposição de que *in vivo* este agente não seria removido pela saliva, confirmando que a sua longa retenção na cavidade oral manteria sua prolongada atividade antimicrobiana.

PUCHER & DANIEL (1993), em seu estudo sobre os efeitos da CHX sobre fibroblastos humanos obtidos da pele e da mucosa oral, avaliaram parâmetros como viabilidade e crescimento celulares, contração de gel de colágeno (como modelo para fechamento de cicatrizes) e síntese de proteínas totais. Com concentrações bastante baixas (0,002%), a viabilidade celular foi pouco alterada, mantendo-se em 90%. Porém, a divisão celular foi bastante comprometida. Ainda em baixas concentrações da droga (0,005%), houve pequena inibição da contração do gel de colágeno, enquanto que em concentrações mais elevadas (0,12%), houve quase completa inibição. A síntese de proteínas totais também foi fortemente inibida pela CHX em

concentrações a partir de 0,005%. Os autores também enfatizaram a falta de uniformidade nos protocolos de estudos disponíveis envolvendo a CHX, principalmente no que se refere ao uso de diferentes concentrações da droga (PUCHER & DANIEL, 1993).

2.2.3. Efeitos colaterais do uso da clorexidine

Ao lado da extensa literatura existente sobre o uso seguro da CHX por humanos, estudos relacionados aos seus efeitos colaterais também são amplamente disponíveis.

Um dos primeiros trabalhos relatando efeitos tóxicos da CHX foi realizado por SONIS *et al.* (1978). Estes autores pesquisaram o efeito da ingestão de água contendo CHX (0,02% e 0,2%) sobre a mucosa oral (língua) de ratos e verificaram macro e microscopicamente a ocorrência de hiperqueratose e displasia significativas no epitélio lingual dos animais testados, as quais foram dependentes das doses utilizadas. A observação de tais lesões é de grande importância, visto que este tipo de patologia é sugestivo de leucoplasia e a presença de displasias normalmente é interpretada como uma possível alteração pré-maligna. Contudo, a reversibilidade destas lesões foi observada 30 dias após o término do tratamento. Os autores sugeriram, por fim, que esta reversibilidade das lesões poderia representar o desenvolvimento de uma aparente tolerância ao agente tóxico pelos animais.

Em humanos, sabe-se que a CHX pode causar efeitos sobre o paladar, (LANG *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995), reduzindo temporariamente a intensidade de percepção ao cloreto de sódio e ao quinino-HCl, afetando pouco a percepção ao doce. HELMS *et al.* (1995) propuseram que a CHX não tem um efeito deletério geral sobre as membranas celulares das papilas gustativas e que o efeito dual da CHX sobre o epitélio gustativo estaria relacionado com sua característica anfipática. No entanto, a CHX tem efeitos tóxicos sobre células epiteliais (HELGELAND *et al.*, 1971), fibroblastos (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1977), e leucócitos (KENNEY *et al.*, 1972).

Um efeito indesejado e muito comum nos tratamentos com CHX é a formação de manchas escuras sobre dentes, restaurações (de compósitos) e próteses (acrílicas) de grande número de pacientes (FLOTRA *et al.*, 1971; ERIKSEN & NORDBO, 1978; NORDBÖ *et al.*, 1983; WARNER *et al.*, 1993; ADDY *et al.*, 1995). Alguns profissionais consideram que a ausência de tais manchas seria um indicador da falta de eficácia da droga ou da falta de colaboração no tratamento por parte do paciente (ADDY *et al.*, 1995). *In vivo*, estas manchas são mais prevalentes em áreas que favorecem a formação de placa mais espessa, como as superfícies interproximais ou em locais de difícil acesso à escovação (SIEGRIST, *et al.*, 1991). De acordo com SHEEN *et al.* (2001), a formação de tais manchas progride de forma exponencial, conforme aumentam as exposições à CHX.

Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar o mecanismo de formação destas manchas. Entre as hipóteses mais aceitas estão aquelas que consideram que:

- a) A CHX pode precipitar diretamente os corantes orgânicos contidos nos alimentos (JENSEN, 1977; ADDY *et al.*, 1995; SHEEN *et al.*, 2001);
- b) A CHX pode reagir com várias substâncias orgânicas, formando produtos fortemente corados (NORDBO, 1971; ADDY *et al.*, 1979);
- c) A CHX pode desnaturar proteínas, expondo grupamentos sulfidrilas que reagem com metais, particularmente ferro, para formar sulfetos corados (ELLINGSEN *et al.*, 1982; NORDBÖ *et al.*, 1982).

Ainda existem grandes controvérsias a respeito destas hipóteses, visto a natureza indireta das evidências que lhes dão suporte. Por exemplo, as evidências para a “hipótese dos metais” advêm de estudos envolvendo a adição de soluções contendo ferro ao invés da utilização de placa bacteriana de ocorrência natural. Por outro lado, estudos *in vivo* feitos por NORDBÖ *et al.* (1982) revelaram a presença de grandes quantidades de ferro no material corado coletado a partir da película dental, sendo que em películas não coradas, a quantidade de metal era inferior.

WARNER *et al.* (1993), avaliando a hipótese que os metais de transição e o enxofre seriam os causadores do manchamento dental induzido por CHX,

realizaram um estudo com placa dental humana, adquiridas a partir de indivíduos tratados com CHX (0,12%) ou água (controles), usando microscopia eletrônica analítica. Observaram que os níveis aumentados de enxofre e de metais de transição (particularmente ferro) nas regiões manchadas eram diretamente correlacionados, enquanto que nas regiões livres de manchas, os níveis de enxofre e metais de transição eram semelhantes aos encontrados em indivíduos tratados com água. Por fim, os autores sugeriram que a formação de manchas é devida a um complexo formado entre metais e material orgânico que contém enxofre (por exemplo, a proteína salivar lactoferrina, a qual também possui ferro). Os autores propuseram que a CHX aumenta a incorporação de proteínas sulfatadas na placa, o que aumentaria o processo de manchamento natural.

Portanto, enquanto os efeitos antiplaca da CHX e do TRN estão bem documentados, os efeitos bioquímicos colaterais, bem como sua interação com diferentes materiais dentários, são pouco estudados. Considerando o interesse neste trabalho referente a materiais restauradores odontológicos, uma breve revisão sobre este tema será apresentada.

2.3. Materiais restauradores odontológicos

Apesar dos esforços visando a prevenção da cárie, o eventual desenvolvimento destas lesões é inevitável, considerando as condições de saúde pública. Assim, a utilização de materiais restauradores faz-se necessária. Portanto, o conhecimento das propriedades e dos efeitos clínicos de materiais restauradores já consagrados, como o amálgama dental, ou de materiais relativamente novos na prática odontológica, como as resinas compostas, é fundamental.

2.3.1. Amálgama dental

2.3.1.1. Composição do amálgama dental

A Especificação nº 1 da Associação Dentária Americana (ADA) exige que as ligas de amálgama contenham predominantemente prata e estanho. Quantidades não especificadas de outros elementos (por exemplo, cobre, zinco, ouro e mercúrio) são permitidas em concentrações menores do que o conteúdo de prata e estanho. Ligas contendo zinco em concentrações superiores a 0,01% são exigidas para que recebam a designação de “ligas contendo zinco”. Quando contêm 0,01% de zinco ou menos são designadas como “ligas sem zinco”. *Per se*, não há especificação para uma liga pobre ou rica em cobre (PHILLIPS, 1993). Entretanto, os fabricantes das ligas as classificam em dois grupos principais (com base no seu teor de cobre): ligas com composição tradicional ou convencional e aquelas contendo alto teor de cobre.

2.3.1.2. Ligas convencionais para amálgama

As ligas convencionais para amálgama contêm em sua composição essencialmente três partes de prata para uma de estanho e mais uma pequena porção de cobre e, algumas vezes, o zinco. Esta relação básica de três partes de prata para uma de estanho não difere muito da composição desenvolvida por G. V. Black em 1895 (PHILLIPS, 1993). A percentagem típica de cada elemento da liga está mostrada na Tabela I.

Tabela I: Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental

Elemento	Percentagem Típica (%)	Variação de Percentagem
Prata	68	40-74
Estanho	28	25-30
Cobre	4	4-30
Zinco	0-2	0-3

Cada um dos metais desempenha um papel importante no sucesso clínico de uma restauração de amálgama. Assim:

- * A prata contribui principalmente para a dureza da restauração acabada, além de diminuir o escoamento (deformação sob a ação de uma carga). Até determinado limite, a prata influi sobre o tempo de presa (endurecimento) do amálgama.
- * O estanho é o segundo maior componente em peso e geralmente participa com um quarto na composição da liga. Ele rapidamente combina-se com o Hg, formando uma fase estanho-mercúrio, denominada gama 2 (γ_2). Esta fase provoca falhas nas restaurações de amálgama. O estanho tende a reduzir a resistência e diminuir a expansão do amálgama, além de aumentar o escoamento.
- * A concentração de cobre nas ligas convencionais para amálgama varia de 2 a 4%. Este elemento aumenta a dureza e a resistência. Por outro lado, enquanto tende a diminuir o escoamento, aumenta a expansão de presa.
- * A função básica do zinco nas ligas é servir como agente de limpeza de substâncias estranhas, como óxidos. O problema mais sério relacionado com a presença do zinco é a expansão tardia. Se, por exemplo, o amálgama durante a condensação for contaminado pela saliva ou qualquer outro tipo de exudato, a restauração apresentará expansão tardia e uma corrosão excessiva.

2.3.1.3. Ligas para amálgama com alto teor de cobre

Esta modificação na formulação, que foi denominada “amálgama resistente com dispersão”, contém uma fase dispersa, constituída de pequenas esferas de uma liga eutética prata-cobre (76% prata- 24% cobre). Estas partículas esféricas, supostamente mais duras e resistentes que as partículas da liga para amálgama, aumentam a resistência à compressão em aproximadamente 30%. Estas ligas, comparadas com as convencionais, têm um escoamento sob carregamento, cerca de 600% menor. A percentagem típica de cada elemento da liga está mostrada na Tabela II.

Tabela II: Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental com alto teor de cobre

Elemento	Percentagem Típica (%)	Varição de Percentagem
Prata	60	40-70
Estanho	27	25-30
Cobre	13	12-30
Zinco	0	0-2

Pode ser notado que o conteúdo de cobre é substancialmente maior que o encontrado nas ligas convencionais. Em geral, nessas ligas o conteúdo de cobre varia entre 12 e 30%, comparado com aqueles 5% ou menos usados nas ligas convencionais. O papel de cada metal na liga é semelhante ao descrito para as ligas convencionais.

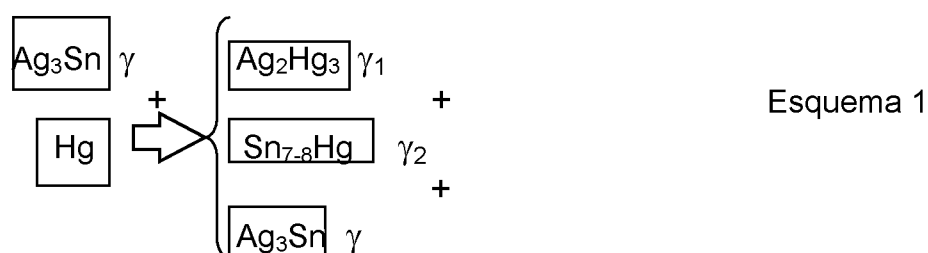
2.3.1.4. Composição após trituração (mistura com Hg)

O amálgama após a trituração contém aproximadamente 50% Hg metálico, 35% prata, 9% estanho, 6% cobre e um traço de zinco (HAHN *et al.*, 1989; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Estimativas do uso anual de Hg por dentistas americanos vão de 10.000 kg nos anos 70 a 70.000kg atualmente (LORSCHIEDER *et al.*, 1995).

2.3.1.5. Mecanismo de reação de presa do amálgama dental

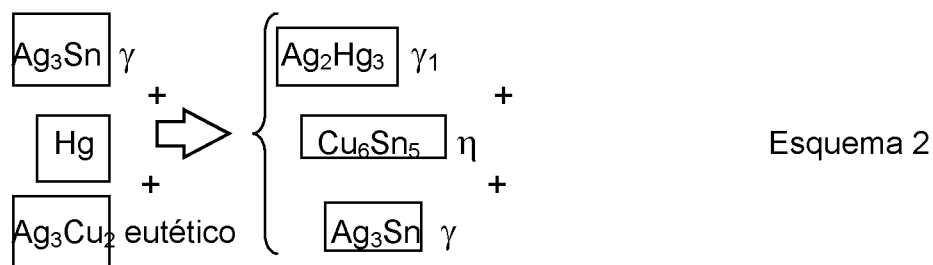
2.3.1.5.1. Amálgamas convencionais

Quando o Hg é triturado com a liga para amálgama, várias fases ou produtos são formados. O esquema 1 a seguir mostra a reação de maneira bastante simplificada, onde γ , γ_1 e γ_2 representam as diferentes fases do material (LEINFELDER & LEMONS, 1995):



2.3.1.5.2. Amálgamas com alto teor de cobre

Em função dos amálgamas com alto teor de cobre possuírem composição diferente, o mecanismo de reação de presa proposto difere do anterior (LEINFELDER & LEMONS, 1995). A reação simplificada pode ser descrita como mostrado no esquema 2:



Comparando-se a reação (esquema 2) com àquela da liga convencional mostrada no esquema 1, verifica-se que a fase γ_2 , que tem baixa resistência à corrosão e que é frágil, não está presente ou é simplesmente reduzida. Isto ocorre porque a afinidade do cobre pelo estanho é maior do que a do mercúrio pelo estanho, resultando na inibição ou diminuição da fase γ_2 (estanho-mercúrio).

2.3.1.6. Evidências da liberação de Hg de amálgama dental

Um dos primeiros estudos que pesquisaram a liberação de Hg a partir de amálgama dental foi feito por CHAN & SVARE (1972). Estes autores analisaram a emissão de vapores de Hg a partir de corpos de prova de amálgama de prata de diferentes marcas comerciais. Notaram que a taxa de liberação de Hg decresceu com o tempo (para todas as marcas) e o padrão de emissão de vapores foi o mesmo para as diferentes técnicas de acabamento (apenas condensação, brunimento ou polimento).

BRUNE *et al.* (1983) transferiram pequenas partículas de amálgama diretamente para o estômago de ratos, a fim de simular a deglutição de pequenas partículas deste material pelos pacientes e notaram que os níveis mais elevados de Hg foram encontrados no fígado e no sangue.

Diferentes estudos realizados com a finalidade de avaliar a liberação de Hg de amálgama, *in vitro*, mostraram dados dispersos, sugerindo que os diferentes protocolos afetam fortemente os resultados obtidos. MAREK (1990) avaliando os fatores (saliva artificial x água destilada; câmara aberta x câmara fechada) que afetam a liberação de Hg *in vitro*, para, a partir disso, considerar os possíveis mecanismos de liberação *in vivo*, mostrou que a liberação de Hg de amálgama é maior na primeira hora, diminuindo com o tempo, até alcançar um nível basal de liberação após 25 horas. Não houve diferença significativa na taxa de liberação de Hg durante a primeira hora com o uso de saliva artificial ou água destilada. Entretanto, quando o estado basal de liberação foi atingido, esta taxa foi maior nas condições de saliva artificial. O uso de câmaras abertas ou fechadas também não mostrou diferenças significativas. A partir dos resultados, o autor sugeriu que *in vivo*, o Hg seria liberado por mecanismo envolvendo processos de dissolução e evaporação. Assim, o Hg entra na fase líquida a partir da superfície do amálgama, principalmente sob a forma de Hg elementar (Hg^0). Parte dele será ionizado ou ligado em complexos e levado junto com os líquidos para o trato gastrointestinal e a outra parte evapora na atmosfera oral.

Segundo MAREK (1992), o Hg de amálgama dissolvido na cavidade oral pode tanto evaporar quanto ser oxidado a uma forma iônica. A importância da distinção qualitativa entre a evaporação seca direta e a dissolução seguida por evaporação é que, no primeiro caso, a quantidade de Hg liberado é mínima, considerando que as superfícies dentais restauradas quase sempre estão úmidas, banhadas por saliva. Já no último caso, apenas uma fração do Hg atômico dissolvido escapa sob a forma de vapor; a maior parte é oxidada em uma forma não volátil. Como existe uma diferença substancial entre a eficiência da absorção do vapor de Hg pelos pulmões e a absorção do Hg iônico pelo trato gastrointestinal, a dissolução seguida de oxidação desempenha um papel crucial na captação de Hg pelo organismo (MAREK, 1992).

Existe grande polêmica acerca da liberação de Hg a partir das restaurações de amálgama, e grande variação de valores citados pelos autores (1,2 - 27 μ g/ dia, chegando a valores tão altos como 100 μ g/ dia). Atualmente,

aceita-se que o Hg é constantemente liberado pelas restaurações de amálgama, a uma taxa de 10µg/ dia (HAHN *et al.*, 1990; BOYD *et al.*, 1991; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Também é aceito por vários autores (VIMY & LORSCHIEDER, 1985; HAHN *et al.*, 1989; HAHN *et al.*, 1990; VIMY *et al.*, 1990; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 2001) que esta liberação aumenta durante e/ou após períodos de mastigação e escovação. Em contraste, estimativas da absorção diária de todas as formas de Hg, obtidas a partir da ingestão de frutos do mar, são de 2,3µg de Hg e, a partir de outras fontes de alimentação, junto com o consumo de água, são de 0,3µg de Hg (WHO, 1991). Portanto, é aceito atualmente que as restaurações de amálgama dental são as principais fontes de exposição ao Hg para a população em geral (WHO, 1991). Neste aspecto, MOLIN *et al.* (1990) a fim de avaliar se algumas variáveis biológicas poderiam ser influenciadas pela liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama, estudaram os efeitos da remoção de restaurações de amálgama sobre Hg, selênio e a enzima glutathione peroxidase (dependente de selênio). Notaram que, vinte meses após a remoção das restaurações de amálgama, os níveis de Hg no plasma e na urina eram significativamente mais baixos, enquanto os níveis de Hg nos eritrócitos, que representam o conteúdo de Hg na alimentação, não apresentavam diferenças significativas. Os níveis de selênio no plasma, no grupo teste, diminuíram significativamente no 5º e 10º dias após a remoção das restaurações, voltando ao normal após isso. Os valores três meses antes e seis e doze meses após a remoção das restaurações não foram diferentes daqueles do grupo controle. Os valores de glutathione peroxidase plasmática não diferiram entre os dois grupos em nenhum momento do estudo.

Vários outros trabalhos em humanos mostram evidências do acúmulo de Hg a partir de restaurações de amálgama dental (NYLANDER *et al.*, 1987; APOSHIAN *et al.*, 1992; APOSHIAN, 1998), o qual, segundo os autores estaria relacionado com alterações do sistema nervoso central (ECHEVERRIA *et al.*, 1998); de fertilidade (GERHARD *et al.*, 1998); cardíacas (FRUSTACI *et al.*, 1999) e malformações de fetos (WEISS & LANDRIGAN, 2000). Além destes, vários trabalhos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as mitocôndrias de

células do túbulo renal proximal são o alvo principal dos efeitos do Hg (II) (GOYER & RHYNE, 1975; FOWLER & WOODS, 1977), que compromete a eficiência da fosforilação oxidativa (SOUTHARD & NITISEWOJO, 1973; WEINBERG *et al.*, 1982a; WEINBERG *et al.*, 1982b) com conseqüente depleção de ATP (NIEMINEN *et al.*, 1990), induz a lipoperoxidação (LUND *et al.*, 1991), promove danos no DNA (CANTONI *et al.*, 1982) e ainda, a depleção da glutathiona reduzida (GSH) (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983; CHUNG *et al.*, 1982). Estes efeitos sugerem que o mecanismo de toxicidade do Hg(II) é semelhante ao do estresse oxidativo (LUND *et al.*, 1993; BULAT *et al.*, 1998).

Como alternativa ao amálgama dental, que contribui para o aumento da exposição ao Hg (II), outros materiais restauradores foram desenvolvidos e são muito utilizados na prática odontológica; entre esses estão as resinas compostas. Uma breve revisão sobre este material será apresentada a seguir, devido ao interesse neste trabalho.

2.3.2. Resinas compostas

As resinas compostas consistem de dois componentes importantes: a matriz que se une à resina e o preenchedor inorgânico. A resina que se liga à matriz não é muito variável entre os materiais de resina composta, sendo que a resina de Bowen, bisfenol A-glicidil metacrilato (BisGMA), constitui a matriz de resina da maioria das resinas compostas, e o uretano dimetacrilato é ocasionalmente usado como uma matriz em certos materiais de resina composta. Contudo, não há diferenças significantes no desempenho clínico entre o BisGMA e o uretano dimetacrilato (PHILLIPS, 1993). Características tais como o tipo de preenchedor inorgânico, o tamanho das partículas e a extensão da carga inorgânica, que variam amplamente entre os materiais de resina composta, podem ser usados pelo operador para prever o desempenho clínico de um determinado material de resina composta, bem como para obter informações extremamente valiosas relativas ao polimento do material e o seu grau de resistência à fratura quando colocado em situações de carga (PHILLIPS, 1993).

Os requisitos ideais para uma resina odontológica incluem translucidez e transparência, a fim de que o material possa reproduzir esteticamente os tecidos bucais que irá substituir, inclusive quanto à pigmentação após a conclusão da peça. O material não deve expandir, contrair ou distorcer, isto é, deve ser dimensionalmente estável durante todas as etapas e tempos de utilização. Resistência mecânica, resiliência e resistência à abrasão adequada, além de impermeabilidade aos fluidos bucais, de modo a não se tornar anti-higiênico ou desagradável, quanto ao paladar ou ao odor também são importantes e, se utilizado como material restaurador ou como cimento, deve aderir quimicamente ao dente. Deve ser completamente insolúvel nos fluidos orais ou a quaisquer substâncias presentes na boca. Atoxicidade e ausência de irritabilidade aos tecidos bucais também são requisitos desejáveis em uma resina composta. Sua temperatura de amolecimento deve situar-se acima da temperatura de qualquer alimento quente ingerido pelo paciente. No caso de fratura, deve ser passível de reparo, de uma maneira fácil e eficiente. A fabricação de um aparelho odontológico com a resina deve ser efetuada facilmente e com equipamento simplificado.

Nenhuma resina disponível atualmente preenche todos estes requisitos. As condições da boca são muito rigorosas; portanto, somente os materiais quimicamente estáveis podem suportar tais condições, sem apresentar deterioração (PHILLIPS, 1993).

2.3.2.1. Estudos clínicos das resinas compostas e de seus componentes

Embora as propriedades físicas das resinas compostas sejam constantemente melhoradas, estudos *in vivo* sugerem que o uso destas resinas como materiais restauradores é ocasionalmente associado com necrose e irritação da polpa (TOBIAS *et al.*, 1973; STANLEY *et al.*, 1975) bem como do periodonto (NASJLETI *et al.*, 1983). Além disso, respostas alérgicas como dermatite de contato também já foram relacionadas com BisGMA (CARMICHAEL *et al.*, 1997).

TERAKADO *et al.* (1984) mostraram que o peróxido de benzoíla, um catalisador para resinas compostas, foi capaz de converter ácidos graxos poli-

insaturados e fosfolipídios em lipoperóxidos, especialmente em presença de baixas concentrações de Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} . Os compostos capazes de causar a formação de lipoperóxidos foram: peróxido de benzoíla, metilmetacrilato, etilenoglicol dimetacrilato, trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA), Bis-glicidil metacrilato e 2-2-bis-4-metacriloxi-etoxi fenilpropano.

FUJISAWA *et al.* (1978) relataram que TEGDMA liga-se a lipossomos, sugerindo que os processos odontoblásticos nos túbulos dentinários são danificados por esta ligação à bicamada lipídica da célula, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana da célula e à exposição das membranas plasmáticas internas a concentrações ainda mais altas destes agentes. O subsequente inchamento celular devido à permeabilidade e à ação de radicais livres, incluindo hidroperóxidos lipídicos, sobre DNA, proteínas e enzimas, poderia inibir os processos sintéticos celulares.

A partir de quatro resinas compostas, HANKS *et al.* (1981) observaram que os compostos extraídos em meio aquoso difundiram-se através da dentina causando resposta citotóxica na polpa em 24 horas. FERRACANE & CONDON (1990) observaram que 50% das espécies liberadas do compósito Silux[®] foram eluídas nas primeiras três horas de imersão em água, e de 85 a 100% das espécies liberadas foram eluídas dentro de 24 horas de imersão. Estes autores ainda relataram que uma mistura de etanol e água foi ainda mais efetiva: mais componentes foram removidos, sendo que 75% deles foram removidos dentro de três horas.

HANKS *et al.* (1991) observaram que as concentrações inibitórias de 50% (ID_{50}) de BisGMA para síntese de DNA e síntese de proteínas em células Balb/c 3T3 foram de $13 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e de $16 \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente. Os autores demonstraram ainda que, em maiores concentrações, estes agentes químicos causavam morte celular, visto que as células tornaram-se esféricas, descolaram-se do substrato de crescimento e deixaram de apresentar atividade respiratória mensurável.

Do ponto de vista toxicológico, a detecção de monômeros, oligômeros ou precursores dos polímeros sintéticos que são liberados das resinas compostas é relevante, visto que tais compostos podem reagir com moléculas

biologicamente importantes. Um exemplo é o bisfenol A (BPA) (PULGAR *et al.*, 2000). O BPA mimetiza o efeito do 17 β -estradiol *in vitro*, bem como de estrógenos sintéticos como o dietilstilbestrol em órgãos-alvo do estrogênio em modelos animais (KRISHNAN *et al.*, 1993). Mais recentemente mostrou-se que o BPA e o bisfenol A dimetacrilato (BisDMA) eram responsáveis pela estrogenicidade de alguns compósitos e selantes usados na prática odontológica (PULGAR *et al.*, 2000).

Os importantes relatos da literatura que atribuem ao Hg e a alguns monômeros de resina composta o efeito indutor de lipoperoxidação direcionam a uma investigação criteriosa desta ação. Outra questão refere-se aos processos de transição de permeabilidade mitocondrial. Vale destacar que nenhum trabalho foi encontrado na literatura quanto às abordagens do TRN como agente de lipoperoxidação e de transição de permeabilidade mitocondrial. Devido à importância deste assunto, uma breve revisão sobre os mecanismos de lipoperoxidação e da transição de permeabilidade mitocondrial será apresentada a seguir.

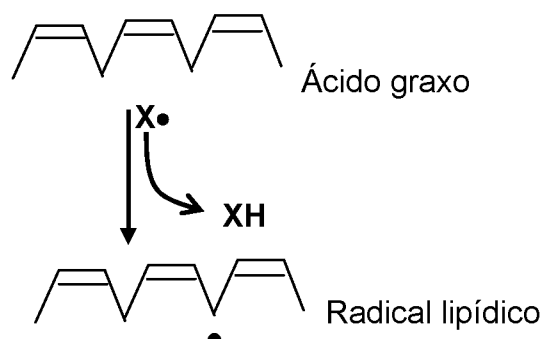
2.4. Lipoperoxidação

A lipoperoxidação é um processo complexo que envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos, a captação de oxigênio, um rearranjo de duplas ligações em lipídios insaturados e a eventual destruição de membranas lipídicas. Proteínas de membrana também podem ser danificadas pela lipoperoxidação. Este processo produz uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres. Como as membranas biológicas são muitas vezes ricas em ácidos graxos insaturados e banhadas em um fluido rico em oxigênio, contendo metais, não é surpreendente que estas sejam susceptíveis ao ataque peroxidativo (BUEGE & AUST, 1978).

Usualmente, o início da lipoperoxidação se dá com a abstração de um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno de um ácido graxo insaturado, resultando na formação de um radical lipídico (BUEGE & AUST, 1978). A presença de uma dupla ligação nos ácidos graxos enfraquece a

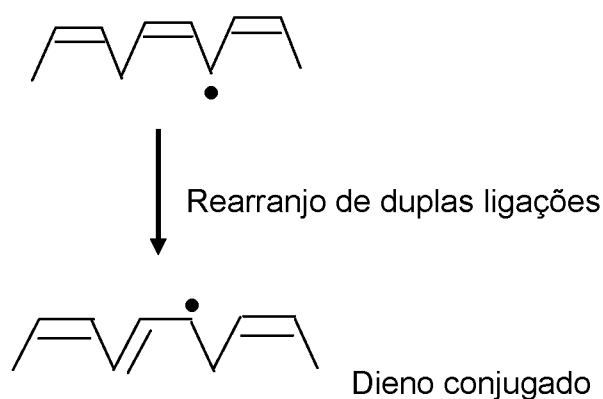
ligação C-H no átomo de carbono adjacente à dupla ligação, tornando a remoção do átomo de hidrogênio mais fácil, como pode ser observado na Figura 3 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Figura 3: Formação de radicais lipídicos



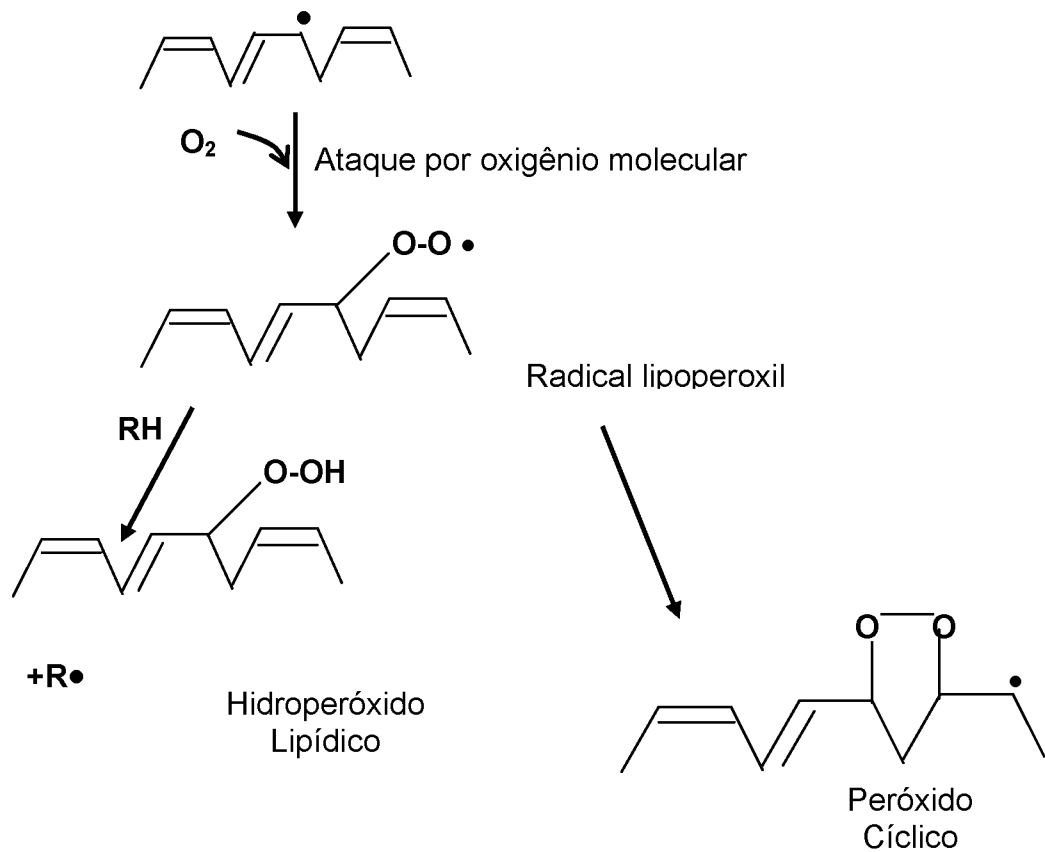
O radical lipídico tende a sofrer um rearranjo das duplas ligações, resultando na formação de dienos conjugados (Figura 4).

Figura 4: Formação de dienos conjugados



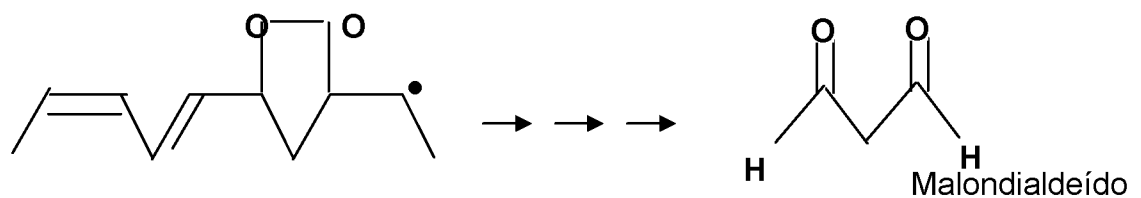
O ataque por oxigênio molecular produz um radical lipoperoxil, o qual pode tanto abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um lipídio adjacente para formar um hidroperóxido lipídico quanto formar um endoperóxido lipídico, como mostrado na Figura 5.

Figura 5: Formação de hidroperóxido ou endoperóxido lipídico



A formação de endoperóxidos lipídicos em ácidos graxos insaturados contendo pelo menos três duplas ligações interrompidas por metileno pode levar à formação de malondialdeído (MDIA) como um dos produtos de degradação (Figura 6) (BUEGE & AUST, 1978).

Figura 6: Formação do malondialdeído



O malondialdeído, por sua vez, serve como um índice conveniente para determinar a extensão da reação de lipoperoxidação de membranas *in vitro*, através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, a qual resulta em um produto de cor vermelha que absorve em 535nm.

2.4.1. Importância do ferro na lipoperoxidação

A participação dos íons ferro na aceleração da lipoperoxidação tem sido reconhecida (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A adição de um sal de Fe^{2+} a um sistema de lipídeos insaturados livres de peróxidos pode permitir a iniciação da primeira cadeia da lipoperoxidação, caso exista H_2O_2 no meio, por abstração de H por OH^\bullet (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os lipídeos disponíveis comercialmente são usualmente contaminados com lipoperóxidos, portanto, micelas ou lipossomos feitos a partir destes lipídeos já apresentarão traços de lipoperóxidos. Quando as células sofrem algum tipo de injúria, a lipoperoxidação é favorecida e lipoperóxidos são formados enzimaticamente nos tecidos, pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase. Assim, frações de membranas isoladas a partir de células rompidas também contêm lipoperóxidos. Quando os sais de ferro são adicionados às frações de membranas isoladas (que já contêm lipoperóxidos), os lipoperóxidos presentes serão decompostos para formar radicais peroxil e alcoxil. Ambos podem abstrair H^\bullet e estimular a lipoperoxidação. Portanto, a presença de ferro pode não só iniciar o processo de lipoperoxidação (em sistemas livres de peróxidos), mas também estimular a sua propagação (em sistemas que já possuem peróxidos) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

2.4.2. Efeitos deletérios da lipoperoxidação

A reação de complexos de ferro ou cobre com lipoperóxidos gera uma vasta gama de produtos, incluindo epóxidos, compostos contendo grupamento carbonil ($C=O$), gases de hidrocarbonetos (como os gases pentano e etano), cetonas (como butanona, pentanona e octanona), além de aldeídos saturados (propanal, butanal e hexanal), insaturados (hexenal e nonenal), e dialdeídos,

como o MDIA. Tem-se observado que o tratamento de membranas com MDIA *in vitro* leva à formação de ligações cruzadas e à agregação de proteínas de membrana.

Enzimas que requerem grupamentos $-NH_2$ ou $-SH$ para sua atividade, normalmente são inibidas durante a lipoperoxidação. Como exemplo, pode-se citar a enzima glucose 6-fosfatase, que é encontrada na fração microssomal, é inibida assim que seus grupamentos $-SH$ são oxidados. Outras enzimas, como a Na^+K^+ ATPase, bem como receptores de superfície, responsáveis pelas respostas celulares aos hormônios, também podem ter sua atividade alterada como consequência da lipoperoxidação. Sabe-se que a peroxidação de lipídeos de membranas de fígado ou de eritrócitos leva à formação de agregados protéicos de alto peso molecular dentro da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os principais efeitos da lipoperoxidação são: diminuição da fluidez de membranas, aumento do trânsito de substâncias e íons que normalmente não atravessam a membrana (como íons Ca^{2+} , por exemplo) e inativação de enzimas ligadas à membrana (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

A contínua fragmentação das cadeias laterais de ácidos graxos leva, eventualmente, à completa perda de integridade da membrana. Em membranas de lisossomos, por exemplo, esta ruptura pode levar à liberação de enzimas hidrolíticas no interior da célula, amplificando o dano. Em membranas de eritrócitos, a lipoperoxidação pode levar à perda da sua capacidade de mudança de forma ("deformability"), necessária para sua passagem por capilares menores, levando até à hemólise (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial resulta em perda irreversível de funções como respiração mitocondrial, fosforilação oxidativa e transporte de íons (VLADIMIROV *et al.*, 1980; MASINI *et al.*, 1985; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Pode também ser observada uma extensa fragmentação do DNA mitocondrial (mtDNA) quando a lipoperoxidação é promovida por complexos de Fe^{2+} (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Como o mtDNA codifica algumas proteínas essenciais envolvidas no processo

de fosforilação oxidativa, esta fragmentação leva à disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, futura estimulação de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano oxidativo do mtDNA, numa sequência de eventos que termina na indução da apoptose celular (OZAWA, 1997).

2.5. Transição de permeabilidade mitocondrial

O fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) ocorre quando as mitocôndrias são expostas a concentrações suprafisiológicas de cálcio na matriz, perdem a sua permeabilidade seletiva a pequenas moléculas (< 1500 Da), levando à perda de componentes de baixo peso molecular da matriz, ao desacoplamento (colapso do $\Delta\psi$) e ao inchamento mitocondrial (“*swelling*”) (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998; BERNARDI, 1999).

A existência desta condição foi observada desde o início do trabalho com mitocôndrias (POTTER, 1947), contudo o termo transição de permeabilidade mitocondrial induzida pelo Ca^{2+} foi primeiramente definido por HUNTER & HAWORTH (1979), após um estudo aprofundado do fenômeno. Estes autores mostraram que, juntamente com este fenômeno, ocorre uma mudança configuracional e funcional das mitocôndrias. Assim, a partir de uma forma agregada e de um estado acoplado, a mitocôndria passaria a apresentar matriz expandida e estado desacoplado.

Inúmeros compostos químicos não relacionados estruturalmente são conhecidos como agentes indutores da MPT. Entre eles, podem ser citados: agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina (acetoacetato), geradores de espécies reativas de oxigênio (ascorbato), hidroperóxidos (*t*-butilhidroperóxido), oxidantes (diamida) ou ligantes (metais pesados e de transição e/ou seus complexos) de grupamentos tiólicos (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Ainda podem ser citados outros compostos, como a tiroxina, a triiodotironina (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995), a citrulina (DA LOZZO *et al.*, 1998) e a clorexidine (NEWTON *et al.*, 2004).

Agentes protetores da MPT também são conhecidos e são utilizados para auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação dos agentes indutores.

Neste grupo, podem ser citados: nucleotídeos de adenina (adenosina difosfato - ADP, adenosina trifosfato -ATP), ligantes do translocador de nucleotídeos de adenina, cátions divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}), seqüestradores de radicais livres (como o butilhidroxitolueno - BHT), agentes redutores de grupamentos tiólicos (ditiotreitól - DTT), inibidores de fosfolipase A_2 (brometo de *p*-bromofenacila), além da ciclosporina A (CsA), que é muito conhecida também devido à sua ação imunossupressora (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

A característica da MPT como um processo de “tudo-ou-nada” foi provavelmente a principal razão que convenceu HUNTER & HAWORTH (1979) a concluir que este fenômeno não resulta de um processo degenerativo da bicamada lipídica, mas da formação/abertura de um poro na MMI. Esta hipótese ganhou suporte a partir dos trabalhos de CROMPTON *et al.* (1987) e CROMPTON & COSTI (1988). Os autores mostraram que a permeabilização da membrana era prontamente interrompida pela adição de EGTA e, nesta condição, a sacarose (^{14}C), a qual entrou prontamente nas mitocôndrias na condição permeável, ficou retida no seu interior. Da mesma forma, o processo de entrada de moléculas para o interior das mitocôndrias também ficou bloqueado, indicando que a organela retomou o estado de impermeabilidade característico. Desta forma, excluiu-se a possibilidade que a sacarose estaria atravessando a membrana via “defeitos de permeabilidade” devidos ao acúmulo de lisofosfolípídeos (ZORATI & SZABÒ, 1995).

Atualmente, o estudo das propriedades e regulação do poro de transição de permeabilidade (PTP), que é especificamente inibido por doses sub-micromolares de CsA, tem merecido atenção devido ao seu papel proposto na apoptose celular e defesa intracelular contra radicais livres derivados de ERO (MALKEVITCH *et al.*, 1997). Sugere-se também que o PTP pode se abrir sob condições fisiológicas, servindo como um canal de liberação de cálcio mitocondrial (WALTER *et al.*, 2000).

A impermeabilidade seletiva da MMI é essencial para a manutenção do potencial de membrana e do gradiente de pH, requisitos para a síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa. Quando esta barreira de permeabilidade é rompida pela abertura do PTP, as mitocôndrias tornam-se desacopladas e a

ATPase translocadora de prótons hidrolisa ativamente ATP, ao invés de sintetizá-lo. Se este evento ocorre em uma célula, as concentrações de ATP não poderão ser mantidas, mesmo pela glicólise e, a menos que o poro se feche novamente, a célula estará destinada a morrer, pois o dano a componentes celulares causado por hipóxia e estresse oxidativo apenas podem ser reparados se o ATP estiver disponível. Assim, a MPT representa um mecanismo pelo qual a morte celular por necrose pode ser iniciada (HALESTRAP *et al.*, 1998). A injúria celular causada por isquemia e reperfusão também está relacionada ao processo de MPT (ZORATI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998). CASSARINO *et al.* (1999) sugeriram que os processos de MPT podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças como o mal de Parkinson. Considerando que a MPT pode ser desencadeada por alguns agentes químicos, e o amplo uso do TRN em diferentes situações clínicas em Odontologia e em outras especialidades médicas, onde se verificam possíveis alterações na membrana celular, é relevante conhecer se o mecanismo de ação deste agente envolve a transição de permeabilidade mitocondrial. Este aspecto ainda não foi explorado e permanece como uma lacuna na literatura.

3. Justificativa e Objetivos

3.1. Justificativa dos objetivos

Como abordado anteriormente, o uso da CHX e do TRN na prática odontológica tem se tornado bastante comum. Vários estudos sobre estes agentes já foram realizados, abordando diversos aspectos e características importantes, tais como efeito antiplaca (ARWEILER *et al.*, 2001; JOHARJI & ADENUBI, 2001; MORAN *et al.*, 2000; GREENSTEIN & POLSON, 1998), modo de ação (LYGRE *et al.*, 2003; HIDALGO & DOMINGUES, 2001; ZUCKERBRAUN *et al.*, 1998), além de alguns efeitos colaterais (HELMS *et al.*, 1995; WARNER *et al.*, 1993). O Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, estudando os efeitos da CHX demonstrou importantes efeitos biológicos, tais como o estímulo da lipoperoxidação ferro-induzida e da MPT (NEWTON *et al.*, 2004). Considerando-se que os efeitos do TRN sobre tais processos ainda não foram investigados, os estudos da presente tese foram direcionados neste sentido.

O uso odontológico tanto de CHX quanto de TRN é feito principalmente para combate à placa bacteriana. Entretanto, a utilização de tais agentes os faz entrar em contato não apenas com as superfícies dentárias, mas também com o epitélio oral e com restaurações dentárias. Portanto, a avaliação dos efeitos de tais agentes sobre células do epitélio oral, nas suas três possíveis linhagens: normal, pré-neoplásica e neoplásica também seria de grande interesse científico.

Além disso, deve-se considerar que a maior parte da população mundial possui restaurações odontológicas, estando assim exposta constantemente aos materiais utilizados para a confecção das mesmas (MOYSES *et al.*, 2003). Dentre os materiais restauradores odontológicos mais comumente utilizados, pode-se citar o amálgama dental e as resinas compostas (PHILLIPS, 1993; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). As restaurações de amálgama dental (contendo Hg) são susceptíveis à liberação de Hg de sua composição. Neste aspecto, resultados iniciais deste laboratório mostraram um aumento na liberação de Hg

de amálgama por ação da CHX (NEWTON, 2002). Portanto, considerando os inúmeros trabalhos mostrando as conseqüências deletérias da exposição ao Hg liberado de tais restaurações (BOYD *et al.*, 1991; LUND *et al.*, 1993; HULTMAN *et al.*, 1994; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; BULAT *et al.*, 1998; HULTMAN *et al.*, 1998) e dando continuidade aos estudos já iniciados, faz-se necessária a investigação de quais drogas que seriam potencialmente capazes de aumentar a liberação de Hg de amálgama, as quais por sua vez, poderiam exacerbar os efeitos deletérios relacionados com este metal.

Por outro lado, as restaurações de resina composta têm se tornado cada vez mais populares, devido não só à estética, mas também por permitir a confecção de preparos cavitários mais conservadores (ORTENGREN *et al.*, 2001). Entretanto, a exposição dos pacientes aos monômeros destes materiais pode trazer alguns efeitos indesejados aos pacientes (HANKS *et al.*, 1991; CARMICHAEL *et al.*, 1997; SCHWEIKL *et al.*, 1998; THONEMANN *et al.*, 2002). Assim, outra avaliação que se faz necessária é a possibilidade de a liberação de tais produtos (monômeros) das resinas compostas ser exacerbada pela ação de agentes tais como a CHX e o TRN.

3.2. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do TRN sobre o metabolismo energético mitocondrial, sobre a lipoperoxidação ferro-induzida e a MPT, bem como investigar efeitos sobre células intactas do epitélio oral e ainda, averiguar a possibilidade de sua interação com os materiais restauradores odontológicos, amálgama dental e resina composta.

3.3. Objetivos específicos

Para cumprir o objetivo geral foram desenvolvidas as seguintes metas específicas:

❖ Avaliação dos efeitos do TRN sobre funções vinculadas ao metabolismo energético mitocondrial, lipoperoxidação mitocondrial ferro-induzida, MPT e PTP, a partir de mitocôndrias isoladas de fígado de rato;

- ❖ Avaliação dos efeitos do TRN e da CHX sobre células intactas do epitélio oral;
- ❖ Avaliação da interação do TRN ou da CHX com íons metálicos, tais como ferro, mercúrio de amálgama, e íons cálcio;
- ❖ Avaliação da interação do TRN e da CHX com os materiais restauradores odontológicos, amálgama dental e resinas compostas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Materiais e reagentes

Os reagentes: soro albumina bovina (BSA), ácido *N* – 2 (4 - hidroxietilpiperazina) – *N'* – 2 – etano - sulfônico (HEPES), ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, EGTA, rotenona, D-manitol, citocromo *c*, ferricitocromo *c*, diclorofenolindofenol (DCPIP), Tris, Rodamina 123, Hoechst 33342, digluconato de clorexidine (solução a 20%) e triclosan foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico e ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil).

Amálgama dental (GS80 e Permite C) foi gentilmente doado pelo representante da SDI no Brasil. As resinas compostas (Durafill, Charisma, TPH e Z100) foram compradas em lojas especializadas em produtos odontológicos, em Curitiba.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio KGM[®], meio basal para queratinócitos (Clonetics[®], Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA). Todo o material plástico utilizado para cultura de células (garrafas de cultura, placas de cultura e pipetas estéreis) eram descartáveis.

4.1.2. Preparo da solução de triclosan

A solução de TRN (0,3%) utilizada nos ensaios para observação de liberação de Hg de corpos de prova de amálgama dental e de monômeros de resina de corpos de prova de resina composta foi preparada a partir de uma solução estoque alcoólica concentrada (20%), a qual foi diluída diretamente na solução tampão utilizada nos experimentos.

Para os demais ensaios, as soluções de TRN foram preparadas de maneira a se obter uma solução estoque concentrada, sempre mantendo a

relação de, no máximo, 0,01% de álcool no meio de cultura ou meio condutor (ensaios com mitocôndrias). Tais soluções foram mantidas em geladeira por, no máximo, 1 mês, a fim de se evitar a formação de produtos de degradação e conseqüente diminuição da concentração esperada.

4.1.3. Preparo da solução de clorexidine

A solução de CHX (0,12%) utilizada nos ensaios para observação de liberação de monômeros de corpos de prova de resina composta foi preparada a partir de uma solução estoque concentrada (20%), a qual foi diluída utilizando-se água deionizada (MilliQ). Tal procedimento eliminou possíveis interferências devido tanto à presença de outros compostos comumente presentes nas formulações de CHX disponíveis comercialmente, tais como etanol, aromatizantes ou corantes, quanto à presença de outros íons que poderiam causar algum tipo de interferência nos resultados (mostrando picos indesejados).

Para os demais ensaios, as soluções de CHX também foram preparadas a partir de solução estoque concentrada (20%), a qual foi diluída utilizando-se água deionizada (MilliQ). Tais soluções foram mantidas em geladeira por, no máximo, 1 mês, a fim de se evitar a formação de produtos de degradação e conseqüente diminuição da concentração esperada.

4.1.4. Equipamentos

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-21, com rotores JA10 (6x250 mL) para volumes de até 250 mL e JA20 (8x50 mL) para volumes de até 50 mL.
- Ultracentrífuga Beckman L8- 80M, com rotor basculante SW28 (6x12 mL).
- Prensa francesa SLM-Aminco com célula de 40 mL.
- Microscópio Nikon modelo Eclipse TE300 provido de óptica Nomarski e de fluorescência, condensador de abertura numérica 1,7, objetiva Plan Apo 60x. Sistema de filtro quandflour para capturar epi-iluminação com filtro cúbico

provido de espelho diacrônico de 515 nm e filtros de excitação de 500/20 nm e emissão de 535/30 nm.

- Câmara SPOT RT Monochrome (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI).
- Equipamento de eletroforese vertical Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell.
- Equipamento de transferência semi-seca Trans-Blot SD (Bio-Rad).
- Fonte de alimentação para eletroforese e transferência Power Pac 200 (Bio-Rad).
- Espectrofotômetro UV-Vis Cary 300 (Varian).
- Estufa para cultivo celular Infors AG CH-4103.
- Homogenizadores de vidro tipo Dounce (Thomas Scientific).
- Balança analítica eletrônica, com precisão de 0,1 mg (Sartorius BP61).
- Medidor de pH digital, Crison microPH 2002, com sonda para correção de temperatura incorporada. Foram utilizadas soluções comerciais para padrões de calibração.
- Sistema de HPLC (Shimadzu, Tóquio, Japão), constituído por duas bombas LC-10AD, detector de absorvância UV SPD-10AD, controlador de sistema CBM-10AD e forno CTO-10AD.
- Sistema de MS composto por espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, Reino Unido), injetor *Rheodyne* (Califórnia, Estados Unidos).

4.1.5. Equipamentos para técnica de pinçamento de membranas

- ✓ Microscópio invertido Zeiss modelo Axiovert 10, provido de óptica Nomarski, condensador de abertura numérica 0,55, objetiva Achromat 40x/0,60 Korr e oculares de 10x.
- ✓ Micromanipulador elétrico inclinável Luigs e Newmann-Feinmechanick + Elektrotechnik GmbH modelo 100-350, com deslocamentos finos de 100 µm nas três direções espaciais.
- ✓ Mesa com amortecimento a ar, sobre a qual colocava-se a torre de pinçamento, que por sua vez suporta o microscópio e o micromanipulador.
- ✓ Amplificador de Patch-clamp modelo L/M-PC (List-Electronics).

- ✓ Osciloscópio digital Hitachi modelo VC-6025 com dois canais, velocidade de 20 mS/S e largura de banda de 50 MHz.
- ✓ Filtro de 8 polos Frequency devices, Haverhill, MA, modelo 902.
- ✓ Vídeo digital com dois canais Biologic, modelo DTR-1205.
- ✓ Torre de Patch Clamp tipo 100-100 de Luigs e Neumann-Feinmechamik e Elektrotechnik GmbH.
- ✓ Microforça a chama para a fabricação de micropipetas de vidro, modelo P-87 (Sutter Instrument Co.).
- ✓ Capilares de vidro para a fabricação de micropipetas de borosilicato tipo 1BBL e parede fina, com filamento interno e 1,5 mm de diâmetro externo, produzidos por World Precision Instruments Inc.

4.1.6. Suporte de informática

- Strathclyde Electrophysiological Data Analysis, EDR for Windows V2.5.8. (Dempster programs) para análises de registros eletrofisiológicos.
- Prism 2.01 de GraphPad, para análises estatísticas.
- Software LC-10AD, para análises em HPLC.
- Software Masslynx versão 3.2, para análises de espectrometria de massas, modo ESI⁺.

4.2. Métodos

4.2.1. Métodos para ensaios de metabolismo energético mitocondrial, lipoperoxidação e MPT

4.2.1.1. Isolamento de mitocôndrias

As preparações mitocondriais foram obtidas de acordo com o método descrito por VOSS *et al.* (1961), com algumas modificações. Os animais foram mortos por decapitação; o fígado foi removido imediatamente e colocado no meio de isolamento gelado (4°C) assim constituído: D-manitol 250mmol. L⁻¹, HEPES 10mmol. L⁻¹, pH 7,2, BSA 0,1 g% e EGTA 1mmol. L⁻¹. O fígado foi

finamente picado e homogeneizado em homogeneizador de van Potter Elvehjen por três vezes com pistilo frouxo e por duas vezes com o pistilo apertado. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Hitachi mod. Himac CR21E) a $320 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante desta centrifugação que contém as mitocôndrias foi novamente centrifugado a $12.600 \times g$ por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão com meio de extração e centrifugado a $8.100 \times g$ por 10 minutos. Este procedimento foi executado por duas vezes. Finalmente, o sedimento foi ressuspensão em meio de isolamento, ajustando-se a concentração de proteína para 75 a 90 mg. mL⁻¹. Foram utilizadas somente preparações que apresentavam coeficiente de controle respiratório (CCR) acima de 4,0. Para os experimentos de MPT, o sedimento de mitocôndrias foi ressuspensão em meio de isolamento, porém sem EGTA. Durante todo o processo de isolamento, o material foi mantido a uma temperatura de, no máximo, 4°C.

4.2.1.2. Determinação da concentração de proteínas

O conteúdo protéico das suspensões de mitocôndrias foi determinado pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

4.2.1.3. Determinação do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas, cálculo do coeficiente de controle respiratório e razão ADP/O

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo Gilson. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL, sob agitação em câmara fechada, termostatizada a 28°C (VOSS *et al.*, 1963). O sistema de reação utilizado, constituído de D-manitol 125 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol. L⁻¹, EGTA 0,1 mmol. L⁻¹, BSA 0,1 g%, foi suplementado com glutamato 5 mmol. L⁻¹, Pi 1,6 mmol. L⁻¹, ADP 0,16 µmol. L⁻¹ e 2 mg. mL⁻¹ de proteína mitocondrial ou com succinato 2 mmol. L⁻¹, rotenona 5 µmol. L⁻¹, Pi 1 mmol. L⁻¹, ADP 0,08 µmol. L⁻¹ e 0,5 mg. mL⁻¹ de proteína mitocondrial.

As velocidades respiratórias foram expressas em nmol de O₂ consumidos.min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, considerando-se que a solubilidade do O₂ na água, a 28°C e 1 atm, é de 250 μmol. L⁻¹ (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido a partir da razão entre a velocidade da respiração em presença de ADP (estado 3 da respiração) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4 da respiração) (CHANCE & WILLIAMS, 1955). A razão ADP/O foi determinada segundo o método descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955), considerando a concentração de ADP utilizada no sistema e os átomos-grama de oxigênio consumidos durante a respiração na presença de ATP (estado 3 da respiração).

4.2.1.4. Obtenção de mitocôndrias de fígado de rato rompidas por congelamento, para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito anteriormente, foram congeladas em nitrogênio líquido (-190°C) por um período máximo de 30 dias. As organelas foram rompidas por descongelamento e recongelamento. Os fragmentos de membrana obtidos, cujos componentes da cadeia respiratória apresentavam atividade satisfatória, foram armazenados a 4°C até a realização dos experimentos.

4.2.1.5. Determinação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em mitocôndrias rompidas por congelamento

A determinação das atividades da NADH oxidase e da succinato oxidase foram realizadas polarograficamente através da determinação do consumo de oxigênio. As demais atividades das enzimas ligadas à cadeia respiratória foram realizadas espectrofotometricamente em aparelho HITACHI (modelo U-2001), equipado com impressora Epson LX300. Antes de dar início às reações de determinação enzimática, concentrações crescentes de TRN (1,25 – 60 nmol. mg⁻¹ de proteína mitocondrial) foram pré-incubadas por dois minutos com a preparação.

4.2.1.5.1. NADH oxidase (NADH: oxigênio óxido-redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada polarograficamente pelo método de SINGER (1974). O sistema de reação a 28°C e em volume final de 1,3 mL foi constituído de tampão fosfato 80 mmol. L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol. L⁻¹, NADH 0,17 mmol. L⁻¹ e 1 mg de proteína mitocondrial. A preparação foi incubada com os compostos em estudo por dois minutos e a reação foi iniciada pela adição do NADH. A velocidade do consumo de oxigênio foi determinada e os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumidos. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

4.2.1.5.2. NADH desidrogenase (NADH: ferricianeto óxido-redutase)

A atividade da NADH desidrogenase (EC 1.6.5.3.) foi determinada pelo método espectrofotométrico de SINGER (1974), utilizando-se o ferricianeto como aceptor de elétrons na presença de rotenona, para bloquear a atividade da NADH-oxidase, à temperatura de 28°C. O sistema de reação, em volume final de 3 mL, foi constituído de tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol. L⁻¹, rotenona 1 µmol. L⁻¹, NADH 0,17 mmol. L⁻¹, ferricianeto de potássio 0,6 mmol. L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de NADH e monitorada a 420 nm. Os resultados foram expressos em µmol de ferricianeto reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1.040 mmol. L⁻¹. cm⁻¹ (CREUTZ & SUTIN, 1973).

4.2.1.5.3. NADH citocromo c redutase (NADH: citocromo c óxido-redutase)

A atividade da NADH citocromo c redutase (EC 1.6.99.3.) foi estimada pelo método descrito por SOMLO (1965) em sistema de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol. L⁻¹, NaCN 1 mmol. L⁻¹, NADH 50 µmol. L⁻¹, citocromo c (oxidado) 40 µmol. L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação em volume final de 1 mL, foi realizada a 28°C e iniciada pela adição de NADH. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm, e o resultado expresso em nmol de citocromo c

reduzido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm de $19.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.1.5.4. Succinato oxidase (Succinato:oxigênio óxido-redutase)

A atividade do segmento succinato oxidase foi determinada polarograficamente pelo método de SINGER (1974). O sistema de reação, em volume final de 1,3 mL, foi constituído de tampão fosfato $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4, EDTA $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, rotenona $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, succinato de sódio $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e 1 mg de proteína mitocondrial. A velocidade de consumo de oxigênio foi determinada polarograficamente a 30°C , sendo a reação iniciada pela adição do substrato. Os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumidos. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando-se a solubilidade do O_2 de $235 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a 30°C (ESTABROOK, 1967).

4.2.1.5.5. Succinato citocromo *c* redutase (Succinato: ferrocitocromo *c* óxido-redutase)

A atividade desta enzima foi determinada pelo método de SOMLO (1965), medindo-se a redução do citocromo *c*, após o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN e rotenona.

O sistema de reação, em volume final de 1 mL, foi constituído de tampão fosfato $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4, EDTA $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCN $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, rotenona $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, succinato de sódio $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, e 100 μg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema foram incubados por 10 minutos a 28°C . A reação, iniciada pela adição de $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ do citocromo *c*, foi acompanhada a 550 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de citocromo *c* reduzido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm de $19.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.1.5.6. Succinato desidrogenase (Succinato: fenazina metassulfato óxido redutase)

A atividade da succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1.) foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se 2,6 diclorofenolindolfenol

(DCPIP) e fenazina metassulfato (PMS) como aceitadores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol. L⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol. L⁻¹, NaCN 1 mmol. L⁻¹, EDTA 2 mmol. L⁻¹ e 20 µg de proteína mitocondrial. O sistema foi incubado por 10 minutos a 28°C e a reação foi iniciada pela adição de DCPIP 60 µmol. L⁻¹ e PMS 1 mmol. L⁻¹. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada em 600 nm e os resultados foram expressos em nmol de DCPIP reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100 mol. L⁻¹. cm⁻¹ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.2.1.5.7. Obtenção do ferrocitocromo c

Citocromo c (tipo IV Sigma Chemical Co) de coração de boi foi reduzido com ditionito de sódio (Na₂S₂O₈) e a solução foi filtrada em coluna de Sephadex G-25, para separar o ferrocitocromo c do excesso de ditionito (YONETANI & RAY, 1965). A concentração de citocromo c reduzido foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 27.700 .mol. L⁻¹. cm⁻¹ a 550 nm (MARGOLIACH, 1954). O ferrocitocromo preparado através deste procedimento contém menos de 5% de proteína oxidada e se mantém reduzido durante 24 horas.

4.2.1.5.8. Citocromo c oxidase (Ferrocitocromo c: oxigênio óxido-reductase)

A atividade da citocromo c oxidase (EC 1.9.3.1.) foi determinada segundo método espectrofotométrico de MASON *et al.* (1973). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol. L⁻¹, ferrocitocromo c 30 µmol. L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição do ferrocitocromo e a atividade foi expressa em nmol de citocromo c oxidado. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar como descrito no item anterior.

4.2.1.5.9. Determinação da atividade da F₁F₀ATPase em mitocôndrias rompidas

A atividade da F₁F₀ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias rompidas (item 4.2.1.4.) foi determinada medindo-se a liberação de fosfato inorgânico decorrente da hidrólise do ATP, na presença de um sistema regenerador de ATP, segundo o método descrito por PULLMAN *et al.* (1960).

O sistema de reação, em volume final de 1 mL, foi mantido a 30°C e era constituído de: tampão Tris-HCl 50 mmol. L⁻¹, pH 8,4, MgSO₄ 3 mmol. L⁻¹, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mmol. L⁻¹, piruvato quinase 10 UI e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4 mmol. L⁻¹. Após 10 minutos, a adição de ácido tricloro acético (TCA) a 5% parou a reação. O material foi centrifugado a 7.800 g por 1 minuto e o fosfato inorgânico (Pi) liberado no sobrenadante foi dosado pelo método descrito por SUMMER (1944). Os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

4.2.1.5.10. Determinação da atividade da F₁F₀ATPase em mitocôndrias intactas

A atividade da F₁F₀ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada na ausência ou presença de 1 µmol. L⁻¹ de FCCP, através do método de PULMANN *et al.* (1960). O sistema de reação, em volume final de 1 mL, foi mantido a 28°C e era constituído de: sacarose 50 mmol. L⁻¹, tampão Tris-HCl 12 mmol. L⁻¹, pH 7,4, KCl 50 mmol. L⁻¹ e 2 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol. L⁻¹ e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos, a reação foi parada pela adição de TCA a 5 g%. Em seguida, o material foi centrifugado a 7.800 g, durante 1 minuto, e o Pi liberado foi dosado segundo o método descrito por SUMMER (1944). Os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

4.2.1.6. Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) foi determinado em espectrofluorímetro modelo RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.), pela variação de fluorescência promovida pela captação de safranina O como descrito por ÅKERMAN & WIKSTRÖM (1976). Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 495 e 586 nm, respectivamente, e as aberturas das fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 3 nm (WEICKOWSKI & WOJTCZAK, 1998). A suspensão mitocondrial (0,5 mg. mL⁻¹) foi incubada a 28°C em meio contendo: sacarose 250 mmol. L⁻¹, tampão MOPS 20 mmol. L⁻¹, pH 7,2, suplementado com safranina O 5 µmol. L⁻¹, succinato de sódio 3 mmol. L⁻¹, NaH₂PO₄ 2 mmol. L⁻¹, rotenona 1 µmol. L⁻¹ e concentrações crescentes de TRN (1,25 – 60 nmol. mg⁻¹ proteína) em volume final de 2 mL. Para determinar o $\Delta\psi$ em cada situação experimental foram previamente elaboradas curvas de calibração, onde o potencial de membrana foi medido pela difusão de K⁺ na presença de valinomicina (0,12 mmol. L⁻¹), de acordo com as metodologias descritas por ÅKERMAN & WIKSTRÖM (1976) e ROSSI & AZZONE (1969).

4.2.1.7. Determinação do inchamento mitocondrial (*swelling*)

4.2.1.7.1. Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas

Os experimentos de inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas foram realizados acompanhando-se a variação da absorbância a 540 nm (MORENO & MADEIRA, 1990), em espectrofotômetro HITACHI (mod. U-2001). A suspensão mitocondrial (1 mg) foi incubada a 28°C em meio contendo: KNO₃ 135 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 0,1 mmol. L⁻¹ e rotenona 4 µmol. L⁻¹, suplementado com valinomicina 4 µg. mL⁻¹, antimicina A 2 µg. mL⁻¹ e concentrações crescentes de TRN (1,25 – 60 nmol. mg⁻¹ proteína), em volume final de 2 mL.

4.2.1.7.2. Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas

Os experimentos de inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas foram realizados acompanhando-se a variação da absorbância a 540 nm (SEPALLA *et al.*, 1973), em espectrofotômetro HITACHI (mod. U-2001). A adição de acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹ à suspensão mitocondrial forneceu os íons necessários para o inchamento mitocondrial. Tais experimentos foram realizados com suspensão mitocondrial (1 mg proteína) mantida em meio de reação contendo sacarose 100 mmol. L⁻¹, tampão Tris-HCl 30 mmol. L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol. L⁻¹ e acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹. O inchamento mitocondrial foi induzido pela adição de glutamato 15 mmol. L⁻¹ após pré-incubação com crescentes concentrações de TRN (1,25 – 60 nmol. mg⁻¹ proteína) e a contração mitocondrial foi observada pela adição de rotenona (4 μmol. L⁻¹).

4.2.1.8. Transição de permeabilidade mitocondrial

A transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) foi acompanhada como recomendado por GUNTER & PFEIFFER (1990), pelo decréscimo na absorbância a 540 nm, devido ao inchamento mitocondrial na presença de íons cálcio.

O meio de reação a 28°C e volume final de 1 mL era constituído de: D-manitol 250 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,2, fosfato de potássio 0,3 mmol. L⁻¹, succinato de potássio 3 mmol. L⁻¹, rotenona 5 μmol. L⁻¹, proteína mitocondrial (mitocôndrias acopladas) 0,5 mg. mL⁻¹, CaCl₂ 100 - 200 μmol. L⁻¹, TRN 2,5 – 50 μmol. L⁻¹.

4.2.1.9. Liberação de ferro de ferritina

Nos experimentos de liberação de ferro de ferritina, foi usada ferritina de baço de cavalo, seguindo o método de OTEIZA *et al.* (1995). Para a remoção do ferro fracamente ligado à ferritina, 200 μL de ferritina foram incubados por 1 hora a 4°C com 200 μL de tampão Tris-HCl 20 mmol. L⁻¹, pH 7,4, contendo NaCl 140 mmol. L⁻¹ e EDTA 10 mmol. L⁻¹. A preparação foi então

cromatografada em coluna de gel permeação Sephadex G-25, utilizando como eluente, tampão Tris-HCl 20 mmol. L⁻¹ (pH 7,4) contendo NaCl 140 mmol. L⁻¹. A concentração de proteína do eluato foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

O efeito do TRN na liberação de ferro de ferritina foi monitorado em um sistema de reação em volume final de 1 mL contendo: tampão Tris-HCl 20 mmol. L⁻¹, pH 7,3, NaCl 140 mmol. L⁻¹, sulfonato de batofenantrolina 1 mmol. L⁻¹, ferritina 0,3 mg. mL⁻¹, na ausência (controle) e presença de TRN em diferentes concentrações (50 - 1000 µmol. L⁻¹), sendo a reação iniciada pela adição deste agente. O tempo de incubação antes da leitura em 530 nm foi de 20 minutos. Os resultados foram expressos em µmol de Fe (II) quelado. A liberação de ferro de ferritina foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 530 nm, devido à quelação do Fe (II) liberado por sulfato de batofenantrolina.

4.2.1.10. Lipoperoxidação mitocondrial

A reação de lipoperoxidação foi avaliada através da determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo o método descrito por BUEGE & AUST (1978).

Mitocôndrias (1,0 mg proteína. mL⁻¹), obtidas de acordo com o procedimento já descrito (item 4.2.1.1.), foram incubadas sob agitação a 37°C, em meio de reação sugerido por TAKAYANAGI *et al.* (1980), com algumas modificações. O sistema apresentava volume final de 3 mL e era constituído de D-manitol 250 mmol. L⁻¹, HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,2, FeCl₃ 0,2 mmol. L⁻¹, ADP 2 mmol. L⁻¹, na ausência e na presença de TRN. A incubação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 5 mmol. L⁻¹. Alíquotas de 0,5 mL da mistura foram retiradas nos tempos zero, 10, 20, 30 e 45 minutos de incubação na presença de substrato. Às alíquotas de cada tempo, foram adicionados 2 mL de reagente TBA-TCA-HCl, assim constituído: TCA 15% p/v, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375 g% e HCl 0,25 N, e BHT 0,01 g%. A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. A absorbância foi lida em 535 nm, em

espectrofotômetro (HITACHI mod. 2001), contra um branco, onde a fração protéica foi excluída, mas submetida aos mesmos procedimentos da amostra.

A concentração de TBARS na amostra foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \cdot 10^5 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a concentração foi expressa em $\mu\text{mol TBARS. mg}^{-1}$ proteína.

4.2.1.11. Interação entre triclosan e clorexidine com íons ferro

4.2.1.11.1. Estudos espectrofotométricos da ligação do triclosan e da clorexidine com íons ferro

4.2.1.11.1.A. Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro

Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro HITACHI (mod. U-2001). Os espectros de absorção do TRN e da CHX (em diferentes concentrações), em solução de NaCl 150 mmol. L^{-1} , pH 7,4, foram realizados entre 200 e 600 nm, utilizando-se cubeta de quartzo. A habilidade do TRN e da CHX em quelar íons ferro foi avaliada através de variações espectrais causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de FeCl_3 , de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre TRN e ferro e CHX e ferro.

4.2.1.11.1.B. Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro – ensaio preparado sob atmosfera inerte

Previamente à realização dos espectros de absorção do TRN e da CHX na presença de íons ferro, todas as soluções utilizadas (Água MilliQ, solução de CHX 20%) foram deaeradas durante 20 min., pela adição de gás nitrogênio, a fim de remover todo o oxigênio presente nestas soluções, o qual poderia interferir nos resultados obtidos sob atmosfera inerte.

Após deaeração, as soluções de TRN 0,3%, CHX 0,12%, FeSO_4 e FeCl_3 foram preparadas sob atmosfera inerte, utilizando-se para isso, uma “*glove bag*”, mantida sob atmosfera de nitrogênio. Estes ensaios foram realizados no

Departamento de Química, desta Universidade, com a gentil colaboração do Prof. Dr. Antônio Salvio Mangrich e Profa. Jaíza .

Após a preparação das soluções de TRN 0,3%, CHX 0,12%, FeSO₄ e FeCl₃ sob atmosfera inerte, os espectros de absorção do TRN e da CHX na presença de íons ferro foram realizados sob as mesmas condições descritas no item 4.2.1.11.1.A.

4.2.1.11.2. Ensaio da ferrozina

A ligação do TRN e da CHX a íons ferrosos também foi avaliada através da formação do complexo Fe²⁺-ferrozina (CARTER, 1971). TRN ou CHX (0 – 200 µmol. L⁻¹) foram incubados com Fe²⁺ 20 µmol. L⁻¹ (sulfato ferroso amoniacal) em acetato de amônio a 5%, pH 6,9. A reação foi iniciada pela adição de ferrozina 100 µmol. L⁻¹ e, após equilíbrio (10 minutos), a absorbância foi determinada a 562 nm.

4.2.1.12. Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável difenil picril hidrazila (DPPH)

A reatividade do TRN com o radical livre estável DPPH foi determinada através das medidas de alteração de absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958). O sistema de reação era constituído de 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹, pH 5,5, 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH e suplementado com concentrações crescentes de TRN (5 – 1500 µmol. L⁻¹). Após 5 minutos de incubação, foi determinado o decréscimo da absorbância. Concentrações adequadas de agentes redutores, como ácido ascórbico e cisteína, também foram utilizadas nos experimentos como controle.

4.2.2. Métodos para ensaios de pinçamento de membranas (eletrofisiologia)

Os ensaios de pinçamentos de membranas foram desenvolvidos na New York University College of Dentistry, sob orientação da Dra. Kathleen W. Kinnally.

4.2.2.1. Isolamento de mitocôndrias

O isolamento de mitocôndrias de fígado de rato para os ensaios de pinçamento de membranas foi realizado segundo o método descrito por KINNALLY & TEDESCHI (1978). Os animais foram mortos por intoxicação com CO₂, o fígado foi removido e colocado imediatamente em meio gelado. Este meio, denominado 1x, continha sacarose 70 mmol. L⁻¹, D- manitol 230 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, suplementado com EDTA 2,5 mmol. L⁻¹ e inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,8 mmol. L⁻¹ (solução em propanol), adicionado ao meio imediatamente antes do uso. O fígado foi finamente picado e homogeneizado em homogeneizador de Van Potter Elvehjen por cinco vezes com pistilo apertado. Este homogeneizado foi separado em 4 tubos de centrífuga de 50 mL, preenchidos com meio 1x e centrifugado em centrífuga refrigerada a 320 x g por 15 minutos em rotor JA-20. O sobrenadante desta centrifugação que continha as mitocôndrias foi novamente centrifugado a 12.600 x g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão com meio 1x sem PMSF e centrifugado a 12.600 x g por 10 minutos.

4.2.2.2. Obtenção de mitoplastos e purificação de membranas mitocondriais

A obtenção de mitoplastos, que são mitocôndrias desprovidas da membrana externa, foi realizada de acordo com o método descrito por DECKER & GREENAWALT (1977) com pequenas modificações, pela utilização de uma prensa francesa. Brevemente, a partir do precipitado de mitocôndrias, foi feita uma incubação em gelo, por 10 minutos, com meio hiperosmótico, o qual ocasiona pequena contração da matriz mitocondrial e, por conseqüência, uma ligeira separação da MMI em relação à membrana mitocondrial externa (MME). Este meio, denominado 2x era constituído por sacarose 140 mmol. L⁻¹, D- manitol 460 mmol. L⁻¹ e tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,4. Após incubação, as mitocôndrias foram submetidas a uma pressão de 2.000 psi na prensa francesa, o que ocasiona a fragmentação da MME, sem danificar a

MMI. A preparação resultante foi equilibrada osmoticamente pela adição de meio 1x e centrifugada a $13.250 \times g$, durante 20 minutos. O precipitado resultante continha os mitoplastos, enquanto o sobrenadante possuía a fração com MME.

Para a purificação da MMI, a fração contendo os mitoplastos, isto é, o precipitado da centrifugação anterior, foi ressuspensa em tampão de lise, o qual continha tampão Tris-HCl 1 mmol. L^{-1} , pH 7,4, EGTA 1 mmol. L^{-1} e EDTA 1 mmol. L^{-1} , em volume final cerca de 30 vezes maior do que o do precipitado. Este volume foi mantido sob agitação constante por 5 minutos e depois foi homogeneizado em homogenizador Dounce de 2 mL de capacidade para separar os fragmentos de MME eventualmente ainda ligados aos mitoplastos, após o tratamento anterior. O homogeneizado foi então colocado em um tubo de ultracentrifuga, juntamente com tampão de lise, até completar cerca de 2/3 do tubo. Após isso, com a ajuda de uma seringa de cânula grossa apoiada no fundo do tubo, foram colocados cerca de 8 mL de solução densa de sacarose a 35%, contendo tampão Tris 10 mmol. L^{-1} , pH 7,4 (MANNELLA, 1982). O gradiente assim formado no tubo foi mantido em gelo até que a amostra contendo MME também fosse preparada para serem ultra-centrifugadas simultaneamente.

Para a purificação da MME utilizou-se o sobrenadante obtido na última centrifugação. A preparação foi misturada com aproximadamente 5 mL de tampão de lise e colocado em tubos de ultracentrifuga, os quais foram preenchidos em aproximadamente 2/3 com tampão de lise. Por fim, como foi descrito anteriormente para MMI, foi formado um gradiente descontínuo de sacarose para a fração da MME (MANNELLA, 1982).

Tanto as amostras que continham MME quanto as que continham MMI foram submetidas a uma ultracentrifugação de $44.500 \times g$ refrigerada a 4°C , durante 75 minutos, utilizando-se para isso, rotor basculante SW41.Ti. Finalizada esta ultra-centrifugação, o precipitado obtido correspondia à MMI, a qual foi ressuspensa no menor volume possível de um tampão constituído por Tris-HCl 10 mmol. L^{-1} , pH 7,4, ajustando-se a concentração final de proteínas para 500 - 700 $\mu\text{g/mL}$.

Por outro lado, na interface do tubo onde estava a amostra contendo MME foi observado um anel mais turvo, o qual foi recolhido com uma pipeta Pasteur. Este material recolhido foi então novamente ultra-centrifugado a $44.500 \times g$ a 4°C , por 60 minutos, em rotor basculante SW41.Ti. O precipitado obtido correspondia à MME purificada a qual, por sua vez, também foi ressuspensa no menor volume possível em tampão contendo Tris-HCl 10 mmol. L^{-1} , pH 7,4, ajustando-se a concentração final de proteínas para $500 - 700 \mu\text{g/mL}$.

4.2.2.3. Preparação de lipossomos

Os lipossomos foram preparados a partir de L- α -fosfatidil colina purificada de soja, conforme procedimento descrito por CRIADO & KELLER (1987).

4.2.2.3.1. Purificação da L- α - fosfatidil colina

Como passo prévio à obtenção dos lipossomos, procedeu-se à purificação da L- α -fosfatidil colina. Para tal, foram misturados em um recipiente protegido da luz, à temperatura ambiente, 2,5 g de L- α -fosfatidil colina (SIGMA) com 2 mL de acetona desidratada. Após borbulhar um pouco de nitrogênio, selou-se o recipiente e manteve-se agitação constante por 48 horas, sob temperatura ambiente. Após este período, centrifugou-se esta mistura a $3.000 \times g$ por 10 minutos. O precipitado obtido foi colocado em um outro recipiente protegido da luz, seguindo-se a adição de 10 mL de éter etílico. A mistura foi mantida sob agitação e sob atmosfera de nitrogênio durante 1 hora, e posteriormente filtrada através de filtro milipore de $0,45 \mu\text{m}$. Os lipídeos que se encontravam no filtrado foram transferidos para um tubo de vidro (Corex) de 30 mL, previamente lavado com ácido clorídrico 2 N, onde então procedeu-se a evaporação parcial do éter das paredes do tubo, fazendo-se borbulhar nitrogênio. Os restos de éter foram eliminados colocando-se o tubo em um dessecador a vácuo durante 2 horas ou até que o odor de éter não fosse mais perceptível. O resíduo do tubo contendo os lipídeos foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio e transferido para "vials" de cristal, onde foram mantidos congelados a -40°C .

4.2.2.3.2. Obtenção de lipossomos

Para a obtenção de lipossomos, 0,5 mL da solução contendo lipídeos purificados conforme descrito no item anterior foram evaporados pelo borbulhamento de nitrogênio. Após evaporação, foram adicionados 3 mL de água MilliQ e a mistura foi agitada vigorosamente com o auxílio de um vortex. A mistura foi então sonicada em banho de ultra-som a 35 Watts, por 10 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Para evitar aquecimentos, este procedimento foi realizado em banho de gelo.

A seguir, a mistura foi colocada em um tubo de ultracentrífuga contendo KCl 150 mmol. L⁻¹ e tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, e ultra-centrifugada durante 105 minutos a 142.000 x g, em rotor 80 Ti. O precipitado contendo lipossomos foi ressuspenso em 1 mL do mesmo tampão e armazenado em pequenas frações (~30 µL) a -40°C. Geralmente o rendimento desta preparação é de 200 mg lipídeos .mL⁻¹.

4.2.2.4. Obtenção de proteolipossomos

A obtenção de proteolipossomos foi realizada mediante um procedimento de desidratação e re-hidratação dos lipossomos obtidos conforme descrito no item anterior, segundo o método descrito por CRIADO & KELLER (1987).

Para isso, foram colocados em um tubo *ependorf* 5 µL da preparação de lipossomos, além do volume necessário da suspensão protéica correspondente à MMI para se alcançar a concentração final de 1,5 mg% de proteína mitocondrial, e tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4. O conteúdo do *ependorf* foi agitado em vortex em ciclos de 5 segundos seguidos de ciclos de 10 segundos de descanso em gelo, durante 5 minutos. Em seguida, a mistura foi distribuída em minúsculas gotas em uma lâmina de vidro limpo, a qual por sua vez, foi colocada no interior de uma placa de Petri parcialmente preenchida com CaCl₂, que funciona como agente dessecante. A placa de Petri então, foi mantida em refrigerador durante 3 – 4 horas. Após verificação de que todas as gotículas da lâmina de vidro estavam secas, procedeu-se a re-hidratação das mesmas pela adição de pequenas gotículas de KCl 150 mmol. L⁻¹ e tampão

HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, com concomitante remoção do agente dessecante da placa de Petri. No fundo da placa de Petri também foi adicionado papel absorvente umedecido na mesma solução tampão. O procedimento de re-hidratação dos proteolipossomos foi realizado em refrigerador por, pelo menos, 12 horas. Após este período, a lâmina de vidro contendo os proteolipossomos foi lavada por várias vezes com 0,5 mL do mesmo tampão e a solução obtida foi armazenada a -80°C durante até 1 mês, sem haver dano na atividade dos canais dos mesmos.

4.2.2.5. Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo o método colorimétrico descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se BSA como padrão, em concentrações entre 10 e 50 µg de proteína.

Todos os tubos analisados, incluindo os da curva padrão, incluíam 1 mL de NaOH 0,1 mol. L⁻¹ e 1 mL da amostra analisada e, após 5 minutos de incubação, foi adicionado 0,5 mL de reativo de Bradford. Após 10 minutos, a absorbância foi determinada a 595 nm.

4.2.2.6. Eletrofisiologia

4.2.2.6.1. Obtenção de micropipetas e preparação de microeletrodos

As micropipetas foram obtidas a partir de capilares de vidro de borossilicato (World Precision Instruments, New Haven, CT, 1BBL), de parede fina e filamento interno, combinando-se os efeitos que sobre este vidro produzem o aquecimento, a velocidade de estiramento e posterior esfriamento de uma microforça (Sutter Instrument Co., P-87). O programa desenvolvido para tal efeito está descrito na Tabela III.

Tabela III: Programa para fabricação de micropipetas

	Aquecimento	Força de estiramento	Velocidade de estiramento	Tempo de resfriamento
	Unidades arbitrárias			
Linha 1	575	65	90	190

As unidades de aquecimento são programadas e ajustadas uma vez estabelecida a curva de aquecimento, segundo a qual o vidro vai se aquecendo progressivamente até o ponto em que se funde. Este ponto de fusão está estabelecido em 552 unidades. Com este programa, obtêm-se micropipetas com um diâmetro da ponta de 0,2 a 0,5 μm e uma resistência de 10 a 50 $\text{M}\Omega$, medida em 150 mmol. L^{-1} de KCl.

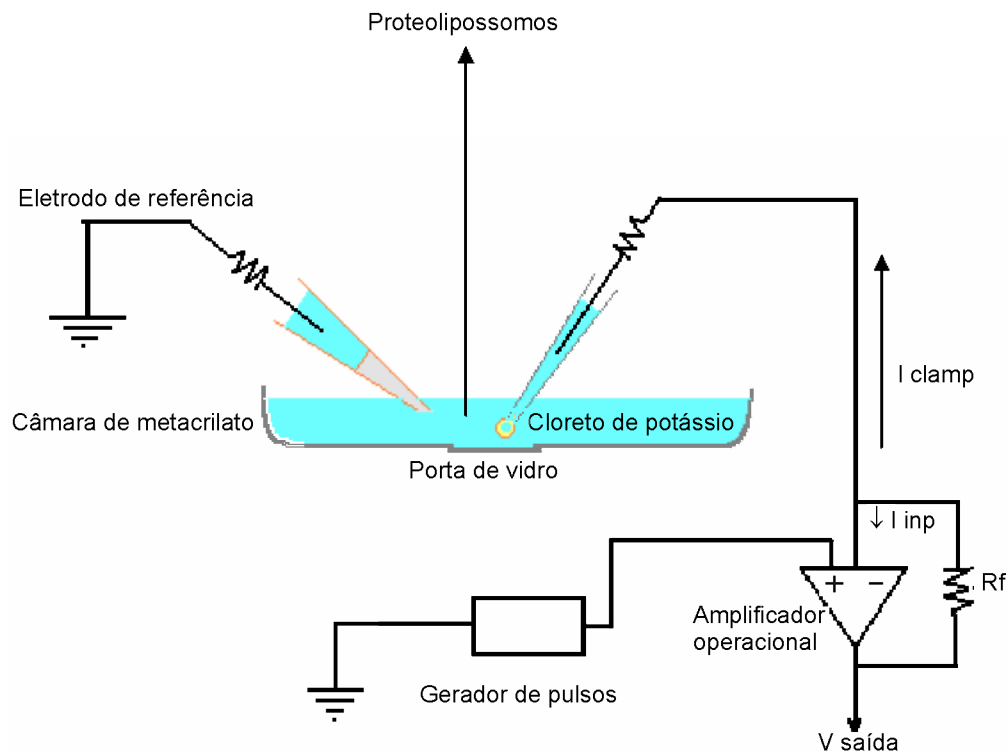
Estas micropipetas eram preenchidas com solução de KCl 150 mmol. L^{-1} , HEPES 5 mmol. L^{-1} , pH 7,4, Ca^{2+} 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e Pi 300 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e constituíam os microeletrodos que poderiam se aproximar do protelipossomo que seria pinçado.

Por outro lado, o eletrodo de referência foi fabricado, preenchendo-se uma ponteira de plástico com capacidade para 100 μL (utilizadas em pipetas automáticas) com uma solução contendo o mesmo tampão presente nas micropipetas, adicionado de agarose a 1 g%, a uma altura de aproximadamente 5 mm. Esta solução é preparada a quente e quando ela esfria, a agarose se solidifica e permite o preenchimento da parte posterior da ponteira com o mesmo meio líquido, na ausência de ágar. Com a ponteira preenchida, foi-lhe introduzida também na parte posterior um fio de prata clorado, convenientemente conectado a um fio terra, constituindo, assim, o eletrodo de referência.

4.2.2.6.2. Circuito elétrico de medida e pinçamento de voltagem

O circuito elétrico para a medida de correntes iônicas se estabelece entre o eletrodo de referência, o meio condutor, onde se encontram os proteolipossomos, e o microeletrodo de pinçamento, o qual se encontra

conectado a um amplificador operacional (Lis-Medical, modelo D-6100), conforme o esquema demonstrado a seguir:



O meio condutor no qual foram realizados os experimentos era isosmótico em relação ao interior dos proteolipossomos e continha KCl 150 mmol. L^{-1} , tampão HEPES 5 mmol. L^{-1} , pH 7,4, sendo suplementado ainda com Ca^{2+} $50 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ e Pi $300 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$. O eletrodo de referência com ponte de agarose foi introduzido neste meio condutor e o circuito foi fechado com o microeletrodo de medida ou de pinçamento, o qual estava devidamente conectado ao terminal negativo do amplificador operacional. O terminal positivo deste amplificador estava conectado a um gerador de pulsos de voltagem, de maneira que – em todo momento – a voltagem no terminal fosse exatamente igual à do terminal negativo, sendo possível, portanto, pinçar ou manter a voltagem da membrana selada no extremo do eletrodo em um valor determinado e constante. A frequência de resposta do amplificador era de 140 kHz.

Neste sistema, o amplificador tinha, portanto, uma dupla função, pois permitia medir a magnitude da corrente derivada da abertura dos canais na membrana pinçada (I_{clamp}), de tal forma que a variação na voltagem de pinçamento, provocada pelo fluxo de corrente através dos canais, era detectada pelo terminal de saída do amplificador ($V_{\text{saída}}$). Em um amplificador operacional, a corrente que entrava ou saía do terminal negativo (I_{inp}) deveria ser zero, porque através de uma resistência de retroalimentação (R_f), com um valor de $50 \text{ G}\Omega$, fazia-se chegar a este terminal uma intensidade de corrente da mesma magnitude que era originada pelo movimento dos íons através dos canais.

A resistência inicial dos microeletrodos utilizados foi determinada aplicando-se um pulso de voltagem de 1 mV durante 1 ms , a intervalos de 10 ms , oscilando entre 10 e $50 \text{ M}\Omega$, aumentando até 2 ou mais gigaohms, uma vez obtido o gigaselo. Neste momento, deixava-se de aplicar o pulso de 1 mV e fazia-se uma varredura de voltagens, ou seja, uma curva de corrente-voltagem, na qual a voltagem era aplicada de maneira manual e progressiva através do microeletrodo, fazendo-se coincidir com um amplo espectro de valores positivos e negativos. O objetivo desta varredura era detectar o tipo de atividade do canal que estava presente em cada pinçamento. Em seguida, começava-se a aplicar voltagens positivas e negativas, deixando-se cada voltagem constante durante, pelo menos, 30 segundos.

De forma paralela e ininterrupta ao longo de todo o tempo do experimento, as flutuações de corrente observadas e devidas à abertura e ao fechamento dos canais presentes no pinçamento foram gravadas em fitas cassetes digitais DAT.

4.2.2.6.3. Obtenção dos gigaselos

Aproximadamente $1 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão de proteolipossomos foi colocada em uma lâmina de vidro convenientemente adaptada na parte central (aberta) de uma câmara de metacrilato. Esta câmara, cujo volume máximo é de 2 mL , foi adaptada à platina do microscópio invertido e perfundida com $1,5 \text{ mL}$ de tampão HEPES 5 mmol. L^{-1} , pH $7,4$, contendo KCl 150 mmol. L^{-1} , Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}$.

L^{-1} e Pi $300 \mu\text{mol. L}^{-1}$, após o que foram colocados os eletrodos de referência e de pinçamento.

Comprovava-se a resistência do microeletrodo de pinçamento fazendo-se passar através dele um pulso de voltagem de 1 mV de 10 ms, a intervalos de 10 ms, e observando-se concomitantemente na tela do osciloscópio a corrente induzida. Só então a ponta deste microeletrodo se aproximava cuidadosamente de um proteolipossomo até que o primeiro tocasse ligeiramente este último. Quando ambos (microeletrodo e proteolipossomo) estavam em contato, aplicava-se uma pequena pressão negativa, separando-se uma pequena porção de membrana, com os canais iônicos que nela existiam. Esta pressão permitia que a parede interior do vidro do microeletrodo e um pequeno fragmento de membrana, de diâmetro similar ao da ponta do microeletrodo de pinçamento, ficassem selados fortemente. A resistência destes selos frente a corrente oscilava entre 2 e 10 $G\Omega$. Em aproximadamente 20% dos casos, os pinçamentos obtidos foram espontâneos, ou seja, não foi preciso a aplicação de sucção para que os proteolipossomos formassem selos no microeletrodo situado em sua proximidade. Se os passos descritos até aqui fossem seguidos, obtinha-se um pinçamento aderido. Se, ao contrário, o selo fosse separado do resto da membrana ao se retrair suavemente o microeletrodo mediante suave deslocamento do micromanipulador, tinha-se um pinçamento separado ou dividido. No presente trabalho, todos os pinçamentos analisados apresentavam configuração separada ou dividida.

O selo deve apresentar uma resistência muito elevada, superior a $10^9 \Omega$ (gigaselo), o qual é um requisito para se detectar o pequeno fluxo de corrente através de um dos poucos canais geralmente presentes em cada selo. A formação do gigaselo era observada claramente no osciloscópio, visto que a resistência frente à corrente aumentava consideravelmente.

Os dados obtidos foram representados em nanosiemens (nS ou $10^{-9} S$). Siemens é a unidade referente à condutância que, por definição, representa o inverso da resistência, ou ainda, a relação entre corrente e diferença de potencial. Assim:

$$\text{Condutância (S)} = \text{Corrente} / \text{Diferença de potencial}$$

4.2.2.6.4. Efeito do triclosan e da clorexidine sobre a atividade dos canais iônicos mitocondriais

Uma vez obtidos os selos dos proteolipossomos, os experimentos foram realizados em condições de pinçamento de voltagem, aplicando-se diferentes valores de voltagem tanto positivos quanto negativos, durante períodos de tempo não inferiores a 60 segundos. Após a realização da varredura de voltagens e uma vez observadas as características do canal presente em cada pinçamento, o meio condutor era perfundido com 5 mL do mesmo meio, contendo diferentes concentrações dos agentes antissépticos em estudo, TRN ou CHX.

4.2.2.6.5. Obtenção e análise de dados

Durante a realização dos experimentos, o registro das transições de corrente detectadas pelo amplificador durante a aplicação de uma determinada voltagem foi visualizado mediante um osciloscópio, ao mesmo tempo em que foi sendo gravada em uma fita cassete digital. Os dados eram coletados a uma frequência de 10 kHz, enquanto que a análise era limitada a uma largura de banda de 2 kHz, mediante um filtro de 8 pólos (Frequency Devices, modelo 902). Os potenciais (V) em que foram pinçadas as membranas foram expressos em relação à matriz do proteolipossomo. Assim,

$$V = V_{\text{meio}} - V_{\text{pipeta}}$$

A análise dos dados armazenados nas fitas de vídeo era feita transferindo-se porções de dados (entre 30 e 60 segundos) para um computador PC Intel x 86 Family 15 model 0, com processador matemático, mediante uma interfase de conversão digital/ analógico 2801 A D/A. A frequência de aquisição de dados foi de 5 kHz. A análise conseguinte foi baseada no programa Strathclyde Electrophysiological Data Recorder EDR for Windows V2.5.8.

4.2.3. Métodos para ensaios de cultivo celular e microscopia

Os ensaios de cultivo celular e microscopia foram desenvolvidos na New York University College of Dentistry, sob orientação da Dra. Kathleen W. Kinnally.

4.2.3.1. Células e condições de crescimento

No presente estudo foram utilizadas três diferentes linhagens celulares, todas derivadas de epitélio oral de humanos: cultivo primário de células normais NOE (*“normal oral epithelium”*), cultivo de linhagens estabelecidas de células pré-malignas (MSK Leuk1) e malignas (MDA), gentilmente cedidas pelo professor Dr. Peter Sacks, responsável pelo laboratório de pesquisas em câncer oral da New York University College of Dentistry.

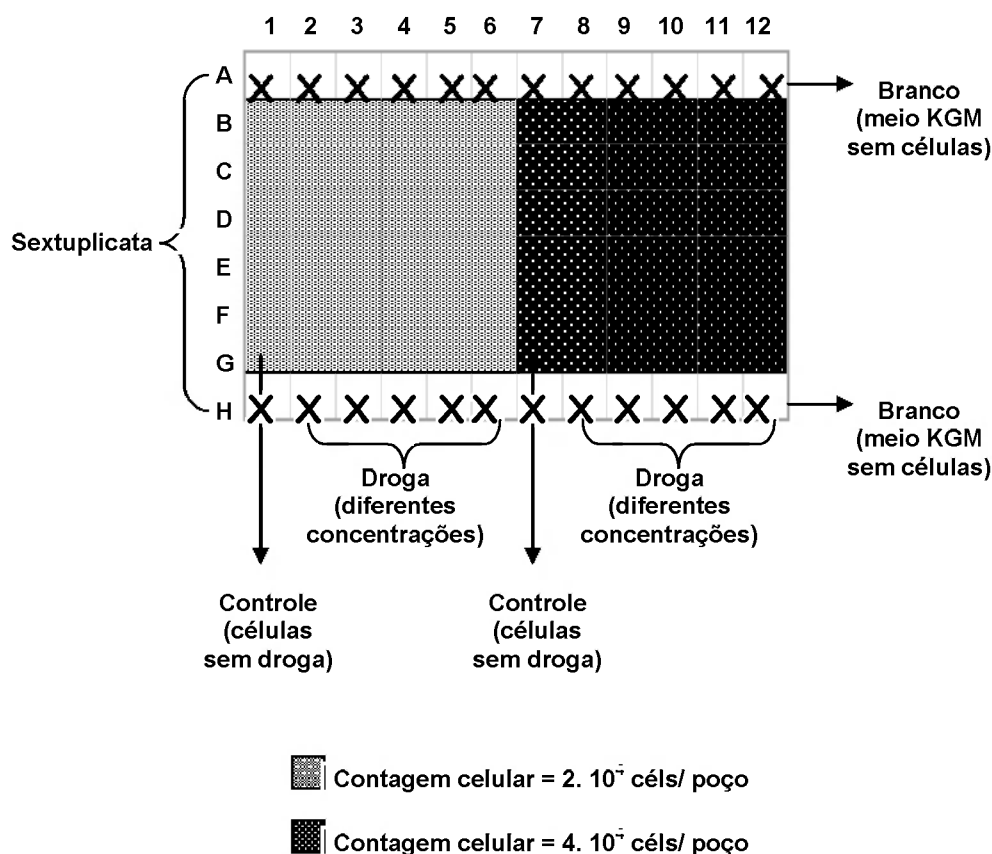
As três linhagens foram cultivadas nas mesmas condições, sendo crescidas a 90% de confluência em garrafas plásticas descartáveis de 25 cm², contendo meio de cultura KGM (BioWittaker, Rockland, ME), livre de soro, mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O cultivo das células NOE foi mantido até que se obtivesse a confluência necessária para os experimentos, não sofrendo – portanto – nenhuma passagem. Com exceção das células NOE, que foram culturas primárias, as outras linhagens eram usadas até aproximadamente 15 passagens, as quais eram realizadas semanalmente, pela utilização de tripsina 0,1% (Difco), enriquecida com EDTA 1 mmol. L⁻¹. Após a tripsinização das garrafas, adicionou-se às células um volume igual ou superior de meio KGM contendo 2% de soro bovino fetal (FCS), para neutralização da tripsina. As células eram então centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. e ressuspensas em meio KGM livre de soro. Após contagem das células, ajustava-se o volume para aproximadamente 3. 10⁵ células. mL⁻¹ com meio KGM livre de soro.

4.2.3.2. Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) nas três linhagens celulares

A determinação da DL₅₀ pela ação do TRN ou da CHX para as três linhagens celulares estudadas foi realizada segundo o método descrito por FINLAY *et al.* (1984), pelo ensaio de azul de metileno.

Previamente aos experimentos, foi feita uma curva de crescimento, para se determinar o número ideal de células a serem adicionadas em cada poço, de acordo com o protocolo experimental. Desta forma, as células NOE, MSK Leuk1 e MDA foram plaqueadas e mantidas por 24 h em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Após este período de aderência celular, diferentes concentrações de CHX ou TRN devidamente diluídos em meio KGM eram adicionadas seguindo a incubação nas mesmas condições por mais 24 h, conforme mostrado na Figura 7:

Figura 7: Representação esquemática detalhada da montagem das placas de 96 poços para ensaios de determinação da DL₅₀.



Após a incubação por 24h das células com os compostos em estudo, o sobrenadante das culturas foi aspirado, cada poço foi lavado por três vezes com PBS e então as células foram fixadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, pela adição de 100 μ L da solução de azul de metileno, preparada da seguinte forma: 0,4 g de azul de metileno foram dissolvidas em 30 mL de etanol absoluto e posteriormente foram adicionadas a esta solução, 70 mL de água deionizada. Após a fixação, as placas foram então lavadas por imersão em água, até que não fosse mais observada a presença de corante na água descartada. Em seguida, as placas foram mantidas invertidas sobre papel absorvente “*overnight*”, para secagem natural. Após esse período, o material corado e seco foi então solubilizado com 100 μ L de solvente (100 mL de metanol, 1 mL de ácido acético glacial e 99 mL de água deionizada) e sua absorbância em 650 nm foi imediatamente determinada. Os resultados apresentados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Após coleta de absorbâncias, os resultados foram representados como porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle, e estes dados foram então analisados através do programa Prism 2.01 (GraphPad), o qual determina a DL_{50} de cada composto estudado e estabelece o gráfico com a curva de tendência para os valores obtidos.

4.2.3.3. Microscopia de fluorescência

Para a análise por microscopia de fluorescência, as células NOE, MSK Leuk1 e MDA foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.3.1. em lamínulas de vidro. Quando cerca de 70% de confluência foi alcançada, as células foram incubadas com os compostos em estudo por 24 h e então coradas para microscopia de fluorescência.

Foram avaliados mitocôndrias e núcleo. O efeito da CHX e do TRN sobre mitocôndrias *in situ* foi avaliado utilizando-se a Rodamina 123 (Sigma), segundo método descrito por KHODJAKOV *et al.* (2004), com pequenas modificações. Brevemente, após a incubação com os compostos em estudo, as

lamínulas de vidro com as células aderidas foram incubadas com meio KGM suplementado com Rodamina 123, de modo a se obter uma concentração final de 10 µg Rodamina/ mL do meio (solução estoque de Rodamina a 1 mg/ mL água deionizada). Após incubação por 15 min. a 37°C, no escuro, as lamínulas foram então lavadas com 10 mL de meio KGM livre de Rodamina 123.

Para a avaliação do efeito dos compostos sobre o núcleo celular, utilizou-se o corante fluorescente Hoechst 33342 (Sigma), segundo método descrito por DEJEAN *et al.* (2005), com pequenas modificações. Brevemente, após lavagem das células previamente coradas com Rodamina 123, as lamínulas contendo as células foram incubadas com meio KGM suplementado com Hoechst, na concentração final de 2,5 µg Hoechst/ mL do meio (solução estoque de Hoechst a 1 mg/ mL bis-benzimida). Após incubação por 10 min. em temperatura ambiente, a preparação foi então lavada com 10 mL de meio KGM livre de Hoechst.

Após a etapa de coloração, as lamínulas foram então montadas invertidas em lâminas de vidro, permanecendo excesso de meio KGM entre elas, para assegurar a viabilidade celular durante os ensaios. As imagens de fluorescência foram obtidas através de microscópio Nikon Eclipse TE300 equipado com epifluorescência e "shutters" Uniblitz.

4.2.3.4. Microscopia de lapso de tempo

Para as análises de microscopia de lapso de tempo, as células foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.3.1. e colocadas a crescer em lamínulas de vidro. No momento do ensaio, estas foram então montadas em câmaras seladas tipo Rose com meio KGM em presença de TRN 25 µmol. L⁻¹, CHX 10 µmol. L⁻¹ ou ausência de drogas (controles) e mantidas a 37°C, segundo o método descrito por KHODJAKOV *et al.* (2004). As células foram monitoradas durante 24 h e as imagens foram capturadas a cada 5 min. através de lentes 20x PlanApo com uma câmera Spot RT Monochrome (Diagnostic Instruments Inc. Sterlin Heights MI) ou câmera COHU CCD, acopladas a um microscópio de contraste de fase Nikon Eclipse TE300 ou TMS. O controle do "shutter" Uniblitz (modelo VMMD1) era feito pelo software

Spot RT ou Scion Imaging, os quais – após captura das imagens – também faziam a sua montagem em seqüência.

4.2.4. Métodos para ensaios de interação com materiais restauradores odontológicos

4.2.4.1. Ensaios de interação com amálgama dental

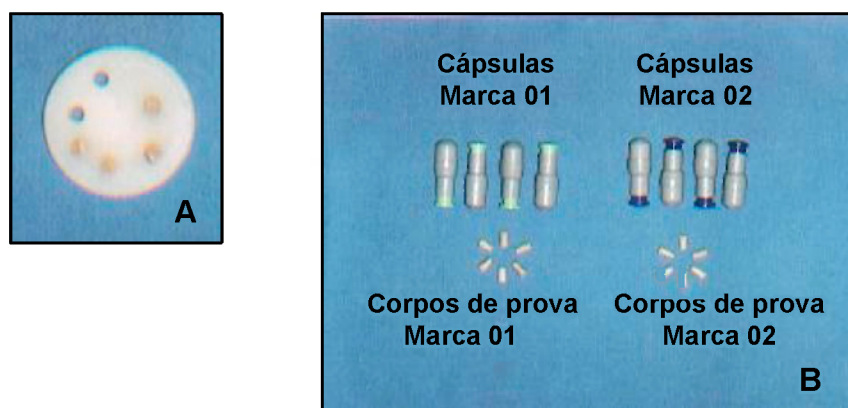
4.2.4.1.1. Confeção dos corpos de prova de amálgama dental

Os corpos de prova de amálgama foram confeccionados a partir de duas marcas comerciais de amálgama de prata: GS-80 e Permite C, designadas de Marca 01 e Marca 02, respectivamente. De acordo com as especificações do fabricante, a liga da Marca 01 era constituída de: prata 40%; estanho 31,1% e cobre 28,7% e a da Marca 02, de prata 56%; estanho 27,9%; cobre 15,4%; índio 0,5% e zinco 0,2%.

Foram confeccionados 12 corpos de prova para cada marca deste material restaurador, totalizando 24 corpos de prova. Cada cápsula foi misturada, automaticamente, em amalgamador dental Dabi Atlante. O tempo de trituração do material e a sua manipulação seguiram as especificações do fabricante. A liga recém-misturada foi condensada em moldes cilíndricos de teflon com cavidades idênticas de 4 x 8 mm, de acordo com as normas especificadas pela ADA, utilizando-se, para isso, condensadores manuais convencionais. O excesso de Hg que eventualmente surgiu nos corpos de prova ao final da condensação foi criteriosamente removido com papel absorvente.

Os espécimes foram mantidos nos moldes para presa inicial por 60 minutos e então removidos e mantidos em recipiente fechado para evitar excessiva oxidação do material. Segundo o método descrito por ROTSTEIN *et al.* (2000), estes corpos de prova foram mantidos sem nenhum tipo de polimento. A Figura 8 mostra o molde utilizado e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais.

Figura 8: Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de amálgama dental e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais



A: Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de amálgama dental. **B:** Cápsulas de amálgama das marcas 01 e 02 utilizadas e seus respectivos corpos de prova.

4.2.4.1.2. Liberação de mercúrio (Hg) de corpos de prova de amálgama dental pela ação do triclosan

O ensaio de liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama foi realizado conforme o método descrito por ROTSTEIN *et al.* (2000) e por NEWTON (2002). Os 24 corpos de prova previamente preparados foram divididos randomicamente em dois grupos – controle (06) e teste (06), para cada marca comercial. Cada corpo de prova foi colocado individualmente em um tubo de ensaio contendo 5 mL de tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹, pH 6,5 (controles) ou 5 mL do mesmo tampão contendo TRN 0,3% (testes). Estes sistemas foram incubados por 24 horas a 37°C, após o que a solução de incubação foi utilizada para a dosagem de Hg. Esta dosagem de Hg liberado foi feita conforme o método descrito por HATCH & OTT (1968), por espectrometria de absorção atômica (Atomic Absorption Spectrometer, PERKIN ELMER 4100) e foi realizada no Lactec-UFPR/Copel.

4.2.1.3. Espectro de absorção da clorexidine na presença de íons Hg^{2+}

Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro HITACHI modelo U-2001 UV/VIS. Os espectros de absorção da CHX (em diferentes concentrações) foram realizados entre 200 e 600 nm, utilizando-se cubeta de quartzo. Foram utilizados dois sistemas de reação diferentes: tampão fosfato 0,1 mol. L^{-1} , pH 6,5, ou tampão Tris-HCl 0,1 mol. L^{-1} , pH 7,4. A habilidade da CHX em interagir com íons Hg foi avaliada através de variações espectrais causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de HgCl_2 , de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre CHX e Hg^{2+} .

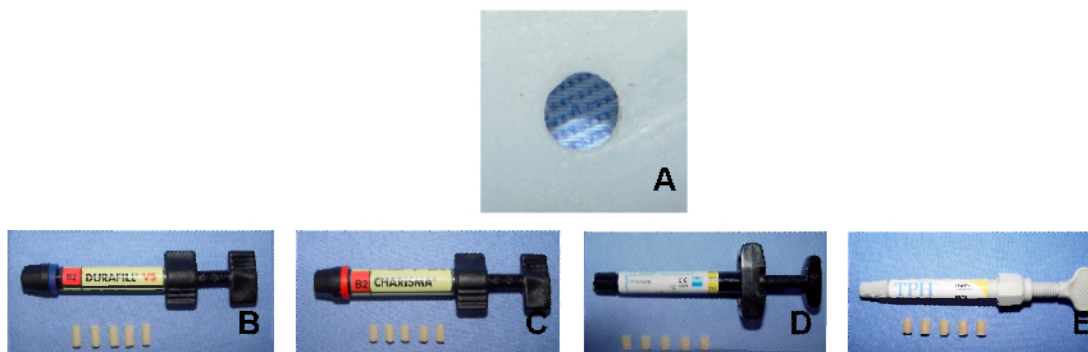
4.2.4.2. Ensaio de interação com resinas compostas

4.2.4.2.1. Confeção dos corpos de prova de resina composta

Os corpos de prova de resina composta foram confeccionados a partir de quatro marcas comerciais: Durafill, Charisma, TPH e Z100.

Foram confeccionados 18 corpos de prova para cada marca deste material restaurador, totalizando 72 corpos de prova. Cada corpo de prova foi confeccionado em moldes cilíndricos de teflon com cavidades idênticas de 4 x 8 mm, de acordo com as normas especificadas pela ADA, utilizando-se, para isso, a técnica de fotopolimerização incremental (Fotopolimerizador Gnatus). Assim, cada incremento de resina composta foi fotopolimerizado durante 40 seg., com fotopolimerização final adicional. Logo após a completa fotopolimerização, os corpos de prova foram removidos dos moldes e mantidos em recipientes fechados e separados de acordo com cada marca comercial. A Figura 9 mostra o molde utilizado e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais.

Figura 9: Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de resina composta e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais



A: Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova de resina composta. Seringas de resina composta das diferentes marcas comerciais analisadas: Durafill (**B**), Charisma (**C**), Z100 (**D**) e TPH (**E**) e seus respectivos corpos de prova.

4.2.4.2.2. Liberação de monômeros de corpos de prova de resina composta pela ação do triclosan e da clorexidine, avaliada por HPLC

Os 72 corpos de prova previamente preparados foram divididos randomicamente em três grupos – controle (06), CHX (06) e TRN (06), para cada uma das quatro marcas comerciais. Cada corpo de prova foi colocado individualmente em um tubo de ensaio contendo 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹, pH 7,4 (controles) ou 1 mL da mesma solução contendo TRN 0,3% ou CHX (0,12%) (testes). Estes sistemas foram incubados por 24 horas a 37°C, após o que a solução de incubação foi utilizada para avaliação de liberação de monômeros. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e mantido em tubos de ensaio de vidro, para posterior análise. Os corpos de prova de resina composta foram secos com papel absorvente e guardados em local seco, sob proteção da luz.

Sob as mesmas condições de ensaio, também foram incubados corpos de prova de resina composta não polimerizada (200 mg de compósito), a fim de avaliar diferenças quali e quantitativas de produtos liberados em relação a resinas polimerizadas e não polimerizadas.

A avaliação da eventual liberação de monômeros por ação dos compostos em estudo sobre as resinas foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O sistema de HPLC utilizado (SHIMADZU, Tóquio, Japão) constituía-se por duas bombas LC-10AD, detector de absorvância UV SPD-10AD, controlador de sistema CBM-10AD, forno CTO-10AD e software LC-10AD.

As análises foram desenvolvidas de acordo com o método de PULGAR *et al.* (2000), com pequenas modificações. Brevemente, foi utilizada uma coluna C-18 (*Metachem* 250 x 4,6 mm, 10 μ m dp), em equipamento acoplado a detector UV, selecionando-se o λ em 205 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C e o volume de injeção foi de 10 μ L. Para a separação dos produtos, foi utilizado fluxo de 1 mL. min⁻¹, com gradiente linear de acetonitrila (ACN) em água, partindo-se de 50% ACN em tempo zero, alcançando 100% da ACN em 15 min. e voltando à relação inicial em 17 min. O tempo total do cromatograma foi de 20 min.

Após avaliação inicial dos cromatogramas obtidos a partir de cada resina composta, a solução sobrenadante foi concentrada em rota-evaporador e as soluções concentradas foram re-injetadas em HPLC, a fim de se realizar a coleta dos picos previamente selecionados, para posteriores análises. Estas re-injeções utilizaram condições semelhantes às dos cromatogramas iniciais quanto à coluna, temperatura, fluxo e gradiente de fase móvel; porém, o volume de injeção foi maior (50 μ L), considerando-se o objetivo de coleta de material.

4.2.4.2.3. Espectrometria de massas (ESI-MS) correspondente aos produtos liberados na incubação de resinas compostas com triclosan ou clorexidina

As frações coletadas e contendo os produtos detectados no HPLC foram analisadas no espectrômetro de massas (MS) no modo de ESI⁺. O sistema de MS era composto por: espectrômetro de massas Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido), software Masslynx versão 3.2, injetor *Rheodyne* (Califórnia, Estados Unidos).

As análises no espectrômetro de massas no modo ESI⁺ foram realizadas com as seguintes especificações: fase móvel constituída de 50 % ACN em solução aquosa 0,1 % de ácido fórmico com fluxo de 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, temperatura da fonte de 100°C, potencial do cone em 24, 44 e 64 V e foram adquiridos espectros no MS1 na faixa de 80 a 500 m/z . Para detecção em *tandem* (MS/MS) na função de íons filhos ou íons pais, o potencial do cone foi fixado em 24 V, sendo que no primeiro analisador (MS1) foi selecionado o íon de interesse ($m/z = 112$ ou 219), na câmara de colisão a energia foi acertada para 30 eV e a pressão de argônio em $1,3 \cdot 10^{-3}$ mBar, e os espectros foram adquiridos no segundo analisador (MS2) na faixa de 50 a 500 m/z .

4.2.5. Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm desvio padrão ($md \pm dp$) e submetidos à análise de variâncias (ANOVA) e teste de Tuckey. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

Para os ensaios de cultivo celular, foi utilizado o programa *GraphPad*, para a determinação do valor de DL_{50} para cada um dos compostos estudados, em cada uma das linhagens celulares analisadas.

Os resultados obtidos pelas análises de ESI-MS não sofreram tratamento estatístico, sendo expressos como espectros de massa representativos. Nas análises de HPLC, foi realizada a integração dos picos obtidos nos cromatogramas, que foram expressos como $md \pm dp$ e submetidos à análise de variâncias (ANOVA) e teste de Tuckey. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

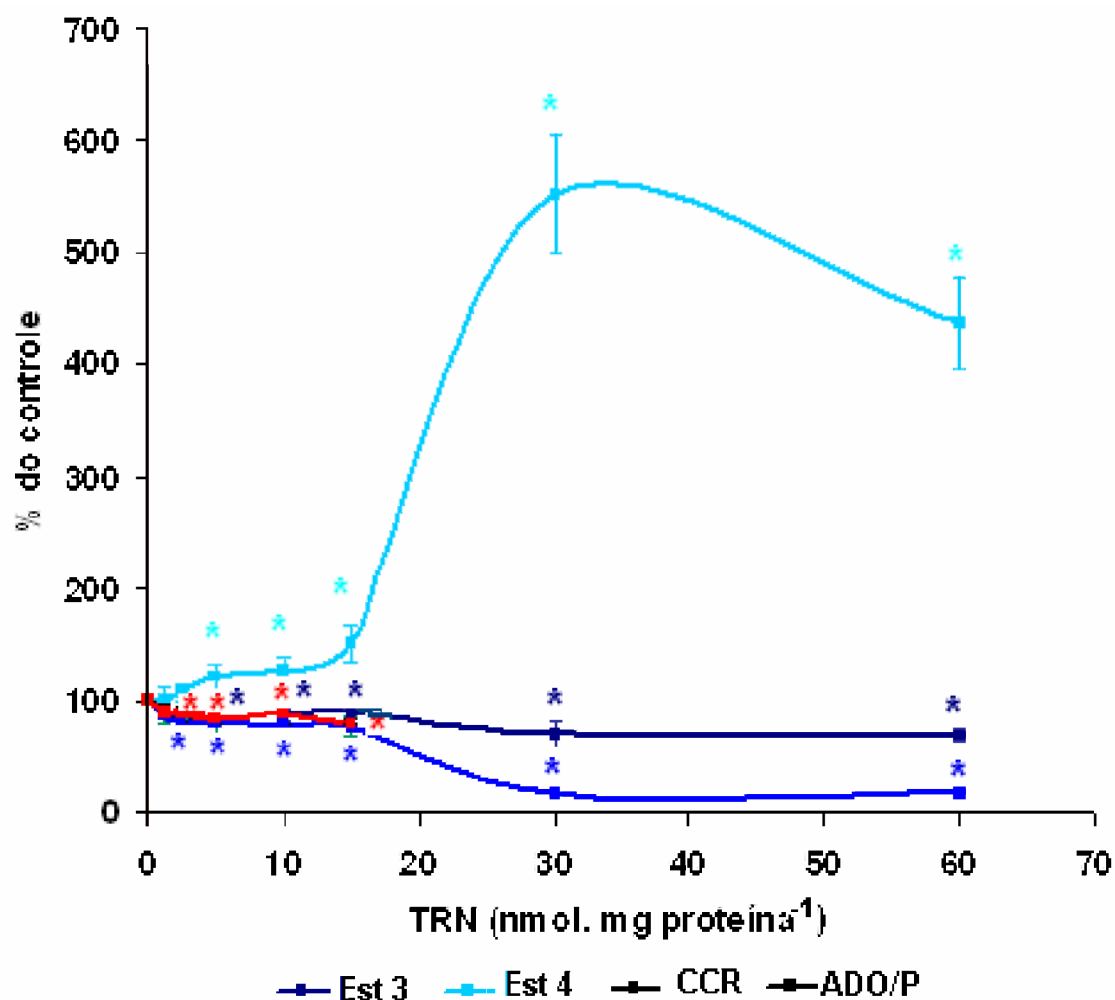
Apesar da vasta literatura existente a respeito do agente antibacteriano TRN, inclusive mostrando que ele é capaz de interferir com o transporte de membranas (van der HOEVEN *et al.*, 1993), não foi encontrado na literatura nenhum trabalho mostrando seu efeito específico sobre o metabolismo energético mitocondrial. Portanto, este trabalho foi inicialmente avaliar o efeito do TRN sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias energizadas com glutamato ou succinato.

5.1. Efeito do triclosan sobre o consumo de oxigênio, em presença de glutamato

Os resultados mostrados na Figura 10 revelam um efeito bastante pronunciado do TRN sobre mitocôndrias energizadas pela oxidação do glutamato. Observa-se que em presença de TRN, ocorre uma significativa ($p < 0,05$) diminuição da velocidade do consumo de O_2 em presença de ADP, ou seja, durante o estado 3 da respiração em todas as concentrações utilizadas. Tal inibição chegou a 31% na maior concentração testada (60 nmol TRN. mg^{-1} proteína) em relação ao controle (100%). Concomitantemente, o TRN causa o aumento da velocidade do consumo de O_2 durante o estado 4 da respiração, o qual representa a quantidade de oxigênio consumido na ausência de ADP (após o término do estado 3). Tal estímulo é significativo ($p < 0,05$) a partir da concentração de 5 nmol TRN. mg^{-1} proteína, chegando ao estímulo máximo (452%) com a utilização de 30 nmol TRN. mg^{-1} proteína. Acima desta concentração, inicia-se uma discreta inibição estado 4, efeito característico de alguns agentes desacopladores.

Outros parâmetros avaliados, mostrados na Figura 10, foram o coeficiente de controle respiratório (CCR), o qual representa a relação entre as velocidades do estado 3 e 4 da respiração, e a razão ADP/O. O CCR sofreu significativa diminuição ($p < 0,05$) a partir da dose de 2,5 nmol TRN. mg^{-1} proteína, chegando a um valor máximo de aproximadamente 84% em relação ao controle com a dose de 30 nmol TRN. mg^{-1} proteína. A razão ADP/O, por sua vez, foi significativamente ($p < 0,05$) inibida em todas as doses utilizadas, nas condições experimentais utilizadas, sendo estabelecida até a concentração de 15 nmol TRN. mg^{-1} de proteína. Acima desta concentração, tal parâmetro não pôde mais ser estabelecido, devido ao grande estímulo do estado 4.

Figura 10: Efeito do triclosan sobre mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato



Sistema: D-manitol 125 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol. L⁻¹, EGTA 0,1 mmol. L⁻¹, BSA 0,1g%, suplementado com glutamato 5 mmol. L⁻¹, Pi 1,6 mmol. L⁻¹, ADP 0,16 mmol. L⁻¹ e 2 mg. mL⁻¹ de proteína mitocondrial. 100% do estado 3 e do estado 4 correspondem, respectivamente, a 44,09 ± 3,03 e 8,19 ± 1,42 nmol de O₂ consumidos. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína mitocondrial. 100% do CCR corresponde a 5,38 ± 0,92 e 100% da razão ADP/O, a 2,48 ± 0,23. Cada valor representa md ± dp de 5 experimentos independentes. * Valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

5.2. Efeito do triclosan sobre o consumo de oxigênio, em presença de succinato

Os efeitos do TRN sobre mitocôndrias oxidando succinato podem ser observados na Figura 11. Verificam-se resultados semelhantes àqueles obtidos com mitocôndrias energizadas com glutamato, porém de diferente magnitude. Pode-se notar uma significativa ($p < 0,05$) inibição do estado 3 da respiração em todas as concentrações analisadas, chegando à inibição máxima de 80,5%, na concentração de 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína. Outros parâmetros, como CCR (76,4% de inibição na concentração de 10 nmol TRN. mg^{-1} proteína) e razão ADP/O (31,3% de inibição na concentração de 10 nmol TRN. mg^{-1} proteína) também mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em todas as concentrações analisadas. Concomitantemente, houve um significativo ($p < 0,05$) estímulo do estado 4 da respiração, a partir da dose de 2,5 nmol TRN. mg^{-1} proteína, o qual chegou ao máximo (210%) já na concentração de 10 nmol TRN. mg^{-1} proteína. Assim como em presença de glutamato, a partir do estímulo máximo do estado 4, houve também uma inibição deste parâmetro, atingindo níveis comparáveis ao controle na dose máxima utilizada (60 nmol TRN. mg^{-1} proteína). Porém, esta inibição foi mais pronunciada do que em presença de glutamato, uma vez que já foi observada a partir da concentração de 15 nmol TRN. mg^{-1} proteína.

Os resultados obtidos, representados nas Figuras 10 e 11, indicam que o TRN afeta o transporte de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória e a síntese de ATP, quando da utilização de ambos os substratos. Contudo, o estímulo do estado 4 da respiração e as inibições observadas no estado 3 da respiração e no CCR foram maiores quando o glutamato foi utilizado como substrato.

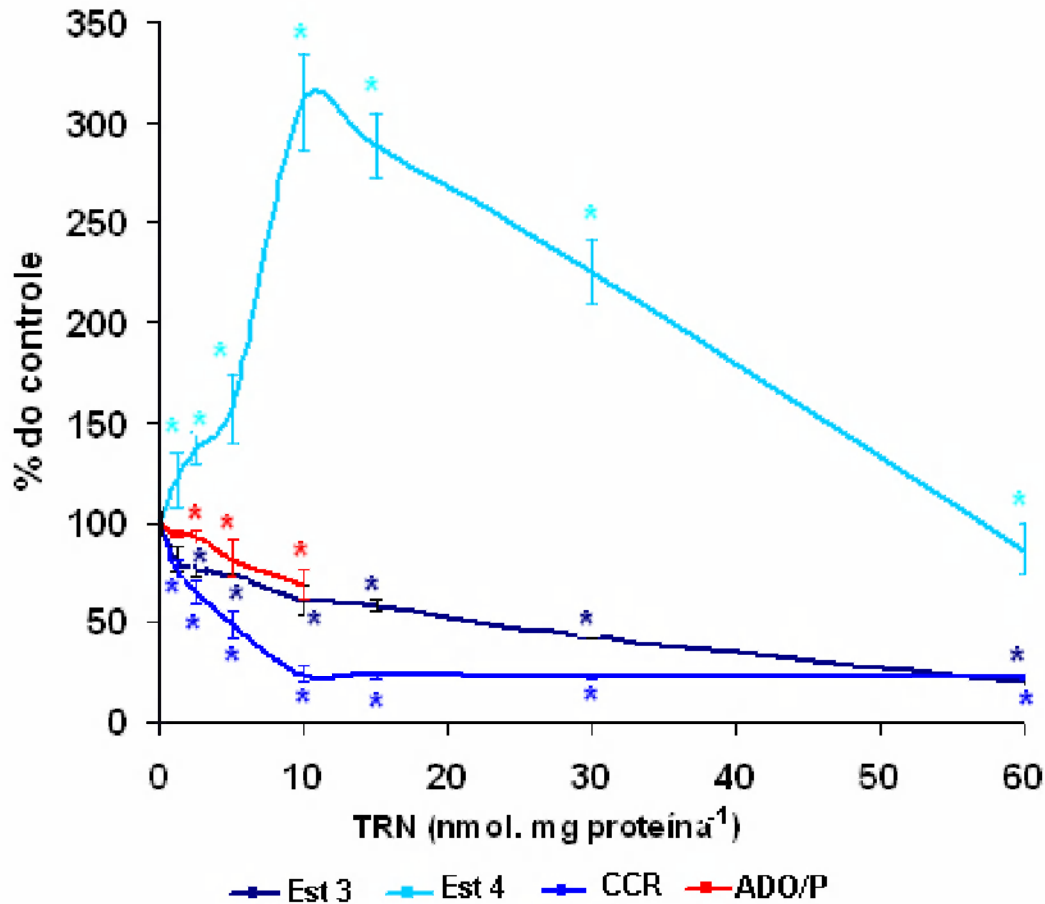
A partir destes dados, foram levantadas algumas hipóteses sobre a maneira pela qual o TRN estaria exercendo os efeitos inibitórios sobre o estado 3. Dentre as principais, pode-se destacar:

- a) Inibição da atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e conseqüentemente restrição parcial no fluxo de elétrons na mesma;

- b) Restrição parcial no fornecimento de elétrons à cadeia respiratória por afetar a metabolização do substrato em etapa anterior à cadeia;
- c) Inibição da atividade da F_1F_0 ATP sintase;
- d) Inibição do translocador ADP^{3-}/ATP^{4-} ;
- e) Alteração da fluidez da membrana interna, a qual afetaria não apenas o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, mas também a translocação de íons e síntese acoplada de ATP;
- f) Desvio de elétrons da cadeia respiratória de forma direta, através de reações de óxido-redução;
- g) Inibição do transporte de substrato (translocadores ou transportadores).

Alternativamente, o estímulo do estado 4 observado é uma característica de efeito desacoplador. Portanto, a fim de avaliar melhor as hipóteses acima citadas, foi primeiramente avaliado o efeito do TRN sobre os complexos enzimáticos relacionados à cadeia respiratória.

Figura 11: Efeito do triclosan sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato



Sistema: D-manitol 125 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol. L⁻¹, EGTA 0,1 mmol. L⁻¹, BSA 0,1g%, suplementado com succinato 2 mmol. L⁻¹, rotenona 5 μmol. L⁻¹, Pi 1 mmol. L⁻¹, ADP 0,08 mmol. L⁻¹ e 0,5 mg. mL⁻¹ de proteína mitocondrial. 100% do estado 3 e do estado 4 correspondem, respectivamente, a 95 ± 8,3 e 22,23 ± 2,38 nmol de O₂ consumidos. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína mitocondrial. 100% do CCR corresponde a 4,28 ± 0,72 e 100% da razão ADP/O, a 1,66 ± 0,12. Cada valor representa md ± dp de 5 experimentos independentes. * Valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

5.3. Efeito do triclosan sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

Com a finalidade de melhor esclarecer os resultados mostrando a inibição do estado 3 (Figuras 10 - 11), foram investigados os efeitos do TRN sobre a atividade dos segmentos da cadeia respiratória, utilizando-se para tal, preparações de mitocôndrias rompidas. Foram avaliados o segmento da NADH oxidase, que compreende toda a cadeia do NADH ao oxigênio; a NADH desidrogenase, atividade enzimática que pertence ao complexo I; a NADH- citocromo *c* redutase, que abrange os complexos I e III; o segmento da succinato oxidase, que corresponde ao transporte de elétrons do complexo II ao oxigênio; a succinato desidrogenase, componente do complexo II; a succinato- citocromo *c* redutase, abrangendo os complexos II e III e a citocromo *c* oxidase, que corresponde ao complexo IV. Os resultados do efeito do TRN sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória estão representados na Tabela IV.

O segmento NADH oxidase foi inibido significativamente ($p < 0,05$) já a partir da concentração de 5 nmol TRN. mg^{-1} proteína, como observado para o estado 3 com glutamato, que também já é inibido a partir de 5nmol. mg^{-1} proteína. Nesta dose, a atividade da NADH oxidase correspondia a ~72% daquela do controle, ou seja, uma inibição de ~27%. Em 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína mitocondrial, a atividade da NADH oxidase era de ~50% daquela do controle, na ausência de TRN. De forma semelhante, o segmento succinato oxidase, em que se verifica o trajeto de elétrons do succinato até o oxigênio, foi inibido significativamente ($p < 0,05$) a partir de concentrações ainda mais baixas (2,5 nmol TRN. mg^{-1} proteína). Nesta concentração, o decréscimo de atividade foi da ordem de 14% (Tabela IV). Também foram observados efeitos inibitórios em outros segmentos da cadeia respiratória: NADH-citocromo *c* redutase, 37% de inibição na concentração de 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína, e succinato-citocromo *c* redutase, 60% de inibição na concentração de 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína. Não foram observados efeitos nas atividades das enzimas NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase, sugerindo, portanto, que o sítio de inibição do TRN situa-se entre os complexos II e III da cadeia respiratória. Estes resultados estão de acordo com o decréscimo do consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração observado nas Figuras 10 e 11. Diferenças nos valores de inibição podem significar propriedades particulares das preparações mitocondriais usadas.

Tabela IV: Efeito do triclosan nas atividades enzimáticas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial

TRN (nmols. mg prot ⁻¹)	Valores em % da atividade comparada ao controle (100%)						
	NADH oxidase	NADH desidrogenase	NADH citocromo c redutase	Succinato oxidase	Succinato desidrogenase	Succinato citocromo c redutase	Citocromo c oxidase
1,25	85,11 ± 8,43	97,7 ± 4,72	84,3 ± 6,53*	83,8 ± 12,42	95,5 ± 10,6	89,7 ± 5,34*	106,6 ± 10,6
2,5	90,25 ± 5,65	96,8 ± 6,97	85,9 ± 5,30*	77,7 ± 7,48*	107,7 ± 2,8	89,1 ± 5,98*	110,6 ± 10,5
5	72,76 ± 12,26*	97,2 ± 2,90	81,4 ± 8,52*	69,5 ± 6,44*	94,3 ± 13,8	88,5 ± 5,84*	108,4 ± 10,8
10	63,35 ± 9,90*	98,6 ± 6,42	86,4 ± 5,42*	62,9 ± 10,21*	94,8 ± 12,8	81,0 ± 6,29*	109,5 ± 7,87
15	68,45 ± 11,6*	97,8 ± 8,69	78,9 ± 3,20*	48,4 ± 8,49*	96,98 ± 13	77,4 ± 4,89*	109,4 ± 9,55
30	68,60 ± 5,05*	97,1 ± 7,88	77,6 ± 5,02*	38,9 ± 10,16*	91,32 ± 15,3	62,3 ± 4,08*	108,6 ± 8,19
60	50,77 ± 3,79*	99,6 ± 5,01	63,4 ± 2,34*	41,7 ± 8,78*	89,1 ± 8,4	40,2 ± 3,28*	111,51 ± 9,3

As condições experimentais estão descritas no item 4.2.1.5. da seção de Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: **NADH oxidase** - 122,42 ± 7,47 nmol de O₂ consumido .min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **NADH desidrogenase** - 3,11 ± 0,16 μmol de ferricianeto reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **NADH citocromo c redutase** - 321,76 ± 29,74 nmol de citocromo c reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **succinato oxidase** - 84,23 ± 7,86 de O₂ consumido. min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **succinato desidrogenase** - 183,5 ± 16,9 μmol de PMS reduzido .min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **succinato citocromo c redutase** - 178,74 ± 10 nmol citocromo c reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ proteína; **citocromo c oxidase** - 340,94 ± 30,27 nmol citocromo c oxidado. min⁻¹. mg⁻¹ proteína. Os valores representam a md ± dp de 03 experimentos independentes e estão expressos como % da atividade do controle (100%). *Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência de TRN), *p* < 0,05.

5.4. Efeito do triclosan sobre a atividade da F_1F_0 ATPase

Como descrito anteriormente, os efeitos inibitórios do TRN sobre a velocidade respiratória do estado 3 (Figuras 10 e 11) podem ser decorrentes da possível ação do agente sobre mecanismos relacionados à síntese de ATP, que poderia envolver desde a inibição direta da enzima responsável pela síntese do nucleotídeo, a ATP sintase, e/ou o translocador de nucleotídeos de adenina. Por sua vez, o efeito desacoplador do TRN sugerido pelo estímulo do estado 4 da respiração (Figuras 10 e 11) poderia ser também evidenciado pela maior atividade ATPásica do complexo F_1F_0 ATPase (ATP sintase). Desta forma, dando continuidade às investigações quanto às ações do TRN sobre as funções ligadas à energia, foram determinados os efeitos deste agente sobre o complexo F_1F_0 ATPase (ATP sintase). Para isso, preparações de mitocôndrias intactas, rompidas e desacopladas com FCCP foram utilizadas. O componente F_0 deste complexo enzimático encontra-se inserido na MMI, através de polipeptídeos hidrofóbicos presentes em sua estrutura, captando prótons do espaço intermembranoso e liberando na matriz mitocondrial, enquanto o componente solúvel F_1 é responsável pela síntese de ATP, na ocasião do transporte de elétrons e passagem de prótons pela porção F_0 ou pela hidrólise do ATP, quando há a presença do nucleotídeo e ausência de substratos para a cadeia respiratória (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). A interação entre F_1 e F_0 é mantida por outros dois componentes, F_6 e OSCP, sendo esta última sensível à oligomicina. Essas proteínas associam-se aos componentes F_1 e F_0 do complexo enzimático, auxiliando a regular a permeabilidade da MMI a prótons e garantindo a eficiência da fosforilação oxidativa (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

De acordo com a teoria quimiosmótica de MITCHELL (1961), o transporte de elétrons pela cadeia respiratória gera um gradiente eletroquímico de prótons no espaço entre as membranas interna e externa, com a conseqüente formação de uma força próton motriz (Δp) e a utilização deste gradiente pela ATP sintase está acoplada à síntese de ATP.

De modo geral, agentes químicos que impedem seletivamente a utilização da energia química derivada do transporte de elétrons para a fosforilação do ADP em ATP são considerados desacopladores.

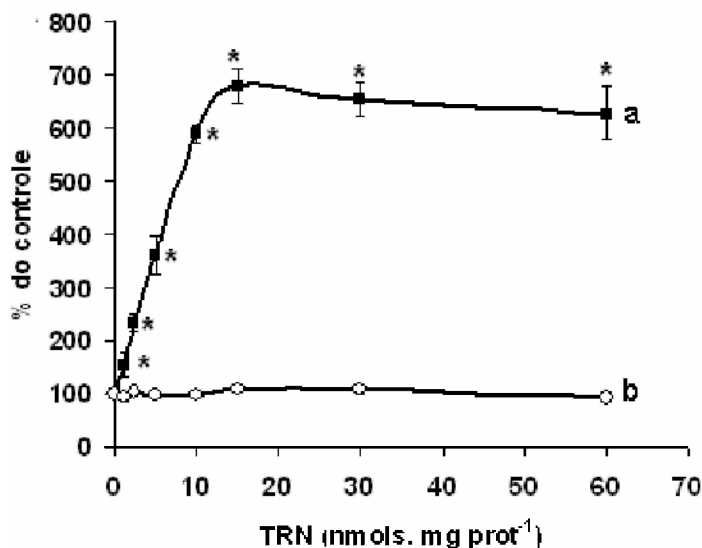
Este aspecto distingue os desacopladores dos inibidores da fosforilação oxidativa, como - por exemplo - a oligomicina, que se liga ao componente OSCP do complexo F_1F_0 ATPase, ou o atracilato, que inibe o translocador ADP/ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Desta forma, agentes desacopladores, translocadores de prótons ou protonóforos aumentam a condutância de prótons através da membrana, desfazem o gradiente eletroquímico e dissipam a força próton motriz, bloqueando a síntese de ATP em virtude do desacoplamento entre o sistema gerador de ΔH^+ (força próton motriz) e a $H^+ - ATP$ (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Como resultado, ocorre menor fosforilação do ADP em ATP, que corresponde a um decréscimo no número de mol de fosfato inorgânico convertido para a forma ligada organicamente por átomo de oxigênio consumido, isto é, a razão P/O tende a zero na presença de substrato, enquanto a respiração continua. Esse aumento na entrada de prótons na matriz mitocondrial faz com que o componente F_1 do complexo enzimático passe a hidrolisar o ATP, ao mesmo tempo que ocorre extrusão de prótons através do componente F_0 . Sendo assim, em mitocôndrias acopladas a atividade da F_1F_0 ATPase é baixa e aumenta quando da presença de desacopladores clássicos (HEYTLER, 1997).

Este complexo enzimático foi avaliado em três condições experimentais: a) em mitocôndrias rompidas por congelamento, uma condição em que podese avaliar um efeito mais direto dos compostos sobre a atividade da enzima, uma vez que a membrana rompida facilita o acesso das drogas; b) em mitocôndrias intactas, em que se pode visualizar a ação de um composto como um desacoplador, isto é, a sua interferência na permeabilidade da membrana a H^+ ; e c) em mitocôndrias intactas tratadas com o desacoplador clássico FCCP, que permite uma visualização dos efeitos somatórios aos desse desacoplador.

Os resultados destes experimentos estão apresentados nas Figuras 12 e 13, as quais mostram que o TRN promove um forte estímulo da atividade hidrolítica da ATPase em mitocôndrias intactas (Figura 12) compatível ao estímulo observado para o estado 4 e como seria esperado para um agente desacoplador. Tal efeito foi dose-dependente, chegando a um estímulo de ~630% na dose máxima avaliada (60 nmol TRN. mg^{-1} proteína). O efeito do TRN também foi avaliado em mitocôndrias desacopladas por FCCP, pois é amplamente conhecido que o excesso ou a combinação simultânea de agentes desacopladores pode resultar em velocidades sub-máximas de alguns parâmetros

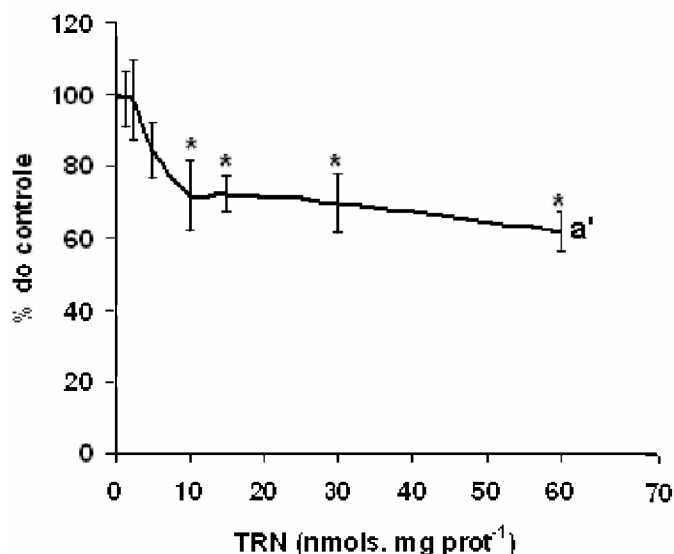
mitocondriais, como a velocidade da hidrólise de ATP (KRAAYENHOLF & VAN DAM, 1969) e/ou do consumo de oxigênio. Nesta condição experimental, não foi observado nenhum efeito sobre a atividade ATPásica (Figura 12), sugerindo que o TRN não exerce efeitos aditivos ao do FCCP e vinculados ao excesso de desacopladores no sistema de reação. Quando foi avaliado o efeito do TRN sobre a ATPase, em mitocôndrias rompidas, este agente causou uma significativa ($p < 0,05$) inibição da atividade desta enzima (Figura 13), em concentrações a partir de 10 nmol. mg^{-1} proteína, demonstrando uma ação direta sobre a enzima. Apesar de o TRN causar significativo estímulo da atividade da ATPase em mitocôndrias intactas (alcançando ~630% de estímulo), ele também é capaz de causar significativa inibição desta enzima em mitocôndrias rompidas. Tais resultados sugerem que o efeito desacoplador do TRN, apesar de muito intenso, pode ainda estar subestimado, visto que em concentrações maiores que 10 nmol. mg^{-1} proteína, este agente também causa efeito inibitório direto sobre a enzima.

Figura 12: Efeito do triclosan sobre a atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas



Condições experimentais conforme descrito em materiais e métodos (itens 4.2.1.5.9. e 4.2.1.5.10.). Valores dos controles (100%) foram: **mitocôndrias intactas (a)**: 673 ± 86 nmol Pi. mg^{-1} proteína. min^{-1} e **mitocôndrias intactas na presença de FCCP (b)**: $4,35 \pm 0,13$ μmol Pi. mg^{-1} proteína. min^{-1} . Resultados (md \pm dp de 03 experimentos independentes) estão expressos como % da atividade do controle (100%). * Significativamente diferente dos controles (100%), $p < 0.05$.

Figura 13: Efeito do triclosan sobre a atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias rompidas



Condições experimentais conforme descrito em materiais e métodos (itens 4.2.1.5.9. e 4.2.1.5.10.). Valores dos controles (100%) foram: (a'): $3,15 \pm 0,53$ μmol Pi. mg proteína⁻¹. min^{-1} ; Resultados (md \pm dp de 03 experimentos independentes) estão expressos como % da atividade do controle (100%). * Significativamente diferente dos controles (100%), $p < 0.05$.

5.5. Efeito do triclosan sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).

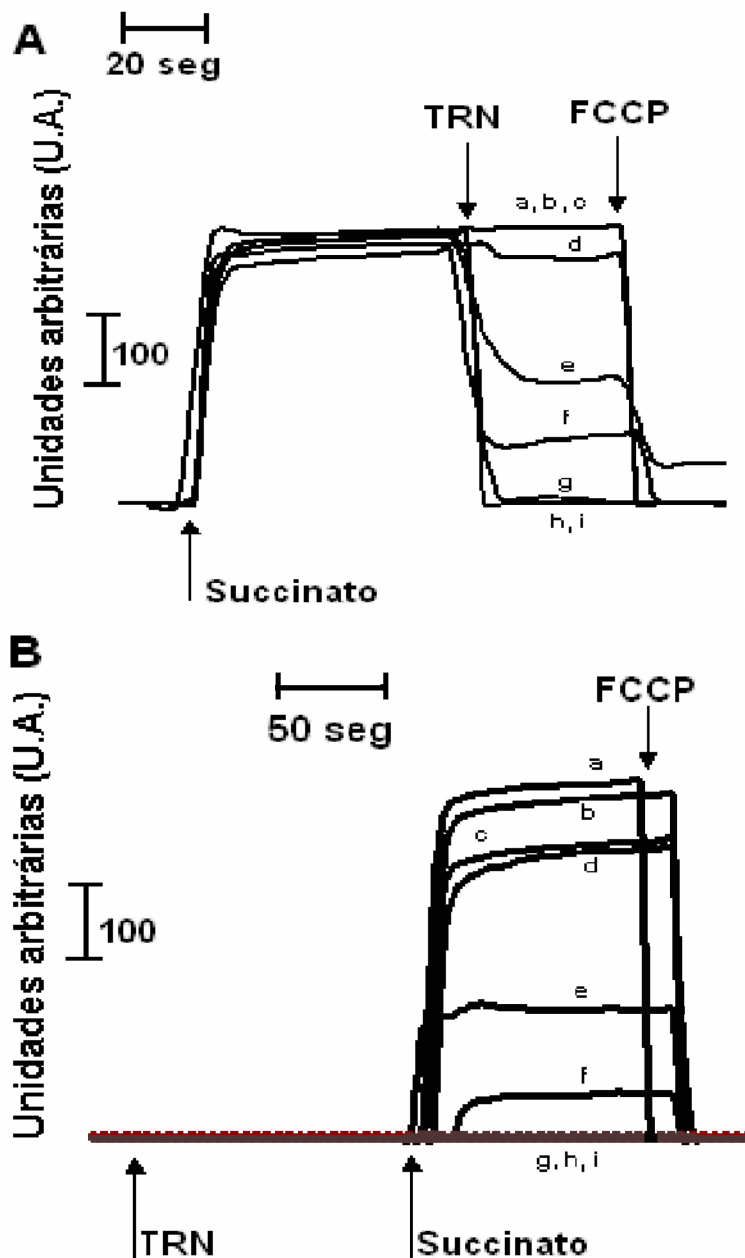
Considerando os resultados anteriormente apresentados, mostrando que o TRN inibe o transporte de elétrons e também apresenta efeito desacoplador, uma avaliação do efeito deste composto sobre o desenvolvimento do potencial da MMI ($\Delta\psi$) se fez necessária. A força próton motriz (Δp), responsável pela síntese de ATP, é constituída pelo ΔpH , resultante da diferença na concentração de prótons e pelo $\Delta\psi$ dado pela diferença de cargas entre o espaço intermembranas e a matriz, que são separadas pela MMI (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). O $\Delta\psi$ mitocondrial é reduzido quando o metabolismo energético é rompido de forma induzida ou durante processos relacionados à morte celular (FULLER & ARRIAGA, 2003).

Neste trabalho o efeito do TRN sobre o $\Delta\psi$ em mitocôndrias isoladas de fígado de rato foi avaliado por espectrofluorimetria, utilizando como sonda a safranina O. Este cátion lipofílico foi escolhido por representar uma abordagem mais dinâmica e quantitativa, além de permitir medidas do $\Delta\psi$ por períodos relativamente longos (FELDKAMP *et al.*, 2005).

A Figura 14 mostra o efeito do TRN sobre o $\Delta\psi$ em preparações mitocondriais oxidando succinato. Quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato, a adição de TRN causou colapso do $\Delta\psi$ de forma dose- dependente, a partir de 5 nmol TRN. mg⁻¹ proteína (Figura 14A, traçados d - f). Concentrações superiores deste agente (15 - 60 nmol. mg⁻¹ proteína) causaram colapso total do $\Delta\psi$ (Figura 14A, traçados g- i).

A Figura 14B apresenta experimentos representativos da pré-incubação de baixas doses de TRN (1,25 - 10 nmol. mg⁻¹ proteína, Figura 14B, traçados b - f) com a preparação mitocondrial. Verifica-se que o TRN interferiu na formação do $\Delta\psi$, sendo que em doses mais elevadas (15 - 60 nmol TRN. mg⁻¹ proteína), ele impediu completamente a formação do potencial (Figura 14B, traçados g - i).

Figura 14: Efeito do triclosan sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias de fígado de rato



Sistema: sacarose 250 mmol. L⁻¹, MOPS 20 mmol. L⁻¹, pH 7,2, suplementada com safranina O 5 μmol. L⁻¹, succinato 3 mmol. L⁻¹, NaH₂PO₄ 2 mmol. L⁻¹, rotenona 1 μmol. L⁻¹ e suspensão mitocondrial 0,5 mg. mL⁻¹, em volume final de 2 mL, a 28°C. Concentrações crescentes de TRN (nmol. mg⁻¹ proteína) foram adicionadas: 1,25 (traçados b); 2,5 (traçados c); 5 (traçados d); 7,5 (traçados e); 10 (traçados f); 15 (traçados g); 30 (traçados h); 60 (traçados i), ou nenhuma adição foi feita (traçados a). Os dados são representativos de 04 experimentos independentes. **A**: Efeitos do TRN observados imediatamente após sua adição. **B**: Resultados do efeito da pré-incubação (2 min.) do TRN com a suspensão mitocondrial.

O colapso do A_y pode decorrer tanto da restrição no fluxo de elétrons, quanto de um efeito desacoplador (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). De fato, o efeito observado sobre o potencial de membrana (A_y) pode ser devido à inibição causada pelo TRN nas enzimas da cadeia transportadora de elétrons, principalmente sobre o segmento entre o complexo II e III, o qual utiliza o succinato como substrato. Realmente este efeito está de acordo com a forte inibição observada na succinato oxidase (~60% na concentração de 60 nmol TRN. mg^{-1} proteína) (Tabela IV). Contudo, considerando o estímulo causado por este agente na atividade ATPásica em mitocôndrias isoladas e intactas (Figura 13), bem como o estímulo do consumo de oxigênio durante o estado IV, o efeito desacoplador também contribui para o decréscimo no potencial observado e, portanto, o resultado pode ser consequência da somatória dos dois efeitos.

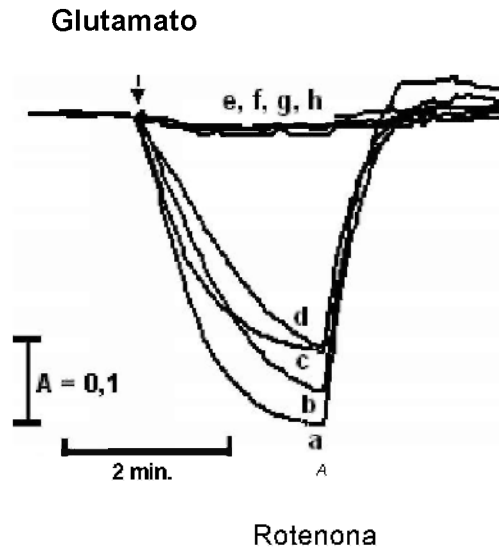
5.6. Efeito do triclosan sobre o inchamento mitocondrial (*swelling*)

Suspensões mitocondriais são turvas e dispersam a luz incidente. A luz dispersa é função da diferença no índice de refração entre a matriz e o meio, e qualquer processo que cause decréscimo desta diferença resultará em decréscimo na dispersão de luz. O aumento do volume da matriz mitocondrial pelo influxo de solutos permeáveis resulta em decréscimo na dispersão de luz, com o índice de refração da matriz aproximando-se ao do meio (NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

As ações do TRN sobre as funções mitocondriais ligadas à energia motivaram a investigação dos efeitos deste agente sobre as alterações osmóticas do volume mitocondrial, com a finalidade de obter informações adicionais quanto ao seu efeito. A Figura 15 mostra os efeitos do TRN (1,25 - 60 nmol. mg^{-1} proteína) sobre o inchamento mitocondrial. Os experimentos foram realizados em presença de acetato de sódio e de glutamato de sódio, como substrato oxidável. O traçado a desta figura representa a condição controle, onde a adição de glutamato causou acentuado inchamento mitocondrial, observado pela diminuição da absorbância. A posterior adição de rotenona causou contração das organelas, confirmando o conceito de que o inchamento é dependente da transferência de elétrons via NADH desidrogenase. Os traçados b - d da Figura 15 mostram que concentrações crescentes de TRN (1,25 - 5 nmol. mg^{-1} proteína) causaram um decréscimo dose-dependente no *swelling*. Doses mais elevadas deste agente (10 - 60 nmol. mg^{-1} proteína, Figura 15, traçados e - h) inibiram completamente o

swelling energizado, sob as condições experimentais utilizadas. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos com o potencial elétrico de membrana mitocondrial, os quais mostraram que o TRN inibe completamente o Δy , em concentrações acima de 15 nmols. mg^{-1} proteína, confirmando que o *swelling* é dependente do Δy .

Figura 15: Efeito do triclosan sobre a amplitude e a velocidade do inchamento mitocondrial energizado com glutamato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato



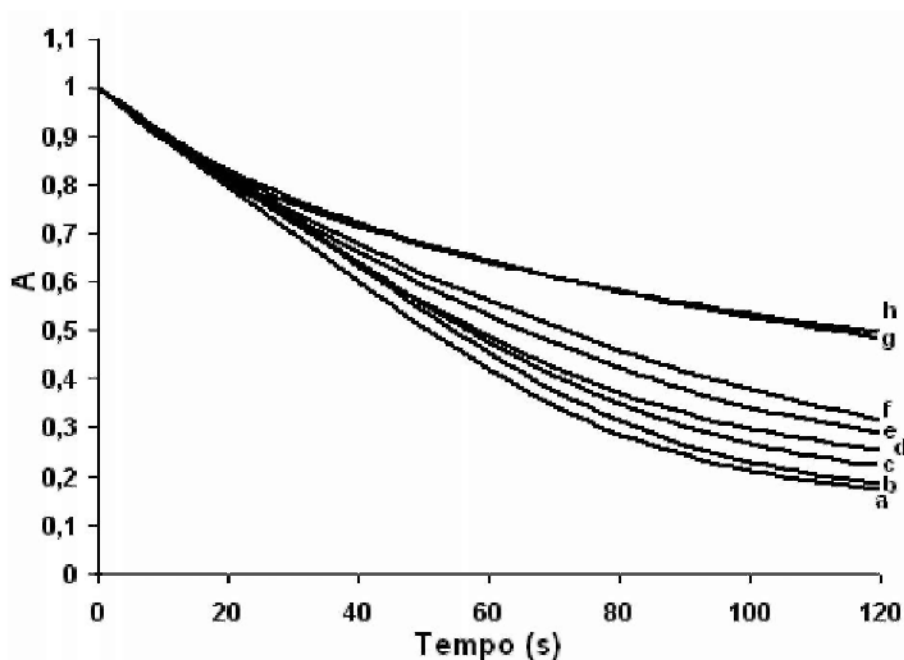
Sistema: sacarose 100 mmol. L^{-1} , Tris-HCl 30 mmol. L^{-1} , pH 7,2, EDTA 0,5 mmol. L^{-1} e acetato de sódio 50 mmol. L^{-1} . Mitocôndrias (1 mg) foram incubadas por 2 min. na ausência (traçado a) ou presença de TRN (nmol. mg^{-1} proteína) nas concentrações de: 1,25 (traçado b); 2,5 (traçado c); 5 (traçado d); 10 (traçado e); 15 (traçado f); 30 (traçado g); 60 (traçado h) Dados representativos de 04 experimentos independentes.

O volume da matriz mitocondrial também pode sofrer alterações pelo influxo de K⁺ através da MMI (NAKASHIMA & GARLID, 1982). O inchamento mitocondrial causado pela difusão de K⁺ pode ser avaliado em mitocôndrias intactas, onde a cadeia respiratória e a ATP sintase não estão funcionais, devido à ausência de substratos. Tal condição é caracterizada pela baixa permeabilidade mitocondrial a íons K⁺, sendo que a captação do cátion pode ser induzida pelo carreador móvel valinomicina, cujas formas complexada e não complexada são capazes de atravessar a membrana ocasionando o inchamento mitocondrial em presença de K⁺ e de um ânion permeante, neste caso, o NO₃⁻. (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Sob tais condições, o TRN reduziu a amplitude do *swelling*, de maneira dose-dependente, alcançando ~40% inibição na maior dose usada (60 nmol. mg⁻¹ proteína) (Figura 16). Considerando-se que o transporte do complexo valinomicina-K⁺ ocorre através da membrana em função da fluidez desta, pode-se sugerir que o TRN também afeta esta importante propriedade das membranas biológicas.

Os resultados aqui obtidos demonstram que, na faixa de concentração usada, que é bem inferior àquelas usualmente utilizadas na prática odontológica, o TRN é capaz de causar alterações significativas nas funções mitocondriais, que podem ter reflexos celulares. De fato, uma das conseqüências do desacoplamento entre o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa e a ativação da atividade hidrolítica da F₁F₀ATPase, levando à despolarização da MMI induzida pelo TRN pode provavelmente representar um importante e precoce evento na indução da apoptose.

Outro aspecto refere-se ao efeito inibidor do transporte de elétrons, pois é amplamente reconhecido que o represamento de elétrons na cadeia contribui para o aumento da formação de ERO, particularmente em nível dos complexos I e III. Considerando-se que o sítio provável da inibição causada pelo TRN esteja localizado entre os complexos II e III, uma avaliação do efeito do TRN nos processos de lipoperoxidação tornou-se importante. Inicialmente, avaliou-se a possibilidade de interação do TRN com a proteína armazenadora de ferro, ferritina, através do ensaio de liberação de ferro de ferritina.

Figura 16: Efeito do triclosan sobre o inchamento mitocondrial desenergizado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato



Sistema: KNO_3 135 mmol. L^{-1} , tampão HEPES 5 mmol. L^{-1} , pH 7,4, EDTA 0,1 mmol. L^{-1} , rotenona 4 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, antimicina A 2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e suspensão mitocondrial (1 mg) em volume final de 3 mL. A reação foi iniciada pela adição de valinomicina 4 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Concentrações crescentes de TRN (nmol. mg^{-1} proteína) foram pré-incubadas (2 min.) com as mitocôndrias: 1,25 (traçado b); 2,5 (traçado c); 5 (traçado d); 10 (traçado e); 15 (traçado f); 30 (traçado g); 60 (traçado h), ou nenhuma adição foi feita (traçado a). Dados representativos de 04 experimentos independentes.

5.7. Efeito do triclosan sobre a liberação de ferro de ferritina

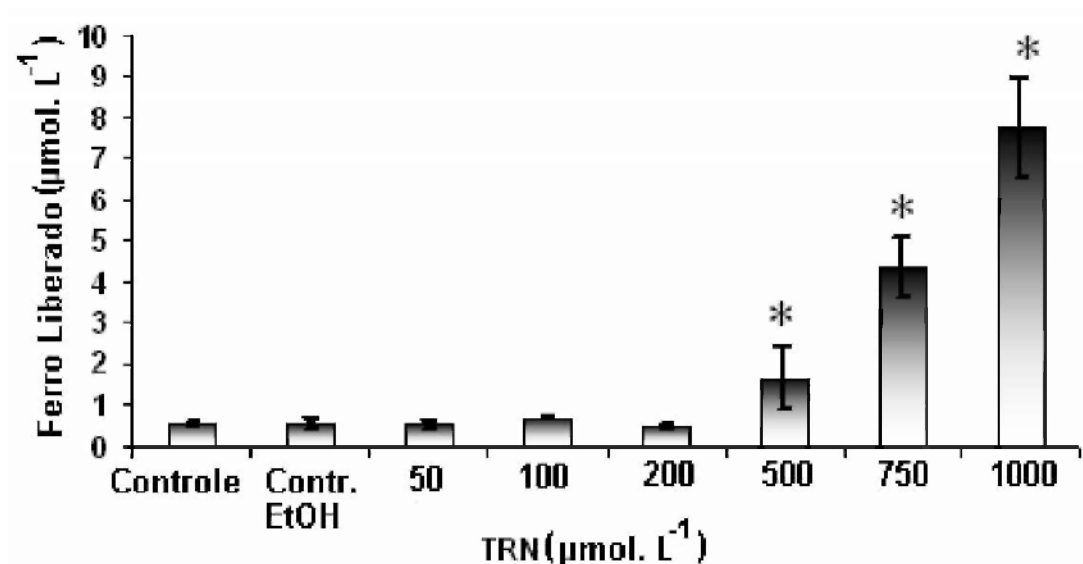
A ferritina contribui para a proteção da célula contra a toxicidade envolvendo ERO, formadas por ação de íons ferro e de peróxidos; o Fe^{3+} da ferritina pode, ao ser reduzido por vários radicais como ânion superóxido e semiquinona, ser liberado como Fe^{2+} e, desta forma, promover injúria oxidativa (ROCHA *et al*, 2000).

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que a liberação de ferro de ferritina é estimulada por TRN de maneira dose-dependente, sendo que a partir da concentração de 500 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, este estímulo é estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

De acordo com a literatura (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2003), a liberação de ferro de ferritina consiste em um dos mecanismos envolvidos na geração de radicais livres capazes de promover injúria oxidativa em componentes celulares. Portanto, a possibilidade de que o ferro liberado de ferritina pelo TRN seja utilizado para este fim não pode ser descartada.

Comparando-se tais resultados com aqueles previamente obtidos nas mesmas condições com CHX (NEWTON *et al.*, 2004), observa-se que a faixa de concentração do TRN necessária para causar tais efeitos é de cerca de 100 vezes maior, tendo em vista que a CHX estimula a liberação de ferro de ferritina a partir da concentração de $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (dados não mostrados), enquanto que o TRN estimula tal liberação a partir da concentração de $500 \mu\text{mol. L}^{-1}$. Entretanto, deve-se ressaltar que a concentração do TRN utilizada em preparações comercialmente disponíveis pode chegar até 10mmol. L^{-1} (BINNEY *et al.*, 1996).

Figura 17: Efeito do triclosan sobre a liberação de ferro de ferritina



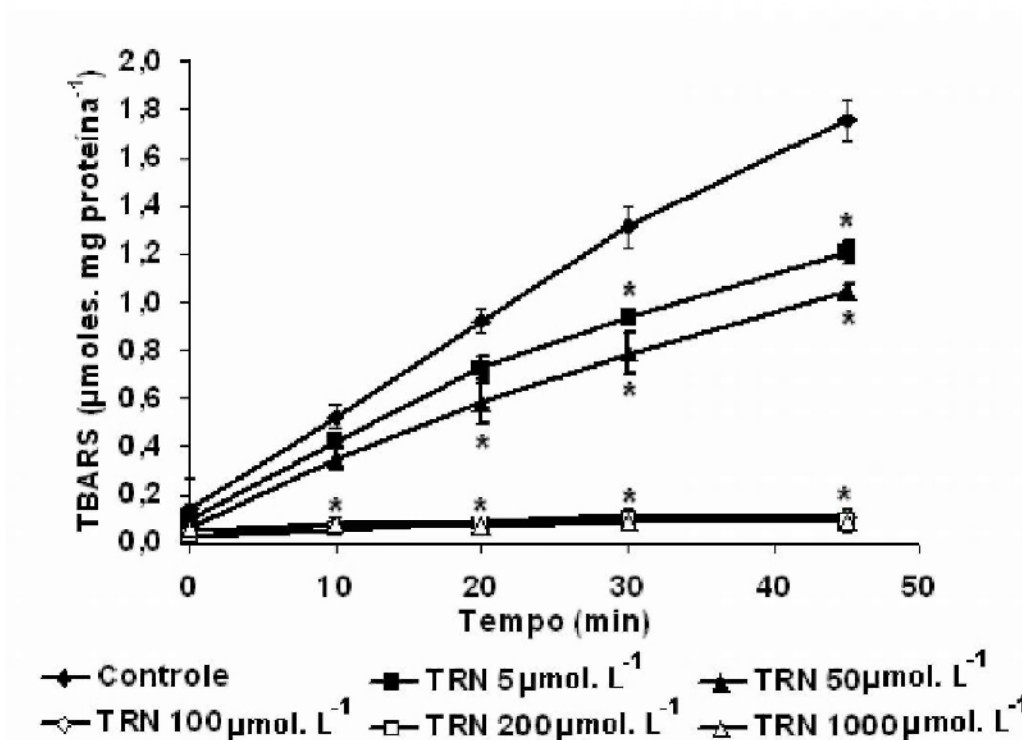
Sistema: tampão Tris-HCl 20mmol. L^{-1} , NaCl 140mmol. L^{-1} , sulfonato de batofenantrolina 1mmol. L^{-1} , $0,3 \text{mg ferritina. mL}^{-1}$ e TRN nas concentrações indicadas. A reação foi acompanhada pela formação do complexo $\text{Fe}^{2+}/$ batofenantrolina ($\epsilon_{530\text{nm}} = 22,14 \text{cm}^{-1} \cdot \text{mmol. L}^{-1}$), durante 20 minutos, à temperatura ambiente, em volume final de 1 mL. Os dados representam $\text{md} \pm \text{dp}$ ($n = 5$). * Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.8. Efeito do triclosan sobre a lipoperoxidação mitocondrial

Alguns autores preconizam que a presença de íons ferro em sistemas de membranas permite não apenas a iniciação da primeira cadeia da lipoperoxidação, mas também a propagação deste processo (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2003). A observação de que o TRN causa liberação de ferro de ferritina motivou a avaliação do efeito deste agente sobre a lipoperoxidação, tendo em vista a importância deste processo nos sistemas biológicos (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Os resultados mostrados na Figura 18 mostram que o TRN inibe a lipoperoxidação de forma dose e tempo-dependente, ou seja, na concentração de $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$, este agente inibe significativamente o processo a partir de 30 min. de reação; na concentração de $50 \mu\text{mol. L}^{-1}$, a partir de 20 min. e nas concentrações de 100, 200 e $1000 \mu\text{mol. L}^{-1}$, o TRN inibe significativamente a lipoperoxidação em todos os tempos analisados (a partir de 10 min.). Os resultados obtidos para o TRN foram distintos daqueles descritos por NEWTON *et al.* (2004) para a CHX, a qual também estimulou a liberação de ferro de ferritina mas, ao contrário do TRN, também estimulou a lipoperoxidação.

Figura 18: Efeito do triclosan sobre a lipoperoxidação mitocondrial



Sistema: D-manitol 250 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol. L⁻¹, pH7,25, FeCl₃ 0,2 mmol. L⁻¹, ADP 2 mmol. L⁻¹ e 2-oxoglutarato 5 mmol. L⁻¹ para iniciar a reação, na presença ou ausência de TRN. A reação foi seguida pela formação de TBARS ($\epsilon_{535nm}=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), num volume final de 3 ml, a 37°C. Os dados representam md \pm dp (n= 5). * Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em relação ao controle.

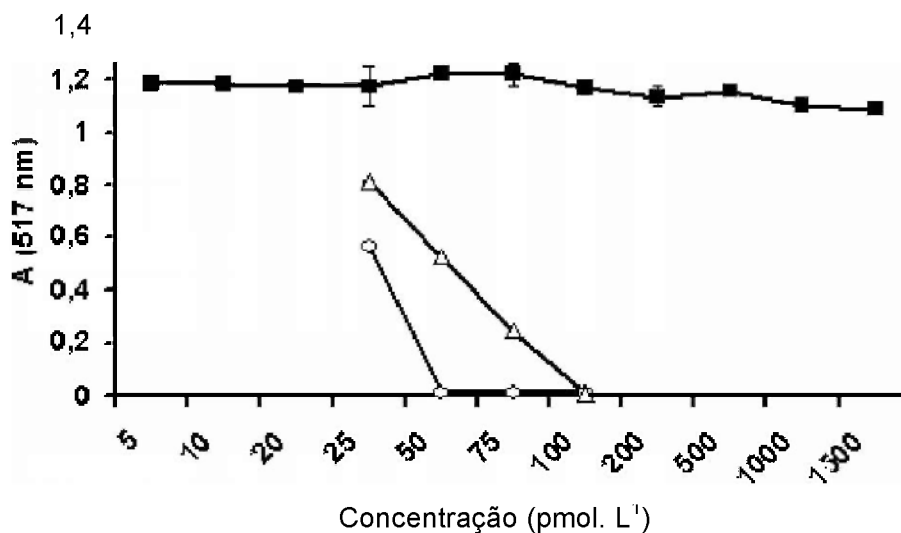
De certa forma, os resultados para o TRN foram inesperados, pois tendo o composto contribuído para a liberação de ferro de ferritina, poder-se-ia esperar um estímulo do processo de lipoperoxidação, o que não ocorreu. Algumas proposições podem ser feitas para justificar este efeito do TRN. O composto poderia atuar como seqüestrador de radicais livres, o que impediria a propagação em cadeia, ou então interagir com o ferro, tornando o metal não disponível para o processo redox. Estas possibilidades foram avaliadas neste trabalho tanto para o TRN como para a CHX, como descrito posteriormente.

5.9. Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável DPPH

O radical livre DPPH pode aceitar um elétron ou um radical hidrogênio convertendo-se em uma molécula diamagnética estável (BLOIS, 1958). Devido ao seu elétron desemparelhado, o DPPH possui uma absorção forte em 517 nm, a qual decresce estequiometricamente em relação ao número de elétrons captados (BLOIS, 1958). A alteração de absorbância produzida nesta reação consiste em uma ferramenta muito útil para avaliar a habilidade de moléculas agirem como seqüestradores de radical, como a cisteína e o ácido ascórbico livre (DINIS *et al.*, 1994), os quais foram utilizados presentemente como controles positivos, para comparação com o efeito do TRN.

Os resultados de tais experimentos estão mostrados na Figura 19. Nela, a redução do DPPH por concentrações crescentes de cisteína e ácido ascórbico é visualizada como decréscimo de absorbância em 517 nm. O TRN não ocasionou redução do DPPH em concentrações até 1,5 mmol. L⁻¹, como observado pela ausência de decréscimo na absorbância, demonstrando que este agente não doou elétrons ao radical livre. Tais resultados descartam, portanto, a hipótese de que o efeito inibidor de lipoperoxidação exercido pelo TRN seria como seqüestrador de radicais. Cogitou-se, então, a possibilidade de o TRN estar interagindo com os íons ferro, envolvidos nos processos de lipoperoxidação mitocondrial ferro induzida.

Figura 19: Reatividade entre o triclosan e o radical livre estável DPPH

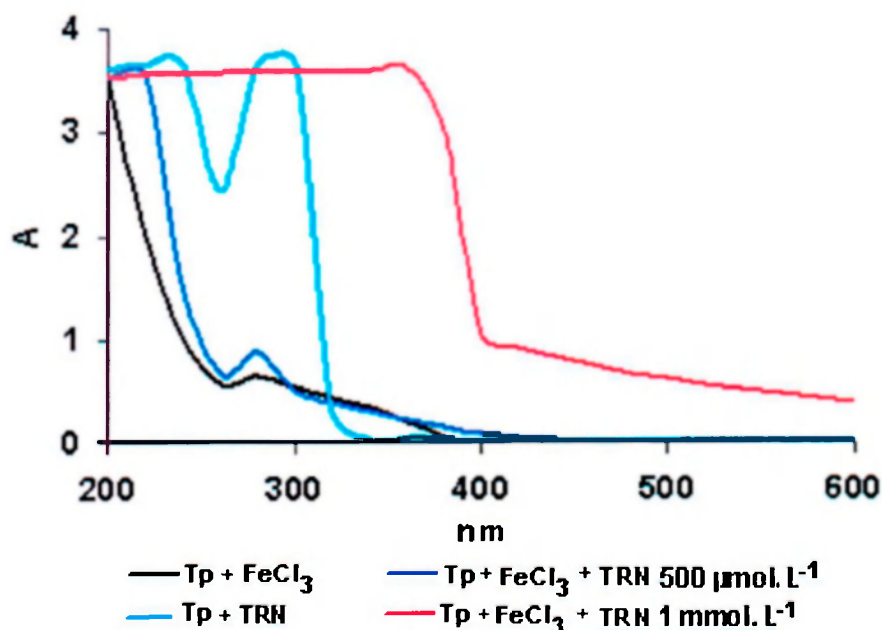


■-TRN -△-Ácido ascórbico -○-Cisteína

Sistema: 1 mL de tampão acetato 100 mmol. L⁻¹, pH 5,5, 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 500 μmol. L⁻¹. A redução do DPPH foi avaliada pelo decréscimo de absorvância a 517 nm, como função da concentração de TRN e antioxidantes cisteína e ácido ascórbico. Os valores de absorvância foram obtidos após 5 minutos de incubação na presença de TRN ou dos reagentes antioxidantes.

5.10. Interação do triclosan e da clorexidine na presença de íons ferro Para fins comparativos e considerando os resultados obtidos nos experimentos de lipoperoxidação ferro-induzida realizados com TRN e previamente com a CHX (NEWTON, 2002), avaliou-se a possibilidade de interação destes agentes antimicrobianos com íons ferro. As Figuras 20 e 21 mostram os espectros de absorção de UV/VIS do TRN e da CHX, realizados em presença de FeCl₃. Pode-se observar que, após o tempo de incubação (20 min.) com o TRN (Figura 20), houve uma grande modificação do espectro de FeCl₃, sugerindo que este agente é capaz de interagir com íons férricos. Estes resultados estão de acordo com os aqueles que mostravam a inibição da lipoperoxidação mitocondrial ferro- induzida pela ação do TRN (Figura 18). Considerando-se que a presença de íons ferro em sistemas biológicos pode, em última instância, promover injúria oxidativa (ROCHA *et al.*, 2000), a interação entre TRN e ferro pode ser benéfica às células, protegendo-as através da indisponibilidade deste metal para reações de radicais livres.

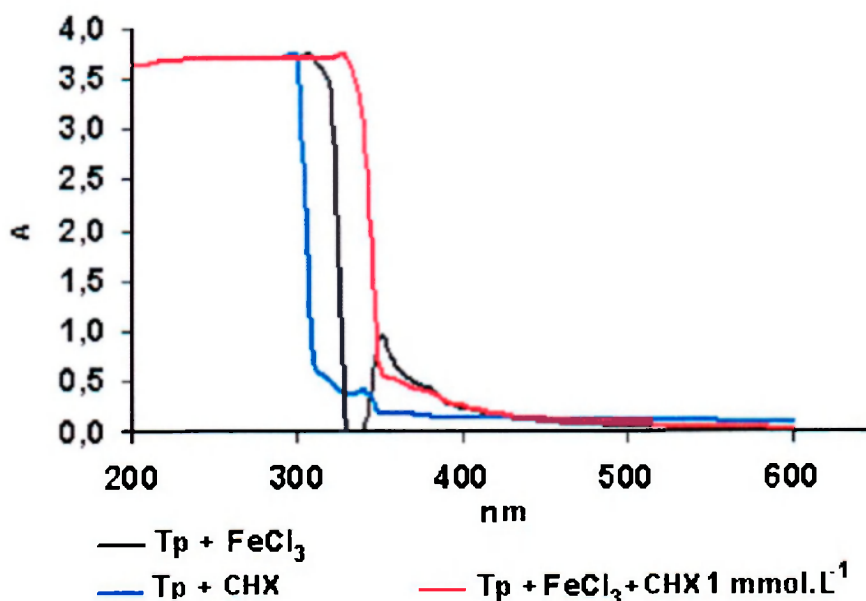
Figura 20: Espectros de absorção do triclosan em presença de íons ferro



Os espectros foram realizados em solução de NaCl 150 mmol. L⁻¹, pH 7,4 e a habilidade do TRN em interagir com íons férricos foi avaliada através de variações espectrais após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de FeCl₃ de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre TRN e ferro.

Da mesma forma, foram feitos espectros de UV/VIS em presença de CHX. Como pode ser observado na Figura 21, o espectro de absorção da CHX foi discretamente alterado após a incubação com FeCl₃, sugerindo uma pequena interação entre este agente com íons férricos. Tais resultados também estão de acordo com aqueles previamente obtidos, os quais mostraram que a CHX induz fortemente a lipoperoxidação ferro-induzida (NEWTON *et al.*, 2004). Entretanto, tal interação com o ferro parece ocorrer de maneira diferente daquela estabelecida com o TRN, visto que estes dois agentes apresentam efeitos opostos sobre a lipoperoxidação mitocondrial.

Figura 21: Espectros de absorção da clorexidina em presença de íons ferro

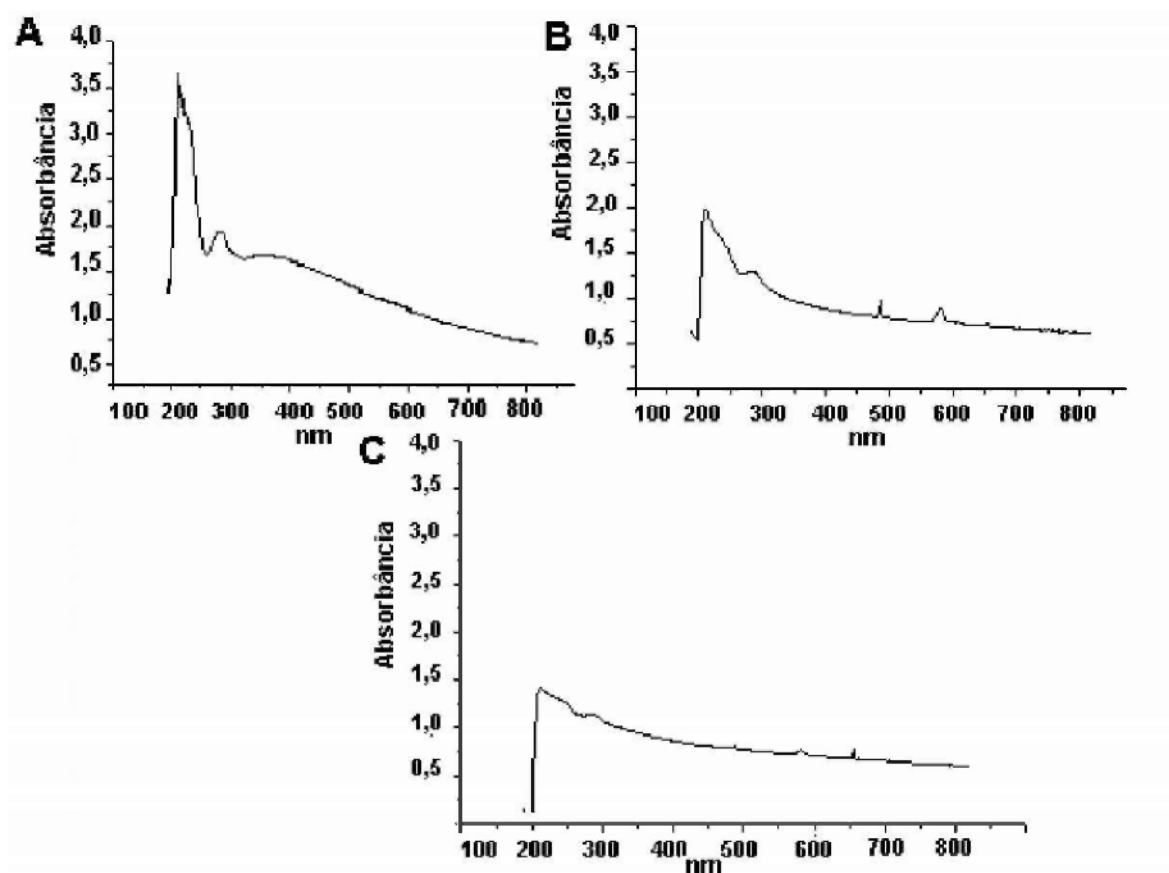


Os espectros foram realizados em solução de NaCl 150 mmol. L⁻¹, pH 7,4 e a habilidade da CHX em interagir com íons férricos foi avaliada através de variações espectrais após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de FeCl₃ de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre CHX e ferro.

Considerando a facilidade com que o Fe²⁺ é oxidado em pH 7,4, os espectros UV/VIS foram realizados sob atmosfera inerte, a fim de se evitar possível interferência do oxigênio nas preparações dos íons ferrosos. Os resultados de tais experimentos estão demonstrados nas Figuras 22 e 23.

O espectro na Figura 22A é correspondente ao espectro do TRN, na ausência do metal. Como pode ser observado nas Figuras 22B e 22C, a incubação do TRN 1 mmol. L⁻¹ com FeSO₄ e FeCl₃, respectivamente, causa uma grande diferença no espectro do TRN (Figura 22A), confirmando, portanto, que este agente é capaz de interagir com as duas formas de valência deste metal, visto que sob as condições experimentais utilizadas, não houve presença de oxigênio, i. e., não houve oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺.

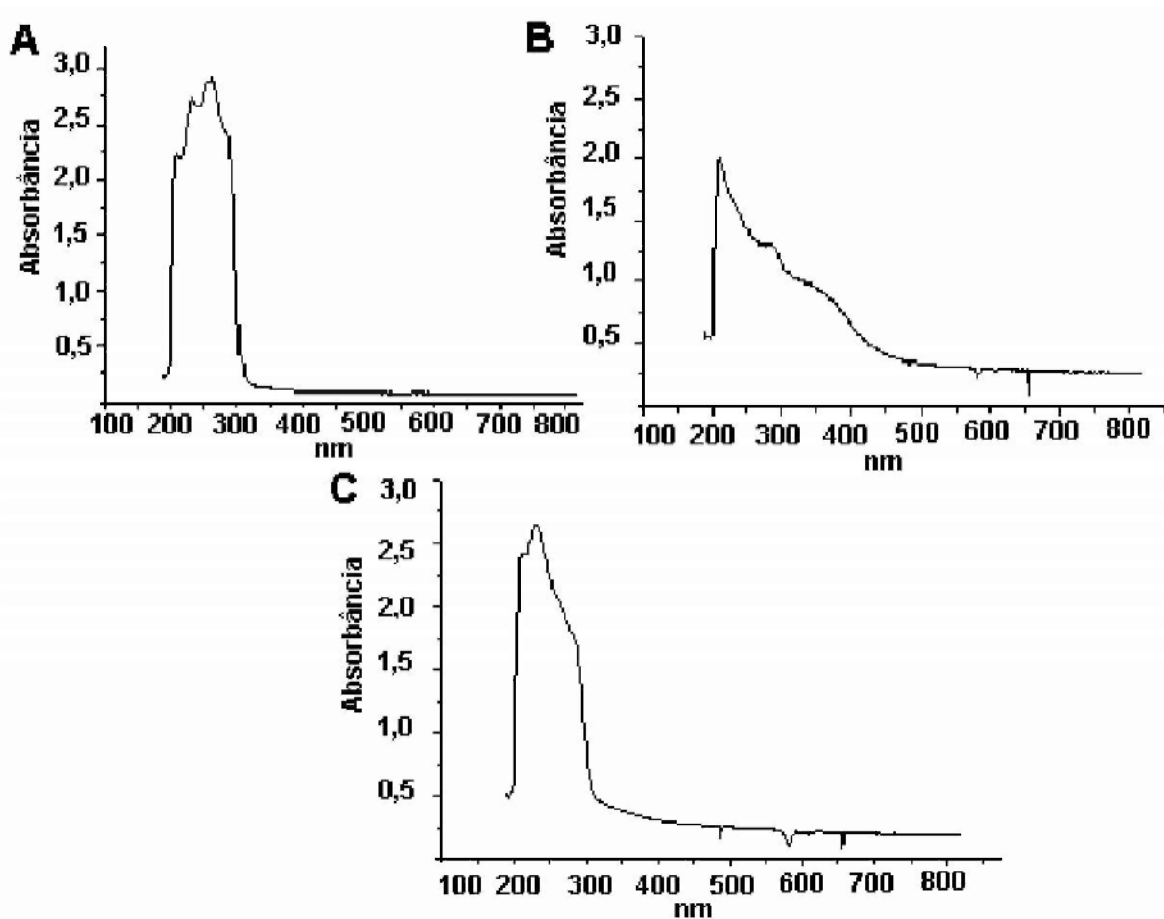
Figura 22: Espectros de absorção do triclosan em presença de íons ferro, sob atmosfera inerte



Os espectros foram realizados em solução de NaCl 150 mmol. L⁻¹, pH 7,4 e a habilidade do TRN em interagir com íons ferro foi avaliada através de variações espectrais do TRN (Figura 22A) após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de FeSO₄, (Figura 22B) ou de FeCl₃ (Figura 22C) em atmosfera inerte, de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre TRN e ferro.

O espectro mostrado na Figura 23A é correspondente ao espectro da CHX 1 mmol. L⁻¹ na ausência do metal. As Figuras 23B e 23C mostram os espectros obtidos após a incubação da CHX com FeSO₄ e FeCl₃, respectivamente. Pode-se observar que, sob as condições experimentais utilizadas, a CHX também interage com ambas as formas de valência do ferro, porém não da mesma forma.

Figura 23: Espectros de absorção da clorexidina em presença de íons ferro, sob atmosfera inerte

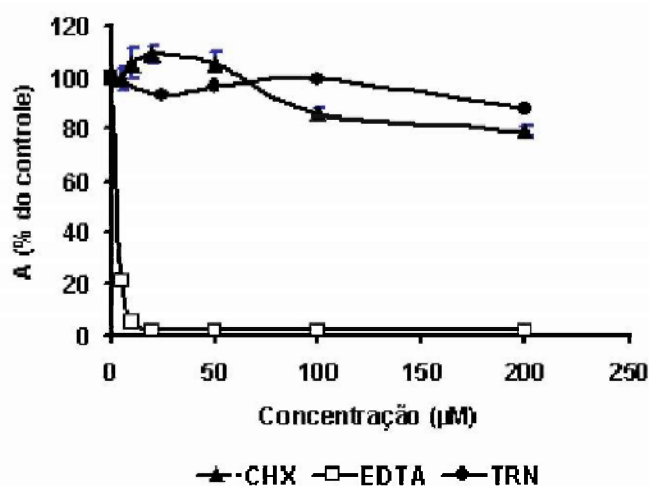


Os espectros foram realizados em solução de NaCl 150 mmol. L⁻¹, pH 7,4 e a habilidade da CHX em interagir com íons ferro foi avaliada através de variações espectrais do CHX (Figura 23A) após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de FeSO₄, (Figura 23B) ou de FeCl₃ (Figura 23C), de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre CHX e ferro.

Um conhecido agente de complexação do Fe²⁺ é a ferrozina (DINIS *et al.*, 1994), que é usada para ensaios de competição. O complexo Fe²⁺-ferrozina forma um cromógeno com absorção em 562 nm, que é proporcional à concentração do complexo. A presença de agentes capazes de competir pela ligação do Fe²⁺ diminui a concentração do complexo Fe²⁺-ferrozina, o que pode ser registrado.

A Figura 24 mostra os resultados destes ensaios, nos quais o EDTA foi usado como controle positivo. Neste caso, o EDTA deixa o ferro indisponível para interação com a ferrozina, levando ao decréscimo de absorvância. Podese observar que nenhum dos agentes antimicrobianos (TRN ou CHX) foi capaz de interferir na formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina, pois não houve diminuição da absorvância observada. Desta forma, embora o TRN e a CHX possam interagir com íons ferro, esta interação é de menor afinidade em relação à interação ferro - ferrozina. Porém no caso do TRN, parece ser suficiente para impedir o processo de lipoperoxidação mitocondrial.

Figura 24: Efeito do triclosan e da clorexidine sobre a formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina



A formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina na presença de TRN e CHX foi avaliada em meio contendo acetato de amônio 5 g%, pH 6,9, sulfato ferroso amoniacal $20 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e ferrozina $100 \mu\text{mol. L}^{-1}$. Após incubação de 10 min. com TRN, CHX ou EDTA nas concentrações indicadas, a absorvância foi avaliada em 562nm. Os valores representam a $\text{md} \pm \text{dp}$ de 03 experimentos individuais.

Outro processo de relevância biológica analisado foi a MPT, visto que, muitas vezes, está envolvido com processos de lipoperoxidação (PENZO *et al.*, 2002).

5.11. Efeito do triclosan sobre a transição de permeabilidade mitocondrial

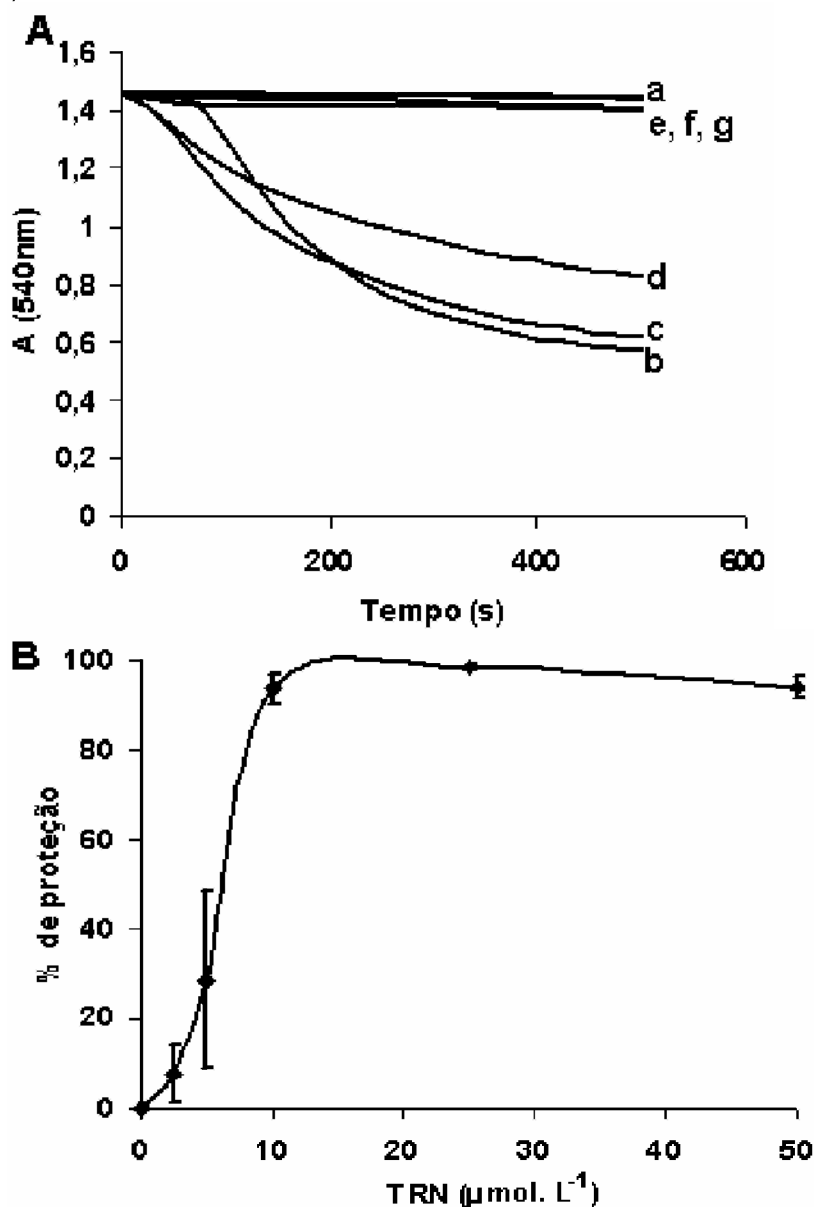
A transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) é um processo sofrido pelas mitocôndrias, quando expostas a concentrações suprafisiológicas de Ca^{2+} na matriz. É caracterizado pela perda de permeabilidade seletiva a pequenas moléculas (< 1500 Da), o que leva à perda de componentes de baixo peso molecular da matriz, ao desacoplamento (colapso do $\Delta\psi$) e ao inchamento mitocondrial ("*swelling*") (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998; BERNARDI, 1999; BASSO *et al.*, 2005). Desta forma, o inchamento mitocondrial pode ser usado para monitorar a transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

A impermeabilidade seletiva da MMI é essencial para a manutenção do potencial de membrana e do gradiente de pH que levam à síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa. Quando esta barreira de permeabilidade é rompida pela abertura do PTP, as mitocôndrias tornam-se desacopladas e a ATPase translocadora de prótons hidrolisa ativamente ATP, ao invés de sintetizá-lo. Se este evento ocorre em uma célula, as concentrações de ATP não poderão ser mantidas, mesmo pela glicólise e, a menos que o poro se feche novamente, a célula estará destinada a morrer, pois o dano a componentes celulares causado por hipóxia e estresse oxidativo apenas podem ser reparados se o ATP estiver disponível. Assim, a MPT representa um mecanismo pelo qual a morte celular pode ser iniciada (HAIL Jr, 2005). A injúria celular causada por isquemia e reperfusão também está relacionada ao processo de MPT (ZORATTI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998; NAKAGAVA *et al.*, 2005). Já existem vários estudos mostrando que os processos de MPT podem estar relacionados aos processos de morte celular (BAINES *et al.*, 2005; HAIL Jr, 2005) e desenvolvimento de doenças como o mal de Parkinson (CASSARINO *et al.*, 1999).

As Figuras 25 e 26 mostram os resultados obtidos nos ensaios de MPT induzido por concentrações relativamente altas de Ca^{2+} (100 e 200 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente) em presença de diferentes concentrações de TRN.

Na Figura 25A pode-se observar que em baixas concentrações de TRN (2,5 e 5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, traçados c e d), ocorre pequena, porém gradual, proteção da MPT, mas a partir da concentração de 10 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 25A, traçado e), verifica-se que o TRN protege integralmente o processo. O efeito da proteção do TRN pode ser melhor visualizado na Figura 25B, onde o efeito é apresentado em termos percentuais. Concentrações iguais ou superiores a 10 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de TRN protegeram totalmente a MPT induzida por altas concentrações de Ca^{2+} em todos os ensaios realizados (Figura 25B). Chama a atenção que os resultados obtidos para o TRN diferem daqueles mostrados para a CHX por NEWTON *et al.* (2004), esta última, promovendo o estímulo da MPT.

Figura 25: Efeito do triclosan sobre a MPT em presença de Ca^{2+} ($100 \mu\text{mol. L}^{-1}$)

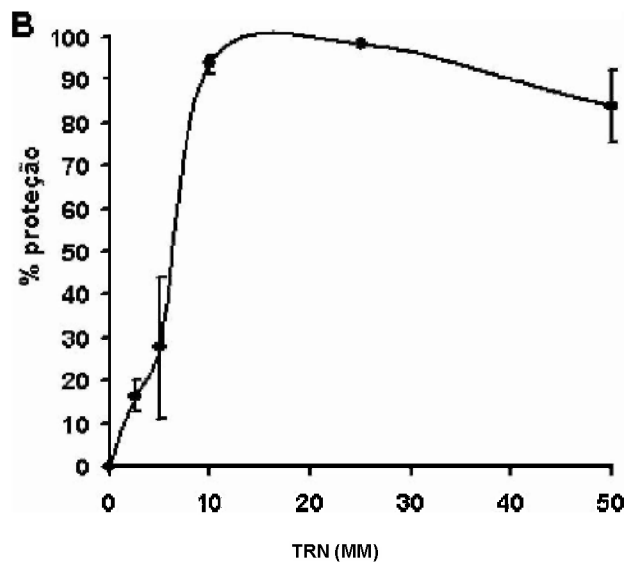
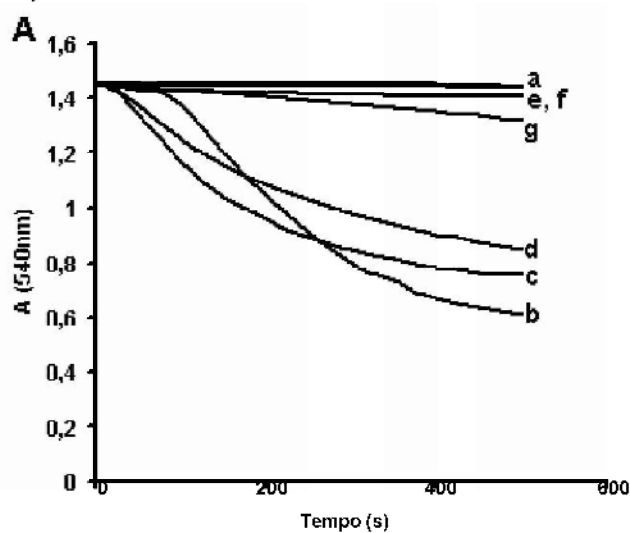


A: Sistema: D-manitol 250 mmol. L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol. L^{-1} , pH 7,2, Pi $0,3 \text{ mmol. L}^{-1}$, succinato de potássio 3 mmol. L^{-1} , rotenona $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e proteína mitocondrial $0,5 \text{ mg. mL}^{-1}$. Após incubação de 2 minutos com CaCl_2 $100 \mu\text{mol. L}^{-1}$, foi adicionado TRN, nas seguintes concentrações: $2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado c); $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado d); $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado e); $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado f) e $50 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado g). Foram feitos também controles negativos (mitocôndrias sem adição de Ca^{2+} , traçado a) e positivos (mitocôndrias com Ca^{2+} $100 \mu\text{mol. L}^{-1}$, traçado b). Gráfico representativo de 6 experimentos independentes. **B:** Valores percentuais obtidos da $md \pm dp$ de 6 experimentos independentes realizados conforme descrito em **A**.

O mesmo perfil de proteção pode ser observado mesmo em concentrações mais altas de Ca^{2+} ($200 \mu\text{mol. L}^{-1}$, Figura 26).

Figura 26: Efeito do triclosan sobre a MPT em presença de Ca^{2+} ($200 \mu\text{mol. L}^{-1}$)

$\mu\text{mol. L}^{-1}$)

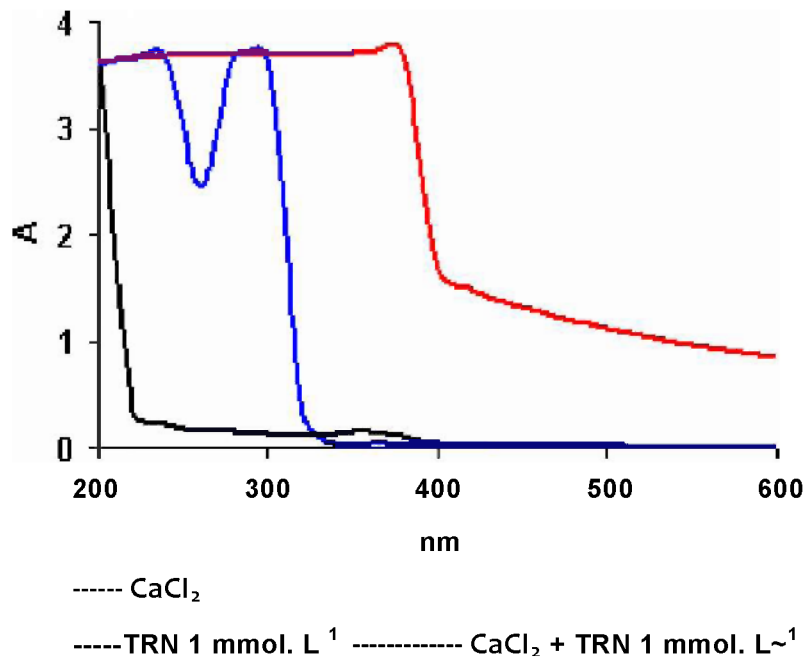


A: Sistema: D-manitol 250 mmol. L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol. L^{-1} , pH 7,2, Pi $0,3 \text{ mmol. L}^{-1}$, succinato de potássio 3 mmol. L^{-1} , rotenona $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e proteína mitocondrial $0,5 \text{ mg. mL}^{-1}$. Após incubação de 2 minutos com CaCl_2 $200 \mu\text{mol. L}^{-1}$, foi adicionado TRN, nas seguintes concentrações: $2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado c); $5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado d); $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado e); $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado f) e $50 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (traçado g). Foram feitos também controles negativos (mitocôndrias sem adição de Ca^{2+} , traçado a) e positivos (mitocôndrias com Ca^{2+} $200 \mu\text{mol. L}^{-1}$, traçado b). Gráfico representativo de 6 experimentos independentes. **B:** Valores percentuais obtidos da $md \pm dp$ de 6 experimentos independentes realizados conforme descrito em A.

5.12. Espectro de absorção do triclosan e da clorexidine na presença de íons cálcio

Considerando-se os resultados obtidos em experimentos de transição de permeabilidade mitocondrial realizados tanto com TRN quanto com CHX, avaliou-se a possibilidade de interação destes agentes antimicrobianos com íons cálcio. As Figuras 27 e 28 mostram os espectros de absorção de UV/VIS realizados em presença de CaCl_2 . Pode-se observar que, após o tempo de incubação (20 min.) com o CaCl_2 (Figura 27), houve uma modificação do espectro do TRN, com a eliminação de um discreto pico na região de 260 nm, além do desaparecimento do pico em 300 nm, com concomitante surgimento de novo pico na região de 400 nm. Desta forma, uma possível interação deste agente com íons cálcio não pode ser descartada, o que poderia explicar o efeito do TRN sobre a MPT (Figuras 25 e 26). Entretanto, tal possibilidade ainda deve ser analisada de forma mais aprofundada e, se confirmada, terá grande impacto à prática odontológica, tendo em vista que o cálcio representa um íon importante na constituição da apatita do esmalte dental e da saliva. Neste aspecto, vale lembrar que o esmalte dental permanece íntegro na cavidade bucal através de processos que mantêm um equilíbrio de desmineralização-remineralização do esmalte. Neste contexto, os principais fatores que controlam a estabilidade da apatita do esmalte são o pH e as concentrações ativas livres de cálcio-fosfato em solução. Sob condições de pH fisiológico, a saliva e o fluido da placa ficam supersaturados destes íons em relação à apatita do esmalte e, em presença de lesões cariosas, há a precipitação de íons, os quais tendem a neutralizar ou a reverter a perda mineral (remineralização). Entretanto, quando ocorre queda do pH no ambiente bucal devido à produção de ácido pela placa bacteriana, ocorre uma inversão, ou seja, a apatita dental torna-se supersaturada em relação à saliva e ao fluido da placa. Neste momento, ocorre perda mineral do esmalte dental e há a formação da cárie dental (desmineralização) (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995). Portanto, uma interação do TRN com íons Ca^{2+} eventualmente poderia interferir neste equilíbrio.

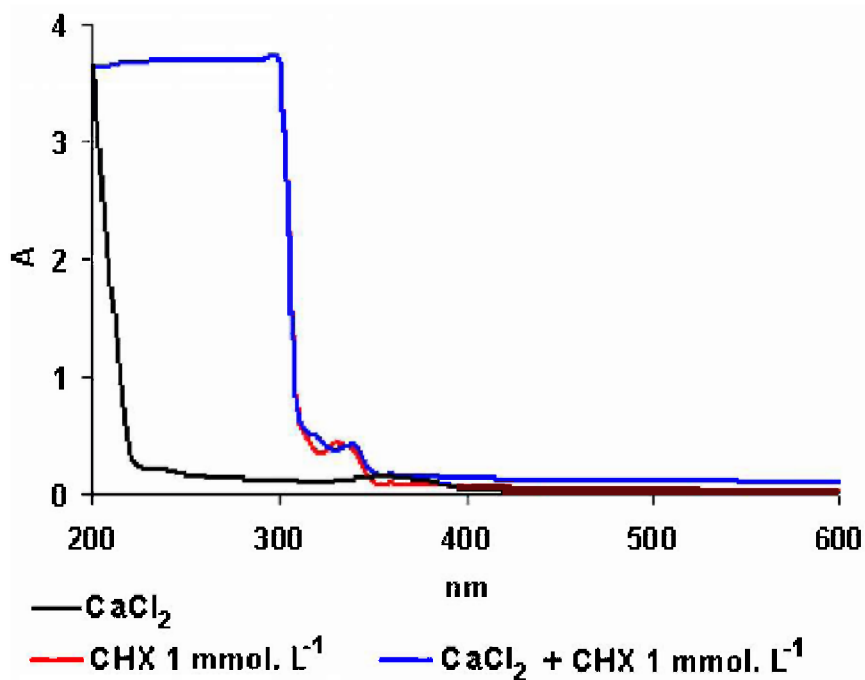
Figura 27: Espectros de absorção do triclosan em presença de íons cálcio



Os espectros foram realizados em solução de NaCl 150 mmol. L⁻¹, pH 7,4 e a habilidade do TRN em interagir com íons cálcio foi avaliada através de variações espectrais após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de CaCl₂, de forma a se obter uma relação final de 1:1 mol entre TRN e Ca²⁺.

Por outro lado, a possibilidade de interação entre CHX e Ca²⁺ foi descartada (Figura 28), visto que o espectro feito após incubação destes reagentes não foi alterado, ficando exatamente sobreposto sobre o espectro da CHX. Tais dados também estão de acordo com aqueles previamente obtidos (NEWTON *et al.*, 2004), os quais mostravam que a CHX é um forte agente indutor de MPT.

Figura 28: Espectros de absorção da clorexidine em presença de íons cálcio



Os espectros foram realizados em solução de $\text{NaCl } 150 \text{ mmol. L}^{-1}$, pH 7,4 e a habilidade da CHX em interagir com íons cálcio foi avaliada através de variações espectrais após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de CaCl_2 , de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre CHX e Ca^{2+} .

Os resultados referentes à diferença espectral observada após a incubação do TRN com íons Ca^{2+} (Figura 27), apesar de serem sugestivos de uma interação deste agente com o cálcio, não esclareceram de forma definitiva como o TRN estaria inibindo a MPT, exigindo a realização de ensaios futuros.

Por outro lado, resultados recentes deste Laboratório já demonstraram que a CHX é capaz de estimular a MPT através de um mecanismo inibido por CsA e protegido por ditioneitol (DTT) e EGTA, sugerindo a necessidade da formação do poro protéico, da oxidação de grupos -SH e da presença de Ca^{2+} intramitocondrial (NEWTON *et al.*, 2004). Entretanto, tais resultados foram obtidos através da utilização de preparações mitocondriais, ou seja, do efeito deste agente sobre um *pool* de mitocôndrias.

Neste contexto, deve-se levar em consideração que as mitocôndrias são morfológica e funcionalmente diversas e que tal diversidade pode representar importantes variações biológicas (FULLER & ARRAIAGA, 2003). Logo, a utilização de métodos que possibilitem avaliar as propriedades de mitocôndrias individuais é de extrema relevância, principalmente para estabelecer o mecanismo de ação de drogas. Portanto, foram desenvolvidos ensaios de pinçamento de membranas, os quais permitiriam esclarecer de forma satisfatória o modo de ação do TRN e da CHX sobre a MPT, visto que tal técnica permite a avaliação individual de canais iônicos em membranas biológicas. Assim, foi analisado o efeito destes compostos diretamente sobre o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP).

5.13. Ensaios de eletrofisiologia

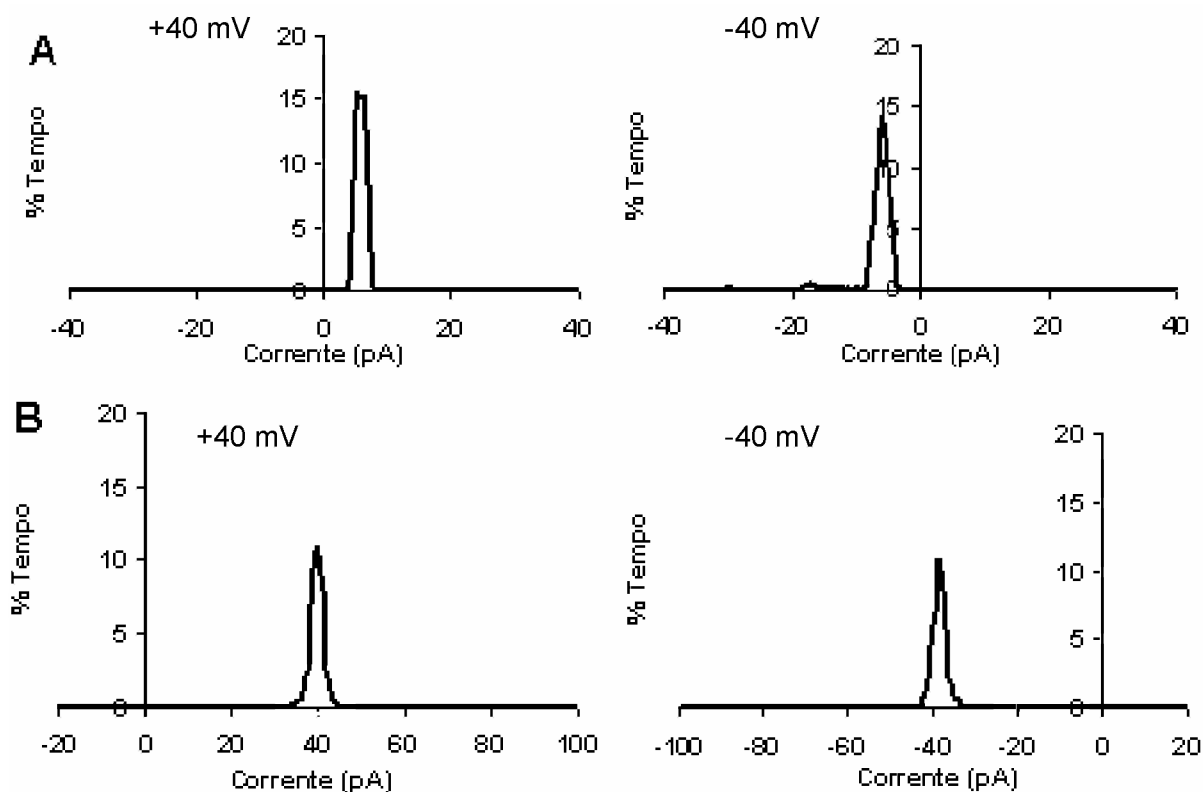
Os ensaios de eletrofisiologia foram desenvolvidos na New York University College of Dentistry, sob orientação da Dra. Kathleen W. Kinnally.

5.13.1. Caracterização eletrofisiológica da atividade do poro de transição de permeabilidade mitocondrial

A caracterização eletrofisiológica do PTP foi realizada utilizando-se um sistema reconstituído (proteolipossomo) formado por lipossomos contendo fragmentos de MMI, a qual tinha sido previamente isolada a partir de mitocôndrias de fígado de rato (Materiais e Métodos, itens 4.2.2.1. a 4.2.2.4). Os pinçamentos obtidos contendo canais iônicos foram considerados como sendo PTP quando obedecidos os seguintes critérios: presença de condutâncias de múltiplos níveis e condutância máxima de pelo menos 900 pS, além da sensibilidade ao íon Ca^{2+} (KINNALLY *et al.*, 1991; SZABÓ & ZORATTI, 1991; SZABÓ *et al.*, 1992).

Após a obtenção dos gigasetos (vide Materiais e Métodos item 4.2.6.3.), os canais obtidos foram submetidos a diferentes voltagens, variando entre + 40 e - 40 mV, de forma constante e por períodos de pelo menos 30 segundos. Desta forma, foram obtidos os histogramas de amplitude total, os quais representam a fração de tempo em que o canal permanece em cada nível de condutância, ou seja, aberto ou fechado. A partir destes histogramas, foi possível determinar os valores máximos de condutância observados em cada voltagem. . A Figura 29 apresenta os histogramas de amplitude representativos dos controles quando o PTP estava fechado (Figura 29A) ou aberto (Figura 29B).

Figura 29: Histograma de amplitude da atividade do PTP

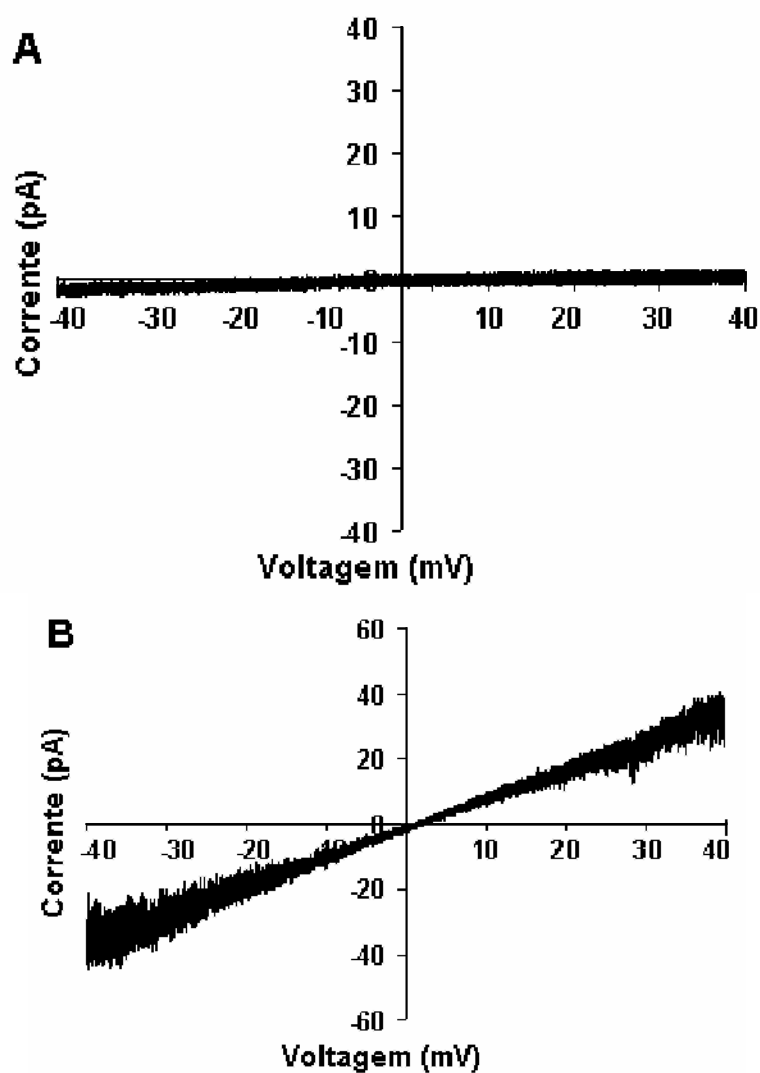


Histogramas de amplitude total dos pinçamentos separados de proteolipossomos contendo MMI e PTP, obtidos a +40 mV (histogramas à esquerda) ou a -40 mV (histogramas à direita) a partir de registros de corrente de 30 a 60 s de duração. O sinal foi filtrado a 2 kHz e as amostras foram adquiridas a uma frequência de 5 kHz. Em todos os casos, os dados mostrados representam a condutância obtida subtraindo-se a condutância intrínseca do selo. Os pinçamentos foram realizados em condições simétricas em presença de KCl 150 mmol. L⁻¹, HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, Ca²⁺ 50 μmol. L⁻¹ e Pi 300 μmol. L⁻¹. **A**: Histograma de amplitude total do PTP na ausência de drogas (controle), no estado fechado do poro. **B**: Histograma de amplitude total do PTP na ausência de drogas (controle), no estado aberto do poro. Os histogramas são representativos de, pelo menos, 5 experimentos independentes.

Os resultados obtidos permitem o cálculo do pico máximo de condutância do PTP, descontando-se a condutância intrínseca do selo. Portanto, a condutância média do PTP foi de $0,126 \pm 0,07$ nS ($n = 5$) quando este se encontrava fechado, e de $1,413 \pm 0,48$ nS ($n = 12$), quando este se encontrava aberto. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, os quais preconizam que a condutância característica do PTP é $\sim 1,3$ nS (KINNALLY *et al.*, 1991; SZABÓ & ZORATTI, 1991; SZABÓ *et al.*, 1992).

Os selos foram sempre sujeitos a voltagens entre +40 mV e -40 mV, visto que a aplicação de voltagens extremas em um canal ativo pode levar à sua inativação (PETRONILLI *et al.*, 1989; SZABÓ *et al.*, 1992). O efeito da voltagem sobre a condutância do poro foi visualizado através de curvas de corrente -voltagem, obtidas pela varredura de voltagem, realizadas de forma contínua e progressiva, durante 40 segundos. O efeito da voltagem sobre a condutância do poro na ausência de drogas (controle) está representado na Figura 30, onde se pode observar que a aplicação de diferentes voltagens não afetou a condutância do poro quando o PTP estava fechado (Figura 30A) ou aberto (Figura 30B).

Figura 30: Relação corrente – voltagem na atividade do PTP

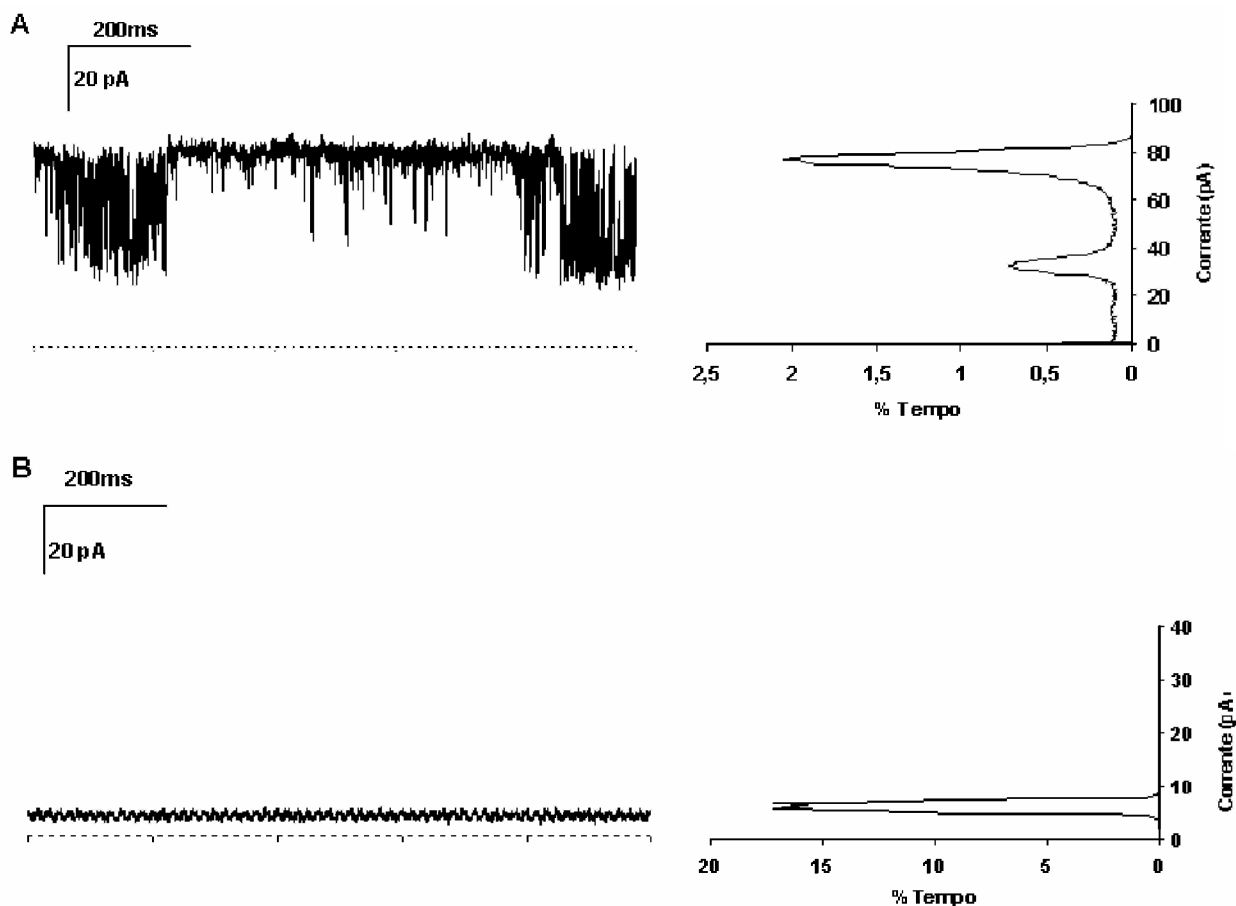


Curvas de intensidade de voltagem dos pinçamentos separados de proteolipossomos contendo MMI e PTP. Os valores de corrente a cada voltagem foram obtidos variando-se a voltagem de maneira progressiva, durante 40 s, nas mesmas condições descritas para a Figura 30. **A:** Curva corrente- voltagem representativa do PTP na ausência de drogas (controle), no estado fechado do poro. **B:** Curva voltagem- corrente representativa do PTP na ausência de drogas (controle), no estado aberto do poro. As curvas são representativas de, pelo menos, 05 experimentos independentes.

A Figura 31 é representativa do tipo de atividade demonstrada pelos proteolipossomos separados contendo MMI e PTP analisados. Em ambos os casos (Figuras 31A e 31B), os traçados representam a condutância do PTP frente à aplicação de uma voltagem de +40 mV, sendo aqui mostrados com seus respectivos histogramas de amplitude total. A condutância intrínseca do selo não foi descontada. Quando o poro encontrava-se aberto (Figura 31A), observava-se intensa atividade do canal, o que pode ser observado pelo grande número de transições presentes no traçado. Por outro lado, quando o canal encontrava-se fechado (Figura 31B), quase não eram observadas transições, sendo o PTP distinguido de "canais mortos" ou sem atividade apenas pela aplicação de altas voltagens (acima de 100 mV). Então, após aplicação de alta voltagem, se o canal aumentasse o número de transições, intensificando um pouco sua atividade, era então considerado um canal ativo; caso mesmo após a aplicação de altas voltagens, o canal permanecesse sem apresentar grande atividade (ausência de transições), este pinçamento era então descartado e considerado como "morto" ou inativo (MARTINEZ - CABALLERO, 2003). Dentre todos os pinçamentos obtidos durante a realização deste estudo, cerca de 30% apresentaram-se como "canais mortos" ou sem atividade. Esta freqüência é bastante aceitável, tendo em vista que a maioria dos dados da literatura relatam também a obtenção de "canais mortos" em cerca de um terço de todos os pinçamentos analisados (~33%) (SZABÓ & ZORATTI, 1991; SZABÓ *et al.*, 1992).

/

Figura 31: Registros de corrente e respectivos histogramas de amplitude do PTP na ausência de drogas (controle)



Os histogramas de amplitude total foram obtidos a partir de registros de corrente de 30 a 60 s de duração e 0,2 pA de largura de banda. O sinal foi filtrado a 2 kHz e as amostras foram adquiridas a uma frequência de 5 kHz. O meio condutor de pinçamento e do microeletrodo continha tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, KCl 150 mmol. L⁻¹, Ca²⁺ 50 μmol. L⁻¹ e Pi 300 μmol. L⁻¹. **A**: Registro de corrente representativo do PTP quando este se encontrava aberto. **B**: Registro de corrente representativo do PTP quando este se encontrava fechado. Em ambos os casos, a condutância intrínseca do selo não foi descontada. Os registros são representativos de, pelo menos, 05 pinçamentos independentes.

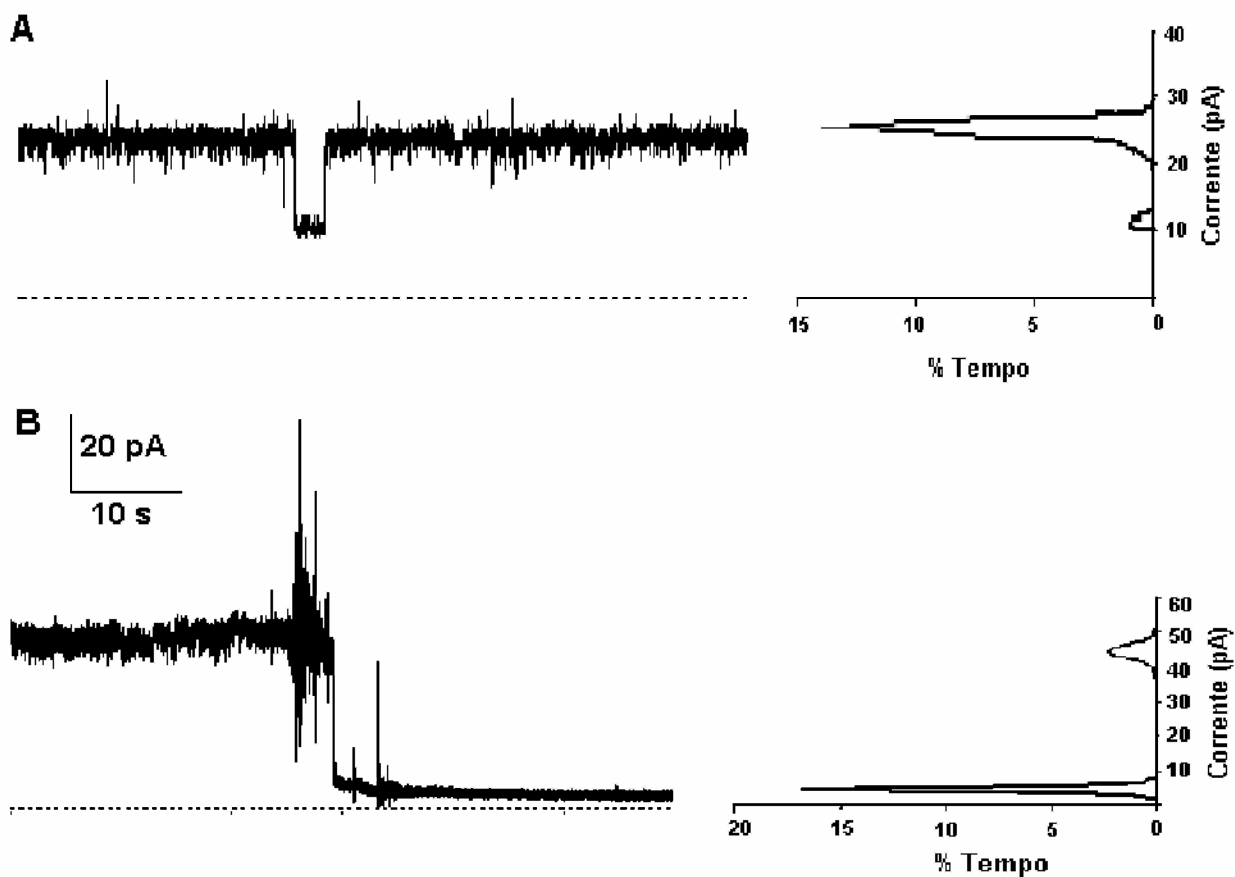
Após a caracterização eletrofisiológica do PTP, observada nas Figuras 29 a 31, procedeu-se então a avaliação dos efeitos do TRN e da CHX sobre a atividade deste canal.

5.13.2. Efeito do triclosan sobre a atividade e perfil eletrofisiológico do PTP

A Figura 32 mostra o efeito do TRN sobre o PTP. Nela podemos observar que antes da adição de TRN, o PTP mostrava-se aberto, com uma condutância de aproximadamente 1,2 nS (Figura 32A). No traçado representativo, pode-se observar uma grande transição (700 pS), a qual é bastante característica do PTP (SZABÓ *et al.*, 1992). Por outro lado, no momento da perfusão com meio idêntico ao usado para o pinçamento (KCl 150 mmol. L⁻¹, tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, Ca²⁺ 50 μ mol. L⁻¹ e Pi 300 μ mol. L⁻¹) suplementado com TRN 10 μ mol. L⁻¹, ocorre o fechamento total e imediato do PTP, observado pelo decréscimo na condutância, que atinge apenas 0,125 nS (Figura 32B). Considerando-se todos os pinçamentos utilizados para ensaios com TRN 10 μ mol. L⁻¹, a condutância média obtida foi de 1,132 \pm 0,183 nS (n = 4) antes da perfusão com TRN, diminuindo para 0,201 \pm 0,185 nS (n = 4) após a perfusão com este agente. O efeito da voltagem sobre a condutância do poro na presença de TRN foi avaliado pelas curvas de corrente -voltagem, obtidas pela varredura de voltagem, realizadas de forma contínua e progressiva, durante 40 segundos. Pode-se observar na Figura 33 que, uma vez fechado pela ação do TRN, o PTP não sofreu nenhuma variação em condutância em função da voltagem aplicada.

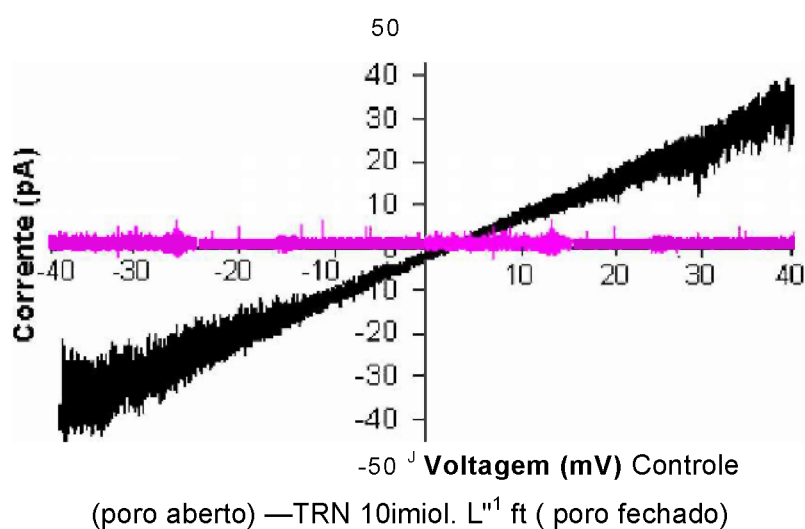
Além da concentração de 10 μ mol. L⁻¹, ainda foram utilizadas outras concentrações de TRN para se investigar qual a menor concentração deste agente capaz de inibir a formação do PTP. Os dados da Tabela V mostram que concentrações tão baixas quanto 500 nmol. L⁻¹ de TRN já fecham o PTP em 25% dos pinçamentos (n = 4). À medida que a concentração de TRN aumenta, a porcentagem de fechamentos também aumenta, chegando a 71% quando da utilização de TRN 25 μ mol. L⁻¹.

Figura 32: Efeito do triclosan sobre o PTP



Os histogramas de amplitude total foram obtidos a partir de registros de corrente de 30 a 60 s de duração e 0,2 pA de largura de banda. O sinal foi filtrado a 2 kHz e as amostras foram adquiridas a uma frequência de 5 kHz. O meio condutor de pinçamento e do microeletrodo continha tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, KCl 150 mmol. L⁻¹, Ca²⁺ 50 μmol. L⁻¹ e Pi 300 μmol. L⁻¹. **A**: Registro de corrente representativo do PTP quando este se encontrava aberto. **B**: Registro de corrente representativo do PTP, mostrando o momento da perfusão com meio idêntico ao do pinçamento suplementado com TRN 10 μmol. L⁻¹ e o fechamento do PTP. Em ambos os casos, a condutância intrínseca do selo não foi descontada. Os registros são representativos de 04 pinçamentos independentes.

Figura 33: Relação corrente - voltagem na atividade do PTP em presença de triclosan



Curva de intensidade de voltagem dos pinçamentos separados de proteolipossomos contendo MMI e PTP. Os valores de corrente a cada voltagem foram obtidos variando-se a voltagem de maneira progressiva, durante 40 s, nas mesmas condições descritas para a Figura 30. As curvas são representativas de 04 experimentos independentes.

Tabela V: Relação entre a concentração de triclosan utilizada e o fechamento do PTP

TRN	Fechamento	Ausência de fechamento	N. total de pinçamentos
50nmol.L ⁻¹	-	100%	n=1
250n mol.L ⁻¹		100%	n=1
500n mol.L ⁻¹	25%	75%	n=4
2.5 M mol.L ⁻¹	50%	50%	n=5
5 M mol.L ⁻¹	80%	20%	n=5
10 M mol.L ⁻¹	50%	50%	n=6
25 M mol.L ⁻¹	71%	29%	n=7

n = número de pinçamentos independentes analisados para cada concentração

Os resultados apresentados nas Figuras 25 e 26 mostram que o mecanismo pelo qual o TRN inibe a MPT é via fechamento do PTP, o que foi comprovado através dos dados mostrados nas Figuras 32 e 33. Porém, o mecanismo pelo qual o TRN leva ao fechamento do PTP não foi esclarecido. É possível que ocorra uma interação do agente com as proteínas formadoras do poro, gerando uma instabilidade conformacional, ocasionando seu fechamento.

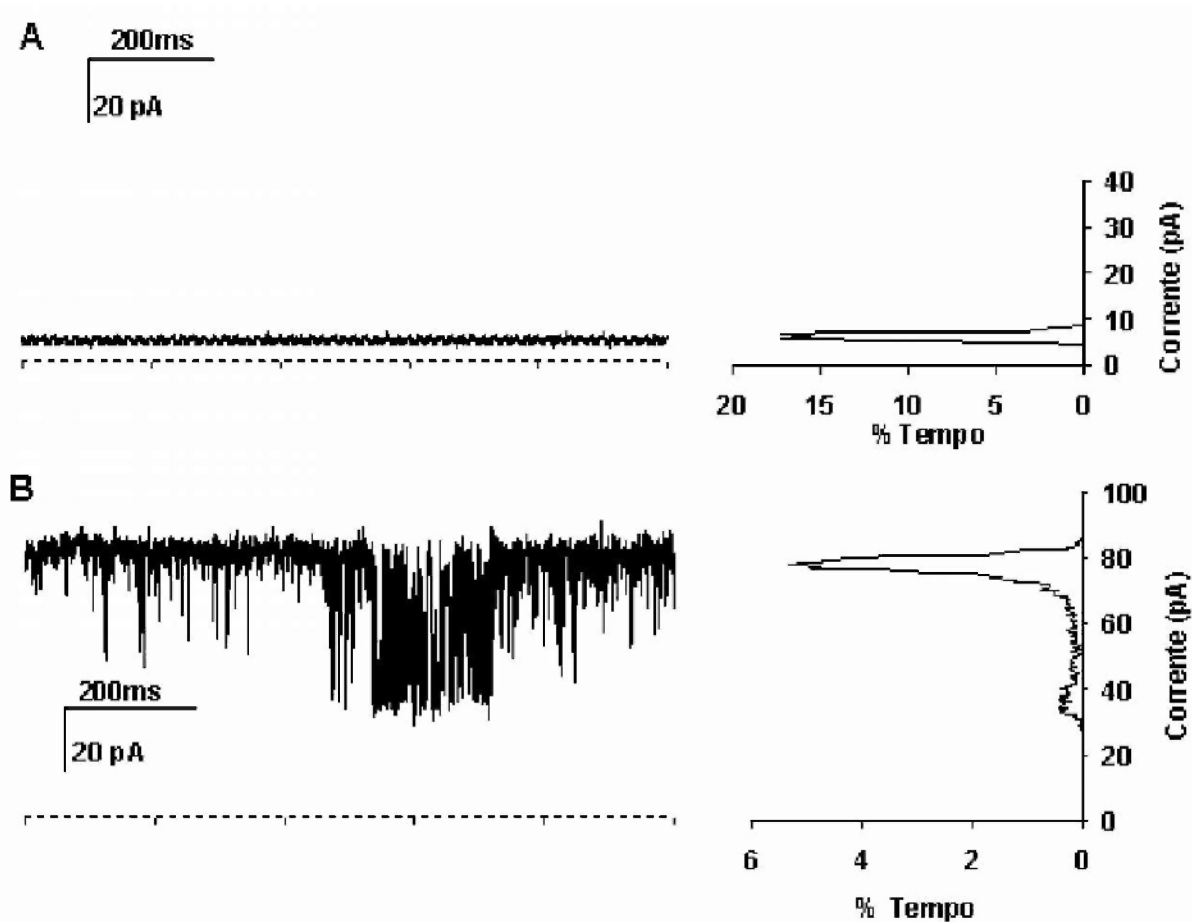
Em paralelo aos ensaios envolvendo interação do PTP com o TRN, foram realizados experimentos avaliando a interação do poro com a CHX.

5.13.3. Efeito da clorexidine sobre a atividade e perfil eletrofisiológico do PTP

Resultados prévios obtidos com a CHX (NEWTON *et al.*, 2004) já apontavam para sua interação com o PTP, visto que a indução da MPT por este agente era inibida por doses sub-micromolares de CsA, um agente inibidor altamente específico do PTP (BAINES *et al.*, 2005; NAKAGAVA *et al.*, 2005).

A Figura 34 mostra o efeito da CHX sobre o PTP. Nela podemos observar que antes da adição de CHX, o PTP mostrava-se fechado, com uma condutância de aproximadamente 0,13 nS (Figura 34A). Por outro lado, no momento da perfusão com meio idêntico ao usado para o pinçamento (tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, KCl 150 mmol. L⁻¹, Ca²⁺ 50 μmol. L⁻¹ e Pi 300 μmol. L⁻¹) suplementado com CHX 2,5 μmol. L⁻¹, ocorre a abertura total do PTP, observada pelo aumento na condutância, que atinge 1,97 nS (Figura 34B). Considerando-se todos os pinçamentos utilizados para ensaios com CHX 2,5 μmol. L⁻¹, a condutância média obtida foi de 0,108 ± 0,076 nS (n = 6) antes da perfusão com CHX, aumentando para 1,592 ± 0,515 nS (n = 6) após a perfusão com este agente.

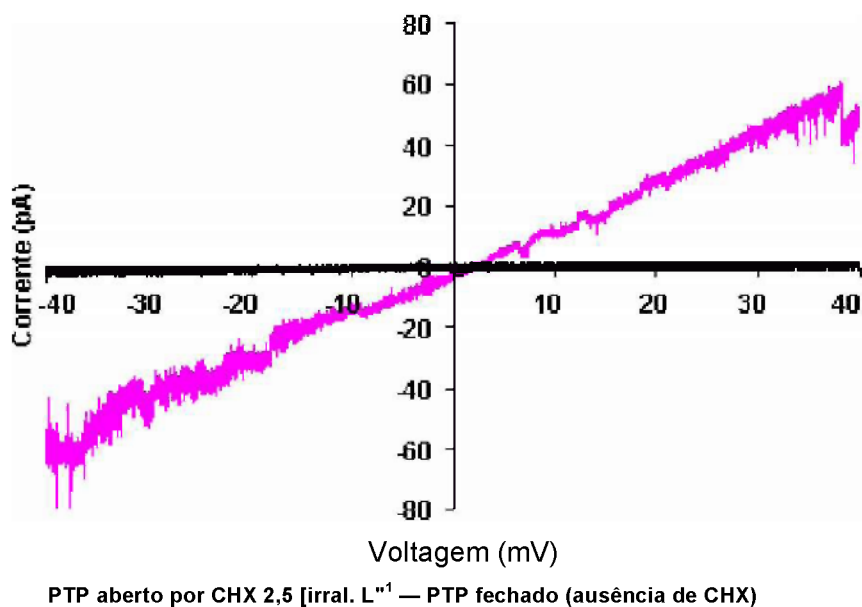
Figura 34: Efeito da clorexidine sobre o PTP



Os histogramas de amplitude total foram obtidos a partir de registros de corrente de 30 a 60 s de duração e 0,2 pA de largura de banda. O sinal foi filtrado a 2 kHz e as amostras foram adquiridas a uma frequência de 5 kHz. O meio condutor de pinçamento e do microeletrodo continha tampão HEPES 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4, KCl 150 mmol. L⁻¹, Ca²⁺ 50 μ mol. L⁻¹ e Pi 300 μ mol. L⁻¹. **A**: Registro de corrente representativo do PTP quando este se encontrava fechado. **B**: Registro de corrente representativo do PTP, após perfusão com meio idêntico ao do pinçamento suplementado com CHX 2,5 μ mol. L⁻¹, mostrando o PTP aberto. Em ambos os casos, a condutância intrínseca do selo não foi descontada. Os registros são representativos de 06 pinçamentos independentes.

O efeito da voltagem sobre a condutância do poro na presença de CHX foi avaliado pelas curvas de corrente-voltagem, obtidas pela varredura de voltagem, realizadas de forma contínua e progressiva, durante 40 segundos. Pode-se observar na Figura 35 que, uma vez aberto pela ação da CHX, o PTP não sofreu nenhuma variação em condutância em função da voltagem aplicada.

Figura 35: Relação corrente - voltagem na atividade do PTP em presença de clorexidine

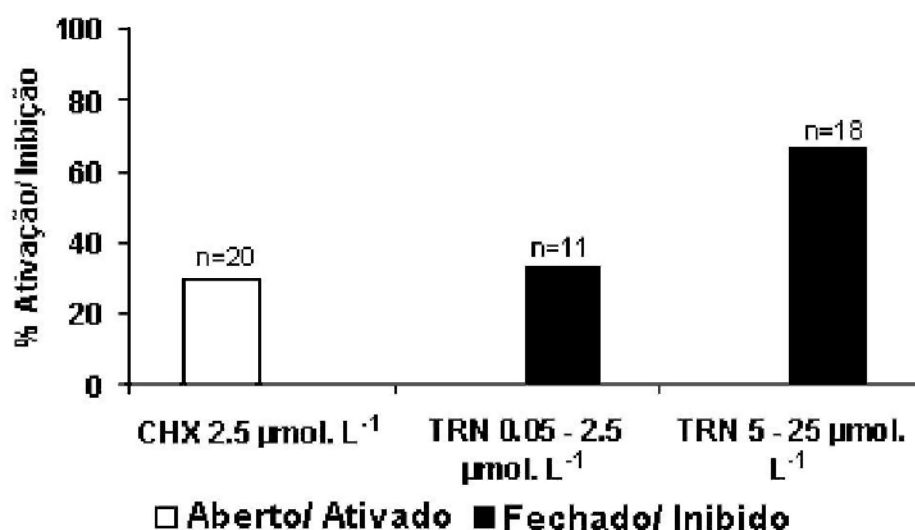


Curva de intensidade de voltagem dos pinçamentos separados de proteolipossomos contendo MMI e PTP. Os valores de corrente a cada voltagem foram obtidos variando-se a voltagem de maneira progressiva, durante 40 s, nas mesmas condições descritas para a Figura 30. As curvas são representativas de 6 experimentos independentes.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 34 e 35, pôde ser demonstrada de forma mais específica a interação da CHX com o PTP, levando à abertura do poro, o que já havia sido sugerido anteriormente (NEWTON *et al.*, 2004). Porém, estes resultados ainda não permitem a elaboração de uma hipótese sugerindo o mecanismo em nível molecular pelo qual a CHX ocasiona tal abertura ou mesmo se este agente interage com as proteínas do poro, levando à sua abertura. Porém, os resultados mostram de forma inequívoca a desestabilização da conformação de estado fechado do poro, conseqüente da interação da CHX com proteínas formadoras do PTP, o que ocasionaria a sua abertura.

Considerados em conjunto, os resultados obtidos com estudos de eletrofisiologia podem ser demonstrados na Figura 36. Nela, pode-se observar que a CHX ($2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$) foi capaz de ativar ou abrir o PTP em 30% dos pinçamentos analisados ($n = 20$). Por outro lado, o TRN foi capaz de fechar ou inibir o PTP em 33,3% dos pinçamentos analisados, quando foi usado em faixa de concentração entre $0,05$ e $2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e em ~67% dos pinçamentos, quando foi usado em faixa de concentração entre 5 e $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$.

Figura 36: Resumo dos resultados de eletrofisiologia



Resultados obtidos nos estudos de eletrofisiologia agrupados em faixas de concentração, para melhor visualização. n = número de pinçamentos independentes.

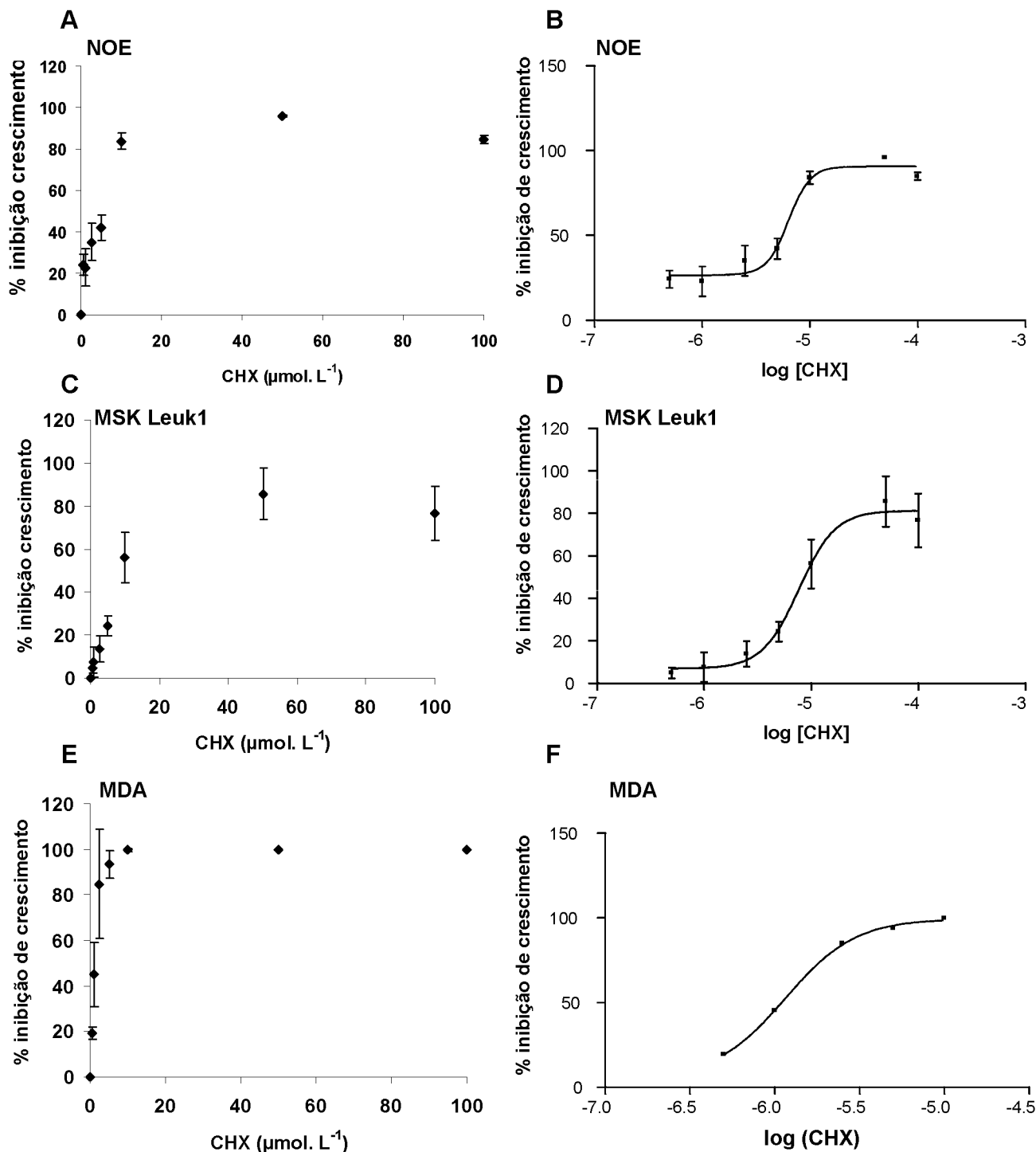
Considerando-se que os compostos em estudo, TRN e CHX, são agentes antissépticos utilizados principalmente no combate à placa dental, a avaliação de seus efeitos diretamente sobre células do epitélio oral seria de grande importância. Portanto, concomitantemente aos ensaios de eletrofisiologia, também foram desenvolvidos estudos envolvendo cultivo de células do epitélio bucal.

5.14. Efeito do triclosan e da clorexidina sobre células do epitélio bucal

A fim de avaliar o efeito direto da CHX e do TRN sobre as células do epitélio bucal, foram desenvolvidos ensaios para determinação da DL_{50} destes agentes em três linhagens celulares estudadas. Estas foram: células NOE (linhagem normal), MSK Leuk1 (linhagem pré-maligna), e MDA (linhagem maligna). As análises foram realizadas por microscopia de fluorescência e de lapso de tempo. Foram também determinados os efeitos do TRN e da CHX sobre o crescimento celular.

A Figura 37 mostra o efeito de diferentes concentrações de CHX sobre o crescimento celular. Nestes experimentos, foi utilizada uma faixa de concentração entre 0,5 e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de CHX. Pode-se observar na Figura 37A que baixas concentrações (0,5 a 5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) foram suficientes para causar uma intensa inibição do crescimento celular de células NOE, aproximando-se de 100% de inibição na concentração de 10 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. A DL_{50} calculada para a CHX para esta linhagem normal foi estabelecida em 6,37 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 37B), que é muito inferior àquela utilizada na prática odontológica (faixa de 1 mmol. L^{-1}). Para as linhagens pré-maligna MSK Leuk1 (Figuras 37C) e maligna MDA (Figuras 37E), o mesmo perfil de inibição de crescimento foi observado, sendo os valores de DL_{50} para estas linhagens estabelecidos em 7,72 (Figura 37D) e 1,16 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 37F), respectivamente. Assim, os efeitos citotóxicos da CHX exercidos nas células do epitélio oral foram mais intensos na linhagem maligna, a qual mostrou o menor valor de DL_{50} .

Figura 37: Determinação da DL₅₀ da CHX para as células do epitélio oral



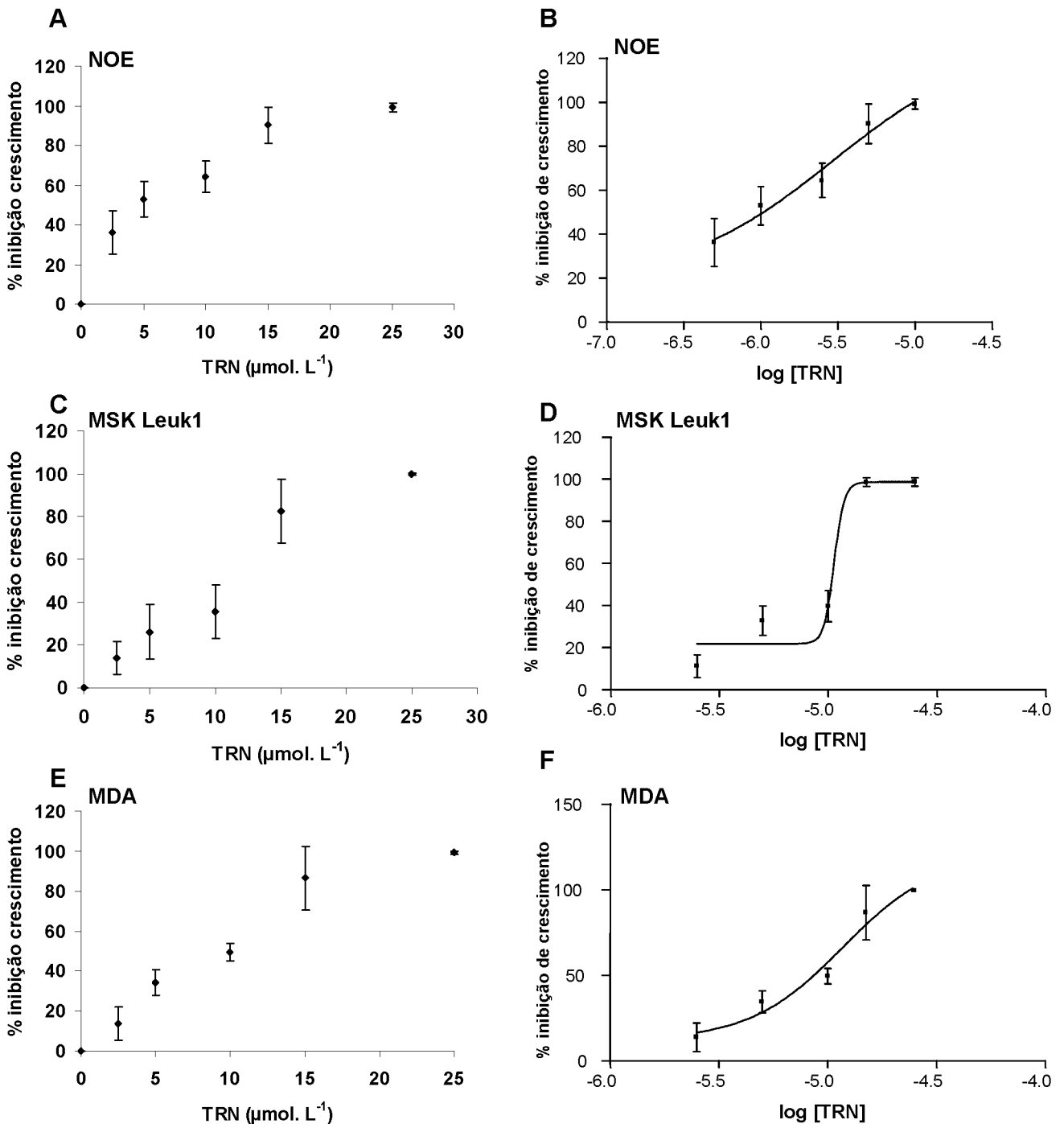
O crescimento celular foi avaliado pelo ensaio do azul de metileno, após 24h de incubação com CHX, nas concentrações indicadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.7.2.). Resultados expressos como md ± dp (n = 3). **A**, **C** e **E** representam as porcentagens de inibição do crescimento em presença de CHX, comparadas aos controles das células NOE, MSK Leuk1 e MDA, respectivamente. **B**, **D** e **F** representam os gráficos obtidos após análise dos dados, pelo programa *GraphPad*, o qual permitiu a determinação da DL₅₀ da CHX para as três linhagens celulares analisadas, sendo 6,37 (**B**); 7,72 (**D**) e 1,16 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (**F**), para as células NOE, MSK Leuk1 e MDA, respectivamente.

Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, onde vários trabalhos suportam o fato de que a CHX afeta a proliferação celular. Utilizando a mesma metodologia deste estudo (ensaio do azul de metileno), LUCAROTTI *et al.* (1990) encontraram 100% de citotoxicidade da CHX (0,0005%) quando fibroblastos humanos foram expostos a este agente durante 24 horas. A citotoxicidade da CHX sobre fibroblastos humanos após 1, 24 e 72 horas também foi reportada por BABICH *et al.* (1995), os quais usaram o corante supravital vermelho neutro. Mais recentemente, os resultados obtidos por MARIOTTI & RUMPF (1999) sugeriram que a CHX, por curtos períodos de tempo (1, 5 e 15 minutos), reduz a proliferação celular de forma dose-dependente.

O efeito do TRN sobre o crescimento de células do epitélio bucal está apresentado na Figura 38. Pode-se observar que este agente também exerce efeitos citotóxicos significativos sobre estas células. Entretanto, comparando-se os efeitos observados sobre as diferentes linhagens estudadas, observa-se que o TRN apresenta efeito oposto àquele exercido pela CHX. Ou seja, os efeitos do TRN são mais pronunciados sobre células da linhagem normal (Figura 38A), com uma DL_{50} de $2,93 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 38B), e menos pronunciados sobre as linhagens pré-maligna (Figura 38C) e maligna (Figura 38E), com DL_{50} de $10,70$ e $11,70 \mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente (Figuras 38D e 38F, respectivamente). Considerando que as concentrações utilizadas na prática odontológica para este agente situam-se na faixa de milimolar, pode-se supor que os efeitos observados seriam mais pronunciados e, provavelmente, seriam alcançados em menor tempo. É importante se ressaltar o papel do tempo de incubação neste tipo de ensaio. No presente estudo, os compostos foram incubados por 24h. Este tempo não é excessivo, quando se considera que tais agentes apresentam tempo de retenção na cavidade oral de várias horas (NETUSCHIL *et al.*, 1989; LORENZ *et al.*, 2002). Além disso, a utilização de ambos os agentes é feita em doses repetidas e por períodos de tempo de tratamento prolongado, muitas vezes durando cerca de 15 a 20 dias consecutivos (NETUSCHIL *et al.*, 2003). Assim, a incubação destas células por um período de 24h não representa uma superestimativa dos efeitos, devido à real

superexposição das células da cavidade bucal aos agentes citotóxicos. De fato, mudanças freqüentes do meio de cultura poderiam levar a danos celulares independentes do efeito dos agentes avaliados (xenobióticos), visto que agentes sinalizadores celulares podem ser encontrados no meio de cultura, e sua troca freqüente eliminaria tais produtos, o que levaria, por fim, ao sofrimento celular e a avaliações incorretas quanto ao real efeito dos xenobióticos em estudo.

Figura 38: Determinação da DL₅₀ do TRN para as células do epitélio oral



O crescimento celular foi avaliado pelo ensaio do azul de metileno, após 24h de incubação com TRN, nas concentrações indicadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.7.2.). Resultados expressos como $md \pm dp$ ($n = 3$). **A**, **C** e **E** representam as porcentagens de inibição do crescimento em presença de TRN, comparadas aos controles das células NOE, MSK Leuk1 e MDA, respectivamente. **B**, **D** e **F** representam os gráficos obtidos após análise dos dados, pelo programa *GraphPad*, o qual permitiu a determinação da DL₅₀ do TRN para as três linhagens celulares analisadas, sendo 2,93 (**B**); 10,70 (**D**) e 11,70 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (**F**), para as células NOE, MSK Leuk1 e MDA, respectivamente.

5.15. Efeito do triclosan e da clorexidine sobre mitocôndrias e material nuclear de células NOE, MSK Leuk1 e MDA: Microscopia de fluorescência

Com a finalidade de avaliar o efeito dos compostos em estudo sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) *in situ* bem como suas eventuais ações nucleares, as células do epitélio bucal foram tratadas e preparadas para análise por microscopia de fluorescência com as sondas Rodamina 123 e Hoechst 33342.

A Rodamina 123 (Rho123) é um corante lipofílico catiônico fluorescente que se distribui no compartimento mitocondrial em função do $\Delta\psi$ de acordo com a equação de Nernst, emitindo fluorescência vermelha, medida na região de 530 nm, que é proporcional à quantidade absoluta de Rho123. Assim, a redução na fluorescência está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna (LECOUER *et al.*, 2004; SARIS *et al.*, 2004).

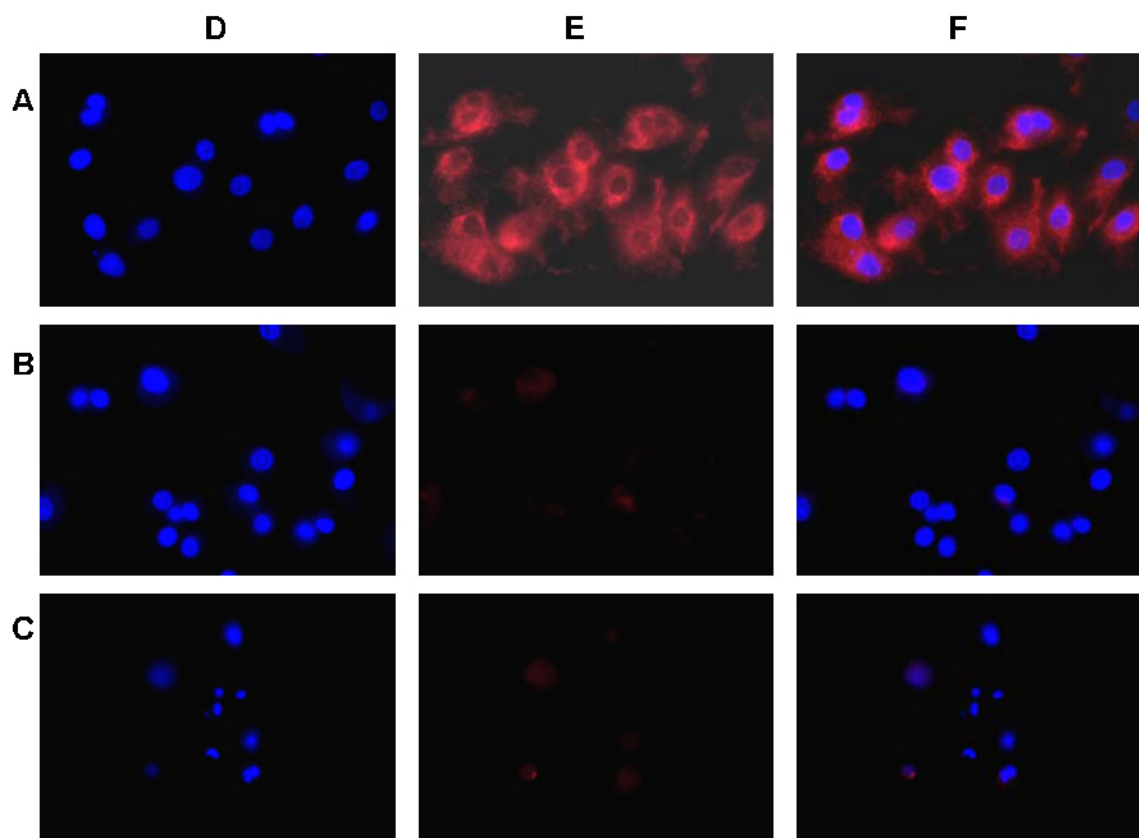
O corante Hoechst, por sua vez, é um corante tipo bis-benzimidazol, o qual se liga ao DNA. Pode se apresentar sob duas formas: Hoechst 33342 ou 33258. O primeiro possui fórmula estrutural mais lipofílica que a do segundo e, portanto, pode atravessar mais facilmente membranas lipídicas e chegar ao núcleo. O segundo pode apenas penetrar em células que foram previamente fixadas e permeabilizadas por ação de um detergente. Este corante forma ligações não covalentes com pares de base, preferencialmente com A - T. No entanto, não deve ser considerado um agente intercalante, visto que causa distorções mínimas na hélice do DNA. Por estas características, o uso deste corante pode auxiliar na quantificação e localização do material genético celular (DEJEAN *et al.*, 2005).

O efeito da incubação das células do epitélio bucal com CHX (10^{-10} mol. L⁻¹) e TRN (25^{-10} mol. L⁻¹) está mostrado nas Figuras 39 - 41. Pode-se notar a partir destes resultados que o perfil de atuação da CHX e do TRN foi semelhante nas três linhagens celulares estudadas. Ou seja, ambos os agentes causaram diminuição da fluorescência em presença de Rodamina 123 (Figuras 39, 40 e 41B e C, colunas E) em relação ao controle.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em experimentos prévios desenvolvidos neste Laboratório (NEWTON *et al.*, 2005), bem como dados da literatura (CHRISTENSEN *et al.*, 1975), que já apontavam o TRN e a CHX como agentes desacopladores, a partir de ensaios com mitocôndrias isoladas. Também foram observadas alterações no padrão de fluorescência nas células coradas com Hoechst (Figuras 39, 40 e 41B e C, colunas D), caracterizando a diminuição do tamanho nuclear. Deve-se notar que o efeito do TRN foi menos pronunciado na linhagem maligna, observado pela presença de maior número de células (Figura 41C), o que está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de azul de metileno, onde este agente mostrou requerer a maior concentração para a DL₅₀ nesta linhagem celular (TRN DL₅₀= 11,70 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, comparados a 2,93 e 10,70 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para as linhagens normal e pré maligna, respectivamente).

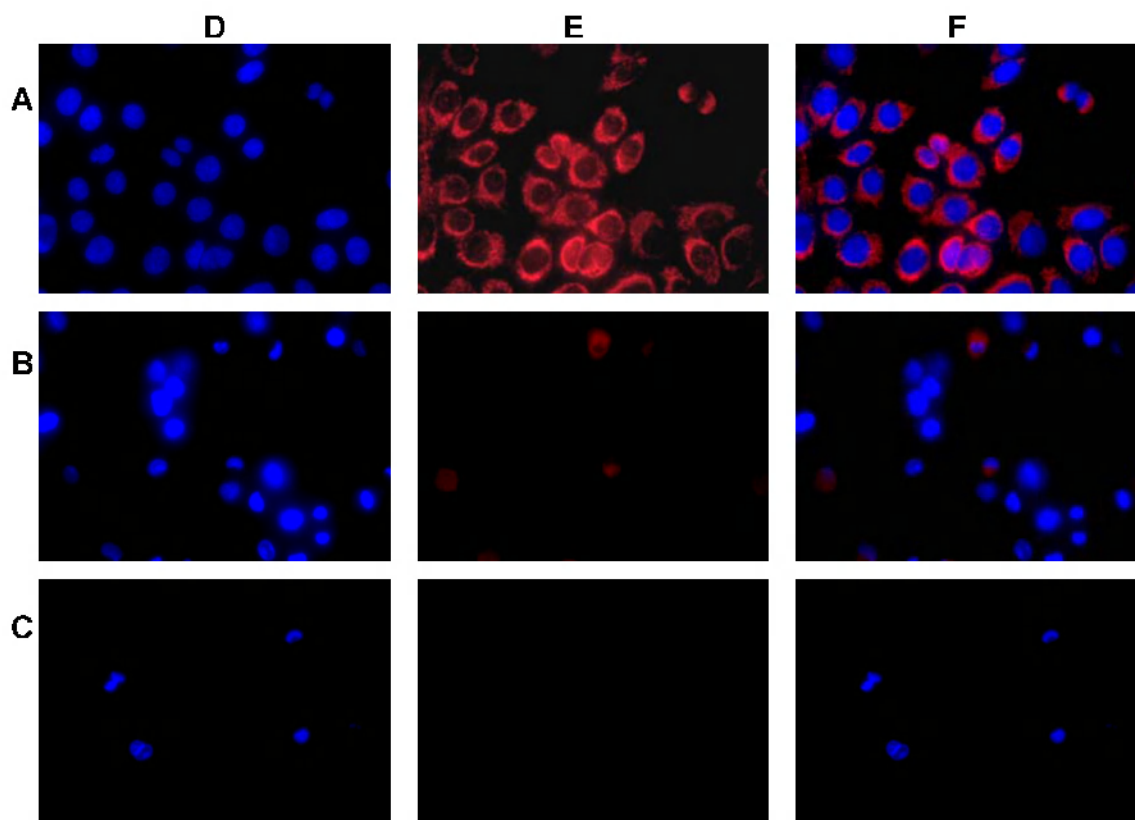
Vale destacar que outros autores já sugeriam que o efeito citotóxico da CHX provavelmente seria através de dano mitocondrial (HIDALGO & DOMINGUES, 2001), bem como já podem ser encontrados dados na literatura mostrando o efeito do TRN na morte celular por apoptose (ZUCKERBRAUN *et al.*, 1998).

Figura 39: Efeitos do triclosan e da clorexidine sobre núcleo e mitocôndrias de células de epitélio oral – linhagem normal (NOE)



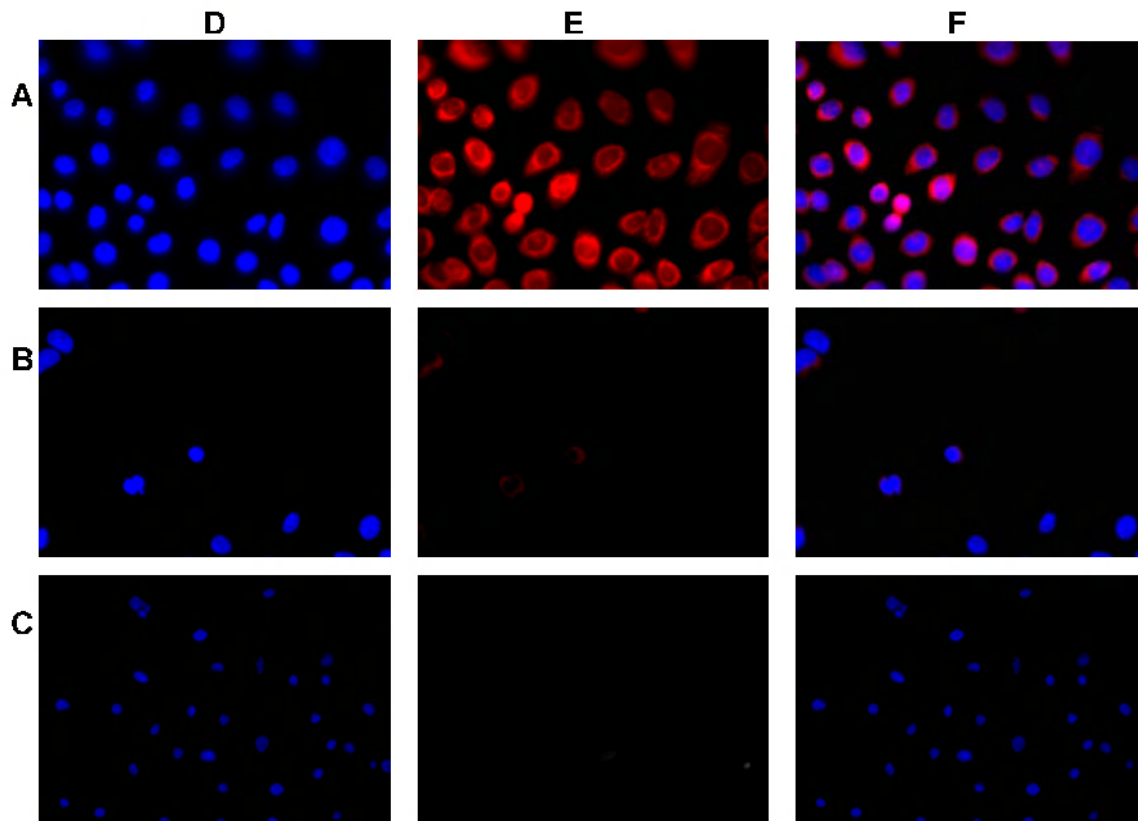
As células foram crescidas em meio KGM (controle [A]) em presença de CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (C) durante 24h e coradas com Rodamina 123 e Hoechst, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.3.). As imagens foram obtidas utilizando microscópio Nikon Eclipse TE300 equipado com epifluorescência e "shutters" Uniblitz (aumento de 400x). As colunas D, E e F correspondem, respectivamente, à coloração Hoechst, Rodamina 123 e a superposição de ambas as colorações.

Figura 40: Efeitos do TRN e da CHX sobre núcleo e mitocôndrias de células de epitélio oral – linhagem pré-maligna (MSK Leuk1)



As células foram crescidas em meio KGM (controle [A]) em presença de CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (C) durante 24h e coradas com Rodamina 123 e Hoechst, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.3.). As imagens foram obtidas utilizando microscópio Nikon Eclipse TE300 equipado com epifluorescência e "shutters" Uniblitz (aumento de 400x). As colunas D, E e F correspondem, respectivamente, à coloração Hoechst, Rodamina 123 e a superposição de ambas as colorações.

Figura 41: Efeitos do TRN e da CHX sobre núcleo e mitocôndrias de células de epitélio oral – linhagem maligna (MDA)



As células foram crescidas em meio KGM (controle [A]) em presença de CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (C) durante 24h e coradas com Rodamina 123 e Hoechst, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.3.). As imagens foram obtidas utilizando microscópio Nikon Eclipse TE300 equipado com epifluorescência e "shutters" Uniblitz (aumento de 400x). As colunas D, E e F correspondem, respectivamente, à coloração Hoechst, Rodamina 123 e a superposição de ambas as colorações.

5.16. Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células NOE, MSK Leuk1 e MDA:

Microscopia de lapso de tempo

Para verificar os efeitos da CHX e do TRN em células do epitélio oral em tempo real, foram realizadas análises por microscopia de lapso de tempo. Tal técnica permite a tomada de imagens em diferentes intervalos de tempo, mostrando as células vivas interagindo entre si, evidenciando as possíveis modificações causadas pela adição de xenobióticos adicionados ao meio de cultura. Após a união de todas as imagens capturadas, sua visualização em seqüência permite a montagem de um filme, mostrando o comportamento celular em tempo real. Desta forma, os efeitos observados por métodos também utilizados neste estudo (determinação de DL₅₀, microscopia de fluorescência) podem ser mais detalhadamente analisados. Os resultados obtidos nestes experimentos estão mostrados nas Figuras 42 -44. As fotos apresentadas correspondem às imagens tomadas nos tempos de zero, 6, 12 e 24h (colunas D, E, F e G, respectivamente), dos ensaios de microscopia de lapso de tempo, realizados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.4.).

Inicialmente, os ensaios de lapso de tempo foram ajustados para a captação de imagens a cada 10 minutos. Entretanto, a incubação com as drogas em estudo levava, neste intervalo de tempo, a alterações muito severas na morfologia celular, tornando necessário um novo ajuste para a captura de imagens a cada 5 minutos. O aumento da freqüência de abertura do *shutter*, e conseqüente aumento de exposição celular aos efeitos da luz não causaram dano celular, como observado pela similaridade das células não expostas à luz (fora do campo de visão). Ou seja, na ausência de drogas (controles), as células presentes fora do campo de exposição à luz apresentavam características semelhantes às das células expostas à luz. Da mesma forma, em presença de drogas (testes), a morte celular observada também ocorreu nas células não expostas à luz, confirmando ser este um efeito da droga em estudo, e não da exposição à luz.

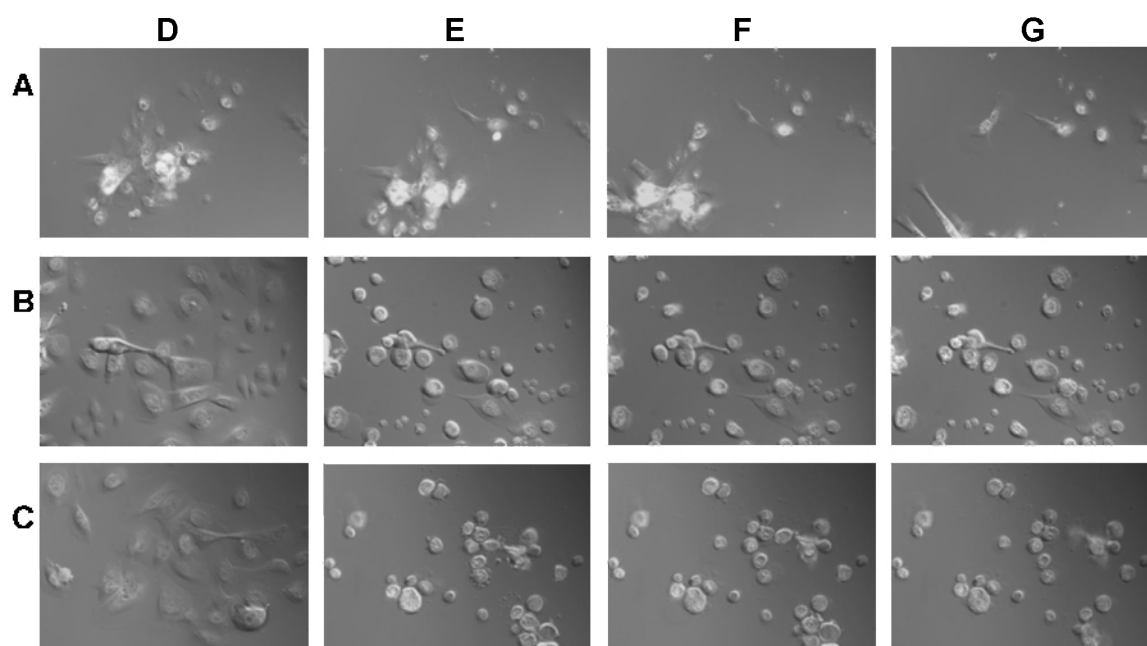
Entretanto, deve-se ressaltar que as células normais em todos os ensaios de lapso de tempo realizados na ausência de droga, apresentaram um tropismo negativo em relação

ao campo de visão e migraram para fora do campo observado, chegando a não ser possível sua observação no campo fixo ao final do tempo de 24h. Isso pode ser visualizado na Figura 42A, coluna G. Na presença dos compostos em estudo, tal tropismo não foi observado, provavelmente porque a ação citotóxica da CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 42B) e do TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (Figura 42C) já havia causado danos celulares irreversíveis, não permitindo a migração. De fato, os efeitos citotóxicos destes agentes mostraram-se bastante intensos mesmo nos tempos iniciais dos experimentos (dados não mostrados), chegando ao efeito máximo (morte celular de todas as células do campo em observação) em 6h (Figura 42B e C, coluna E).

Nos experimentos com as linhagens pré-maligna (Figura 43) e maligna (Figura 44), pode-se observar que os controles (Figuras 43A e 44A) apresentam perfil de crescimento normal, sendo levemente mais acelerado nas células MSK Leuk1, observado pelo maior confluência atingida após 24h (Figura 43A, coluna G), quando comparado às células MDA (Figura 44A, coluna G). Diferentemente das células normais, o tropismo negativo frente à luz não foi observado nestas duas linhagens estabelecidas. Contudo, semelhantemente às células NOE, os efeitos citotóxicos dos compostos estudados (TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$) sobre as duas linhagens estabelecidas foram também observados em tempos precoces, desde o início dos experimentos (dados não mostrados), chegando ao efeito máximo em 6h (Figuras 43B, 43C, 44B, 44C, colunas E - G).

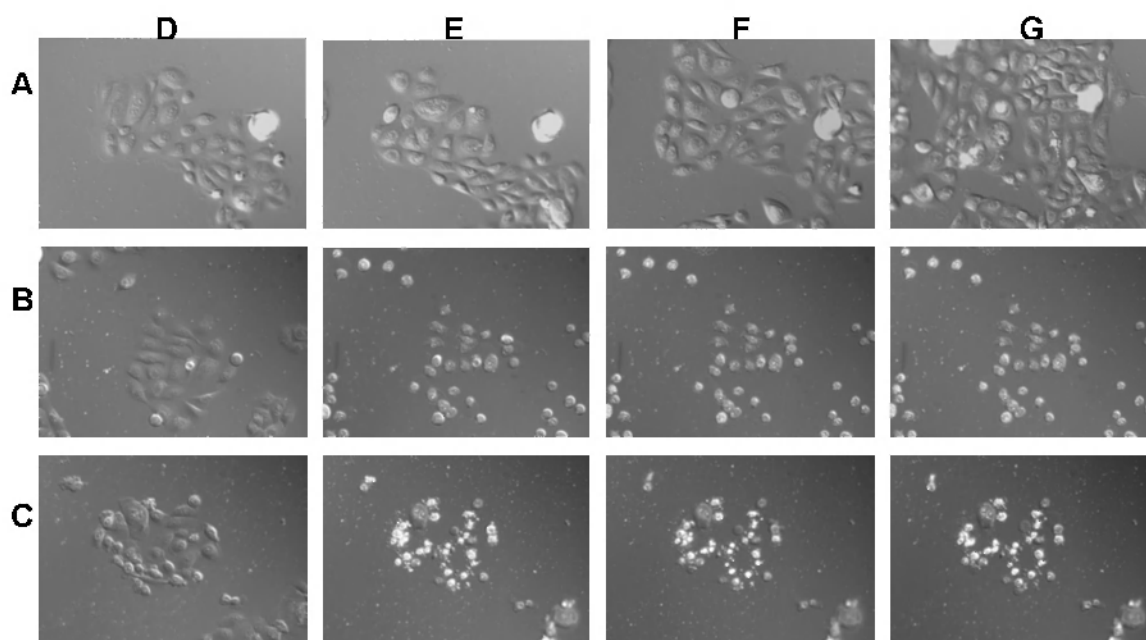
Estes resultados confirmaram aqueles obtidos com microscopia de fluorescência; além do desacoplamento mitocondrial (resultados com Rodamina 123), o efeito citotóxico do TRN e da CHX seria alcançado por indução de apoptose celular, como observado pela diminuição de tamanho nuclear através da coloração de Hoechst (Figuras 39 - 41). Os resultados apresentados nas Figuras 42 - 44, em presença de TRN e CHX mostram a formação de protuberâncias da membrana plasmática, uma das características marcante deste processo biológico. Os filmes realizados nestes ensaios de microscopia de lapso de tempo podem ser visualizados por completo no CD que acompanha esta tese.

Figura 42: Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células NOE



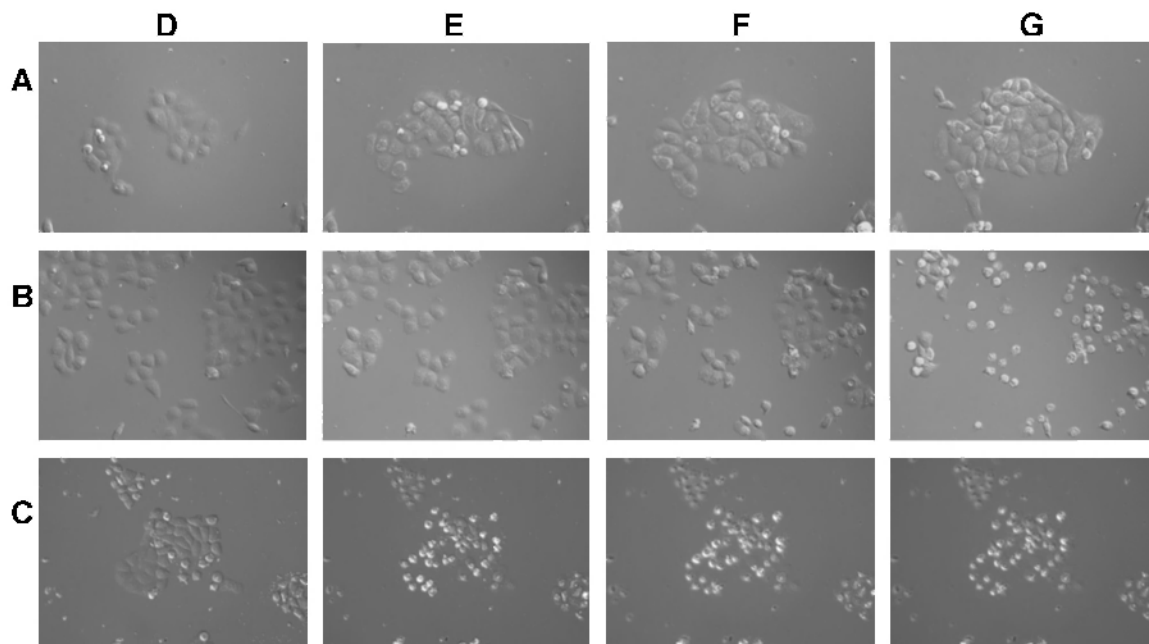
As células NOE foram crescidas em meio KGM (controle [A]), em presença de CHX $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (C). As colunas D, E, F e G correspondem às imagens tomadas nos tempos de zero, 6, 12 e 24h, dos ensaios de microscopia de lapso de tempo, realizados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.4.). Aumento de 200x.

Figura 43: Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células MSK Leuk1



As células MSK Leuk1 foram crescidas em meio KGM (controle [A]), em presença de CHX 10 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (C). As colunas D, E, F e G correspondem às imagens tomadas nos tempos de zero, 6, 12 e 24h, dos ensaios de microscopia de lapso de tempo, realizados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.4.). Aumento de 200x.

Figura 44: Efeito do triclosan e da clorexidine sobre células MDA



As células MDA 886Ln foram crescidas em meio KGM (controle [A]), em presença de CHX 10 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) ou TRN 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (C). As colunas D, E, F e G correspondem às imagens tomadas nos tempos de zero, 6, 12 e 24h, dos ensaios de microscopia de lapso de tempo, realizados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.3.4.). Aumento de 200x.

Assim, a citotoxicidade detectada com o TRN e a CHX sobre células do epitélio bucal estão em concordância com os estudos utilizando mitocôndrias isoladas, em que causaram drástica redução no consumo de oxigênio (Figuras 10 e 11), inibição das enzimas relacionadas com o transporte de elétrons (Tabela IV), da atividade ATPásica (Figura 13) e do potencial de membrana (Figura 14).

5.17. Ensaios de interação com materiais restauradores odontológicos

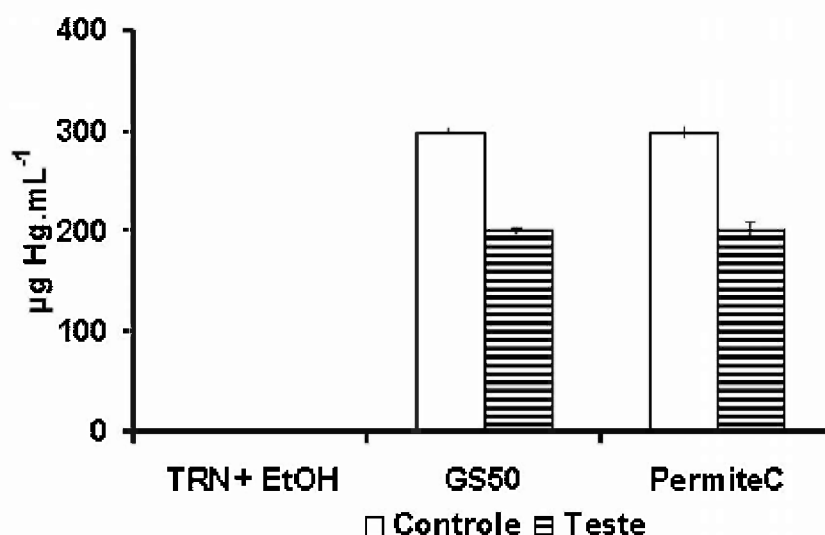
Os resultados até aqui obtidos demonstraram que o TRN e a CHX podem causar efeitos deletérios diretos sobre células e organelas. Entretanto, a possibilidade de que estes agentes pudessem interagir com materiais dentários e desta forma contribuir com efeitos indiretos, não poderia ser descartada. De fato, NEWTON (2002) avaliando possíveis interações entre agentes antimicrobianos (CHX) e materiais restauradores odontológicos, verificou-se o aumento da liberação de Hg de amálgama, tanto a partir de corpos de prova (avaliação *in vitro*) como na saliva de indivíduos portadores deste tipo de restauração (avaliação *in vivo*). Com a finalidade de avaliar se o TRN também promoveria tal efeito, corpos de prova de amálgama foram confeccionados e expostos ao TRN. Adicionalmente, foram desenvolvidos ensaios para avaliar a possibilidade de interação do TRN ou da CHX com resinas compostas, tendo em vista o grande aumento do uso destes materiais restauradores estéticos.

5.17.1. Interação "*in vitro*" do triclosan com corpos de prova de amálgama dental

Fatores químicos, mecânicos e eletroquímicos estão envolvidos nas interações do amálgama com o ambiente bucal (MAREK, 1992). Como resultado destas interações, componentes da liga metálica são continuamente liberados para o meio bucal, particularmente o mercúrio, trazendo importantes conseqüências para os pacientes (APOSHIAN *et al.*, 1992; MAREK, 1992). Em adição a estes mecanismos, a introdução de substâncias que modifiquem as propriedades do fluido oral, mesmo que transitoriamente, podem atuar de forma isolada e/ou em sinergismo, exacerbando a liberação dos componentes do amálgama, como foi descrito para os clareadores a base de peróxidos (ROTSTEIN *et al.*, 2000).

Como já comentado, os resultados previamente obtidos mostraram que a CHX promove acentuada liberação de Hg de amálgama dental, tanto *in vitro* (a partir de corpos de prova deste material) quanto *in vivo* (a partir de amostras de saliva coletada de doadores voluntários) (NEWTON, 2002). Portanto, avaliou-se a possibilidade de o TRN também ser capaz de liberar Hg de amálgama dental. Os dados apresentados na Figura 45 mostram que o TRN não estimula a liberação de Hg de corpos de prova de amálgama dental, ao contrário do que ocorre com a CHX.

Figura 45: Efeito do triclosan na liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama



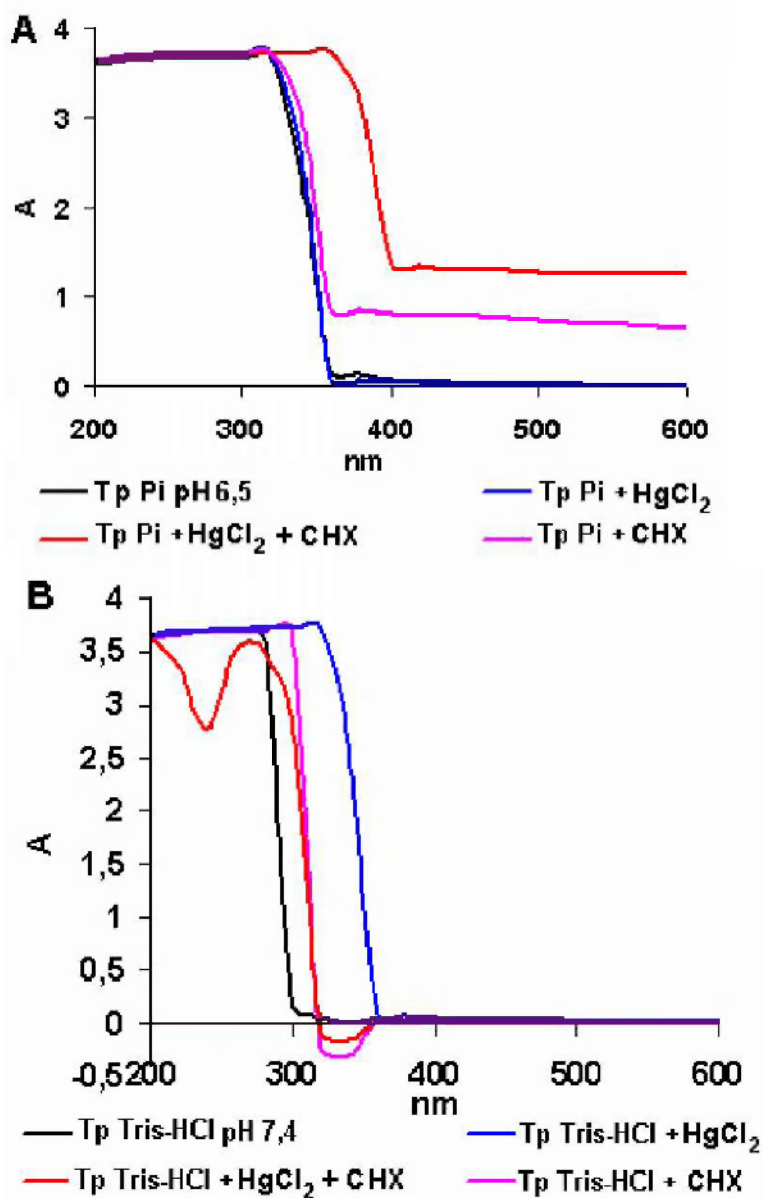
Corpos de prova de amálgama das diferentes marcas foram incubados por 24h a 37°C com tampão fosfato pH 6,5 (controle) ou do mesmo tampão na presença de TRN a 0,3% (teste). O Hg foi dosado como descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.4.1.2.). Resultados representam md ± dp de valores obtidos a partir de 06 corpos de prova de amálgama dental.

5.17.2. Espectro de absorção da clorexidine em presença de HgCl₂

A fim de confirmar os efeitos da CHX, aumentando a liberação de Hg de corpos de prova de amálgama dental (NEWTON, 2002), foram realizados espectros de absorção UV/VIS para avaliar a possível interação entre CHX e Hg²⁺. Para isso, foram feitas adições de solução de HgCl₂, as quais mantiveram sempre a proporção CHX: Hg²⁺ igual a 1:1.

A Figura 46 demonstra que o perfil do espectro de absorção da CHX muda após a incubação (20 min.) com HgCl_2 , sob duas condições experimentais: em presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 6,5 (Figura 46A) e tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ (Figura 46B). As duas condições experimentais foram feitas, considerando-se que a CHX sofre precipitação em presença de fosfato; portanto, o espectro UV/VIS também foi realizado utilizando-se outro tampão (Tris-HCl), a fim de avaliar se tal precipitação não estaria interferindo na interpretação do espectro obtido. Em presença de tampão Tris-HCl, também houve leve modificação do perfil espectral da CHX após incubação com HgCl_2 , confirmando os dados obtidos em presença de tampão fosfato. Tal mudança no UV/VIS sugere que o estímulo na liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama dental incubados em presença de CHX (0,12%) é devido a uma possível interação da CHX com o Hg^{2+} .

Figura 46: Espectros de absorção da clorexidina em presença de HgCl_2



Sistema: tampão fosfato 0,1 mol. L^{-1} , pH 6,5 (A) ou tampão Tris- HCl 0,1 mol. L^{-1} , pH 7,4 (B), em presença de diferentes concentrações de CHX e HgCl_2 . A habilidade da CHX em interagir com Hg foi avaliada através de variações espectrais após incubação (20 min.) causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de HgCl_2 , de forma a se obter uma relação final de 1:1 entre CHX e Hg^{2+} .

Espectros de UV/VIS em presença de TRN e HgCl_2 não foram realizados devido ao resultado negativo obtido a partir da incubação do TRN com corpos de prova de amálgama dental, o qual mostrou que o TRN não estimula a liberação de Hg de amálgama.

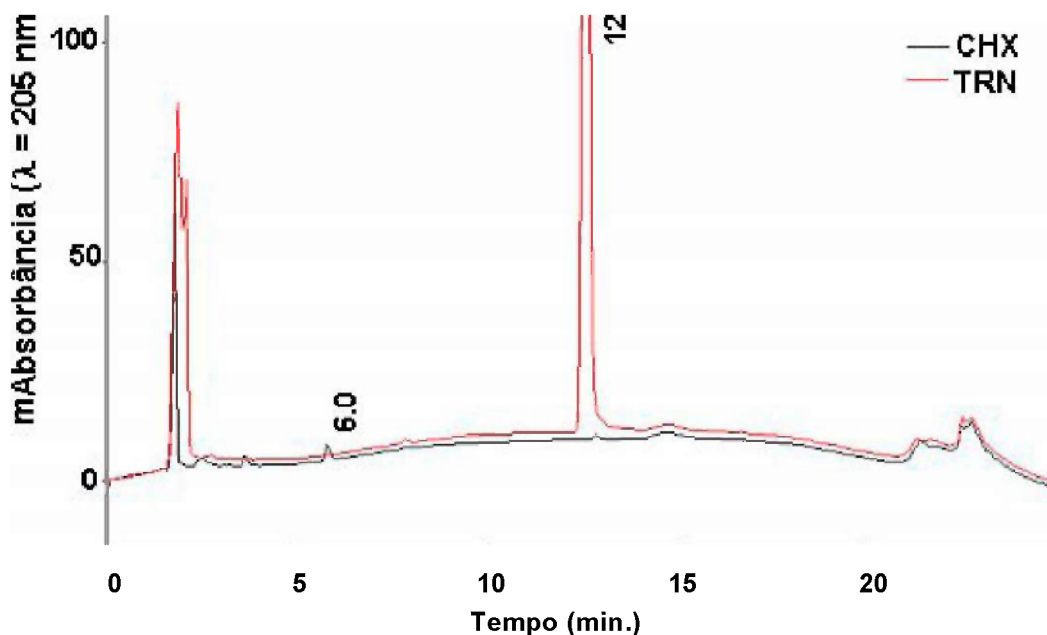
5.18.3. Interação "in vitro" do triclosan e da clorexidine com corpos de prova de resina composta

O efeito do TRN e da CHX foram também avaliados quanto a interação com resinas compostas. Para isso, corpos de prova deste material foram confeccionados (Materiais e Métodos item 4.2.4.2.1.) e incubados a 37°C por 24 h, em sistema contendo tampão fosfato 0,1 mmol. L⁻¹ (pH 6,5), em presença de TRN (0,3%), CHX (0,12%) ou na ausência destes agentes (controle), sendo as análises realizadas por HPLC.

5.18.3.1. Avaliação de produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta, por HPLC

A Figura 47 mostra que os tempos de retenção (R.T.) para a CHX e o TRN são de 6,0 e de 12,2 minutos, respectivamente.

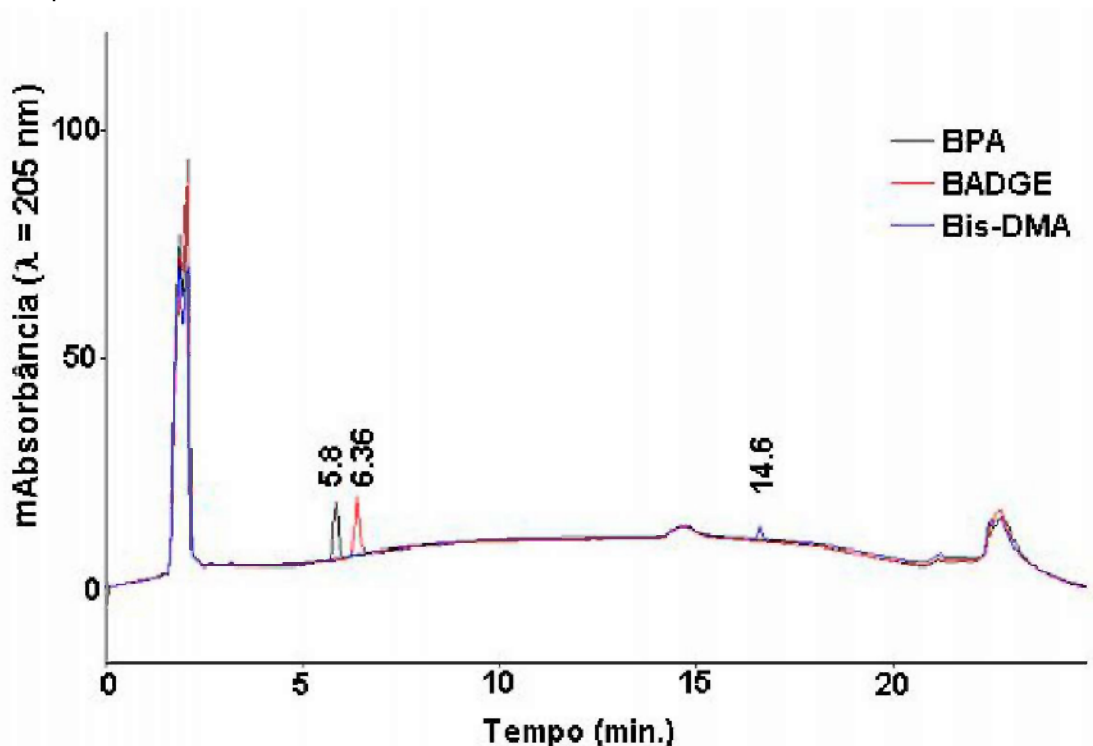
Figura 47: Cromatogramas representativos do triclosan e da clorexidine



Os cromatogramas foram obtidos com injeções (10 de soluções de TRN a 0,3% ou CHX 0,12%). As soluções foram mantidas nas mesmas condições de incubação dos corpos de prova de resina composta: em estufa seca a 37°C, durante 24h. Os cromatogramas são representativos de 06 injeções individuais para cada composto.

Da mesma forma, foram feitas injeções individuais dos padrões de monômeros de resina composta adquiridos: bisfenol A (BPA), bisfenol A dimetacrilato (BisDMA) e bisfenol A (2,3 - dihidróxi propil) glicidil éter (BADGE). Por não ser disponível comercialmente, o padrão bisfenol A glicidil metacrilato (BisGMA) não pôde ser adquirido. A Figura 48 mostra os cromatogramas representativos de 06 injeções individuais de cada monômero analisado, injetados a uma concentração final de 20 μ g monômero. mL. Tais soluções foram preparadas inicialmente como soluções etanólicas estoque a 2 mg. mL⁻¹, as quais foram posteriormente diluídas em tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹ (pH 7,4). Pode-se observar na Figura 48 que, nas condições experimentais utilizadas, os R.T. dos padrões injetados foram de 5,8; 6,36 e de 14,6 minutos para o BPA, BADGE e Bis-DMA, respectivamente.

Figura 48: Cromatogramas representativos dos monômeros de resina com posta

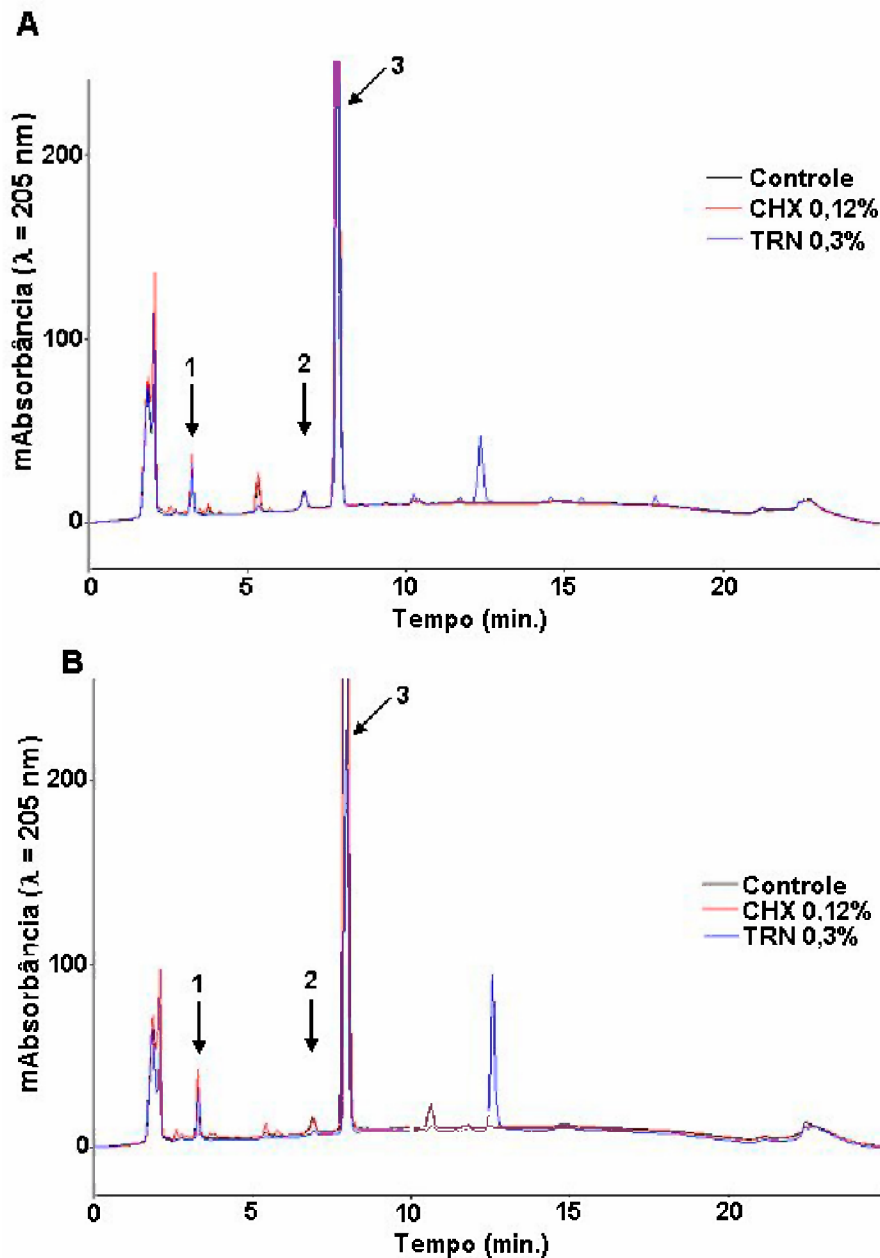


Cromatogramas obtidos com injeções de soluções de monômeros de resina composta (conforme indicado), em concentrações finais de $20 \mu\text{g monômero. mL}^{-1}$. As soluções foram mantidas nas mesmas condições de incubação dos corpos de prova de resina composta: em estufa seca a 37°C , durante 24h. Os cromatogramas são representativos de 06 injeções individuais para cada composto.

Para avaliar os produtos liberados a partir dos corpos de prova de resina composta, o sobrenadante coletado após incubação com TRN 0,3% e CHX 0,12% foi primeiramente analisado por HPLC (Materiais e Métodos item 4.2.4.2.2.). Para cada corpo de prova de resina composta (18 para cada marca comercial analisada) foi feita uma injeção em HPLC, obtendo-se no total 72 cromatogramas, que foram analisados quanto ao perfil de liberação de produtos pelas 04 marcas comerciais analisadas (Charisma, Z-100, TPH e Durafill). Este perfil foi bastante semelhante, mesmo em presença dos agentes antissépticos TRN e CHX, variando apenas a quantidade relativa destes produtos. A Figura 49 é representativa dos cromatogramas obtidos em presença de TRN e CHX, ou na ausência destes agentes (controle), para duas marcas comerciais: Charisma (Figura 49A) e Durafill (Figura 49B).

Observa-se que os picos referentes aos produtos liberados são coincidentes em ambas as marcas comerciais e nos três tratamentos realizados (controle, TRN e CHX). Entretanto, tais picos não foram coincidentes com aqueles referentes aos padrões de monômeros (Figura 48). Assim, os picos correspondentes aos produtos liberados foram assinalados como picos 1, 2 e 3.

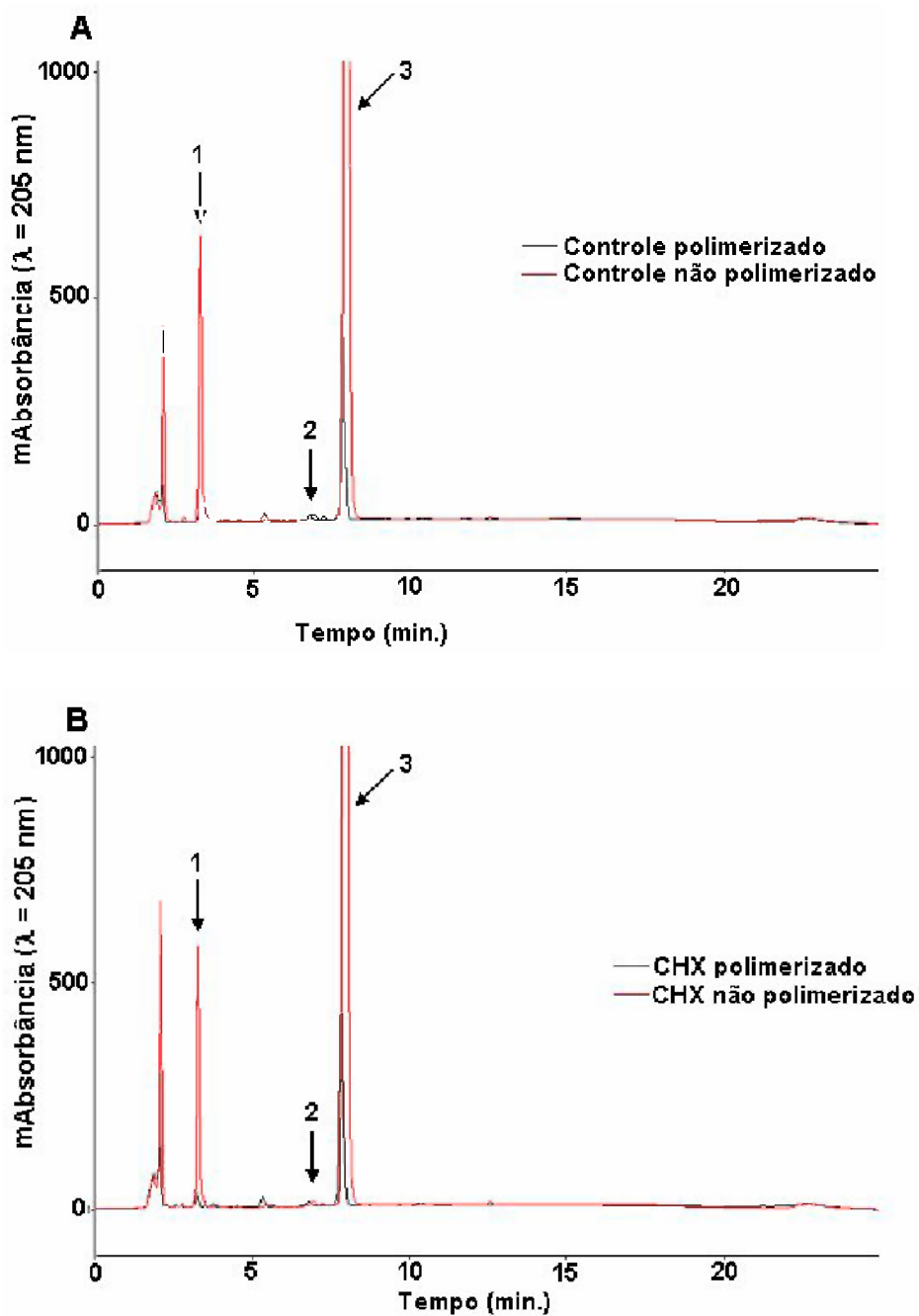
Figura 49: Cromatogramas representativos dos produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta

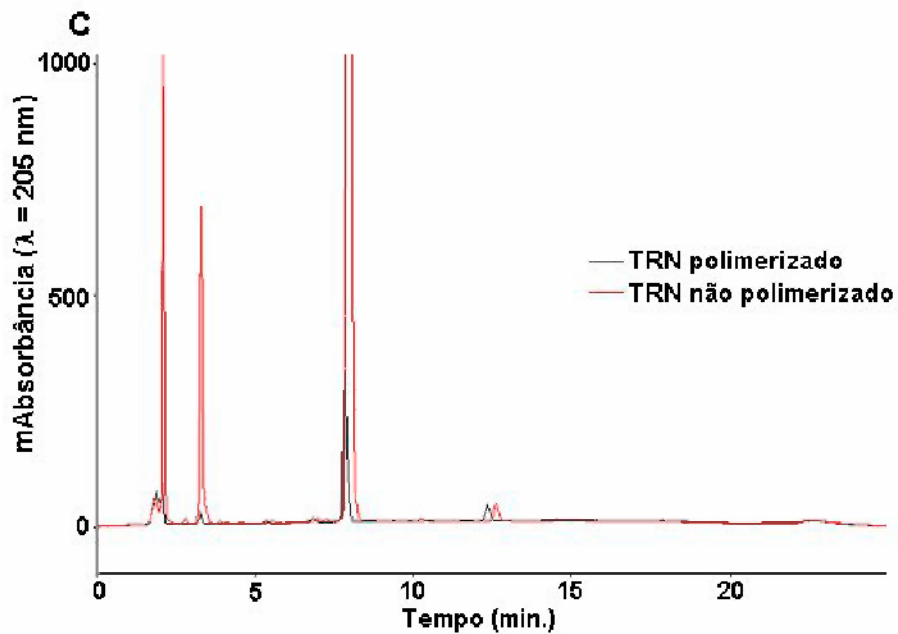


Cromatogramas obtidos com injeções do sobrenadante obtido após a incubação dos corpos de prova de resina composta com CHX (0,12%), TRN (0,3%) ou na ausência de tais agentes (controle), conforme indicado. Condições de incubação: corpos de prova de resina foram incubados em 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹ (pH 7,4), na presença ou ausência de TRN ou CHX, durante 24h, em estufa seca a 37°C. **A**: Cromatogramas obtidos pela injeção do sobrenadante obtido com a incubação de corpos de prova da resina Charisma. **B**: Cromatogramas obtidos pela injeção do sobrenadante obtido com a incubação de corpos de prova da resina Durafill. Os cromatogramas são representativos de 06 injeções individuais para cada composto.

Devido à semelhança do perfil de produtos liberados a partir dos corpos de prova, inclusive entre as diferentes marcas comerciais avaliadas, serão representados apenas os cromatogramas referentes à resina Charisma. A Figura 50 mostra os cromatogramas obtidos a partir de corpos de prova de resina composta polimerizada e não polimerizada. Pode-se observar que o tratamento com CHX (0,12%, Figura 50B) ou TRN (0,3%, Figura 50C) não resultou na formação de novos picos. Observa-se que os cromatogramas das resinas não polimerizadas apresentaram picos coincidentes com aqueles observados nas resinas polimerizadas, sugerindo, portanto, a liberação dos mesmos produtos (Figura 50A). Os tratamentos com CHX (0,12%) ou TRN (0,3%) não resultou na formação de novos picos (Figura 50B e C, respectivamente). Portanto, estes resultados mostraram que tais agentes não são capazes de degradar a estrutura do compósito já polimerizado, ou seja, os produtos liberados observados correspondem provavelmente àquela porção do material que permanece sem polimerização (~10%). De fato, a quantidade de produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta não polimerizada é significativamente maior, quando comparada à resina composta polimerizada. Tal proporção pode ser melhor visualizada nas Figuras 51 - 53, onde estão representadas as áreas de integração obtidas a partir dos picos selecionados como mais promissores para análises posteriores.

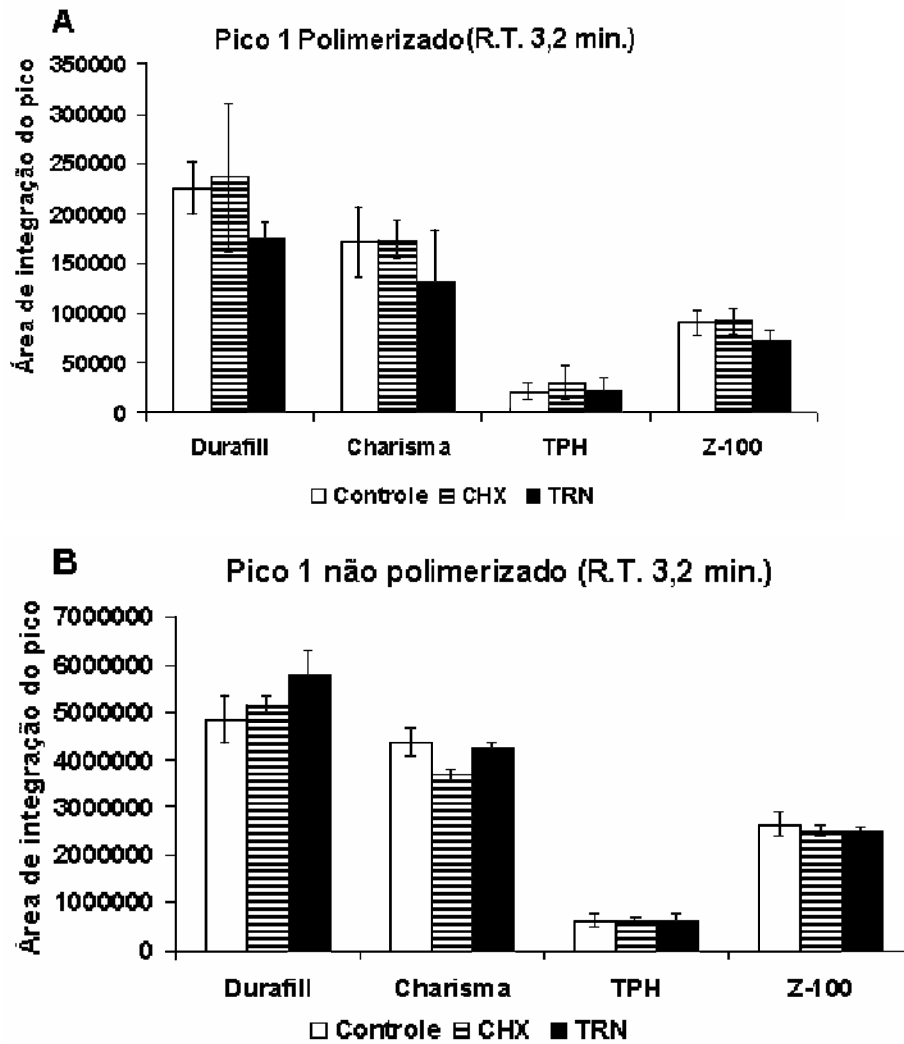
Figura 50: Cromatogramas representativos dos produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta polimerizada e não polimerizada





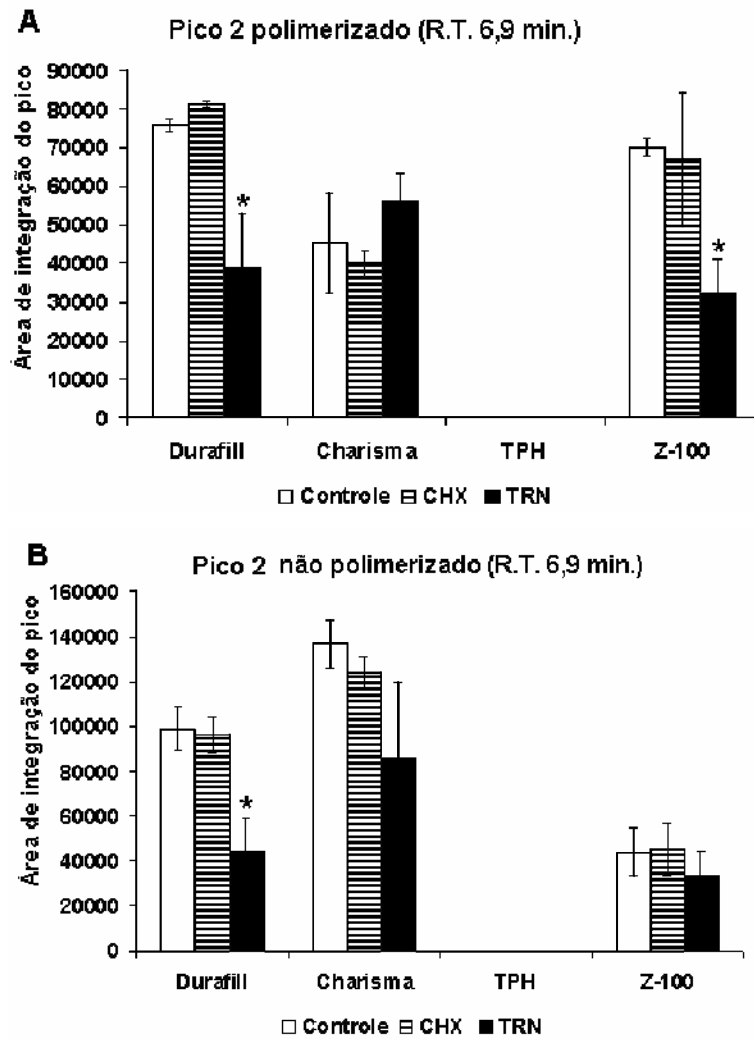
Cromatogramas obtidos com injeções do sobrenadante obtido após a incubação dos corpos de prova de resina composta polimerizada e não polimerizada (conforme indicado). Condições de incubação conforme descrito para a Figura 45. **A:** Cromatogramas obtidos na ausência de drogas (controles). **B:** Cromatogramas obtidos após incubação com CHX (0,12%). **C:** Cromatogramas obtidos após incubação com TRN (0,3%). Dados representativos de 06 injeções individuais para cada composto.

Figura 51: Integração da área do pico 1



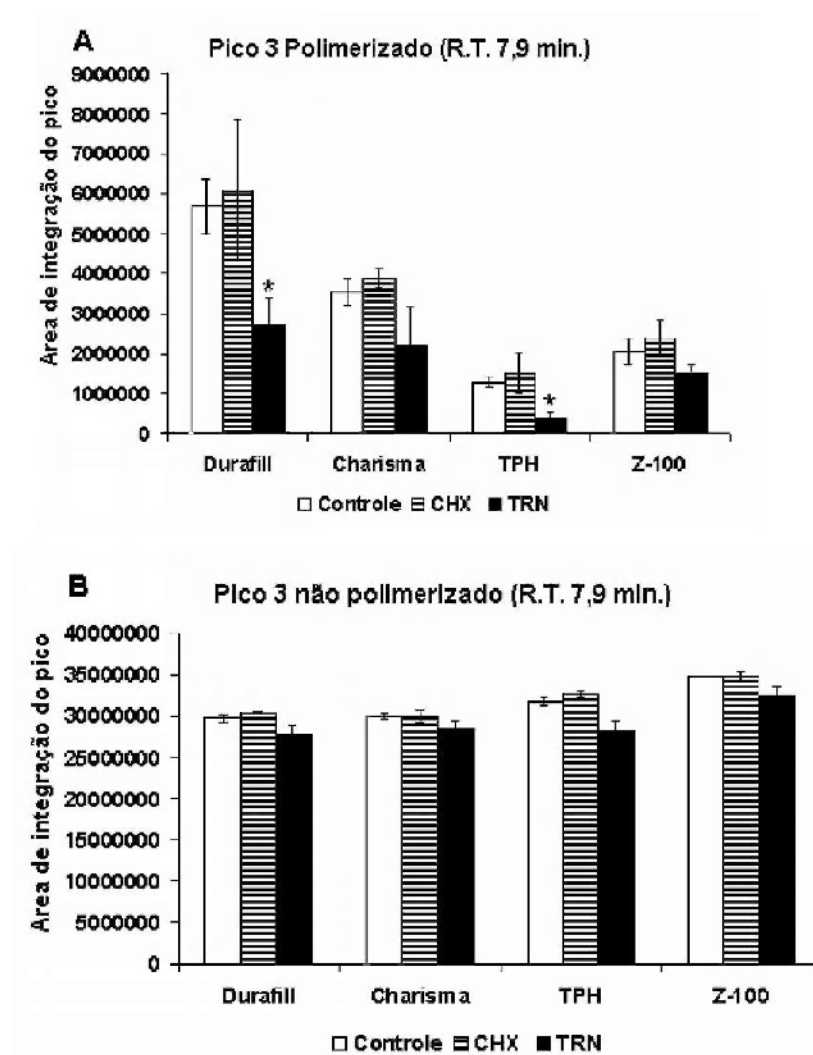
Dados representam $md \pm dp$ ($n = 6$) dos valores obtidos pela integração da área do pico 1 (tempo de retenção de 3,2 minutos), conforme mostrado na Figura 50, de corpos de prova de resina composta polimerizada (**A**) e não polimerizada (**B**).

Figura 52: Integração da área do pico 2



Dados representam $md \pm dp$ ($n = 6$) dos valores obtidos pela integração da área do pico 2 (tempo de retenção de 6,9 minutos), conforme mostrado na Figura 50, de corpos de prova de resina composta polimerizada (**A**) e não polimerizada (**B**). * Valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Figura 53: Integração da área do pico 3



Dados representam md \pm dp (n = 6) dos valores obtidos pela integração da área do pico 3 (tempo de retenção de 7,9 minutos), conforme mostrado na Figura 50, de corpos de prova de resina composta polimerizada (A) e não polimerizada (B). * Valores significativamente diferentes do controle (p < 0,05).

De maneira geral, a resina TPH mostrou liberar a menor quantidade de produtos, inclusive não podendo ser detectado o pico 2 (R.T.- 6,9 min.), tanto para resinas polimerizadas (Figura 52A) quanto não polimerizadas (Figura 52B). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, os quais mostram que os produtos derivados de BisGMA e TEGDMA liberados da resina TPH apresentavam-se em uma proporção bem

menor do que os liberados pela resina Z100 (SANTERRE *et al.*, 1999) Por outro lado, as resinas Durafill e Charisma foram as que tiveram maior quantidade de produtos liberados, principalmente os produtos referentes ao pico 1 (R.T. 3,2 min.) e ao pico 3 (R.T. 7,9 min.) não polimerizados.

Um dado que chamou a atenção foi que, para o pico 2 polimerizado (Figura 52A) e não polimerizado (Figura 52B), a resina Durafill em presença de TRN apresentou uma liberação significativamente menor ($p < 0,05$). Da mesma forma, para o pico 3, tanto a resina Durafill quanto a TPH polimerizadas (Figura 53A) em presença de TRN, apresentaram significativa ($p < 0,05$) diminuição dos produtos liberados. A partir de tais resultados, duas hipóteses foram levantadas: a) o TRN estaria interagindo diretamente com o produto liberado, impedindo que este fosse detectado nos cromatogramas; ou b) o TRN estaria interagindo com os corpos de prova de resina composta, impedindo a liberação do produto referente ao pico 2 (Figuras 52A e B) e ao pico 3 (Figura 53A). Foi feita, então, nova análise das áreas de integração dos picos, onde se observou que a quantidade relativa de TRN em presença de corpos de prova de resinas compostas não diminuiu, quando comparada à quantidade dele na ausência de compósitos. Assim, a possibilidade de interação deste agente diretamente com o produto liberado das resinas compostas foi descartada, pois tal hipótese implicaria na observação de um novo pico nos cromatogramas, o que não ocorreu, ou na diminuição da quantidade relativa de TRN, pois sua interação com o produto liberado da resina estaria ocasionando sua precipitação, e isto também não ocorreu. Portanto, os dados observados sugerem que a diminuição da quantidade do produto liberado referente aos picos 2 e 3 das resinas Durafill e TPH, em presença de TRN seria devida a uma interação do TRN com os corpos de prova de resina, o que dificultaria a liberação deste produto.

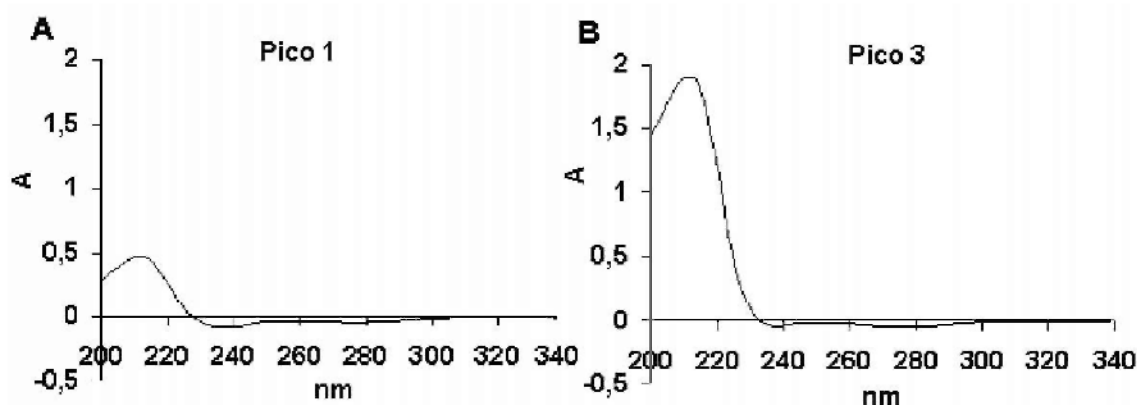
A fim de avaliar melhor os produtos liberados referentes aos picos 1, 2 e 3, as amostras obtidas foram concentradas em rota- evaporador e re- injetadas em HPLC, para possibilitar a coleta dos picos de interesse, os quais foram então submetidos a diferentes metodologias de análise (UV/VIS, ESI-MS), visando esclarecer melhor a estrutura destes produtos liberados.

5.17.3.2. Análise por UV/VIS dos produtos coletados por HPLC

Primeiramente, foram feitos espectros de UV/VIS dos picos 1 e 3 coletados. A realização do espectro de absorvância do pico 2 não foi possível porque a quantidade de material coletado foi muito pequena. Novamente, após a realização de todos os espectros, notou-se uma similaridade bastante grande entre todos eles (polimerizados e não polimerizados e entre as diferentes marcas comerciais) e, portanto, apenas aqueles referentes à resina Charisma serão mostrados. Tal semelhança poderia indicar a liberação de compostos com mesma estrutura química, porém de pesos moleculares diferentes. Assim, os diferentes picos coletados (1, 2 e 3) apresentariam diferentes tempos de retenção por representarem produtos de unidades repetitivas de diferentes tamanhos (monômeros, dímeros ou oligômeros da mesma unidade estrutural).

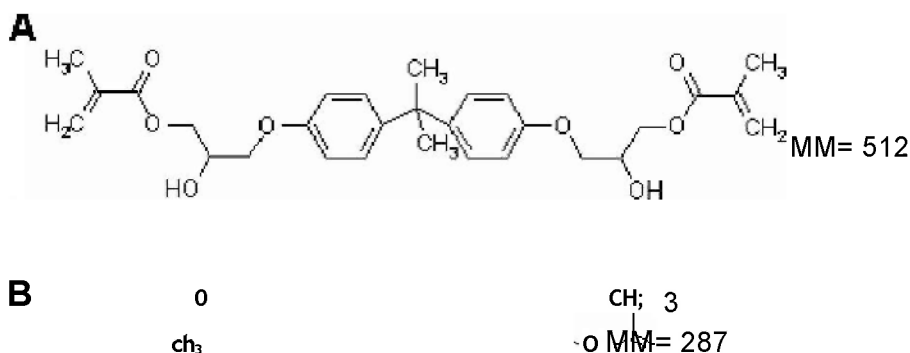
A Figura 54 mostra que os espectros dos picos 1 e 3 foram bastante semelhantes, sendo um pouco mais intenso para o pico 3. Isso poderia ser esperado, tendo em vista que a quantidade de produtos liberados referentes ao pico 3 foi bem maior (Figura 53). Pode-se observar nestes espectros a presença de absorvâncias intensas em região de UV, sugestivas da presença de anel aromático ou de dupla ligação conjugada nos produtos analisados. Tais resultados seriam sugestivos da presença de monômeros de BisGMA, os quais possuem anel aromático na estrutura (Figura 55A), ou de TEGDMA, os quais possuem duplas ligações conjugadas (Figura 55B).

Figura 54: Espectros de UV/VIS dos picos 1 e 3 coletados por HPLC



Os espectros de UV/VIS foram realizados em espectrofotômetro HITACHI (mod. U-2001), contra branco feito por solução de água: acetonitrila em relação 1:1 v/v (correspondente à fase móvel utilizada no HPLC).

Figura 55: Fórmula estrutural dos monômeros BisGMA e TEGDMA



A: Fórmula estrutural do BisGMA; **B:** fórmula estrutural do TEGDMA.

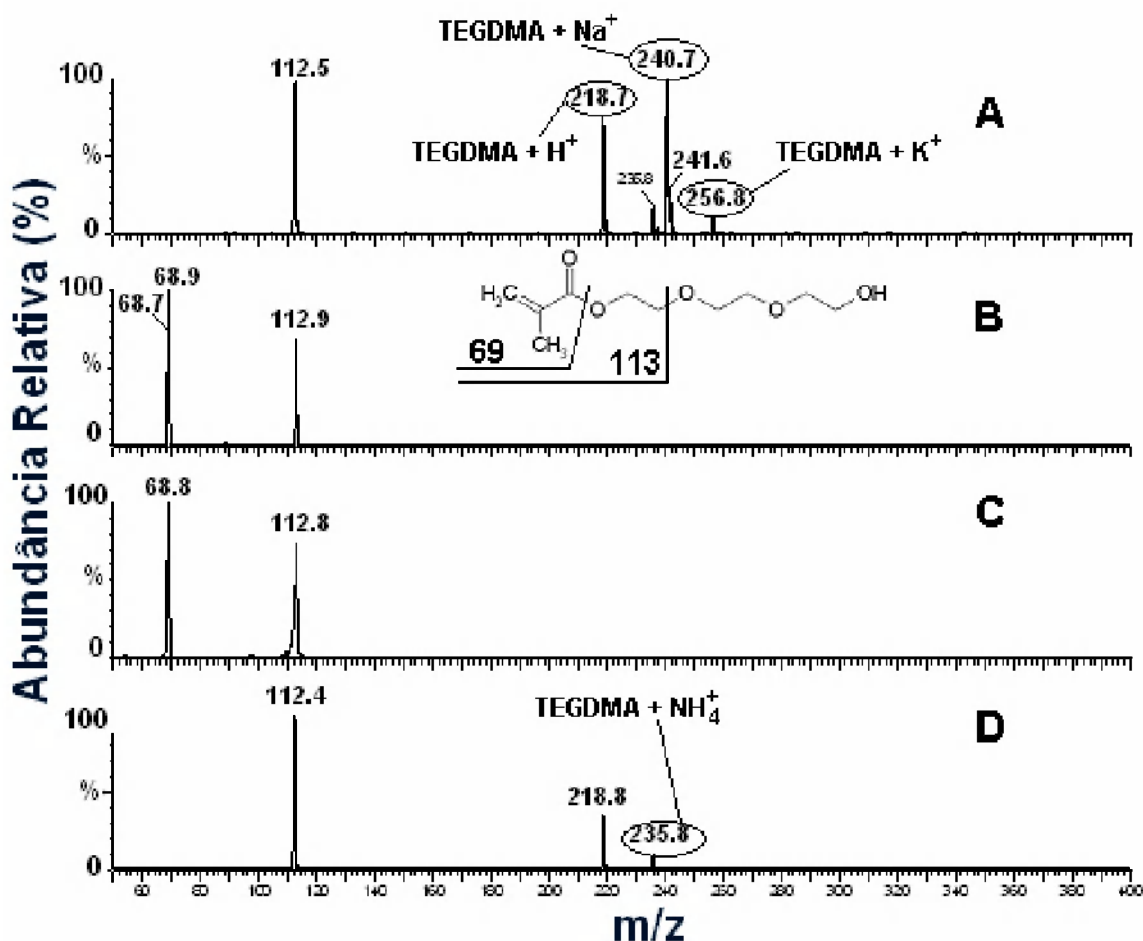
5.17.3.2. Análise por espectrometria de massas dos produtos coletados por HPLC

Após análises por UV/VIS, foram feitas análises por espectrometria de massas, para tentar elucidar a estrutura química dos produtos liberados. Inicialmente, foi feito o espectro de massa do material coletado referente ao pico 1. O espectro de massa adquirido no modo ESI+ (Figura 56A) exibe três íons majoritários em $m/z = 112$; $m/z = 219$ e $m/z = 241$. O íon em $m/z = 219$ corresponde à unidade monomérica TEGDMA hidrolizada em uma ligação éster (SHAJII & SANTERRE, 1999), ou seja, o composto TEGMA (Figura 57).

Os outros íons observados no espectro de massa adquirido no modo ESI+, ou seja, os íons em $m/z = 236$, $m/z = 241$ e $m/z = 257$ correspondem, portanto, à molécula de TEGMA com o íon amônio, com o íon sódio e com o íon potássio, respectivamente (Figura 56A). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por SHAJII & SANTERRE (1999), os quais obtiveram espectro de massa muito semelhante ao obtido no presente trabalho. As Figuras 56B e 56C mostram os espectros de fragmentação de íons filhos, selecionando-se os íons de $m/z = 112$ e $m/z = 219$, respectivamente. Em ambos, os íons de fragmentação observados foram de $m/z = 69$ e $m/z = 113$, demonstrando-se que ambos os íons (112 e 219) correspondem à mesma molécula. A Figura 56D mostra o espectro de íons pais, selecionando-se o íon de $m/z = 112$; obteve-se dois íons majoritários em $m/z = 219$ e $m/z = 236$, os quais correspondem à unidade monomérica TEGMA e esta unidade com o íon de amônio, respectivamente.

O espectro de massa adquirido no modo ESI+ do produto referente ao pico 3 está mostrado na Figura 58. Tal espectro apresenta dois íons majoritários em $m/z = 112,3$ e $m/z = 308,9$ (Figura 58A). O íon em $m/z = 308,9$ corresponde à unidade monomérica TEGDMA com o íon sódio (SHAJII & SANTERRE, 1999). Os outros íons observados em $m/z = 286,9$, $m/z = 303,8$ e $m/z = 324,8$ correspondem à molécula de TEGDMA com um próton, com o íon amônio e com o íon potássio, respectivamente (SHAJII & SANTERRE, 1999). De acordo com os dados da literatura, a relação carga/ massa característica do TEGDMA ('*fingerprint*') em espectros de massa é de $m/z = 69$ e $m/z = 113$ (TANAKA *et al.*, 1991). A partir de espectros de fragmentação de íons filhos, o presente trabalho obteve íons de relação carga/ massa muito próxima destes valores ($m/z = 69$ e $m/z = 113$; Figuras 58B e C), sugerindo fortemente que o produto analisado, referente ao pico 3, corresponde ao TEGDMA. O espectro de íons pais selecionando-se para o íon de $m/z = 112$ mostrou íons de $m/z = 287$ e $m/z = 304$, que correspondem à unidade monomérica TEGDMA com um próton e com o íon amônio.

Figura 56: Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI⁺ com potencial do cone em 24V do pico 1 (R.T. 3,2 min.)



A: Espectro de massas obtido a partir do pico 1 dos cromatogramas de HPLC (Figura 50) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺. **B e C:** Espectro de íons filhos obtido a partir do pico 1 dos cromatogramas de HPLC (Figura 50) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺ selecionando os íons de $m/z = 112$ e $m/z = 219$, respectivamente, no MS1 com potencial do cone em 24 V e energia de colisão em 30 eV. **D:** Espectro de íons pais obtido a partir do pico 1 dos cromatogramas de HPLC (Figura 50) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺ selecionando o íon de $m/z = 112$ no MS1 com potencial do cone em 24 V e energia de colisão em 30 eV.

Figura 57: Fórmula estrutural do TEGMA

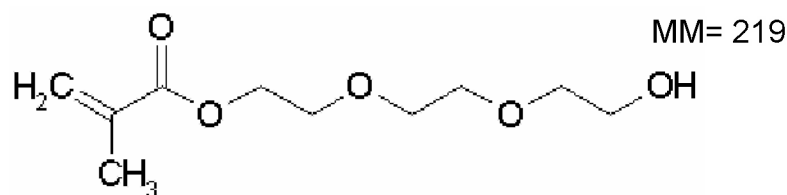
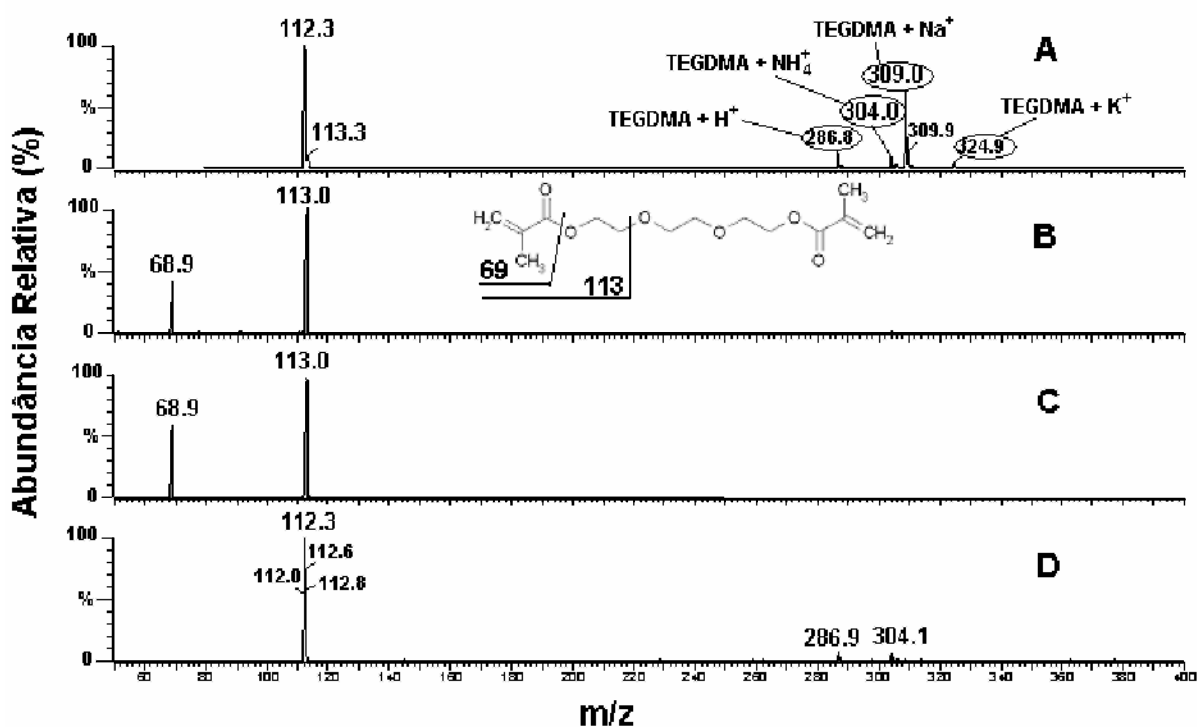


Figura 58: Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI⁺ com potencial do cone em 24V do pico 3 (R.T. 7,9 min.)



A: Espectro de massas obtido a partir do pico 3 dos cromatogramas de HPLC (Figura 49) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺. **B e C:** Espectro de íons filhos obtido a partir do pico 3 dos cromatogramas de HPLC (Figura 49) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺ selecionando os íons de $m/z = 304$ e $m/z = 287$, respectivamente, no MS1 com potencial do cone em 24 V e energia de colisão em 30 eV. **D:** Espectro de íons pais obtido a partir do pico 3 dos cromatogramas de HPLC (Figura 49) para os produtos liberados dos corpos de prova de resina composta, no modo ESI⁺ selecionando o íon de $m/z = 112$ no MS1 com potencial do cone em 24 V e energia de colisão em 30 eV.

Considerando-se que a informação disponibilizada pelos fabricantes a respeito da composição das resinas compostas geralmente é incompleta (KANERVA *et al.*, 1997), o desenvolvimento de estudos avaliando os produtos liberados destes materiais são necessários para um melhor entendimento sobre sua composição e característica de degradação/ liberação de compostos potencialmente tóxicos a sistemas biológicos (KAWAI & TSUCHITANI, 2000; MICHELSEN *et al.*, 2003). Neste aspecto, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com vários autores que já relataram a liberação de TEGMA e/ou TEGDMA de compósitos, analisados por HPLC e MS (TANAKA *et al.*, 1991; SHAJII & SANTERRE, 1999; ORTENGREN *et al.*, 2001; ATKINSON *et al.*, 2002; MICHELSEN *et al.*, 2003). Tendo em vista que a liberação de monômeros a partir de resinas compostas já está bem caracterizada, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que avaliem condições que alterem tal perfil de liberação. Assim, o presente estudo avaliou a possibilidade de agentes antissépticos utilizados amplamente em dentifrícios (TRN) e colutórios (CHX) afetarem a liberação de produtos a partir de corpos de prova de resina composta. A partir dos dados obtidos, demonstrou-se que, de maneira geral, a incubação destes materiais com TRN ou CHX não causa nenhuma modificação no perfil de liberação de produtos a partir de corpos de prova de resina composta quanto ao aparecimento de novos picos. De fato, o TRN, quando incubado com as resinas Durafill e TPH, causou decréscimo na liberação do produto referente aos picos 2 (Durafill polimerizada e não polimerizada) e 3 (Durafil e TPH polimerizadas).

Considerando-se que vários estudos têm apontado o TEGDMA como não apenas um agente causador de reações citotóxicas (GEURTSSEN *et al.*, 1998; GEURTSSEN *et al.*, 1999; THONEMAN *et al.*, 2002; MICHELSEN *et al.*, 2003), mas também como agente ativo de superfícies em bicamadas lipídicas de membranas celulares, causando dano de membrana (FUJISAWA *et al.*, 1978; MICHELSEN *et al.*, 2003), os resultados obtidos no presente estudo podem apresentar relevância clínica quanto aos produtos liberados dos compósitos analisados. Principalmente quando se considera que a cavidade bucal representa um ambiente peculiar, onde as restaurações estão sempre sofrendo ação de forças mastigatórias, além de estarem sendo expostas a diferentes tipos de substâncias, tais como alimentos, componentes de dentifrícios e colutórios (ROULET, 1987).

Assim, a incubação de espécimes de resinas compostas para análises *in vitro*, apesar de não mimetizar de forma precisa tais condições, fornece dados importantes a respeito dos materiais estudados (ROULET, 1987; LYGRE *et al.*, 1999). Portanto, a exposição das restaurações de resinas compostas a este ambiente poderia levar à liberação dos produtos observados de forma intensificada e estas considerações deveriam ser levadas em conta no momento da utilização de tais produtos.

6. Discussão Final

6.1. Metabolismo mitocondrial

O TRN foi primeiramente reconhecido por seus efeitos como agente antimicrobiano (REGOS *et al.*, 1979). Entretanto, ele mostra significativa absorção bucal após aplicações tópicas de colutórios, é retido na placa dental (LIN, 2000), interfere na função renal (CHOW *et al.*, 1977), e é detectado no plasma sanguíneo humano (HOVANDER *et al.*, 2002), fígado e vesícula biliar (KANETOSHI *et al.*, 1988), indicando a excreção biliar e o ciclo entero-hepático deste composto. Além de ter sido reportada a sua metabolização no fígado (WANG *et al.*, 2004), é reconhecido que o TRN age como indutor de citocromo P450 em microsomas de fígado (KANETOSHI *et al.*, 1992) e, devido à sua similaridade estrutural com os policlorobifenilos, o TRN inibe sulfotransferases e glucuronosiltransferases, sendo também substrato para estas enzimas (WANG *et al.*, 2004). Portanto, a despeito da possibilidade de detoxificação hepática deste agente, os efeitos diretos do TRN sobre mitocôndrias de fígado não podem ser excluídos.

No presente estudo, demonstrou-se que o TRN afetou o metabolismo energético mitocondrial de modo complexo, interferindo em diferentes segmentos deste metabolismo. Este agente inibiu de forma significativa o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Figuras 10 e 11), segmentos da cadeia respiratória (Tabela IV), além de promover o estímulo da atividade ATPásica (Figura 13) e colapso do $\Delta\psi$ (Figura 14), sendo estes dois últimos efeitos característicos de compostos desacopladores, como observado, por exemplo, o FCCP e o DNP (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Destaca-se que a ação desacopladora ocorreu nas concentrações em que a inibição do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi também observada.

Neste contexto, é importante ressaltar que o TRN possui características hidrofóbicas como os agentes desacopladores, o que indica uma possível interação deste agente com a MMI (van der HOEVEN *et al.*, 1993; LEVY *et al.*, 1999). Portanto, não se pode descartar os efeitos associados às propriedades das membranas, que poderiam levar a alterações de fluidez, o que afetaria, em

última instância, a translocação de íons e síntese acoplada de ATP. Dados da literatura demonstram que, em eucariotos, o efeito primário do TRN é sobre membranas (McDONNELL & RUSSELL, 1999). No presente trabalho, a inserção do TRN na MMI não foi avaliada de forma direta. Porém, a inibição do inchamento mitocondrial na presença do ionóforo valinomicina indiretamente sugere um efeito deste agente sobre membranas, uma vez que o trânsito da valinomicina- K^+ é dependente da fluidez destas. Estes resultados estão de acordo com dados recentes da literatura, os quais mostram que o TRN é capaz de perturbar as interações entre fosfolípidos de membrana em temperaturas inferiores às temperaturas de transição (VILLALAIN *et al.*, 2001). LYGRE *et al.* (2003) demonstraram que o TRN parece ser capaz de afetar o polimorfismo lipídico. Os efeitos perturbadores do TRN em estruturas de membranas atribuem a este agente a perda de funções da membrana, por afetar não apenas lipídeos, mas também indiretamente as proteínas nela inseridas (LYGRE *et al.*, 2003). Neste aspecto, GUILLÉN *et al.* (2004) demonstraram que a molécula de TRN fica confinada próxima da região de cabeça polar destes lipídeos e alinhada aproximadamente em paralelo à superfície da membrana (quase ortogonalmente ao eixo da cadeia hidrocarboneto de lecitina de gema de ovo). Tal posicionamento poderia ser o responsável por tais efeitos perturbadores das membranas lipídicas.

Os efeitos sobre o metabolismo mitocondrial causados pelo TRN poderiam induzir a morte celular por apoptose. Destacam-se a inibição do transporte de elétrons e conseqüentemente do consumo de oxigênio, além do colapso do potencial de membrana ($\Delta\psi$). Reforça esta proposta a quase completa eliminação do potencial elétrico de membrana, observada também *in situ* através dos experimentos com Rodamina 123 (Figuras 39 - 41) nas células do epitélio bucal. Outro aspecto que chamou a atenção foi o efeito do TRN sobre o núcleo celular, observado com o corante Hoechst 33342 (Figuras 39 - 41). A diminuição observada nesta organela reforça a proposta de que este agente esteja causando a apoptose nas células expostas ao TRN.

Entre os resultados obtidos no presente estudo, chama a atenção o fato de que o TRN, apesar de causar efeitos citotóxicos às células do epitélio oral

(Figuras 42 – 44), causa inibição da MPT em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Figuras 25 e 26). Tais resultados foram confirmados a partir de experimentos de pinçamento de membranas em sistemas reconstituídos, ou seja, proteolipossomos formados a partir de lipossomos e MMI isolada de fígado de rato e livre de MME através da metodologia de choque osmótico (conforme descrito no item 4.2.2.2.). A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que o TRN atua de forma direta sobre o PTP, causando o seu fechamento em concentrações tão baixas quanto 500 nmol. L⁻¹ (Figura 32 e Tabela V). Um dos aspectos que merece discussão é o de que a formação do PTP envolve componentes protéicos da MME, como o canal iônico dependente de voltagem (VDAC). Neste aspecto, nos estudos aqui desenvolvidos este componente do poro não estaria presente, tendo em vista o uso da MMI. Porém, deve ser considerado que a inexistência de VDAC na MMI não foi comprovada. Pelo contrário, evidências disponíveis apontam para sua presença também na MMI. Por exemplo, PON *et al.* (1989), utilizando frações de membrana obtidas a partir de mitocôndrias de levedura, observaram que 4,8% da porina total (VDAC) estava presente na MMI. No mesmo estudo, a imunoeletron microscopia versus VDAC em mitocôndrias totais produziu 4,6% da contagem na MMI. Alternativamente, o PTP pode residir em pontos de contato entre as duas membranas (HAIL Jr, 2005). Condutâncias semelhantes às do PTP têm sido observadas em frações de pontos de contato entre MMI e MME (MORAN *et al.*, 1990). No estudo desenvolvido por SZABÓ *et al.* (1993), eletromicrografias indicaram que os mitoplastos obtidos por choque osmótico retiveram fragmentos de MME, presumivelmente dos sítios de contato. A presença do VDAC em mitoplastos preparados através da metodologia de choque osmótico também tem sido reportada (SCHWAIGER *et al.*, 1987), enquanto outros estudos têm indicado que a exposição ao Ca²⁺ leva à formação de sítios de contato (van VENETIE & VERKLEIJ, 1982; BRDICZKA, 1991). A possibilidade de a indução da atividade do PTP por altas concentrações de Ca²⁺ estar relacionada com este último fenômeno deve ser considerada (SZABÓ *et al.*, 1993). Além dos resultados coincidentes com os dados da literatura (KINNALLY *et al.*, 1991; SZABÓ & ZORATTI, 1991; SZABÓ

et al., 1992), os quais permitiram caracterizar a atividade eletrofisiológica do PTP nos pinçamentos de membrana analisados no presente estudo (Figuras 29 – 31), considerando as evidências existentes na literatura, é possível admitir que o VDAC também estivesse presente em nossas preparações. Portanto, pela primeira vez o TRN foi descrito como um agente protetor da MPT, colocando este composto ao lado da CsA como uma nova ferramenta de estudo do PTP.

6.2. Cultivo celular

Vários estudos têm demonstrado que a CHX apresenta efeitos tóxicos em uma variedade de células eucarióticas. HELGELAND *et al.* (1971) reportaram uma interação da CHX com membranas de eritrócitos humanos, resultando na inibição da Na⁺K⁺ATPase. A liberação de enzimas lisossomais no meio de cultura, a partir de macrófagos peritoneais de rato (KNUUTTILA & SÖDERLING, 1981), e um aumento na permeabilidade ao Ca²⁺ acompanhada por liberação de lactato desidrogenase, a partir de células gengivais humanas expostas à CHX (BABICH *et al.*, 1995) também já foram descritos. Entretanto, o aumento da permeabilidade celular devido à alta afinidade da CHX por radicais orgânicos negativamente carregados não parece ser o único mecanismo de toxicidade deste agente. Tem sido reportado que a síntese de proteínas também pode ser afetada pela CHX em diferentes graus (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1977; PUCHER & DANIEL, 1993). Foi mostrado também que a CHX inibe a atividade de dois tipos de metaloproteinases de matriz (gelatinases A e B) via um mecanismo quelante de cátions (GENDRON *et al.*, 1999) e diminuir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados por LPS, expostos a concentrações sub-tóxicas de CHX (BONACORSI *et al.*, 2004), via estímulo dependente de receptor. Assim, a CHX também é capaz de apresentar efeitos moduladores da ativação de macrófagos. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo vêm contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação da CHX, mostrando seus efeitos sobre linhagens celulares do epitélio oral, às quais são diretamente expostas à CHX quando do seu uso.

Por outro lado quanto ao TRN, embora existam vários artigos mostrando os efeitos clínicos deste agente (WALER *et al.*, 1993; ARWEILER *et al.*, 2001), sua toxicologia e farmacologia *in vivo* (DeSALVA *et al.*, 1989; KANETOSHI *et al.*, 1992), faltam informações sobre seus efeitos em nível celular. Alguns artigos mostram o efeito inibitório do TRN sobre a produção de prostaglandina E₂ induzida por interleucina, em fibroblastos gengivais humanos (GAFFAR *et al.*, 1995; MODÉER *et al.*, 1996), além da indução de vacuolização destas células após exposição ao TRN (BABICH & BABICH, 1997). Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os dados da literatura, que sugerem que o efeito citotóxico do TRN seria alcançado através da indução da apoptose (ZUCKERBRAUN *et al.*, 1998). Entretanto, estes autores observaram tais efeitos a partir da utilização de concentrações mais altas (a partir de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ TRN) do que as utilizadas no presente estudo (a partir de 2,93 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ TRN). Como a linhagem celular utilizada no estudo de ZUCKERBRAN *et al.* (1998) (células S-G de epitélio gengival humano) foi diferente das presentemente analisadas (células NOE, MSK Leuk1 e MDA de epitélio oral humano), o TRN pode exercer seu efeito citotóxico de forma diferente e específica para cada linhagem celular.

O efeito inibitório do TRN na proliferação celular, acoplado ao decréscimo de adesão celular em fragmentos de dentina tratados com TRN, pode ser indicativo de potenciais efeitos adversos sobre a regeneração tissular, pelo uso em longo prazo de produtos dentais contendo TRN após terapia periodontal (tratamento gengival) (ZUCKERBRAUN *et al.*, 1998), como notado por ALLEYN *et al.* (1991).

Deve-se salientar que os estudos de citotoxicidade *in vitro* fornecem informações sobre a resposta celular aos agentes testados e ajudam a elucidar o modo de toxicidade destes agentes. Tais estudos, quando realizados para apenas um agente-teste, têm aplicabilidade limitada. Estudos de toxicologia *in vitro* têm maior valor quando estudos comparáveis são conduzidos para diferentes agentes-teste, os quais podem então ser confrontados e analisados a fim de se estabelecer tendências em respostas celulares. O presente estudo mostrou o efeito de dois agentes-teste de largo uso em odontologia, TRN e

CHX, em diferentes linhagens celulares do epitélio oral. Portanto, as diferentes respostas celulares puderam ser comparadas frente aos diferentes agentes estudados, os quais podem – assim – ser classificados conforme a citotoxicidade apresentada. A classificação de citotoxicidade entre as células do epitélio oral frente ao TRN e à CHX foi: CHX + MDA (1,16 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) > TRN + NOE (2,93 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) > CHX + NOE (6,37 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) > CHX + MSK Leuk1 (7,72 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) > TRN + MSK Leuk1 (10,70 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) > TRN + MDA (11,70 $\mu\text{mol. L}^{-1}$). A partir de tais comparações, sugere-se que o TRN apresenta o maior grau de citotoxicidade, visto que apresentou a menor DL_{50} para as células normais (NOE). Por outro lado, apesar de também apresentar efeitos citotóxicos sobre células normais, a CHX parece apresentar os efeitos mais pronunciados sobre células das linhagens maligna (MDA) e pré-maligna (MSK Leuk1).

Por definição, a quimioprevenção é o uso de agentes para diminuir a progressão, reverter ou inibir a carcinogênese, diminuindo assim, o risco do desenvolvimento de doenças invasivas, clinicamente significativas (HONG & SPORN, 1997; KELLOFF *et al.*, 2001). Aproximadamente três décadas após ter sido sugerida (SPORN, 1976), a quimioprevenção parece uma estratégia promissora quanto à diminuição da incidência de câncer tanto em grupos de risco bem definidos quanto na população em geral (KELLOFF *et al.*, 2001; KAKIZOE, 2003). Uma abordagem interessante envolve o uso de agentes que podem eliminar células transformadas de forma rápida, preferencialmente através da indução da apoptose, ao invés de simplesmente diminuir sua proliferação e/ou grau de diferenciação. Por exemplo, a erradicação de lesões pré malignas ou possivelmente a prevenção de tumores secundários poderia ser alcançada pelo uso de agentes quimiopreventivos, os quais demonstram desencadear a apoptose em células tumorais. Pelos efeitos esperados destes agentes de quimioprevenção, eles deveriam ser administrados cronicamente a indivíduos com alto risco de desenvolvimento da doença (HONG & SPORN, 1997). Dentro deste contexto, o uso da CHX como um agente de quimioprevenção poderia ser sugerido, tendo em vista que seus efeitos citotóxicos foram mais pronunciados sobre células pré malignas (MSK Leuk1) e

malignas (MDA) do que em células normais (NOE). Entretanto, uma das propriedades necessárias para se caracterizar um agente como sendo quimiopreventivo é a ausência de efeitos adversos, mesmo que mínimos (WATTENBERG, 1995), o que não ocorre com a CHX. De fato, a faixa de concentração que separa seus efeitos citotóxicos em células neoplásicas e pré neoplásicas daquela de seus efeitos sobre células normais é bastante estreito. Porém, a validade e a importância destes resultados poderia apontar para a procura de outras substâncias, provavelmente de estrutura química semelhante à da CHX, que pudessem aliar os efeitos citotóxicos às células malignas sem, entretanto, afetar as células normais.

6.3. Interação com materiais restauradores odontológicos

Nas últimas décadas, a Odontologia vem observando uma mudança na preferência do uso de materiais restauradores estéticos no lugar das restaurações escuras de amálgama (SUNDBERG *et al.*, 2000), sendo que as resinas compostas representam o material restaurador de escolha em países onde a cárie dentária é considerada controlada, tais como Dinamarca, Suécia e Finlândia (FORSS & WIDSTROM, 2001). A razão pela qual o uso dos materiais à base de compósitos ultrapassou o do amálgama pode ter várias explicações: a) a crescente consciência dos efeitos adversos do Hg de amálgama não apenas para a saúde dos pacientes, mas também seus danos ao meio ambiente; b) a constante busca por estética; c) o cuidado com a preservação de maior quantidade de estrutura dentária nos preparos cavitários (MOIN *et al.*, 2001).

Entretanto, o uso de tais materiais também pode trazer efeitos deletérios aos pacientes. Já existem vários relatos na literatura mostrando os efeitos citotóxicos dos componentes das resinas compostas. Em nível celular, os monômeros de resina podem influenciar a viabilidade celular e causar reações inflamatórias (ADAMS *et al.*, 1994; BOUIL LAGUET *et al.*, 2000; REICHL *et al.*, 2002; THONEMANN *et al.*, 2002). HANSEL *et al.* (1998) sugeriram, inclusive, que o TEGDMA no ambiente bucal pode predispor a infiltração marginal. Devido a estes efeitos, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar

quais produtos são liberados das resinas compostas frente a diferentes condições experimentais (SHAJII & SANTERRE, 1999; MICHELSEN *et al.*, 2003) e quais os efeitos de tais produtos (BOUILLAGUET *et al.*, 2000; THONEMANN *et al.*, 2002).

Neste contexto, os principais métodos analíticos utilizados para a determinação das substâncias liberadas a partir de compósitos são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), que ainda podem estar combinadas à espectrometria de massas (MS) (ORTENGREN *et al.*, 2001). A GC é um método útil para análises de componentes de baixo peso molecular com boa estabilidade térmica (ORTENGREN *et al.*, 2001). Entretanto, moléculas de alto peso molecular, tais como BisGMA e TEGDMA, sofrerão decomposição na GC e apenas estes produtos de degradação serão, então, detectados (GEURTSSEN *et al.*, 1999). Por esta razão, a maioria dos estudos envolvendo monômeros de alto peso molecular tem sido desenvolvida com a utilização do HPLC (MOHSEN *et al.*, 1998; MUNKSGAARD *et al.*, 2000), método também escolhido no presente estudo.

De acordo com MICHELSEN *et al.* (2003), a composição das resinas compostas pode mudar durante a polimerização com os processos de hidroxilação e oxidação, principalmente em presença de compostos altamente reativos, tais como iniciadores e estabilizadores. Estes autores observaram substâncias a partir de amostras polimerizadas que não foram eluídas nas amostras não polimerizadas, mas que apresentavam fórmula estrutural bastante próxima. Os resultados obtidos no presente trabalho não estão de acordo com estes autores, pois os cromatogramas obtidos a partir de corpos de prova de resina composta não polimerizada apresentaram picos coincidentes com aqueles observados nas resinas polimerizadas (Figura 50). A única diferença entre eles foi a quantidade relativa, que foi significativamente maior nas resinas não polimerizadas (Figuras 51 – 53). De fato, nem a incubação com a CHX ou o TRN levaram à formação de novos picos, demonstrando, portanto, que tais agentes não degradam a estrutura do compósito (Figura 50). E embora vários trabalhos avaliando a liberação de monômeros de resina

composta sejam elaborados mantendo um período de incubação por vários dias (LEE *et al.*, 1998; MICHELSEN *et al.*, 2003), um estudo baseado em técnicas de perda de peso desenvolvido por FERRACANE & CONDON (1990) estimou que a liberação máxima de monômeros não polimerizados a partir de resinas à base de BisGMA/TEGDMA ocorre dentro das primeiras 24h, tempo de incubação utilizado no presente trabalho.

Um fato interessante observado foi que, apesar de ter utilizado compósitos à base de BisGMA/TEGDMA, apenas este último monômero foi observado nos cromatogramas, sob as condições experimentais utilizadas. Este fato pode ser devido à relativa facilidade deste monômero de baixo peso molecular para se difundir através da matriz de resina, para o meio tampão (FERRACANE & CONDON, 1990; FERRACANE, 1994). Em contraste, a natureza volumosa e a capacidade de formação de ligações de hidrogênio da rígida molécula de BisGMA, em adição ao seu alto peso molecular e baixa solubilidade em água, poderiam impedir sua difusão para o meio aquoso (SHAJII & SANTERRE, 1999). Assim, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os dados obtidos por SHAJII & SANTERRE (1999), os quais também não observaram a presença de BisGMA em eluatos obtidos a partir de resinas à base de BisGMA/TEGDMA.

Considerados em conjunto, os resultados presentemente obtidos sugerem que a utilização de agentes antissépticos, tais com TRN e CHX, deve ser feita com cautela. Apesar de apresentarem efeitos positivos, como controle de placa e indução de apoptose em células pré-malignas e malignas, também apresentam efeitos citotóxicos importantes sobre células normais e organelas, em concentrações bastante inferiores às utilizadas na prática odontológica. Além disso, a possibilidade de interações destes agentes com íons deve ser analisada mais aprofundadamente. Ou seja, apesar da interação do TRN e da CHX com íons ferro (Figuras 20 – 23) poder significar, no ambiente bucal, um efeito desejável, por indisponibilizar este metal para o metabolismo das bactérias da placa, a possibilidade de interação do TRN com íons cálcio (Figura 27) não é atrativa. Pelo contrário, a interação deste composto com íons cálcio pode representar um grande impacto para a prática odontológica, visto que

este agente é encontrado na maioria dos dentífricos disponíveis comercialmente no momento e, portanto, usado rotineiramente pela maioria da população; e que o cálcio é o principal íon constituinte da hidroxiapatita, formadora do esmalte dental. Um outro ponto importante a ser considerado é o comportamento dos materiais odontológicos no ambiente bucal, considerando-se as possíveis interações entre eles, com os tecidos bucais e com agentes modificadores, tais como dentífricos e colutórios. Portanto, novos estudos a respeito dos agentes antissépticos e dos materiais restauradores utilizados na prática odontológica devem ser desenvolvidos a fim de se esclarecer seus mecanismos de ação e citotoxicidade.

7. Conclusões

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

a) O TRN interfere nas funções energéticas mitocondriais, inibindo o estado 3 da respiração, CCR e razão ADP/O, além de estimular o estado 4 da respiração e provocar o colapso do $\Delta\psi$. Tais efeitos são mais pronunciados quando o substrato oxidável utilizado é o succinato e são resultantes de efeitos sobre as enzimas da cadeia respiratória. O sítio de inibição situa-se entre os complexos II e III. Os efeitos observados em mitocôndrias isoladas ocorrem também em células íntegras. Os dados obtidos por fluorescência (Rodamina123) mostram que os agentes estudados causam desacoplamento mitocondrial. Da mesma forma, os dados obtidos por fluorescência (Hoechst) mostram que ambos os agentes estudados induzem a apoptose, observada pela diminuição do tamanho nuclear.

b) Apesar de estimular a liberação de ferro de ferritina, o TRN não estimula o processo de lipoperoxidação. Pelo contrário, ele inibe tal processo de maneira dose e tempo-dependente. Este efeito parece ser decorrente de uma interação entre o TRN e íons ferro, tendo em vista os resultados obtidos por espectrofotometria. Entretanto, o TRN não parece ser um ligante forte de Fe^{2+} , pois não demonstrou efeitos no ensaio da ferrozina.

c) TRN e CHX apresentam efeitos opostos sobre a MPT. Enquanto o TRN fecha/ inibe a formação do PTP, a CHX abre/ estimula sua formação. Quando o PTP foi estimulado pela ação da CHX ou inibido pela ação do TRN, nenhuma alteração de condutância foi observada quando diferentes voltagens foram aplicadas, para ambos os agentes. Portanto, os efeitos da CHX e do TRN sobre o PTP não depende da voltagem aplicada ao poro.

d) Ambos os agentes antissépticos estudados (TRN e CHX) mostraram efeitos citotóxicos importantes, em concentrações abaixo daquelas utilizadas na prática odontológica.

e) O TRN não é capaz de estimular a liberação de Hg de amálgama, diferente do observado para a CHX.

f) TRN e CHX não são capazes de degradar a estrutura de compósitos já polimerizados, ou seja, os produtos liberados observados provavelmente correspondem àquela porção do material que permanece sem polimerização (~10%). Como já era esperado, a quantidade de produtos liberados a partir de corpos de prova de resina composta não polimerizada é significativamente maior, quando comparada à resina composta polimerizada. E, de maneira geral, a resina TPH mostrou liberar a menor quantidade de produtos. Por outro lado, as resinas Durafill e Charisma foram as que tiveram maior quantidade de produtos liberados, principalmente os produtos referentes ao pico 1 (R.T. 3,2 min.) e ao pico 3 (R.T. 7,9 min.) não polimerizados.

8. Referências Bibliográficas

ADAMS, A. M.; SOAMES, J. V.; SEARLE, R. F. Cytotoxicity studies of dental restorative materials using human periodontal ligament cells in vitro. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 171- 177, 1994.

ADDY, M.; MAHDAVI, S. A.; LOYN, T. Dietary staining *in vitro* by mouthrinses as a comparative measure of antiseptic activity and predictor of staining *in vivo*. **J. Dent.**, Oxford, v. 23, p. 95- 99, 1995.

ADDY, M.; PRAYITNO, S.; TAYTLOR, L.; CADOGAN, S. An *in vitro* study of the role of dietary factors in the etiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 14, p. 403- 410, 1979.

AERTS, D.; ABEGG, C.; CESA, K. O papel do cirurgião dentista no sistema único de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 131- 138, 2004.

AKERMAN, K. E. O.; WIKSTRÖM, M. F. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 191- 197, 1976.

ALLEYN, C. D.; O'NEAL, R. B.; STRONG, S. L.; SCHEIDT, M. J.; VAN DYKE, T. E.; McPHERSON, J. C. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 7, p. 434- 438, 1991.

APOSHIAN, H. V. Mobilization of mercury and arsenic in humans by sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate (DMPS). **Environ. Health Perspect.**, Washington, v. 106, Supplem. 4, p. 1017- 1025, 1998.

APOSHIAN, H. V.; BRUCE, D. C.; ALTER, W.; DART, R. C.; HURLBUT, K. M.; APOSHIAN, M. M. Urinary mercury after administration of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid: Correlation with dental amalgam score. **FASEB J.**, Bethesda, v. 6, p. 2472- 2476, 1992.

ARWEILER, N. B.; NETUSCHIL, L.; REICH, E. Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 28, n. 2, p. 168- 174, 2001.

ASBOE-JÖRGENSEN, V.; ATTSTRÖM, R.; LANG, N.; LÖE, H. Effect of a chlorhexidine dressing on the healing after periodontal surgery. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 45, p. 13- 17, 1974.

ATKINSON, J. C.; DIAMOND, F.; EICHMILLER, F.; SELWITZ, R.; JONES, G. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. **Dent. Mater.**, Alexandria, v. 18, n. 2, p. 128- 135, 2002.

AUDUS, K. L.; TAVAKOLI-SABERI, M. R.; ZHENG, H.; BOYCE, E. N. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 71, n. 6, p. 1298- 1303, 1992.

BABICH, H.; BABICH, J. P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 91, n. 3, p. 189- 196, 1997.

BABICH, H.; WURZBURGER, B. J.; RUBIN, Y. L.; SINENSKY, M. C.; BLAU, L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. **Cell. Biol. Toxicol.**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 79- 88, 1995.

BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; PURCELL, N. H.; BLAIR, N. S.; OSINSKA, H.; HAMBLETON, M. A.; BRUNSKILL, E. W.; SAYEN, M. R.; GOTTLIEB, R. A.; DORN II, G. W.; ROBBINS, J.; MOLKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, London, v. 434, p. 658- 662, 2005.

BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V.; FORTE, M. A.; BERNARDI, P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 280, n. 19, p. 18558-18561, 2005.

BERNARDI, P. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers and Permeability Transition. **Phys. Rev.**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 1127- 1155, 1999.

BINNEY, A.; ADDY, M.; McKEOWN, S.; EVERATT, L. The effect of a commercially available triclosan-containing toothpaste compared to a sodium-fluoride-containing toothpaste and a chlorhexidine rinse on 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 830- 834, 1995.

BINNEY, A.; ADDY, M.; McKEOWN, S.; EVERATT, L. The choice of controls in toothpaste studies. The effect of a number of commercially available toothpastes compared to water on 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, p. 456- 459, 1996.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p. 1199- 1200, 1958.

BONACORSI, C.; RADDI, M. S.; CARLOS, I. Z. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 207- 212, 2004.

BONINE, F. L. Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 79, p. 154, 1995.

BOUILLAGUET, S.; WATAHA, J. C.; VIRGILLITO, M.; GONZALEZ, L.; RAKICH, D. R.; MEYER, J. M. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. **Dent Mater.**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 213- 217, 2000.

BOYD, N. D.; BENEDIKTSSON, H.; VIMY, M. J.; HOOPER, D. E.; LORSCHIEDER, F. L. Mercury from dental "silver" tooth fillings impairs sheep kidney function. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 261, R1010- R1014, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248- 254, 1976.

BRADSHAW, D. J.; MARSH, P. D.; WATSON, K.; CUMMINS, D. The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 72, n. 1, p. 25- 30, 1993.

BRDICZKA, D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1071, n. 3, p. 291- 312, 1991.

BREThERICK, M. **Hazards in the Chemical Laboratory.** 4th ed. London : The Royal Society of Chemistry., 1986.

BRUNE, D.; GJERDET, N.; PAULSEN, G. Gastrointestinal and in vitro release of copper, cadmium, indium, mercury and zinc from conventional and copper-rich amalgams. **Scand. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 66- 71, 1983.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. In: FLEICHER, S., PACKER, L. **Methods in Enzimology**. New York/London : Academic Press, v. 52, p. 302- 310, 1978.

BULAT, P.; DUJIC, I.; POTKONJAK, B.; VIDA KOVIC, A. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **Int. Arch. Occup. Health**, Berlin, v. 71, Suppl, S37- S39, 1998.

CANCRO, L. P.; PAULOVICH, D. B.; KLEIN, K.; PICOZZI, A. Effects of a chlorhexidine gluconate mouthrinse on dental plaque and calculus. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 43, n. 11, p. 687- 691, 1972.

CANTONI, O.; EVANS, R. M.; COSTA, M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 108, p. 614- 619, 1982.

CARMICHAEL, A. J.; GIBSON, J. J.; WALLS, A. W. G. Allergic contact dermatitis to bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate (BIS-GMA) dental resin associated with sensitivity to epoxy resin. **Br. Dent. J.**, London, v. 183, n. 8, p. 297- 298, 1997.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 40, p. 450- 458, 1971.

CASSARINO, D. S.; PARKS, J. K.; PARKER Jr., D.; BENNETT Jr, J. The parkinsonian MPP⁺ opens the mitochondrial permeability pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1453, p. 49- 62, 1999.

CHAN, K. C.; SVARE, C. W. Mercury Vapor Emission from Dental Amalgam. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 51, n. 02, p. 555- 560, 1972.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 217, n. 1, p. 383- 393, 1955.

CHOW, A. Y. K.; HIRSCH, G. H.; BUTTAR, H. S. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of triclosan and chlorhexidine in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 42, p. 1- 10, 1977.

CHRISTENSEN, F.; BLEEG, H. S.; JENSEN, J. E. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver mitochondria. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v. 36, p. 1- 12, 1975.

CHRISTENSEN, F.; JENSEN, J. E. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver microsomes. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v. 35, p. 33- 41, 1974.

CHUNG, A. S.; MAINES, M. D.; REYNOLDS, W. A. Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney: Reversal by selenium. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 31, p. 3093- 3100, 1982.

CIANCIO, S. G. Agents for the management of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 71, n. 7, p. 1450- 1454, 1992.

CREUTZ, C; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proc. Natl. Academ. Sci.**, Washington, v. 70, n. 6, p. 1701- 1703, 1973.

CRIADO, M.; KELLER, B. U. A membrane fusion strategy for single channel recordings of membrane usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 224, p. 172- 176, 1987.

CROMPTON, M.; COSTI, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 178, n. 2, p. 489- 501, 1988.

CROMPTON, M.; COSTI, A.; HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 245, n. 3, p. 915- 918, 1987.

CUMMINS, D. Zinc citrate/ triclosan: a new anti-plaque agent for the control of plaque and the prevention of gingivitis: short term clinical and mode of action studies. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, p. 455- 461, 1991.

DA LOZZO, E.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. V. S. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, Madison, v. 12, n. 5, p. 291- 297, 1998.

DAVIES, R. M.; LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R.; JENSEN, S. B. Chlorhexidine in the prevention of gingivitis. *In*: EASTOE, J. E.; PICTON, D. C. A.; ALEXANDER, A. G. **The prevention of periodontal disease**. London : Henry Kimpton Publ. 1970, p. 224- 229.

DECKER, G. L.; GREENAWALT, J. W. Ultrastructural and biochemical studies of mitoplasts and outer membranes derived from French-pressed mitochondria. Advances in mitochondrial subfractionation. **J. Ultrastruct Res.**, Orlando, v. 59, n. 1, p. 44- 56, 1977.

DEJEAN, L. M.; MARTINEZ-CABALLERO, S.; GUO, L. HUGHES, C.; TEJIDO, O., DUCRET, T.; ICHAS, F.; KORSMEYER, S. J.; ANTONSSON, B.; JONAS, E. A.; KINNALLY, K. W. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome *c* release channel MAC, mitochondrial apoptosis – induced channel. **Mol. Biol. Cell**, Bethesda, v. 16, p. 2424- 2432, 2005.

DeSALVA, S. J.; KONG, B. M.; LIN, Y. J. Triclosan: a safety profile. **Am. J. Dent.**, San Antonio, Spec No:185- 96, 1989.

DINIS, T. C. P.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. **Arch Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 315, n. 1, p. 161- 169, 1994.

ECHEVERRIA, D.; APOSHIAN, H. V.; WOODS, J. S.; HEYER, N. J.; APOSHIAN, M. M.; BITTNER Jr., A. C.; MAHURN, R. K.; CIANCIOLA, M. Neurobehavioral effects from exposure to dental amalgam Hg: new distinctions between recent exposure and Hg body burden. **FASEB J.**, Bethesda, v. 12, p. 971- 980, 1998.

ELLINGSEN, J. E.; ROLLA, G.; ERIKSEN, H. M. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 9, p. 317- 322, 1982.

ERIKSEN, H. M.; NORDBÖ, H. Extrinsic discoloration of teeth. Review Article. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 5, p. 229- 236, 1978.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Methods Enzymol.**, New York, v. 10, p. 41- 47, 1967.

FELDKAMP, T; KRIBBEN, A.; WEINBERG, J. M. Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Baltimore, v. 288, n. 6, F1090- F1091, 2005.

FERRACANE, J. L. Elution of leachable components from composites. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 441- 452, 1994.

FERRACANE, J. L.; CONDON, J. R. Rate of elution of leachable components from composite. **Dent. Mater.**, Alexandria, v. 6, p. 282- 285, 1990.

FINLAY, G. J.; BAGULEY, B. C.; WILSON, W. R. A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of citotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 139, p. 272- 277, 1984.

FLOTRA, L.; GJERMO, P.; ROLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, p. 119- 125, 1971.

FORWARD, G. C. Non-fluoride anticaries agents. **Adv. Dent. Res.**, Alexandria, v. 8, n. 2, p. 208- 214, 1994.

FORSS, H.; WIDSTROM, E. From amalgam to composite: selection of restorative materials and restoration longevity in Finland. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 59, n. 2, p. 57- 62, 2001.

FOWLER, B. A.; WOODS, J. S. Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria following chronic oral methyl mercury exposure: The relationship to renal function. **Exp. Mol. Pathol.**, Orlando, v. 27, p. 403- 412, 1977.

FRUSTACI, A.; MAGNAVITA, N.; CHIMENTI, C.; CALDARULO, M.; SABBIONI, E.; PIETRA, R.; CELLINI, C.; POSSATI, G. F.; MASERI, A. Marked elevation of myocardial trace elements in idiopathic dilated cardiomyopathy compared with secondary cardiac dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 33, n. 6, p. 1578- 1583, 1999.

FUJISAWA, S.; IMAI, Y.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. Studies on hemolytic activity of bisphenol A diglycidyl methacrylate (BIS-GMA). **J. Det. Res.**, Alexandria, v. 57, n. 1, p. 98- 102, 1978.

FULLER, K. M.; ARRIAGA, E. A. Advances in the analysis of single mitochondria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 14, n. 1, p. 35- 41, 2003.

GAFFAR, A.; SHERL, D.; AFFLITTO, J.; COLEMAN, E. J. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 480- 484, 1995.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 6, n. 3, p. 437- 439, 1999.

GERHARD, I.; MONGA, B.; WALDBRENNER, A.; RUNNEBAUM, B. Heavy metals and fertility. **J. Toxicol. Environm. Health PART A**, London, v. 54, p. 593- 611, 1998.

GEURTSSEN, W.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, n. 12, p. 2012- 2019, 1998.

GEURTSSEN, W.; SPAHL, W.; MULLER, K.; LEYHAUSEN, G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 48, n. 6, p. 772- 777, 1999.

GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M. E.; MUSOTTO, G. C.; GIANGRECO, R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, p. 729- 733, 1997.

GOLDSCHMIDT, P.; COGEN, R.; TAUBMAN, S. Cytopathological effects of chlorhexidine on human cells. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 48, p. 212- 215, 1977.

GOYER, R. A.; RHYNE, B. C. Toxic changes in mitochondrial membranes and mitochondrial function. *In: Pathobiology of Cell Membranes*, Eds Trump B. F. and Arstila A. U., Academic Press, New York, v. 1; p. 383- 428, 1975.

GREENSTEIN, G.; POLSON, A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: A comprehensive review. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 5, p. 507- 520, 1998.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W; KOTANKO, P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 32, p. 2969- 2972, 1983.

GUILLEN, J.; BERNABEU, A.; VILLALAIN, J. Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes. **Eur. Biophys J.**, Heidelberg, v. 33, n. 5, p. 448- 453, 2004.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. 755- 786, 1990.

HAHN, L. J.; KLOIBER, R.; VIMY, M. J.; TAKAHASHI, Y.; LORSCHIEDER, F. L. Dental "silver" tooth fillings: a source of mercury exposure revealed by whole-body image scan and tissue analysis. **FASEB J.**, Bethesda, v. 3, p. 2641- 2646, 1989.

HAHN, L. J.; KLOIBER, R.; LEININGER, R. W.; VIMY, M. J.; LORSCHIEDER, F. L. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 3256- 3260, 1990.

HAIL Jr, N. Mitochondria: A novel target for chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, v. 10, p. 687- 705, 2005.

HALESTRAP, A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K. Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsternam, v. 1366, p. 70- 94, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. New York : Oxford University Press, 2003.

HANKS, C. T.; ANDERSON, M.; CRAIG, R. G. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 10, p. 101- 112, 1981.

HANKS, C. T.; STRAWN, S. E.; WATAHA, J. C.; CRAIG, R. G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 70, n. 11, p. 1450- 1455, 1991.

HANSEL, C.; LEYHAUSEN, G.; MAI, U. E.; GEURTSSEN, W. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, n. 1, p. 60- 67, 1998.

HAROLD, F. M.; BAARDA, C.; BARON, C.; ABRAMS, A. DIO₉ and Chlorhexidine: Inhibitors of membrane-bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 183, p. 129- 136, 1969.

HATCH, W. R.; OTT, W. L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. **Anal. Chem.**, Washington, v. 40, p. 2085- 2087, 1968.

HEARD, D. D.; ASHWORTH, R. W. The colloidal properties of chlorhexidine and its interaction with some macromolecules. **J. Pharm. Pharmac.**, London, v. 20, p. 505- 512, 1968.

HEATH, R. J.; RUBIN, J. R.; HOLLAND, D. R.; ZHANG, E.; SNOW, M. E.; ROCK, C. O. Mechanism of inhibition of bacterial fatty acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 274, p. 1110- 1114, 1999.

HELGELAND, K.; HEYDEN, G.; RÖLLA, G. Effect of chlorhexidine and animal cells in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 79, n. 3, p. 209- 215, 1971.

HELMS, J. A.; DELLA-FERA, M. A.; MOTT, A. E.; FRANK, M. E. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch. Oral Biol.**, Kidlington, v. 40, n. 10, p. 913- 920, 1995.

HEYTLER, P. G. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *In*: PACKER, L.; LEISCHER, S. **Select methods in enzymology – Biomembranes**. San Diego, Academic Press, p. 613- 623, 1997.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanism underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicol. In vitro**, Kidlington, v. 15, p. 271- 276, 2001.

HILLAM, D. G.; HULL, P. S. The influence of experimental gingivitis on plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 4, p. 56- 61, 1977.

HONG, W. K.; SPORN, M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**, Washington, v. 278, p. 1073- 1077, 1997.

HOVANDER, L.; MALMBERG, T.; ATHANASIADOU, M.; ATHANASSIADIS, I.; RAHM, S.; BERGMAN, A.; WEHLER, E. K. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 42, n. 1, p. 105- 117, 2002.

HULTMAN, P.; JOHANSSON, U.; TURLEY, S. J.; LINDH, U.; ENESTRÖM, S.; POLLARD, K. M. Adverse immunological effects and autoimmunity induced by dental amalgam and alloy in mice. **FASEB J.**, Bethesda, v. 8, p. 1183- 1190, 1994.

HULTMAN, P.; LINDH, U.; HÖRSTED-BINDSLEV, P. Activation of the Immune System and Systemic Immune-Complex Deposits in Brown Norway Rats with Dental Amalgam Restorations. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, n. 6, p. 1415- 1425, 1998.

HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. **Arch. Biochim. Biophys.**, Duluth, v. 195, n. 2, p. 453- 459, 1979.

JAMINET, F. R.; DELATTRE, L.; DELPORTE, J. P.; MOES, A. Influence de la température de stérilisation et du pH sur la stabilité de la chlorhexidine en solution. **Pharm. Acta Helvetiae**, Surich, v. 45, p. 60- 63, 1970.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine; A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, p. 415- 424, 1988.

JENSEN, J. E. Binding of dyes to chlorhexidine-treated hydroxyapatite. **Scand. J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 85, p. 334- 340, 1977.

JENSEN, J. E.; BLEEG, H.; CHRISTENSEN, F. The effect of chlorhexidine on some enzymes activities of rat liver lysosomes and peroxisomes. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v. 36, p. 366- 376, 1975.

JOHARJI, R. M.; ADENUBI, J. O. Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. **J. Dent.**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 247- 254, 2001.

JOHNSON, N. W.; KENNEY, E. B. Effects of topical application of chlorhexidine on plaque and gingivitis in monkeys. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 180- 188, 1972.

KAKIZOE, T. Chemoprevention of cancer – focusing on clinical trials. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v. 33, p. 421- 442, 2003.

KANERVA, L.; JOLANKI, R.; ESTLANDER, T. 10 years of patch testing with the (meth)acrylate series. **Contact. Dermatitis**, Hellerup, v. 37, n. 6, p. 255- 258, 1997.

KANETOSHI, A.; OGAWA, H.; KATSURA, E.; OKUI, T.; KANESHIMA, H. Disposition and excretion of Irgasan DP300 and its chlorinated derivatives in mice. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.17, p. 637- 644, 1988.

KANETOSHI, A.; KATSURA, E.; OGAWA, H.; OHYAMA, T.; KANESHIMA, H.; MIURA, T. Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 23, n. 1, p. 91- 98, 1992.

KAWAI, K.; TSUCHITANI, Y. Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 51, n. 1, p. 123- 127, 2000.

KELLOFF, G. J.; LIEBERMAN, R.; STEELE, V. E.; BOONE, C. W.; LUBET, R. A.; KOPELOVICH, L.; MALONE, W. A.; CROWELL, J. A.; HIGLEY, H. R.; SIGMAN, C. C. Agents, biomarkers, and cohorts for chemopreventive agent development in prostate cancer. **Urology**, New York, v. 57, n. 4, p. 46- 51, 2001.

KENNEY, E. B.; SAXE, S. R.; BOWLES, R. D. Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. **Arch. Oral. Biol.**, Kidlington, v. 17, n. 11, p. 1633- 1666, 1972.

KJAERHEIM, V.; WAALER, S. M.; RÖLLA, G. Significance of choice of solvents for the clinical effect of triclosan-containing mouthrinses. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 102, p. 202- 205, 1994.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C.; MANNELLA, C. A.; KINNALLY, K. W. Laser micro-irradiation of mitochondria: is there an amplified mitochondrial death signal in neural cells? **Mitochondrion**, v. 3, p. 217- 227, 2004.

KINNALLY, K. W.; TEDESCHI, H. Metabolic effects of some electrofluorimetric dyes. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 503, n. 2, p. 380- 388, 1978.

KINNALLY, K. W.; ZOROV, D.; ANTONENKO, Y.; PERINI, S. Calcium modulation of mitochondrial inner membrane channel activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 176, n. 3, p. 1183- 1188, 1991.

KNUUTTILA, M.; SÖDERLING, E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 39, p. 285- 289, 1981.

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. & Med.**, New York, v. 26, n. 3/4, p. 463- 471, 1999.

KRAAYENHOF, R.; VAN DAM, K. Interaction between uncouplers and substrates in rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 172, p. 189- 197, 1969.

KRISHNAN, A. V.; STARHIS, P.; PERMUTH, S. F.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, Bethesda, v. 132, p. 2279- 2286, 1993.

LAMBERT, P. M.; MORRIS, H. F.; OCHI, S. The influence of 0,12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 55, Suppl. 5, p. 25- 30, 1997.

LANG, N. P.; CATALANOTTO, F. A.; KNÖPFLI, R. U.; ANTCZAK, A. A. A. Quality specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, p. 43- 48, 1988.

LECOUER, H.; LANGONNÉ, A.; BAUX, L.'REBOUILLAT D.; D'RUSTIN, P.; PRÉVOST, M. C.; BRENNER, C.'EDELMAN; L'JACOTOT, E. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 294, p. 106-117, 2004.

LEE, S. Y.; HUANG, H. M.; LIN, C. Y.; SHIH, Y. H.; Leached components from dental composites in oral simulating fluids and resultant composite strengths. **J. Oral Rehab.**, Oxford, v. 25, p. 575- 588, 1998.

LEINFELDER, K. F.; LEMONS, J. E. **Clínica Restauradora - Materiais e Técnicas**. São Paulo : Ed. Santos, 1995.

LENGA, R. E. **The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data**. Edition 1. Milwaukee : Aldrich Chemical Co., 1985.

LEVY, C. W.; ROUJEINIKOVA, A.; SEDELNIKOVA, S.; BAKER, P.; STUITJE, A. R.; SLABAS, A.R.; RICE, D. W.; RAFFERTY, J. B. Molecular basis of triclosan activity. **Nature**, London, v. 398, p. 383- 384, 1999.

LIN, Y. J. Buccal absorption of triclosan following topical mouthrinse application. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 13, p. 215- 217, 2000.

LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J. Periodontal Res**. Copenhagen, v. 5, p.79- 83, 1970.

LORENZ, K.; NETUSCHIL, L.; NOACK, B.; BRECX, M.; HOFFMANN, T. Zeitdauer der antibakteriellen Wirkung Triclosan-haltiger Zahnpapsten *in vivo*. **Dtsch Zahnärztl Z.**, Munchen, v. 57, p. 279- 282, 2002.

LORSCHIEDER, F. L.; VIMY, M. J.; SUMMERS, A. O. Mercury exposure from "silver" tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, p. 504- 508, 1995.

LOWRY, O. H.; RESENBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265- 275, 1951.

LUCAROTTI, M. E.; WHITE, H.; DEAS, J.; SILVER, I. A.; LEAPER, D. J. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to

conservation therapy? **Ann. R. Coll. Surg. Engl.**, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 388- 392, 1990.

LUND, B.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid oxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 42, S181- S187, 1991.

LUND, B.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 45, n. 10, p. 2017- 2024, 1993.

LYGRE, H.; MOE, G.; SKALEVIK, R.; HOLMSEN, H. Interaction of triclosan with eukaryotic membrane lipids. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 111, n. 3, p. 216- 222, 2003.

MALKEVITCH, N. V.; DEDUKHOVA, V. I.; SIMONIAN, R. A.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. Thyroxine induces cyclosporine A-insensitive, Ca²⁺-dependent reversible permeability transition pore in rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 412, p. 173- 178, 1997.

MANNELLA, C. A. Structure of the outer mitochondrial membrane: ordered arrays of pore-like subunits in outer membrane fractions from *Neurospora crassa* mitochondria. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 94, p. 680- 687, 1982.

MAREK, M. The Release of Mercury from Dental Amalgam: The Mechanism and *in vitro* Testing. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 69, n. 5, p. 1167- 1174, 1990.

MAREK, M. Interactions Between Dental Amalgams and the Oral Environment. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 6, p. 100- 109, 1992.

MARGOLIASH, E. The chromatographic behaviour of cytochrome c on cation exchangers. **Biochem J.**, London, v. 56, p. 535- 543, 1954.

MARIOTTI A. J.; RUMPF, D. A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 70, n. 12, p. 1443- 1448, 1999.

MARSH, P. D. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 462- 467, 1991.

MARSH, P. D. Microbial aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 71, n. 7, p. 1431- 1438, 1992.

MARTINEZ – CABALLERO, S. Disecção molecular de la translocasa de proteínas de la membrana interna mitocondrial: implicaciones electrofisiológicas y funcionales. **Tese de Doutorado em Medicina Veterinária**, Cáceres, Espanha, 2003.

MASINI, A.; TRENTI, T.; CECCARELLI-STANZANI, D.; VENTURA, E. The effect of ferric ion complex on isolated rat liver mitochondria. I. Respiratory and electrochemical responses. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 810, p. 20-26, 1985.

MASON, T. L.; POYTON, R. O.; WHARTON, D. C.; SCHATZ, G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. I. Isolation and properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 248, n. 4, p. 1346- 1354, 1973.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

McMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, London, v. 394, p. 531- 532, 1998.

McNEAL, D. R. Anticalculus Agents for Treatment, Control and Prevention of Periodontal Disease. **J. Public Health Dent.**, Richmond, v. 29, n. 3, p. 135-152, 1969.

MENOUTIS, J.; PARISI, A. I. Tecnology Review Series. Triclosan and its impurities. **Quantex Laboratories Technology Review – Triclosan**. Disponível em <<http://www.quantexlabs.com/triclosan.htm>>. Acesso em 23/04/2002.

MICHELSEN, V. B.; LYGRE, H.; SKALEVIK, R.; TVEIT, A. B.; SOLHEIM, E. Identification of organic eluates from four polymer- based dental filling materials. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 111, p. 263- 271, 2003.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144- 148, 1961.

MODÉER, T.; BENGTSSON, A.; ROLLA, G. Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 10, p. 927- 933, 1996.

MOHSEN, N. M.; CRAIG, R. G.; FILSKO, F. E. Effects of curing time and filler concentration on curing and postcuring of urethane dimethacrylate composites: a microcalorimetric study. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 40, n. 2, p. 224- 232, 1998.

MOIN, J. C.; NOMURA, Y.; URABE, H.; OKAZAKI, M.; SHINTANI, H. The relationship between leachability of polymerization initiator and degrees of conversion of visible light- cured resin. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 58, p. 42-46, 2001.

MOLIN, M.; BERGMAN, B.; MARKLUND, S. L.; SCHÜTZ, A.; SKERFVING, S. Mercury, selenium, and glutathione peroxidase before and after amalgam removal in man. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, p. 189- 202, 1990.

MORAN, J.; ADDY, M.; KOHUT, B.; HOVLARAS, C. A.; NEWCOMBE, R. G. Efficacy of mouthrinses in inhibiting the development of supragingival plaque over a 4-day period of no oral hygiene. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, p. 904-907, 1994.

MORAN, J.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G.; MARLOW, I. A study to assess the plaque inhibitory activity of a new triclosan mouthrinse formulation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 11, p. 806- 809, 2000.

MORAN, O.; SANDRI, G.; PANFILI, E.; STUHMER, W.; SORGATO, M. C. Electrophysiological characterization of contact sites in brain mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, n. 2, p. 908- 913, 1990.

MORENO, A. J. M.; MADEIRA, V. M. C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Asmterdam, v. 1015, p. 361- 367, 1990.

MOYSES, S. T.; MOYSES, S. J.; WATT, R. G.; SHEIHAM, A. Associations between health promoting schools' policies and indicators of oral health in Brazil. **Health Promot. Int.**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 209- 218, 2003.

MUNKSGAARD, E. C.; PEUTZFELDT, A.; ASMUSSEN, E. Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. **Eur. J. Oral. Sci.**, Copenhagen, v. 108, n. 4, p. 341- 345, 2000.

NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S.; WATANABE, T.; YAMAGUSHI, O.; OTSU, K.; YAMAGATA, H.; INOHARA, H.; KUBO, T.; TSUJIMOTO, Y. Cyclophilin D-

dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. **Nature**, London, v. 434, p. 652- 658, 2005.

NAKASHIMA, R. A.; GARLID, K. D. Quinine inhibition of Na⁺ and K⁺ transport provides evidence for two cation/H⁺ exchangers in rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, n. 16, p. 9252- 9254, 1982.

NASJLETI, C. E.; CASTELLI, W. A.; CAFFESSE, R. G. Effects of composite restorations on the periodontal membrane of monkeys. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 62, p. 75- 78, 1983.

NETUSCHIL, L.; REICH, E.; BRECX, M. Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 16, p. 484- 488, 1989.

NETUSCHIL, L.; HOFFMAN, T.; BRECX, M. How to select the right mouthrinses in periodontal prevention therapy. Part I. Test systems and clinical investigations. **Int. J. Dent. Hygiene**, Amsterdam, v. 1, p. 143- 150, 2003.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. 2^a ed. São Paulo : Ed. Santos, 1988.

NEWTON, A. P. N. Clorexidine: análise dos efeitos “*in vitro*” sobre a lipoperoxidação, transição de permeabilidade mitocondrial, interação com metais e liberação “*in vivo*” de Hg a partir de restaurações de amálgama. Curitiba, 2002. 125p. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NEWTON, A. P. N.; CADENA, S. M. S.; ROCHA, M. E. M.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition (MPT). **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 151, n. 3, p. 407- 416, 2004.

NEWTON, A. P. N.; CADENA, S. M. S.; ROCHA, M. E. M.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 160, n. 1, p. 49- 59, 2005.

NICHOLLS, D. G.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochem Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 683, p. 57- 58, 1982.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 3**, San Diego: Academic Press, 2002.

NIEMINEN, A. L.; GORES, G. J.; DAWSON, T. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 2399- 2408, 1990.

NORDBÖ, H. Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine and aldehydes or ketones in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 79, p. 356- 361, 1971.

NORDBÖ, H.; ATTRAMADAL, A.; ERIKSEN, H. M. Iron discoloration of acrylic resin exposed to chlorhexidine or tannic acid: A model study. **J. Prosth. Dent.**, St. Louis, v. 49, n. 1, p. 126- 129, 1983.

NORDBÖ, H.; ERIKSEN, H. M.; ROLLA, G.; ATTRAMADAL, A.; SOLHEIM, N. Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine; Preliminary report. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, p. 117- 123, 1982.

NUKI, K.; SCHLENKER, R.; LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. Two years oral use of chlorhexidine in man VI. Effect on oxidative enzymes in oral epithelia. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 11, p. 172- 175, 1976.

NYLANDER, M.; FRIBERG, L.; LIND, B. Mercury concentrations in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings. **Swed. Dent. J.**, Stockholm, v. 11, p. 179- 187, 1987.

ÖRTENGREN, U.; WELLENDORF, H.; KARLSSON, S.; RUYTER, I. E. Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 28, p. 1106-1115, 2001.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 316, n. 1, p. 607- 611, 1995.

OZAWA, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. **Biosc. Rep.**, New York, v. 17, p. 237- 248, 1997.

PARONE, P. ^a; JAMES, D.; MARTINOU, J. C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, Paris, v. 84, p. 105- 111, 2002.

PENZO, D.; TAGLIAPIETRA, C.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1555, p. 160- 165, 2002.

PETRONILLI, V.; SZABÒ, I.; ZORATTI, M. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 259, p. 137- 143, 1989.

PHILLIPS, R. W. **Materiais Dentários de Skinner**. 9^a ed. Rio de Janeiro : Interamericana, 1993.

PON, L.; MOLL, T.; VESTWEBER, D.; MARSHALLSAV, B.; SCHATZ, G. Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in

a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 109, n. 6, p. 2603- 2613, 1989.

POTER, V. R. The assay of animal tissues for respiratory enzymes. Further studies on oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 169, p. 17-37, 1947.

PUCHER, J. J.; DANIEL, J. C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, p. 526- 532, 1993.

PULGAR, R.; OLEA-SERRANO, M. F.; NOVILLO-FERTRELL, A.; RIVAS, A.; PAZOS, P.; PEDRAZA, V.; NAVAJAS, J. M.; OLEA, N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. **Environ. Health Perspect.**, Washington, v. 108, n. 1, p. 21- 27, 2000.

PULLMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol- stimulated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 235, n. 1, p. 3322- 3329, 1960.

RAMBERG, P.; FURUICHI, Y.; SHERL, D.; VOLPE, A. R.; NABI, N.; GAFFAR, A.; LINDHE, J. The effect of triclosan on developing gingivitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 442- 448, 1995.

RAMBERG, P.; FURUICHI, Y.; VOLPE, A. R.; GAFFAR, A.; LINDHE, J. The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 7- 11, 1996.

REED, M. J.; STAPLE, P. H.; MASHIMO, P. A. Use of chlorhexidine gluconate to inhibit dental plaque accumulation *Macaca speciosa*. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 219- 220, 1977.

REGOS, J.; ZAK, O.; SOLF, R.; VISCHER, W. A.; WEIRICH, E. G. Anti-microbial spectrum of triclosan, a broad-spectrum anti-microbial agent for topical application. 2. Comparison with some other anti-microbial agents. **Dermatologica**, v. 158, p. 72- 79, 1979.

REICHL, F. X.; DURNER, J.; MANHART, J.; SPAHL, W.; GEMPEL, K.; KEHE, K.; LIEBL, B.; WALTHER, U. I.; HUME, W. R.; HICKEL, R. Biological clearance of HEMA in guinea pigs. **Biomaterials**, Kidlington, v. 23, n. 10, p. 2135- 2141, 2002.

RENTON-HARPER, P.; ADDY, M.; MORAN, J.; DOHERTY, F. M.; NEWCOMBE, R. G. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, p. 486- 489, 1996.

ROCHA, M. E. M.; FERREIRA, A. M. D. C.; BECHARA, E. J. H. Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. **Free Rad. Biol. Med.**, Bethesda, v. 29, n. 12, p. 1272- 1279, 2000.

ROSSI, E., AZZONE, G. F. Ion transport in liver mitochondria - energy barrier and stoichiometry of aerobic K⁺ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 7, p. 418- 426, 1969.

ROTSTEIN, I.; DOGAN, H.; AVRON, Y.; SHEMESH, H.; STEINBERG, D. Mercury release from dental amalgam after treatment with 10% carbamide peroxide in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 89, n. 2, p. 216- 219, 2000.

ROULET, J. F. A materials scientist's view: assessment of wear and marginal integrity. **Quintessence Int.**, Hanover Park , v. 18, n. 8, p. 543- 552, 1987.

SANTERRE, J. P.; SHAJII, L.; TSANG, H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 78, n. 8, p. 1459- 1468, 1999.

SARIS, N. E. L.; TEPLOVA, V. V.; ODINOKOVA, I. V.; AZARASHVILY, T. S. Interference of calmidazolium with measurement of mitochondrial membrane potential using the tetraphenylphosphonium electrode or the fluorescent probe rhodamine 123. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 328, p. 109- 112, 2004.

SAX, N. I.; LEWIS, R. J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 11th ed, New York : Van Nostrand Reinhold, 1987.

SCHAEKEN, M. J. M.; VAN DER HOEVEN, J. S.; SAXTON, C. A.; CUMMINS, D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation, development of gingivitis and formation of calculus in a 28-week clinical test. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, p. 465- 470, 1996.

SCHIÖTT, C. R.; BRINER, W. W.; LÖE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man II. The effect on the salivary bacterial flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 11, p. 145- 152, 1976a.

SCHIÖTT, C. R.; BRINER, W. W.; KIRKLAND, J. J.; LÖE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man III. Changes in sensitivity of the salivary flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 11, p.153- 157, 1976b.

SCHIÖTT, C. R.; LÖE, H.; BRINER, W. W. Two year oral use of chlorhexidine in man IV. Effect on various medical parameters. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 11, p.158- 164, 1976c.

SCHIOTT, C.; R.; LÖE, H.; JENSEN, B. K. M.; DAVIES, R. M.; GLAVIND, K. The Effect of Chlorhexidine Mouthrinses on the Human Oral Flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 5, p. 84- 89, 1970.

SCHWAIGER, M.; HERZOG, V.; NEUPERT, W. Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 105, n. 1, p. 235- 246, 1987.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; RACKEBRANDT, K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella tyhimurium* and V79 cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 415, p. 119- 130, 1998.

SEPALLA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. *In*: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSH, A. K.; HESS, B. (Eds.), **Biol. Biochem. Oscillators**. Academic Press, New York, p. 115- 124, 1973.

SHAJII, L.; SANTERRE, J. P. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. **Biomaterials**, Kidlington, v. 20, n. 20, p. 1897- 1908, 1999.

SHEEN, S.; BANFIELD, N., ADDY, M. The propensity of individual saliva to cause staining in vitro – a developmental method. **J. Dent.**, Oxford, v. 29, p. 99- 102, 2001.

SIEGRIST, B. E.; BRECX, M. C.; GUSBERTI, F. A.; JOSS, A.; LANG, N. P. In vivo study early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning microscope and bacteriological study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 2, p. 38- 46, 1991.

SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. **Methods Biochem. Anal.**, New York, v. 22, p. 125- 175, 1974.

SKÖLD, K.; TWETMAN, S; HALLGREN, A.; YUCEL-LINDBERG, T.; MODÉER, T. Effect of a chlorhexidine/tymol-containing varnish on prostaglandin E₂ levels in gingival crevicular fluid. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, p. 571- 575, 1998.

SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome *c* reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183- 201, 1965.

SONIS, S. T.; CLARK, W. B.; SHKLAR, G. Chlorhexidine-induced lingual keratosis and displasia in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 585- 591, 1978.

SORGATO, M. C.; KELLER, B. U.; STUHMER, W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. **Nature**, London, v. 330, p. 498- 500, 1987.

SOUTHARD, J. H.; NITISEWOJO, P. Loss of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from kidneys or mercury poisoned rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 52, p. 921- 927, 1973.

SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 36, p. 2699- 2702, 1976.

STALLARD, R. E.; VOLPE, A. R.; ORBAN, J. E.; KING, W. J. The effect of an Antimicrobial Mouthrinse on Dental Plaque, Calculus and Gingivitis. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 4, p. 37- 38, 1969.

STANLEY, H. R.; GOING, R. E.; CHAUNCEY, H. H. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 91, p. 817- 825, 1975.

STURZENBERGER, O. P.; LEONARD, G. S. The effect of a mouthrinse as adjunct in toothcleaning. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 299- 301, 1969.

SUMMER, J. B. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 413- 414, 1944.

SUNDBERG, H.; MEJARE, I.; ESPELID, I.; TVEIT, A. B.; Swedish dentists' decisions on preparation techniques and restorative materials. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 58, p. 135- 141, 2000.

SUROLIA, N.; SUROLIA, A. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. **Nat. Med.**, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 167- 173, 2001.

SZABÒ, I.; BERNARDI, P.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, n. 5, p. 2940- 2946, 1992.

SZABÒ, I.; PETRONILLI, V.; ZORATTI, M. A patch-clamp investigation of the *Streptococcus faecalis* cell membrane. **J. Membr. Biol.**, New York, v. 131, n. 3, p. 203- 218, 1993.

SZABÒ, I.; ZORATTI, M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 6, p. 3376- 3379, 1991.

TAKAHASHI, Y.; TSURUTA, S.; HASEGAWA, J.; KAMEYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues. **Toxicology**, Shannon, v. 163, p. 115- 126, 2001.

TAKAYANAGI, R.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem. J.**, London, v. 192, p. 853- 860, 1980.

TANAKA, K.; TAIRA, M.; SHINTANI, H.; WAKASA, K.; YAMAKI, M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 353- 362, 1991.

TERAKADO, M.; YAMAZAKI, M.; TSUJIMOTO, Y.; KAWASHIMA, T.; NAGASHIMA, K.; OGAWA, J. FUJITA, Y.; SUGIYA, H.; SAKAI, T.; FURUYAMA, S. Lipid peroxidation as a possible cause of benzoyl peroxide toxicity in rabbit dental pulp – a microsomal lipid peroxidation *in vitro*. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 63, p. 901- 905, 1984.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2ª ed. São Paulo : Ed. Santos, 1995.

TOBIAS, M.; CATALDO, E.; SHIERE, F. R.; CLARK, R. E. Pulp reaction to a resin-bounded quartz composite material. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 52, p. 1281- 1286, 1973.

THONEMANN, B.; SCHMALZ, G.; HILLER, K. A.; SCHWEIKL, H. Responses of L292 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. **Dent. Mater.**, Alexandria, v. 18, p. 318- 323, 2002.

VAN DER HOEVEN, J. S.; CUMMINS, D.; SCHAEKEN, M. J. M.; VAN DER OUDERAA, F. J. G. The effect of chlorhexidine and zinc/triclosan mouthrinses on the production of acids in dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v. 27, p. 298-302, 1993.

VAN VENETIE, R.; VERKLEIJ, A. J. Possible role of non-bilayer lipids in the structure of mitochondria. A freeze-fracture electron microscopy study. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 692, n. 3, p. 397-405, 1982.

VILLALAIN, J.; MATEO, C. R.; ARANDA, F. J.; SHAPIRO, S.; MICOL, V. Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 390, n. 1, p. 128-136, 2001.

VIMY, M. J.; TAKAHASHI, Y.; LORSCHIEDER, F. L. Maternal-fetal distribution of mercury (^{203}Hg) released from dental amalgam fillings. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, R939- R945, 1990.

VIMY, M. J.; LORSCHIEDER, F. L. Intraoral air mercury released from dental amalgam. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 64, p. 1069-1071, 1985.

VLADIMIROV, Y. A.; OLENEV, V. I.; SUSLOVA, T. B.; CHEREMISINA, Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv. Lipid. Res.**, San Diego, v. 17, p. 173-249, 1980.

VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 4, p. 48-51, 1961.

VOSS, D. O.; COWLES, J. C.; BACILLA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 6, p. 211-222, 1963.

WAALER, S. M.; RÖLLA, G.; SKJÖRLAND, K. K.; ÖGAARD, B. Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: a pilot study. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 101, p. 192- 105, 1993.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 353- 388, 2000.

WALTER, L.; NOGUEIRA, V.; LEVERVE, X.; HEITZ, M. P.; BERNARDI, P.; FONTAINE, E. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, n. 38, p. 29521- 29527, 2000.

WANG, L. Q.; FALANY, C. N.; JAMES, M. O. Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions. **Drug Metab. Dispos.**, v. 32, p. 1162- 1169, 2004.

WARNER, R. R.; MYERS, M. C.; TAYLOR, D. A. Electron probe analysis of human skin: Determination of the water concentration profile. **J Invest Dermatol.**, New York, v. 90, p. 218- 224, 1988.

WARNER, R. R.; MYERS, M. C.; BURNS, J.; MITRA, S. Analytical electron microscopy of chlorhexidine-induced tooth stain in humans: direct evidence for metal-induced stain. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 28, p. 255- 265, 1993.

WATTENBERG, L. W. What are the critical attributes for cancer chemopreventive agents. **Ann. N Y Acad. Sci.**, New York, v. 768, p. 82- 90, 1995.

WEICKOWSKI, M. R., WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial

permeability transition pore. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 423, p. 339– 342, 1998.

WEINBERG, J. M.; HARDING, P. G.; HUMES, H. D. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. I. Direct effects of *in vitro* mercuric chloride on renal cortical mitochondrial function. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 60- 67, 1982a.

WEINBERG, J. M.; HARDING, P. G.; HUMES, H. D. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. II. Functional alterations of renal cortical mitochondria isolated after mercuric chloride treatment. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 68- 74, 1982b.

WEISS, B.; LANDRIGAN, P. J. The developing brain and the environment, an introduction. **Environm. Health Perspect.**, Washington, v. 108, n. 3, p. 373- 374, 2000.

WILTON, J. M. A.; BAMTON, J. L. M.; GRIFFITHS, G. S.; CURTIS, M. A.; LITE, S.; JOHNSON, N. W.; POWELL, J. R.; HARAP, G. J.; CRITCHLEY, P. Interleukin1-beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross-sectional study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 53- 57, 1992.

WHO. Environmental Health Criteria, Inorganic mercury. **World Health Organization.**, Geneva, v. 118, p. 29- 67, 1991.

YONETANI, T.; RAY, G. S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome *c* by cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 240, n. 7., p. 3392- 3398, 1965.

ZORATTI, M. & SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1241, p. 139- 176, 1995.

ZUCKERBRAUN, H. L.; BABICH, H.; MAY, R. J.; SINENSKY, M. C.; Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells *in vitro*. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, p. 628- 636, 1998.



New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition

Ana Paula Negrelo Newton, Silvia Maria S.C. Cadena, Maria Eliane Merlin Rocha,
Eva Gunilla Skäre Carnieri, Maria Benigna Martinelli de Oliveira*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, C.P. 19046, CEP.81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 19 February 2004; received in revised form 24 February 2004; accepted 24 February 2004

Available online 19 June 2004

Abstract

Chlorhexidine (CHX) is a bis-bis-guanide with anhipatic and antiseptic properties and is largely used in dentistry, mainly for management of periodontal problems and in oral pre-operative procedures. The present study concerns the effect of CHX on lipid peroxidation, mitochondrial permeability transition (MPT), and the interaction of CHX with ferritin (HoSF). CHX (100 μM) increased iron release from HoSF by ~13-fold when compared to control values. CHX also increased iron-dependent lipid peroxidation. MPT induced by CHX was protected by ethylene glycol-bis(β-aminoethyl-ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), dithiothreitol (DTT), and cyclosporin A (CsA), showing a Ca²⁺-dependent effect, in which oxidation of thiol groups is involved, as well as the involvement of the transmembrane proteinaceous pore. BHT, catalase or *o*-phenanthroline did not protect MPT induced by CHX. This suggests that a ROS-independent mechanism is involved in the induction of MPT.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chlorhexidine; Lipid peroxidation; Mitochondrial permeability transition (MPT)

1. Introduction

Chlorhexidine (CHX) (Fig. 1) is a bis-bis-guanide broad-spectrum antiseptic that has been widely used in several skin and mucosa affections (Lafforgue et al., 1997). Developed as a preservative in pharmaceutical preparation (Jaminet et al., 1970), it was first reported as an effective antiplaque agent by Løe and Schiott (1970) and no other agent besides fluorides has re-

ceived more attention in dentistry. CHX is also used against periodontal diseases and in oral pre-operative procedures, such as tooth extractions (Bonine, 1995) and dental implants (Lambert et al., 1997). It can be used as a gel and/or rinse over a range of concentrations, a varnish and, more recently, as small chips introduced directly into the periodontal pocket (Greenstein and Polson, 1998; Sköld et al., 1998).

In dentistry, adverse dose-dependent effects of CHX include increased dental calculus formation, impairment of taste perception, sensitization, and oral mucosa desquamation (Moghadam et al., 1991). Extrinsic staining of the teeth is also a recognized local side ef-

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1664;

fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: mbmo@ufpr.br (M.B. Martinelli de Oliveira).

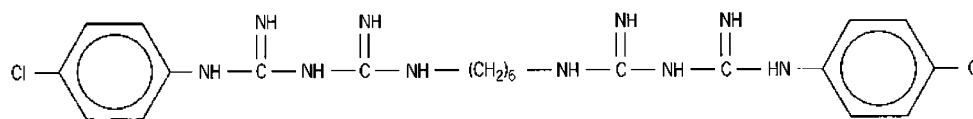


Fig. 1. Structural formula of CHX.

fect. In addition, the absence of extrinsic tooth staining with the drug is considered as an indication of a lack of efficacy, due to the reduced availability of the antiseptic in formulations (Addy et al., 1990). The mechanism by which CHX produces tooth staining seems to be a consequence of protein denaturation accompanied by exposure of sulfhydryl groups that would react with metals such as iron and sulfur, forming colored sulfides (Ellingsen et al., 1982; Warner et al., 1993). Alternatively, CHX may directly precipitate organic dyes from foods (Sheen et al., 2001). It has been recognized that this antiseptic interferes with both microsomal and mitochondrial enzymes (Christensen and Jensen, 1974; Christensen et al., 1975).

The possibility of an interaction between CHX and metals, particularly iron, and sulfur (Ellingsen et al., 1982; Warner et al., 1993), emphasizes the development of CHX studies involving lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition (MPT). In the former, Fe^{2+} is recognized to have an important role (Halliwell and Gutteridge, 1999; Kowaltowski and Vercesi, 1999), while in the latter, Ca^{2+} is important, both interfering in mitochondrial activities. In respect to lipid peroxidation, the addition of a Fe^{2+} salt to a peroxide-free unsaturated lipid in the presence of O_2 initiates a process of H^\bullet abstraction by OH^\bullet . This is inhibited by H_2O_2 -removing enzymes (e.g. catalase), scavengers of OH^\bullet , or chelating agents, which bind iron and prevent its participation in free-radical reactions (Halliwell and Gutteridge, 1999). When mitochondrial lipid peroxidation is promoted by Fe^{2+} complexes, irreversible loss of mitochondrial functions occurs, namely mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation and ion transport, besides extensive mitochondrial DNA (mtDNA) fragmentation (Kowaltowski and Vercesi, 1999).

Under some circumstances, lipid peroxidation appears to be related to the mitochondrial permeability transition phenomenon (Penzo et al., 2002), a process occurring at supraphysiological matrix concentrations of calcium, making the organelles non-selectively

permeable to small molecules (<1500 Da) (He and Lemasters, 2002). This condition causes uncoupling, loss of low molecular weight components from the matrix, and in vivo mitochondrial swelling (Halestrap et al., 1998). Recently, the mitochondrial permeability transition phenomenon has been recognized as a mediator of cell death through the release of cytochrome c and other proteins such as apoptosis-inducing factor, procaspases 3 and 9, and through regulation of levels of cellular ATP (Walter et al., 2000). Thus, the purpose of the present work is to correlate a possible interaction of CHX with iron and processes such as lipoperoxidation. The effect of this antiseptic on the iron-binding protein ferritin was, therefore, evaluated, as well as its interference with iron-dependent lipid peroxidation. Since lipid peroxidation also seems to be related to the MPT phenomenon, the interference of CHX on this process was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bovine serum albumin (BSA), D-mannitol, succinate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES), rotenone, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl-ether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA), catalase, dithiothreitol (DTT), ADP, and butylhydroxytoluene (BHT) were from Sigma (St. Louis, MO); cyclosporin A (CsA) was from Sandoz Pharma AG (Basel, Switzerland) and deferoxamine (deferoxamine mesilate) was from Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). All other chemicals were of the highest commercially available purity.

2.2. Animals

These were male albino rats (Wistar strain, 150–200 g), which received a standard laboratory diet (Purina[®]) and water ad libidum. The recommendation

of the Brazilian National Law (no. 6.638, 5 November 1979) for scientific management of animals was followed. All animals were starved 12 h before being killed by decapitation. Their livers were then excised and immediately added to a cooled (4 °C) extraction medium.

2.3. Preparation of rat liver mitochondria (RLM)

Mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation (Voss et al., 1961) using an extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES–KOH, pH 7.2, 1 mM EGTA, and 0.1 g% BSA. In all cases, the mitochondrial pellet was washed twice with the extraction medium. For the MPT experiments, the remaining pellet was washed and suspended in the same medium, but without EGTA. Only mitochondrial preparations with a respiratory control above 4.0 were used.

2.4. Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951), using BSA as standard.

2.5. Preparation of horse spleen ferritin (HoSF) stock solution

In order to remove loosely bound iron, HoSF was incubated in a solution of EDTA (10 mM) for 1 h at 4 °C. It was then purified on a Sephadex G-25 column, previously equilibrated with 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, containing 140 mM NaCl (Oteiza et al., 1995).

2.6. Iron release from HoSF assay

The assay was carried out at 25 °C as described (Oteiza et al., 1995). The reaction mixture contained HoSF (0.3 mg protein ml⁻¹), 20 mM Tris–HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl and 1 mM bathophenanthroline sulfonate, final volume 1 ml. The addition of different concentrations of CHX (5–100 μM) started the reaction. Iron release from ferritin was followed by measuring the increase in absorbance at 530 nm over 20 min, due to the chelation of Fe²⁺ with the bathophenanthroline sulfonate ($\epsilon_{530} = 22.14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Oteiza et al., 1995).

2.7. Iron-dependent lipid peroxidation assay

This was carried out according to the method described by Buege and Aust (1978). Briefly, the system containing mitochondrial protein (1 mg/ml), 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 2 mM ADP, and 0.2 mM FeCl₃, was maintained at 37 °C under constant agitation, in the absence or presence of CHX (23 μM). The reaction was initiated by addition of 6 mM α -ketoglutarate and was stopped with BHT (0.012%). When indicated, the reaction system was supplemented with *o*-phenanthroline (600 μM) or deferoxamine (600 μM). Aliquots (0.5 ml) were taken at time intervals (0, 10, 20, 30 and 45 min) and lipid peroxidation was shown by an increase in the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) ($\epsilon_{535} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Buege and Aust, 1978).

2.8. Mitochondrial permeability transition assays

These were conducted at 28 °C, in an incubation system containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 0.3 mM Pi, 5 μM rotenone, 3 mM potassium succinate and 0.5 mg protein ml⁻¹. Catalase (1 μM), BHT (10 μM), EGTA (1 mM), DTT (1 mM), CsA (0.5 μM) or *o*-phenanthroline (300 μM) were added to the system as indicated in Figs. 4–7. Ca²⁺ (20 μM) and 2.5 μM CHX, or Ca²⁺ (50 μM) and 0.5 μM CHX were then added. MPT was monitored by measuring the decrease in optical density at 540 nm. (Gunter and Pfeiffer, 1990).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out as analysis of variance and test of Tukey for average comparison. Mean values \pm S.D. were used; values were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Iron release from HoSF

Fig. 2 shows that CHX significantly ($P < 0.05$) stimulated iron release from HoSF in a dose-dependent manner. This effect was noticeable at a low concen-

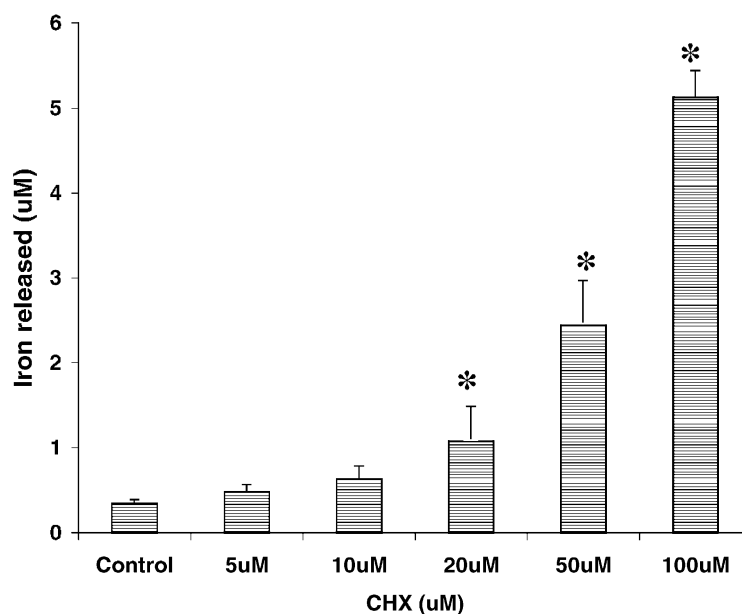


Fig. 2. Iron release from HoSF. HoSF solution ($0.3 \text{ mg protein ml}^{-1}$) was kept at room temperature in a 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer, containing 140 mM NaCl , $1 \text{ mM bathophenanthroline sulfonate}$ and the indicated concentrations of CHX. Iron release from ferritin was followed by measuring the increase in absorbance at 530 nm over 20 min , due to the chelation of Fe^{2+} by bathophenanthroline sulfonate ($\epsilon_{530} = 22.14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 6$). (*) Indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

tration ($20 \mu\text{M}$) and at $100 \mu\text{M}$ CHX, the increase on iron release was ~ 13 -fold when compared to control values.

3.2. Iron-dependent lipid peroxidation

Iron-dependent lipid peroxidation, determined by formation of TBARS, is shown in Fig. 3A and B. ADP and FeCl_3 were present in order to induce lipoperoxidation of mitochondria energized by the oxidation of 2-oxoglutarate. With this system, ROS are chelated with Fe^{3+} and ADP ($\text{ADP-Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$), the complex being an initiator of radical chain reactions (Sassa et al., 1994). Fig. 3A shows the effect of CHX ($23 \mu\text{M}$) on a time course iron-dependent lipid peroxidation. It can be observed that the presence of CHX gave rise to a significant stimulus of lipid peroxidation, starting from 20 min of incubation. At 45 min , the increase in TBARS production was $\sim 100\%$, when compared with control values. Fig. 3B shows that both *o*-phenanthroline and deferoxamine, two chelating agents that bind iron and prevent its participation in free-radical reactions (Halliwell and

Gutteridge, 1999), completely suppressed the effect of CHX, reinforcing the fact that iron is indispensable in this process.

3.3. Mitochondrial permeability transition

MPT assays, evaluated by large-amplitude mitochondrial swelling, that is dependent on the presence of calcium in the matrix (Sakura et al., 2000), are shown in Figs. 4–7. Fig. 4 (trace c) shows that CHX ($0.5 \mu\text{M}$) did not induce swelling in the absence of Ca^{2+} . However, in the presence of $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , CHX ($0.5 \mu\text{M}$) promoted accentuated mitochondrial swelling (trace d), which was completely inhibited by 1 mM EGTA (trace b). This indicates that CHX causes a Ca^{2+} -dependent increase in the permeability of inner mitochondrial membrane, allowing the penetration of the osmotic support (mannitol/KCl) and water into the matrix. This effect was dependent on the concentration of both, Ca^{2+} and CHX, since when a lower Ca^{2+} concentration was used, a longer time was necessary to initiate swelling, even at a higher CHX concentration ($2.5 \mu\text{M}$) (data not shown).

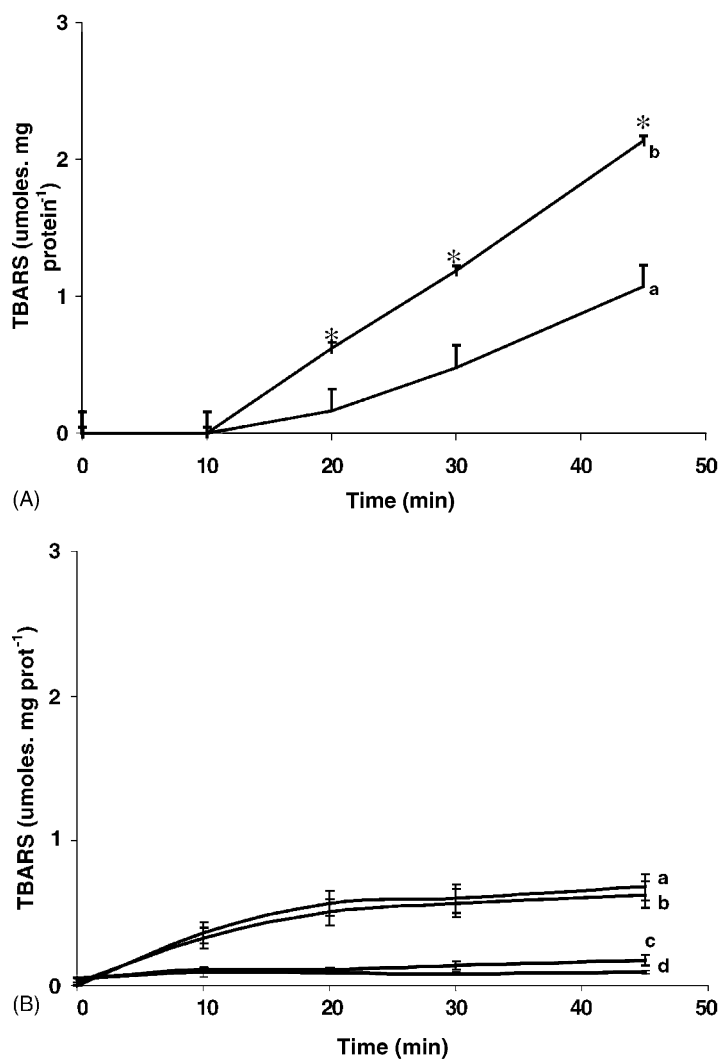


Fig. 3. Effect of CHX on iron-dependent lipid peroxidation. (A) The incubation system containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 2 mM ADP, 0.2 mM FeCl₃, and mitochondrial protein (1 mg ml⁻¹) was kept under constant agitation, at 37 °C, in the presence (trace b) or absence (trace a) of CHX (23 μM). (B) The incubation system, as in A, was kept under constant agitation, at 37 °C. Traces a and b represent the effect of *o*-phenanthroline (600 μM) in the presence (trace a) or absence (trace b) of CHX (23 μM). Traces c and d represent the effect of deferoxamine (600 μM) in the presence (trace c) or absence (trace d) of CHX (23 μM). The reaction was initiated by addition of 6 mM α-ketoglutarate and was stopped with BHT (0.012%). Aliquots (0.5 ml) were taken at intervals and mixed with the TBARS reagent. Lipid peroxidation was followed by increases in the formation of TBARS ($\epsilon_{535} = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 4$). (*) Indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

Mitochondrial inner membrane permeabilization by Ca²⁺ plus pro-oxidants such as diamide has been associated with oxidation of protein thiol groups, to form cross-linked protein aggregates (Fagian et al., 1990). The use of this pro-oxidant, whose effect is completely protected by DTT, is useful as a positive

control of the MPT process, when oxidation of protein thiol groups is involved. Trace b in Fig. 5 shows that swelling caused by 50 μM Ca²⁺ plus 300 μM diamide, in mitochondria oxidizing succinate, was prevented as expected, by 1 mM DTT (Fig. 5, trace c). It can also be observed that swelling caused by 0.5 μM

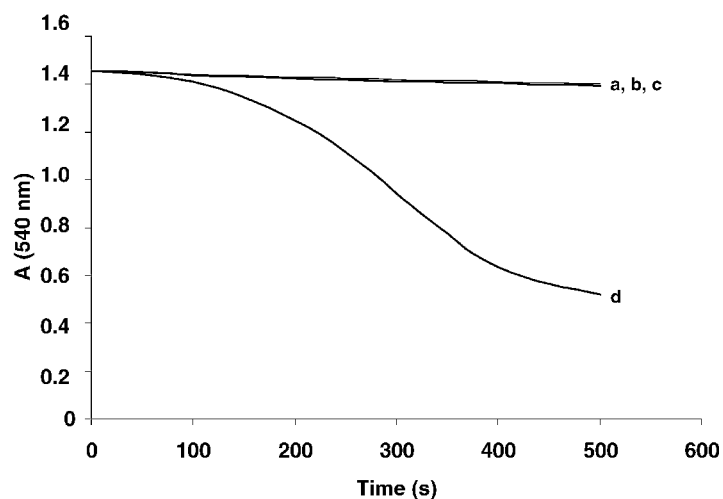


Fig. 4. Effect of CHX on MPT. Rat liver mitochondria (RLM) ($0.5 \text{ mg protein ml}^{-1}$) were added to an incubation medium consisting of 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 0.3 mM Pi, 5 μM rotenone, 3 mM potassium succinate, kept at 28°C . After 2 min pre-incubation with 50 μM Ca^{2+} , 0.5 μM CHX was added to the system. MPT was monitored by measuring the decrease in absorbance at 540 nm. Trace a represents RLM + 50 μM Ca^{2+} ; trace b RLM + 50 μM Ca^{2+} + 1 mM EGTA + 0.5 μM CHX; trace c RLM + 0.5 μM CHX and trace d RLM + 50 μM Ca^{2+} + 0.5 μM CHX. The data shown represent five independent experiments.

CHX in the presence of 50 μM Ca^{2+} (trace d) was also prevented by 1 mM DTT (trace e). Experiments using 20 μM Ca^{2+} plus 2.5 μM CHX, in the presence of 1 mM DTT, gave rise to the same profile (data not

shown), suggesting that under our experimental conditions, the permeabilization promoted by Ca^{2+} plus CHX would involve cross-linking of neighboring thiol groups.

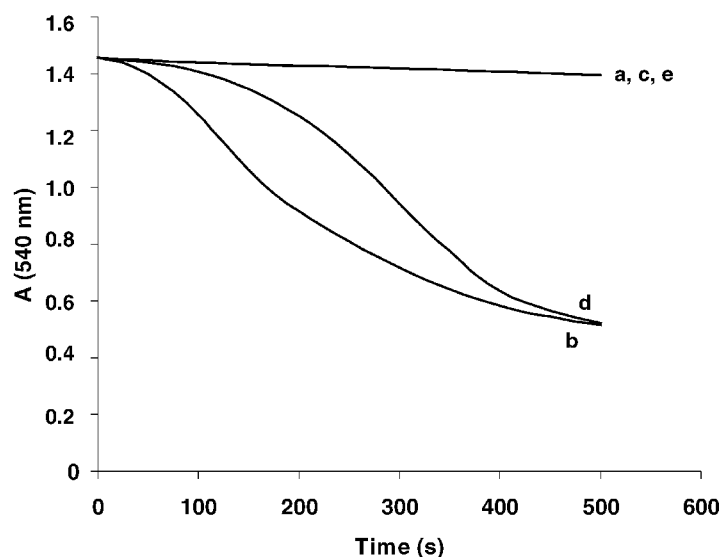


Fig. 5. Effect of DTT on MPT induced by CHX. RLM ($0.5 \text{ mg protein ml}^{-1}$) was added to an incubation buffer consisting of 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 0.3 mM Pi, 5 μM rotenone, 3 mM succinate, kept at 28°C . MPT was monitored by measuring the decrease in absorbance at 540 nm. After 2 min pre-incubation with 50 μM Ca^{2+} , 300 μM diamide (trace b) or 0.5 μM CHX (trace d) was added. From the beginning of the incubations, 1 mM DTT was present before addition of 300 μM diamide (trace c) or 0.5 μM CHX (trace e), or no other additions were made (trace a). The data shown represent five independent experiments.

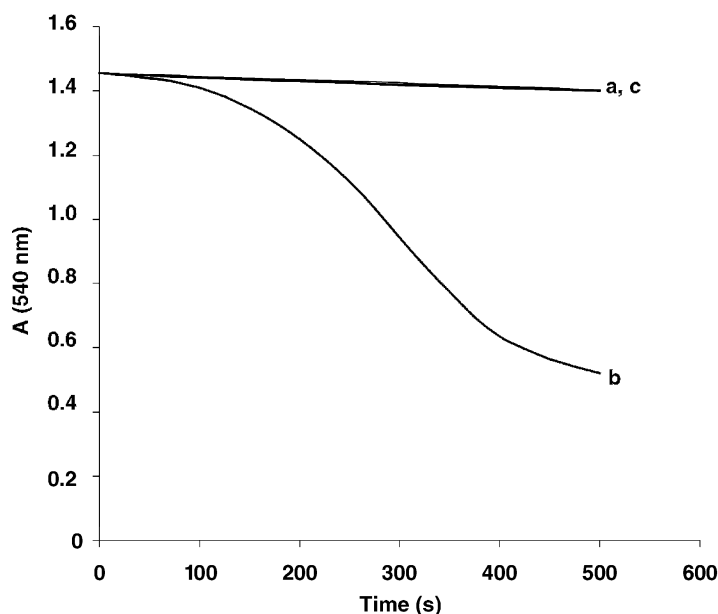


Fig. 6. Effect of CsA on MPT induced by CHX. RLM ($0.5 \text{ mg protein ml}^{-1}$) were added to a medium containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 0.3 mM Pi, 5 μM rotenone, 3 mM succinate, that was kept at 28°C . MPT was monitored by measuring the decrease in absorbance at 540 nm. After 2 min pre-incubation with 50 μM Ca^{2+} , 0.5 μM CHX (trace b) was added. From the beginning of the incubations, 0.5 μM CsA was present or no other additions were made (trace a). The data shown represent five independent experiments.

In order to further clarify the mechanism by which CHX induces MPT, the immunosuppressor CsA was used. This is an inhibitor of the high-conductance channel (transmembrane proteinaceous pore), which is opened by the matrix Ca^{2+} (Zoratti and Szabò, 1995; Bernardi, 1999; Belyaeva et al., 2002). Fig. 6 shows that MPT induced by 50 μM Ca^{2+} plus 0.5 μM CHX (Fig. 6, trace b) was completely inhibited by 0.5 μM CsA (Fig. 6, trace c). This strongly suggests that the effect of CHX plus Ca^{2+} , besides acting as an -SH oxidant, is also susceptible to CsA, confirming the formation of MPT.

Since CHX induces iron-dependent lipid peroxidation in rat liver mitochondria (Fig. 3A), it was important to investigate whether there was a correlation of such an effect with the mechanism by which CHX gives rise to MPT. Consequently, three different agents were used in order to investigate this possibility, namely BHT, catalase, and *o*-phenanthroline. The first two are antioxidant agents (Carbonera and Azzone, 1988; Zoratti and Szabò, 1995); the last was used because of the dependence of iron on lipid peroxidation induced by CHX (Fig. 3B). Fig. 7 shows that

swelling caused by 50 μM Ca^{2+} plus 0.5 μM CHX (trace b) was not protected by 1 μM catalase (trace c), 10 μM BHT (trace d), nor 300 μM *o*-phenanthroline (trace e). Conditions using 20 μM Ca^{2+} plus 2.5 μM CHX gave rise to the same profile (data not shown). The combined results indicate that, under our experimental conditions, there was no oxidative damage involved in the mechanism of membrane permeabilization caused by Ca^{2+} plus CHX.

4. Discussion

We now provide data on the mode of action of CHX. For the first time its effect was demonstrated on iron release from HoSF, lipid peroxidation, and MPT. CHX was able to release iron from ferritin, an iron storage protein, in a significant ($P < 0.05$) and dose-dependent manner, at lower concentrations than those employed in dental practice. This result points out the possibility of an interaction between CHX and iron and sulfur, as proposed by Ellingsen et al. (1982) and Warner et al. (1993) in their studies on dental

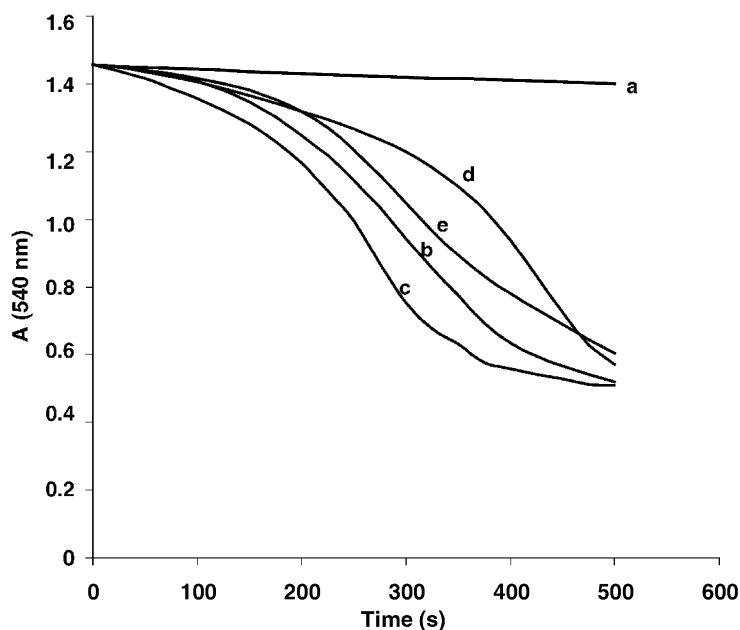


Fig. 7. Effect of BHT, catalase, and *o*-phenanthroline on MPT induced by CHX. RLM ($0.5 \text{ mg protein ml}^{-1}$) were added to a medium consisting of 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 0.3 mM Pi, $5 \mu\text{M}$ rotenone, 3 mM succinate, that was kept at 28°C . MPT was monitored by measuring the decrease in absorbance at 540 nm. After 2 min pre-incubation with $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , $0.5 \mu\text{M}$ CHX (trace b) was added. From the beginning of the incubation, $1 \mu\text{M}$ catalase (trace c), $10 \mu\text{M}$ BHT (trace d), $300 \mu\text{M}$ *o*-phenanthroline (trace e) or no other additions were made (trace a). The data shown represent five independent experiments.

plaque proteins. Iron mobilization from ferritin has long been known to induce oxidative stress, leading to lipid peroxidation and oxidative DNA, and protein damage, and possibly playing a role in iron induced carcinogenesis (Rocha et al., 2000). Hence, ferritin contributes to protection of the cell against toxicity involving oxyradicals formed by iron and peroxides, as well as that ferritin Fe^{3+} can be reduced by several radicals such as O_2^- and semiquinone and released as Fe^{2+} , thus promoting oxidative injury (Rocha et al., 2000).

The release of iron from HoSF induced by CHX associates this agent with lipid peroxidation, a natural process of oxidative damage with deleterious consequences to biological membranes (Vladimirov et al., 1980; Kowaltowski and Vercesi, 1999). CHX ($23 \mu\text{M}$) was now able to induce lipoperoxidation in a process where iron ions were indispensable, since the addition of *o*-phenanthroline or deferoxamine caused complete inhibition (Fig. 3B). Moreover, CHX was also revealed to be a potent MPT inducer, this effect

occurring at a concentration ($0.5 \mu\text{M}$) lower than that involved in lipid peroxidation ($23 \mu\text{M}$). In MPT experiments (Figs. 4–7), doses higher than $5 \mu\text{M}$ were able to cause swelling without the presence of Ca^{2+} (data not shown), suggesting direct effects of CHX on the permeability of membranes. Moreover, an increase in permeability to Ca^{2+} , accompanied by leakage of lactate dehydrogenase from human gingival cells exposed to CHX, has already been observed by Babich et al. (1995). In the induction of MPT caused by CHX, ROS formation seems not to be involved. This could be inferred because low CHX concentrations ($0.5 \mu\text{M}$), which caused MPT, were not able to induce lipoperoxidation (data not shown). In addition, BHT (Fig. 7, trace d), in spite of promoting a delay in MPT when compared with the effect caused by CHX (Fig. 7, trace b), protected only partially this event when compared to the absence of swelling (Fig. 7, trace a), as well as catalase was not able to protect mitochondrial swelling (trace c). MPT induced by CHX is also iron-independent since *o*-phenanthroline

or deferoxamine did not prevent it. In fact, CHX induced the process through a mechanism inhibited by CsA (Fig. 6 trace c), and protected by DTT (Fig. 5, trace e) and EGTA (Fig. 4, trace b). This strongly suggests that both formation of a proteinaceous pore and oxidation of –SH groups are involved in the mechanism of MPT induced by CHX. The possibility of effects involving –SH groups has also been reported by Warner et al. (1993), when an association between the use of CHX and high levels of sulfur-containing proteins, incorporated in dental plaque, was suggested. Having in mind that CHX treatments are long and usually require repetition, our results could, therefore, give rise to some pathophysiological implications. Since the mitochondrial swelling associated to MPT can lead to external mitochondrial membrane rupture with the liberation of apoptosis inducers proteins, such as cytochrome c (Kroemer, 2003), CHX could be an agent that promotes cell death. Also related to this matter, it has been reported that mitochondrial injury caused by CHX, as revealed by ATP depletion and decreased respiratory chain enzymatic complexes activities, could be a cytotoxic mechanism associated with this agent (Hidalgo and Domingues, 2001). In fact, mitochondrial damage is generally correlated with cytotoxic parameters reported in cell culture and intact organisms (Ferreira et al., 1997; Wallace and Starkov, 2000). In addition, several studies have shown that CHX has toxic effects on a variety of eukaryotic cells, these effects being the release of lysosomal enzymes (Knuutila and Soderling, 1981), inhibition of fibroblast proliferation (Lucarotti et al., 1990), cell cytolysis (Gabler et al., 1987), and enzyme inhibition via a cation-chelating mechanism (Gendron et al., 1999). Our results agree with this proposition, since a cation-chelating mechanism could explain the results obtained on iron release from HoSF (Fig. 2).

It is noteworthy that the concentration range of this antiseptic, that causes minimal tissue damage while being effective as an antimicrobial, is not yet established. In the light of our results, a mechanism involving membrane damage could be inferred as underlying the toxicity of CHX. Our overall data show that CHX, an antiseptic agent largely used in dental practice, is able to induce processes that have important biological consequences at concentrations far below those used in clinical practice.

References

- Addy, M., Wade, W., Goodfield, S., 1990. Staining and antimicrobial properties in vitro of some chlorhexidine formulations. *Clin. Prev. Dent.* 12, 13–17.
- Babich, H., Wurzbarger, B.J., Rubin, Y.L., Sinensky, M.C., Blau, L., 1995. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol. Toxicol.* 11, 79–88.
- Belyaeva, E., Glazunov, V.V., Korotkov, S.M., 2002. Cyclosporin A-sensitive permeability transition pore is involved in Cd²⁺-induced dysfunction of isolated rat liver mitochondria: doubts no more. *Arch. Biochem. Biophys.* 405, 252–264.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79, 1127–1155.
- Bonine, F.L., 1995. Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* 79, 154–157.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 52. Academic Press, San Diego, pp. 302–310.
- Carbonera, D., Azzone, G.F., 1988. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 943, 245–455.
- Christensen, F., Bleeg, H.S., Jensen, J.E., 1975. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver mitochondria. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 36, 01–12.
- Christensen, F., Jensen, J.E., 1974. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver microsomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35, 33–41.
- Ellingsen, J.E., Rolla, G., Eriksen, H.M., 1982. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *J. Clin. Periodontol.* 9, 317–322.
- Fagian, M.M., Da Silva, L.P., Martins, I.S., Vercesi, A.E., 1990. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus oxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 19955–19960.
- Ferreira, F.M.L., Madeira, U.M.C., Moreno, A.J., 1997. Interaction of 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene with mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* 53, 299–308.
- Gabler, W.L., Bullock, W.W., Creamer, H.R., 1987. The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. *J. Periodontol. Res.* 22, 445–450.
- Gendron, R., Grenier, D., Sorsa, T., Mayrand, D., 1999. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 6, 437–439.
- Greenstein, G., Polson, A., 1998. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J. Periodontol.* 69, 507–520.
- Gunter, T.E., Pfeiffer, D.R., 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258, 755–786.
- Halestrap, A.P., Kerr, P.M., Javadov, S., Woodfield, K.Y., 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability

- transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 70–94.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- He, L., Lemasters, J.J., 2002. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.* 512, 1–7.
- Hidalgo, E., Domingues, C., 2001. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 15, 271–276.
- Jaminet, F.R., Delattre, L., Delporte, J.P., Moes, A., 1970. Influence de la température de sterilization et du pH sur la stabilité de la chlorhexidine en solution. *Pharm. Acta Helvetiae* 45, 60–63.
- Knuutila, M., Söderling, E., 1981. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol. Scand.* 39, 285–289.
- Kowaltowski, A., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 463–471.
- Kroemer, G., 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 433–435.
- Lafforgue, C., Carret, L., Falson, F., Reverdy, M.E., Freney, J., 1997. Percutaneous absorption of a chlorhexidine digluconate solution. *Int. J. Pharm.* 147, 243–246.
- Lambert, P.M., Morris, H.F., Ochi, S., 1997. The influence of 0.12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55 (Suppl. 5), 25–30.
- Lõe, H., Schiott, C.R., 1970. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J. Periodontal Res.* 5, 79–83.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lucarotti, M.E., White, H., Deas, J., Silver, I.A., Leaper, D.J., 1990. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to conservation therapy? *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 72, 388–392.
- Moghadam, B.K.H., Drisko, C.L., Gier, R.E., 1991. Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case report and review of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 71, 431–434.
- Oteiza, P.I., Kleinman, C.G., Demasi, M., Bechara, E.J.H., 1995. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 607–611.
- Penzo, D., Tagliapietra, C., Colonna, R., Petronilli, V., Bernardi, P., 2002. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochem. Biophys. Acta* 1555, 160–165.
- Rocha, M.E.M., Ferreira, A.M.D.C., Bechara, E.J.H., 2000. Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 1272–1279.
- Sassa, H., Kogure, K., Takaishi, Y., Terada, H., 1994. Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 201–207.
- Sakura, I.K., Stoyanovski, D.A., Fujimoto, Y., Cederbaum, A.I., 2000. Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 273–280.
- Sheen, S., Banfield, N., Addy, M., 2001. The propensity of individual saliva to cause staining in vitro—a developmental method. *J. Dent.* 29, 99–102.
- Sköld, K., Twetman, S., Hallgren, A., Yucel-Lindberg, T., Modéer, T., 1998. Effect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E₂ levels in gingival crevicular fluid. *Eur. J. Oral Sci.* 106, 571–575.
- Vladimirov, Y.A., Olenov, V.I., Suslova, T.B., Cheremisina, Z.P., 1980. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. *Adv. Lipid Res.* 17, 173–249.
- Voss, D.O., Campello, A.P., Bacila, M., 1961. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48–51.
- Wallace, K.B., Starkov, A., 2000. Mitochondrial target of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 353–388.
- Walter, L., Nogueira, V., Leverve, X., Heintz, M.P., Bernardi, P., Fontaine, E., 2000. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J. Biol. Chem.* 275, 29521–29527.
- Warner, R.R., Myers, M.C., Burns, J., Mitra, S., 1993. Analytical electron microscopy of chlorhexidine-induced tooth stain in humans: direct evidence for metal-induced stain. *J. Periodontal Res.* 28, 255–265.
- Zoratti, M., Szabò, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.



Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria

Ana Paula Negrelo Newton, Silvia Maria S.C. Cadena, Maria Eliane Merlin Rocha, Eva Gunilla Skäre Carnieri, Maria Benigna Martinelli de Oliveira*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, C.P. 19046, CEP. 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 24 January 2005; received in revised form 6 June 2005; accepted 7 June 2005
Available online 14 July 2005

Abstract

Bisphenols are a class of compounds that exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity. One of the most widely used member of this group is triclosan (TRN). TRN is a synthetic, non-ionic, broad-spectrum antimicrobial agent, which is incorporated into several products, including hand soaps and detergents and those of skin care and oral hygiene. The effects of TRN on mitochondrial respiratory parameters and the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) are described. That of TRN (up to 60 nmol mg⁻¹ protein) on isolated liver mitochondria decreased oxygen consumption of state 3 respiration, as well as $\Delta\Psi$, but increased oxygen consumption of state 4 respiration, characteristic of an uncoupler effect. Analysis of segments of the respiratory chain suggested that the TRN inhibition site is located between complexes II and III. Mitochondrial swelling, energized or driven by the K⁺ diffusion potential using valinomycin, was also inhibited by TRN, the former being completely inhibited at concentrations greater than 10 nmol TRN mg⁻¹ protein, suggesting that it is also able to interfere with fluidity of the inner mitochondrial membrane. These results suggest that, besides its antibacterial effect, TRN can also impair the mitochondrial function of animal cells.
© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Triclosan (TRN); Mitochondria; Respiratory chain enzymes; Swelling; Mitochondrial transmembrane electrical potential

1. Introduction

Bisphenols are a class of compounds that exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity. One of the most widely used member of this group is triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether

(TRN) (Fig. 1) (Bhargava and Leonard, 1996). TRN is a synthetic, non-ionic, broad-spectrum antimicrobial agent, which possesses mostly antibacterial, but also antifungal and antiviral properties (Jones et al., 2000). Unless the pH is alkaline, it is poorly soluble in aqueous solutions but is readily soluble in most organic solvents. TRN is chemically stable and can be heated up to 200 °C for up to 2 h (Bhargava and Leonard, 1996). This stability makes it suitable for incorporation into

* Corresponding author. Fax: +55 41 2662042.

E-mail address: mbmo@ufpr.br (M.B. Martinelli de Oliveira).

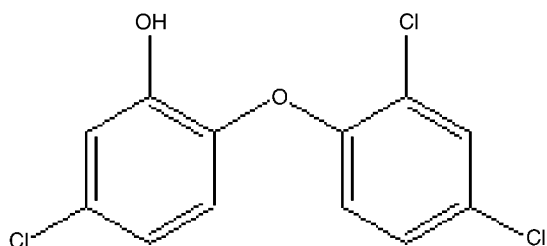


Fig. 1. Structure of TRN.

several applications in a multitude of contemporary consumer products, including hand soaps and detergents and those of skin care (Heath et al., 1999; Jones et al., 2000) and oral hygiene (Moran et al., 2000). It is active at very low concentrations and its long-lasting activity has been demonstrated (Lygre et al., 2003).

Studies have revealed that TRN acts as a site-directed, picomolar inhibitor of bacterial NADH-dependent enoyl-[acyl carrier protein] reductase (FabI, also known as ENR), or its homolog InhA in *Mycobacterium smegmatis* (Mcmurray et al., 1998) and *M. tuberculosis* (Parikh et al., 2000). The inhibition of ENR by TRN becomes progressively stronger with time and is essentially irreversible after several minutes (Heath et al., 1999). This irreversible inhibition correlates with the formation of a stable ENR-NAD⁺-TRN ternary complex (Levy et al., 1999), in which the ether bond and the oxygen bridge in TRN may be critical to the formation of this ternary complex (Stewart et al., 1999; Heath et al., 2000). The inhibition of the ENR by TRN was also demonstrated for *Plasmodium falciparum* where this drug was also shown to be a potent inhibitor of the parasite development both in vitro and in vivo (Surolia and Surolia, 2001). In addition, recent data suggested that inhibition of fatty acid synthase could be a promising target for chemoprevention of breast cancer since TRN at 1000 ppm was able to suppress a model of rat mammary carcinogenesis, induced by methylnitrosourea (Lu and Archer, 2005).

Besides the molecular mechanism involving fatty acid synthesis, there is strong evidence that the membranotropic effects of TRN are also important. In connection to this, TRN interacts with phospholipids of both prokaryotic and eukaryotic cells (Lygre et al., 2003; Guillen et al., 2004; Villalain et al., 2001).

Triclosan has been found in human blood plasma (Hovander et al., 2002). Significant buccal absorption

of TRN has been reported following topical mouthrinse application as well as its retention on dental plaque (Lin, 2000).

Early studies using 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether showed an interference in renal function (Chow et al., 1977). Administration of a tritium-labelled compound to mice gave rise to high levels of radioactivity detectable in the gall bladder and liver (Kanetoshi et al., 1988), indicating its biliary excretion and an enteropathic circulation. Induction of cytochrome P450 in liver microsomes from mice and rats was also reported (Kanetoshi et al., 1992). It has been shown that TRN interacts with drug metabolizing enzymes in vitro (Hanioka et al., 1996), via a competitive inhibition of 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) and a non competitive inhibition of 7-pentoxoresorufin *O*-deethylase (PROD) in rat liver microsomes, K_i values being 0.24 and 1.48 micromolar, respectively. Therefore, in spite of being regarded as a compound of low toxicity from studies on acute and sub acute treatments (Lyman and Furia, 1969; Chow et al., 1977), it may secondarily express toxicity with its metabolism products, so that the extension of the knowledge about TRN is important. In spite of several studies on TRN, much of its biological and toxicological action mechanisms at subcellular levels remain to be elucidated. This agent has membranotropic effects so that mitochondria would be potentially an important target for its effects, since the activities of this organelle is dependent on membrane integrity. In addition, mitochondria have been used by several authors as a model for cytotoxicity studies (Wallace and Starkov, 2000), being implicated in cell death mechanisms (Parone et al., 2002). We now describe the effect of TRN on some energy-linked functions in isolated rat liver mitochondria, to investigate a potential mechanism by which TRN could exert its biological effects.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (FC-CP), sodium glutamate, sodium succinate, rotenone, bovine serum albumin (BSA), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), D-mannitol, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl-ether)-*N,N,N',N'*-

tetraacetic acid (EGTA), ADP and NADH were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of the highest commercially available purity.

2.2. Animals

These were male albino rats (Wistar strain, 150–200 g), which received a standard laboratory diet (Purina[®]) and water ad libitum. All recommendations of the Brazilian National Law (no. 6.638, 5 November 1979) for scientific management of animals were followed. All animals were starved 12 h before being killed by decapitation. Their livers were then excised and immediately added to a cooled (4 °C) extraction medium.

2.3. Preparation of rat liver mitochondria

Mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation (Voss et al., 1961) using an extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES-KOH pH 7.2, 1 mM EGTA, and 0.1 g% BSA. In all cases, the mitochondrial pellet was washed twice with the extraction medium. Only mitochondrial preparations with a respiratory control above 4.0 were used. Disrupted mitochondria were obtained by a freeze-thawing treatment and used to determine the activities of enzymes linked to the respiratory chain and ATPase. TRN was incubated for 2 min with the mitochondrial preparations before initiation of the assays. For each one to be valid, duplicate solvent controls with ethanol were included. Ethanol, in the concentrations used in these experiments, had no effect on mitochondrial properties.

2.4. Oxygen uptake

Oxygen uptake and oxidative phosphorylation were evaluated at 28 °C in a 1.3 ml thermostatically controlled water-jacketed closed chamber with magnetic stirring. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode with a Gilson oxygraph (Chance and Williams, 1955; Voss et al., 1961). The standard respiratory medium contained 125 mM D-mannitol, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7.2, 0.1 mM EGTA and 0.1% BSA. The medium was supplemented either with 1 μM rotenone, 0.8 mM Pi, 0.08 mM ADP, 3 mM sodium

succinate and 0.5 mg of mitochondrial protein, or 0.16 mM Pi, 0.16 mM ADP, 5 mM sodium glutamate and 2 mg of mitochondrial protein. TRN was added to the medium 2 min before initiating the reaction with glutamate or succinate. States 3 and 4 respiration rates were measured after the addition of substrates in the presence (state 3) and after exhaustion (state 4) of ADP and expressed as mmol of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein (Estabrook, 1967). The respiratory control coefficient was calculated as the ratio of state 3 to state 4 respiration (Chance and Williams, 1955).

2.5. Measurements of enzymatic activities of mitochondria

NADH and succinate oxidase activities were assayed polarographically (Singer, 1974) in a reaction medium containing 80 mM phosphate buffer pH 7.4, 50 μM EDTA in a final volume of 1.3 ml at 28 °C. For NADH oxidase activity 1 mg of mitochondrial protein was used and the reaction was started with 0.17 mM NADH. Succinate oxidase activity was estimated using 1.0 mg of mitochondrial protein in the presence of 2 μM rotenone and the reaction was initiated by addition of 10 mM succinate. The results are expressed as mmol of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein (Estabrook, 1967). NADH dehydrogenase (EC 1.6.5.3 NADH:ubiquinone oxidoreductase) and succinate dehydrogenase (EC 1.3.5.1 succinate:ubiquinone oxidoreductase) activities were assayed spectrophotometrically according to Singer (1974). NADH dehydrogenase activity was estimated using the reaction medium containing 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.6 mM potassium ferricyanide, 1 μM rotenone and 100 μg of mitochondrial protein in a final volume of 1 ml at 28 °C. The reaction was started by addition of 0.17 mM of NADH and the concentration of ferricyanide reduced was estimated using a molar extinction coefficient of 1040 M⁻¹ cm⁻¹ at 420 nm. Succinate dehydrogenase was assayed in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM NaCN, 20 mM sodium succinate and 100 μg of mitochondrial protein. The mixture was incubated for 10 min at 28 °C and the reaction was initiated by addition of 1 mM PMS and 60 μM DPIP as artificial electron acceptors. DPIP reduction was monitored at 600 nm and enzyme

activity was calculated using the molar extinction coefficient of $19,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. NADH-cytochrome *c* reductase (EC 1.6.99.3 NADH: cytochrome *c* oxidoreductase) and succinate cytochrome *c* reductase (EC 1.3.99.1 succinate:cytochrome *c* oxidoreductase) activities were measured by reduction of cytochrome *c* at 550 nm as described by Somlo (1965). The reaction medium at 28 °C in a final volume of 1.0 ml was consisted of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM EDTA, NaCN 1 mM, 40 μM ferricytochrome *c* and 100 μg mitochondrial protein. For succinate cytochrome *c* reductase evaluation, the medium was also supplemented with 2 μM rotenone. The reactions were started by addition of 50 μM NADH or 5 mM succinate for NADH or succinate cytochrome *c* reductase, respectively. The concentration of reduced cytochrome *c* was estimated using the molar extinction coefficient of $19,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 550 nm. The activity of cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1 ferrocycytochrome *c*: oxygen oxidoreductase) was determined spectrophotometrically according to Mason et al. (1973). The reaction medium at 28 °C and final volume of 1.0 ml was consisted of 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 2 mM EDTA, 30 μM ferrocycytochrome *c* and 100 μg of mitochondrial protein. The concentration of cytochrome *c* oxidized was estimated using a molar extinction coefficient of $19,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 550 nm. The activity of ATPase in broken and intact mitochondria was evaluated as described by Pullman et al. (1960), but with modifications. In disrupted mitochondria the enzyme was assayed at 28 °C, using a system consisting of 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane Tris-HCl pH 8.4, 3 mM magnesium sulphate, 2.5 mM PEP, 10 U pyruvate kinase, 4 mM ATP and 100 μg of mitochondrial protein. ATPase activity of intact mitochondria was assayed at 28 °C in the presence or absence of 1 μM FCCP, the reaction medium consisting of 50 mM sucrose, 120 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 3 mM ATP and 2 mg of mitochondrial protein. Liberated orthophosphate was measured according to Sumner (1944) and the results expressed as mmol of Pi liberated per min per mg.

2.6. Mitochondrial swelling experiments

Swelling in energized (Sepalla et al., 1973) or de-energized (Moreno and Madeira, 1990) mitochondria was measured using a HITACHI (mod. U-2001

UV-vis) spectrophotometer at 546 nm. The reactions were carried out at 28 °C in a final volume of 3 ml. The addition of 50 mM sodium acetate or potassium nitrate and valinomycin, to the mitochondrial suspension, provided the necessary ions for the swelling process. Swelling supported by electron and energy transfer system, was carried out in a basic reaction mixture containing: mitochondrial suspension (1 mg protein), 100 mM sucrose, 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 50 mM sodium acetate and TRN at different concentrations (1.25–60 mmol mg^{-1} protein). Swelling was induced by addition of glutamate (15 mM) and shrinkage was observed after addition of rotenone (4 μM). Swelling in de-energized mitochondria was carried out in a reaction mixture containing: mitochondrial suspension (1 mg protein), 135 mM KNO_3 , 5 mM HEPES buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 4 μM rotenone, 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A and 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ valinomycin. TRN was added in varying concentrations (1.25–60 mmol mg^{-1} protein).

2.7. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$)

The transmembrane potential ($\Delta\psi$) was evaluated at 28 °C with safranine *O* (Åkerman and Wikström, 1976). The standard reaction medium, containing 250 mM sucrose, 20 mM MOPS buffer pH 7.2, 3 mM succinate, 2 mM NaH_2PO_4 and 1 μM rotenone was supplemented with mitochondrial (0.5 mg protein ml^{-1}) and safranine *O* (5 μM). Fluorescence was measured in a RF-5031PC spectrofluorophotometer (Shimadzu Scientific Instruments Inc.), the excitation and emission wavelengths being 495 and 586 nm, respectively (Weickowski and Wojtczak, 1998), with a slit width of 3.0 for excitation and emission wavelengths. A calibration curve was constructed using the Nernst equation and $\Delta\psi$ was estimated as described by Rossi and Azzone (1969).

2.8. Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951), using BSA as standard.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out as analysis of variance and test of Tukey for average

comparison. Mean value \pm S.D. were used; values were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results

Fig. 2 shows the effect of various concentrations of TRN on respiratory parameters of functionally intact mitochondria. In these experiments, glutamate and succinate were oxidizable substrates and the analyzed parameters were: (i) the rates of oxygen consumption in states 3 (Fig. 2A) and 4 (Fig. 2B) of mitochondrial

respiration and (ii) the respiratory control coefficient (RCC) (Fig. 2C). In Fig. 2A, it can be observed that the effect of TRN on preparations of mitochondria, respiring in the presence of substrates and ADP (state 3), was more pronounced in the presence of sodium succinate, being significantly different ($P < 0.05$) with very low doses such as 2.5 nmol TRN mg^{-1} protein, and reaching $\sim 80\%$ inhibition compared to control values, when the highest dose (60 nmol TRN mg^{-1} protein) was used. With sodium glutamate as oxidizable substrate, the inhibition caused by TRN on state 3 was of a lower magnitude, reaching a maximum value of

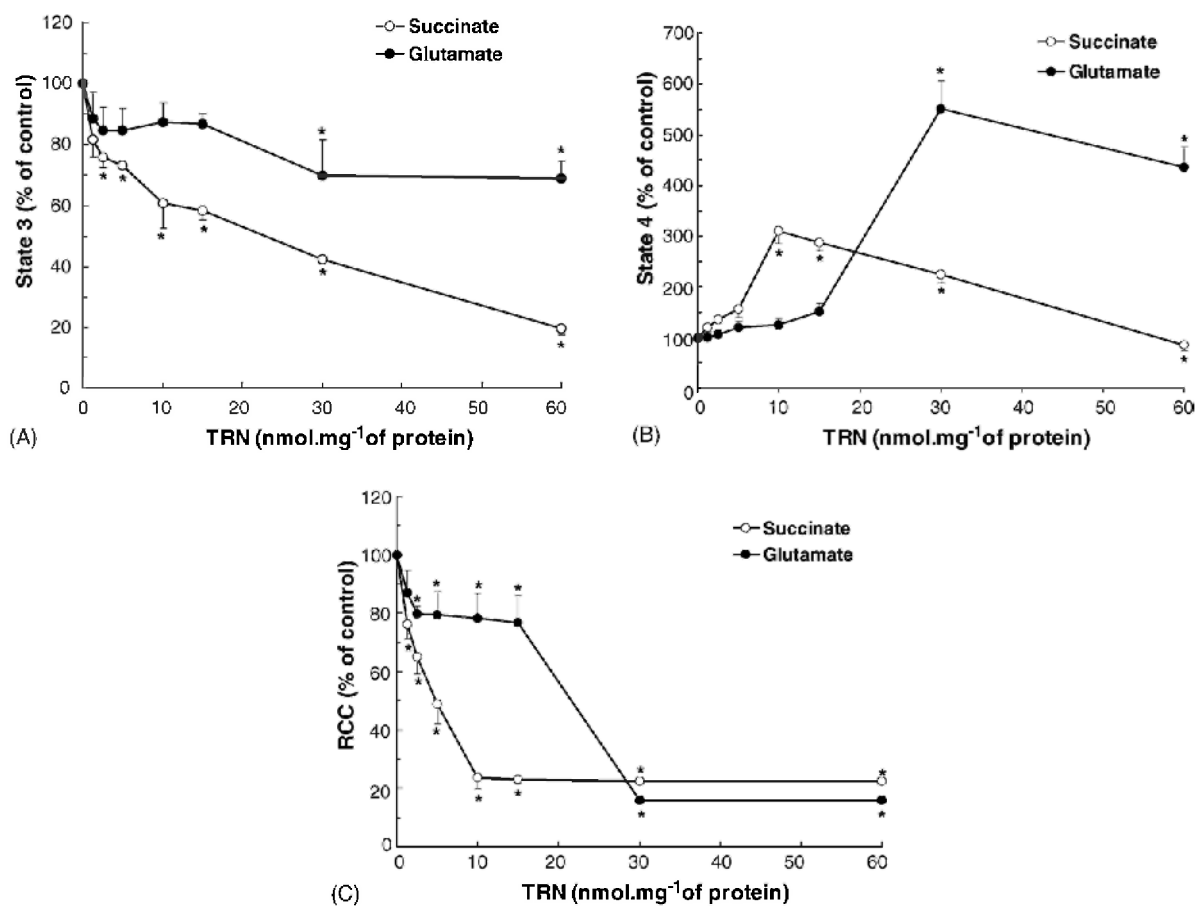


Fig. 2. Effects of TRN on mitochondrial respiration with sodium glutamate (○) or sodium succinate (●) as substrate. Conditions for oxygen uptake measurements are described in Section 2. (A) State 3, mitochondrial oxygen uptake in the presence of ADP and substrate. 100% activity corresponds to 44 ± 3 and 83 ± 9 nmol of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein for glutamate and succinate, respectively. (B) State 4, mitochondrial oxygen uptake after exhaustion of ADP. 100% activity corresponds to 7 ± 1 and 21 ± 3 nmol of oxygen consumed per min per mg of protein for glutamate and succinate, respectively. (C) RCC, respiratory control coefficient. Hundred percent corresponds to 6 ± 0.7 and 5 ± 0.6 for glutamate and succinate, respectively. Each value represents mean \pm S.D. of four different experiments. (*) Represents significantly different from control ($P < 0.05$).

31% with 60 nmol TRN mg^{-1} protein. Fig. 2B shows the effect of TRN on the rate of oxygen consumption after ADP exhaustion (state 4). In this condition TRN strongly stimulated oxygen consumption with both substrates, reaching a stimulus of $\sim 450\%$ in the presence of glutamate at 30 nmol mg^{-1} protein and $\sim 210\%$ in the presence of succinate at 10 nmol mg^{-1} protein. However, as the concentration of TRN was increasing, a decrease in the rate of O_2 consumption occurred, probably related to the inhibition of electron transport as observed in state 3 (Fig. 2A). In consequence of the inhibition of state 3 and stimulus of state 4, the values for RCC (state 3/state 4) were lower than those of the controls (Fig. 2C). As a consequence, TRN also caused impairment of oxidative phosphorylation since the ADP/O ratio for concentrations above 10 and 15 nmol TRN mg^{-1} protein, when succinate and glutamate were used, could not be established (data not shown). The stimulus of state 4 suggests that TRN could give rise to an accentuated uncoupler effect, besides other effects on components of the respiratory chain.

Fig. 3 shows the effect of TRN on mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$). When mitochondria were energized with succinate, the addition of TRN caused a dose dependent collapse, starting at 5 nmol mg^{-1} protein (Fig. 3A, traces d–f), and higher doses (15–60 nmol TRN mg^{-1} protein) caused total collapse of $\Delta\Psi$ (Fig. 3A, traces g–i). When mitochondria were pre-incubated with low doses of TRN (1.25–10 nmol mg^{-1} protein, Fig. 3B, traces b–f), it impaired the development of $\Delta\Psi$ by mitochondria energized with succinate (Fig. 3B, trace a), and higher doses (15–60 nmol TRN mg^{-1} protein) completely prevented the formation of the potential. (Fig. 3B, traces g–i).

In order to clarify the effects of TRN on state 3 respiration, they were evaluated in the enzymatic complexes of the respiratory chain. Table 1 shows that the presence of the drug (60 nmol TRN mg^{-1} protein) in the system decreased the activities of NADH and succinate oxidase by $\sim 49\%$ and $\sim 58\%$, respectively. Other segments inhibited by TRN were NADH-cytochrome *c* reductase ($\sim 37\%$) as well as succinate-cytochrome *c* reductase ($\sim 60\%$) (Table 1). No effect was observed on NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase, suggesting that the site of TRN inhibition is further on than complex I and between complexes II and III. These results explain the decrease

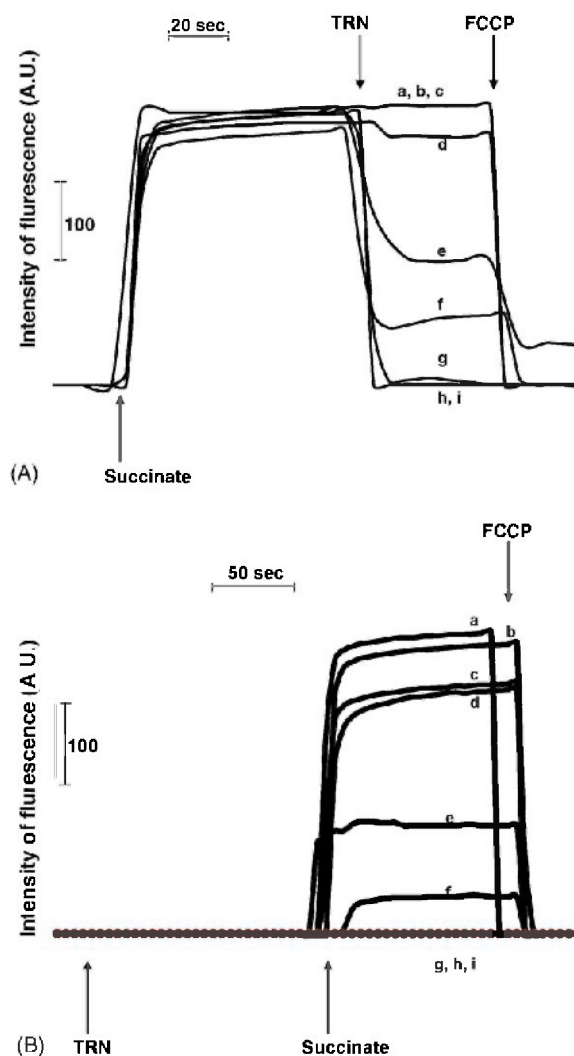


Fig. 3. Effects of TRN on mitochondrial transmembrane potential energized with succinate. Conditions for $\Delta\Psi$ measurements are described in Section 2. (A) Effects of TRN were observed immediately after its addition. (B) Results show the effects of the pre-incubation (2 min) of TRN with mitochondria. Incubation system was maintained at 28 °C and consisted of MOPS buffer (20 mM), pH 7.2 and 250 mM sucrose, supplemented with 2 mM Pi, 5 μM safranin *O*, 0.5 mg of mitochondrial protein per ml, 3 mM sodium succinate and 1 μM rotenone, in a final volume of 2 ml. Increasing concentrations of TRN (nmol mg^{-1} protein) were used: 1.25 (traces b); 2.5 (traces c); 5 (traces d); 7.5 (traces e); 10 (traces f); 15 (traces g); 30 (traces h); 60 (traces i), or no TRN addition (traces a). The data shown represent four independent experiments.

Table 1
Effect of TRN on enzymatic activities related to the respiratory chain

TRN (nmol mg ⁻¹ of protein)	Values in % of activity compared with control (100%)						
	NADH oxidase	NADH dehydrogenase	NADH cytochrome <i>c</i> reductase	Succinate oxidase	Succinate dehydrogenase	Succinate cytochrome <i>c</i> reductase	Cytochrome <i>c</i> oxidase
1.25	85 ± 8	98 ± 5	84 ± 6*	84 ± 12	95 ± 10	89 ± 5*	106 ± 11
2.5	90 ± 5	97 ± 7	86 ± 5*	77 ± 7*	107 ± 3	89 ± 5*	110 ± 10
5	72 ± 12*	97 ± 3	81 ± 8*	69 ± 6*	94 ± 13	88 ± 5*	108 ± 11
10	63 ± 9*	99 ± 6	86 ± 5*	63 ± 10*	95 ± 13	81 ± 6*	109 ± 8
15	68 ± 11*	98 ± 9	79 ± 3*	48 ± 8*	97 ± 13	77 ± 5*	109 ± 9
30	68 ± 5*	97 ± 8	78 ± 5*	39 ± 10*	91 ± 15	62 ± 4*	109 ± 8
60	51 ± 3*	99 ± 5	63 ± 2*	42 ± 9*	89 ± 8	40 ± 3*	111 ± 9

Experimental conditions are described in Section 2. Control values (100%) were: NADH oxidase: 122.4 ± 7.5 nmol of O₂ consumed min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; NADH dehydrogenase: 3.1 ± 0.2 μmol of ferricyanide reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; NADH cytochrome *c* reductase: 321.8 ± 29.7 nmol of cytochrome *c* reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate oxidase: 84.2 ± 7.9 nmol of O₂ consumed min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate dehydrogenase: 183.5 ± 16.9 μmol of DPIP reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate cytochrome *c* reductase: 178.7 ± 10 nmol cytochrome *c* reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; cytochrome *c* oxidase: 340.9 ± 30.3 nmol cytochrome *c* oxidized min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein. Results (mean ± S.D. of three independent experiments) are expressed as % of control activities (100%).

* Significantly different from controls (100%), $P < 0.05$.

of oxygen consumption at state 3. Small differences in inhibition values could signify differences in properties of the mitochondrial preparations. No effect of TRN on the substrate dehydrogenase, i. e., glutamate dehydrogenase, an enzyme from the mitochondrial matrix, was observed (data not shown).

In order to better visualize the uncoupler action of TRN, the effect of this agent was evaluated on ATPase activity, the results being shown in Fig. 4. In these experiments, the enzyme was assayed in preparations consisting of intact, disrupted and FCCP-uncoupled mitochondria. TRN promoted a strong stimulus of the hydrolytic activity of ATPase, assayed in intact mitochondria (Fig. 4A), as would be expected for an uncoupler agent. This stimulus was dependent on the TRN concentration and reached ~628% at 60 nmol mg⁻¹ protein. However, when the effect of TRN was evaluated on ATPase activity using disrupted mitochondria preparations (Fig. 4B), the enzyme was significantly ($P < 0.05$) inhibited with the presence of TRN (10–60 nmol mg⁻¹ protein), demonstrating its direct interference on the enzyme. TRN had no effect on ATPase of FCCP-treated mitochondria (Fig. 4A), suggesting that it does not cause any decrease of ATP hydrolysis due to the excess of uncouplers present in the reaction system.

The actions of TRN on energy-linked functions of isolated mitochondria motivated us to investigate the effects of TRN on osmotic volume changes of liver mitochondria, providing further information on their possible effects on the mitochondrial membrane.

Fig. 5 shows the effects of TRN (1.25–60 nmol mg⁻¹ protein) on energy-linked mitochondrial swelling. The experiments were carried out in the presence of sodium acetate and sodium glutamate, as oxidizable substrates. Trace a represents control conditions, where the addition of glutamate to mitochondria gave rise to accentuated swelling, as observed by the decrease of absorbance. The addition of rotenone promoted shrinkage of the organelles, reinforcing the concept that swelling is dependent on electron transfer via NADH dehydrogenase. Traces b–d, obtained in the presence of varying concentrations of TRN, showed a dose-dependent decrease in swelling. Traces e–h (10–60 nmol TRN mg⁻¹ protein) show that under these experimental conditions, TRN completely inhibits the energized swelling. These results are in agreement with those obtained on the mitochondrial transmembrane electrical potential, which showed that TRN completely inhibits $\Delta\Psi$, at concentrations above 15 nmol mg⁻¹ protein, reinforcing again that swelling is dependent on the $\Delta\Psi$.

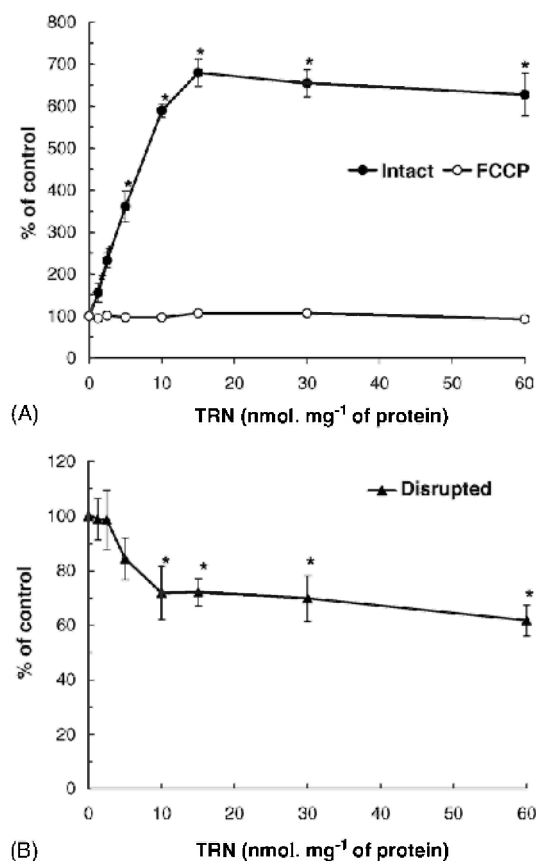


Fig. 4. Effect of TRN on ATPase in intact and FCCP-uncoupled mitochondria (A) and in disrupted mitochondria (B). Experimental conditions are described in Section 2. Control values (100%) were: intact mitochondria (●): 673 ± 86 nmol Pi mg⁻¹ protein min⁻¹; disrupted mitochondria (▲): 3 ± 0.5 μ mol Pi mg⁻¹ protein min⁻¹; intact mitochondria in the presence of FCCP (○): 4 ± 0.1 μ mol Pi mg⁻¹ protein min⁻¹. Results (mean \pm S.D. of three independent experiments) are expressed as percent of control activities (100%). (*) Significantly different from controls (100%), $P < 0.05$.

The mitochondrial volume can be also determined by potassium flux across the inner membrane (Nakashima and Garlid, 1982). Swelling driven by the K⁺ diffusion potential can be evaluated in intact mitochondria, where neither the respiratory chain nor ATP synthase are functional due to the absence of substrates. Such a condition is characterized by a poor mitochondrial permeability to K⁺ ions, their uptake being induced by the mobile carrier valinomycin, whose complexed and uncomplexed forms are able

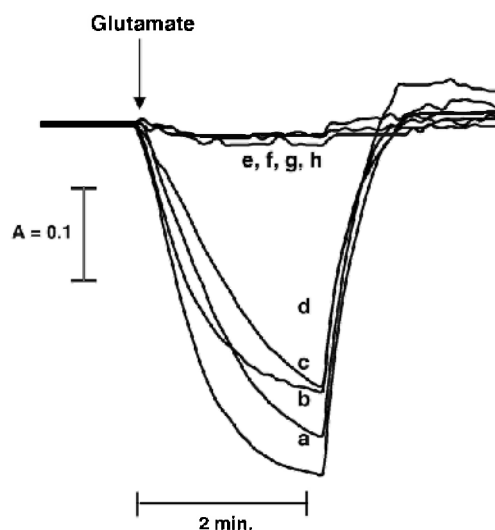


Fig. 5. Effect of TRN on the amplitude and rate of swelling of liver mitochondria energized with glutamate. Mitochondria (1 mg) were suspended in a medium containing 100 mM sucrose, 30 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.5 mM EDTA and 50 mM sodium acetate. Increasing concentrations of TRN (nmol mg⁻¹ protein) were pre-incubated (2 min) with mitochondria: 1.25 (trace b); 2.5 (trace c); 5 (trace d); 10 (trace e); 15 (trace f); 30 (trace g); 60 (trace h), or no TRN addition was made (trace a). The data shown represent four independent experiments.

to pass through the membrane, resulting in the presence of K⁺ in mitochondrial swelling (Nicholls and Ferguson, 2002). Under this condition, TRN reduced the swelling amplitude in a dose-dependent manner, reaching a ~40% inhibition at the highest dose used (60 nmol TRN mg⁻¹ protein) (Fig. 6). Since the transport of the valinomycin-K⁺ complex occurs throughout the membrane as a function of membrane fluidity, it is reasonable to suggest that TRN, besides other biological effects, also affects this important property of biological membranes.

4. Discussion

Mitochondria, due to their peculiar structural and functional characteristics, represent a potential target for xenobiotic-induced bioenergetic failure, playing a determining role in cell signaling and apoptotic modes of cell death (Wallace and Starkov, 2000). In the present study, we provide new data that could potentially be

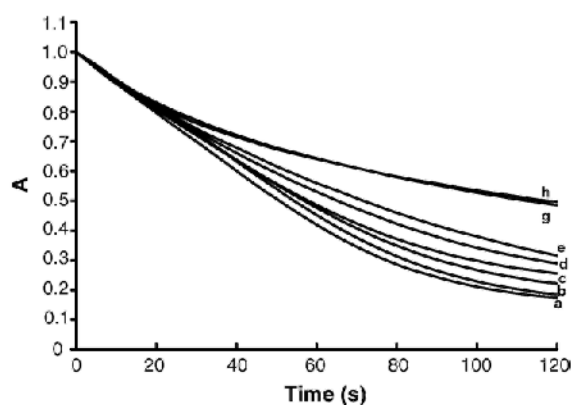


Fig. 6. Effect of TRN on the amplitude and rate of valinomycin-induced swelling of liver mitochondria. Mitochondria (1 mg) were suspended in a medium containing 135 mM KNO_3 , 5 mM HEPES buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 4 μM rotenone and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A, in a final volume of 3 ml. The reaction was initiated by addition of 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ valinomycin. Increasing concentrations of TRN (nmol mg^{-1} protein) were pre-incubated (2 min) with mitochondria: 1.25 (trace b); 2.5 (trace c); 5 (trace d); 10 (trace e); 15 (trace f); 30 (trace g); 60 (trace h), or no TRN addition was made (trace a). The data shown represent four independent experiments.

involved in the mode of action of TRN on animal cells.

TRN, was firstly recognized for its effects as antibacterial agent (Regos et al., 1979). However, it is detected in human blood plasma (Hovander et al., 2002), show a significant buccal absorption following topical mouthrinse application, is retained on dental plaque (Lin, 2000), interferes with renal function (Chow et al., 1977), and is detectable in the gall bladder and liver (Kanetoshi et al., 1988), indicating biliary excretion and an enteropathic circulation of this compound. Besides being reported as metabolized in the liver (Wang et al., 2004), TRN has been recognized as an inducer of cytochrome P450 in liver microsomes (Kanetoshi et al., 1992), as a competitive inhibitor of 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) and a non competitive inhibitor of 7-pentoxoresorufin *O*-depentylase (PROD) in rat liver microsomes (Hanioka et al., 1996). In addition, due to its structural similarity to polychlorobiphenyls, TRN inhibits sulfotransferases and glucuronosyltransferases, besides being a substrate for such enzymes (Wang et al., 2004). Therefore, in spite of the possibility of liver detoxification of this agent, the direct effects of TRN on liver mitochondria cannot be excluded.

The present study shows for the first time the effect of TRN on some mitochondrial functions. The phosphorylation efficiency of mitochondria in the presence of TRN is affected as inferred from the effect on oxygen consumption (Fig. 2A and B), which resulted in decrease of the RCC and ADP/O ratios. TRN caused a progressive decrease in $\Delta\psi$ (Fig. 3B), which in addition to an increase in the state 4 respiration (Fig. 2B), reinforces the proposition that it is an uncoupler agent. At higher concentrations of TRN, the initial stimulating effect was followed by a progressive decrease in stimulation of the respiratory rate, while the mitochondrial $\Delta\psi$ sharply decreased. This biphasic behavior on state 4 respiration indicates the existence of at least two effects or a pleiotropic action of the drug. The stimulation of state 4 respiration suggests that TRN increases the uncoupler effect and the decrease in stimulation observed at higher doses of TRN is probably caused by inhibition of the respiratory chain components, which was also confirmed by the respiratory chain enzymes assays. Experiments using broken mitochondria allowed an evaluation of electron transport along the respiratory chain, independent of the membrane barrier, phosphorylation activity or other processes dependent on $\Delta\psi$. Such a condition showed an inhibition site further on than complex I and between complexes II and III (Table 1).

Also, in agreement with the stimulatory effect of TRN on state 4 respiration, it consistently stimulated the ATPase activity of tightly coupled intact mitochondria (Fig. 4A), reinforcing the action mechanism of TRN to be as an uncoupler. It is noteworthy that, besides its uncoupler effect, TRN directly affects ATPase, causing a significant ($P < 0.05$) inhibition of the enzyme activity ($\sim 40\%$), considering the results obtained with disrupted mitochondria (Fig. 4B).

The actions of TRN on mitochondria are complex with a diverse spectrum of responses being manifest. While it satisfies most of the criteria for an uncoupler agent, it can act at higher concentrations as an electron transport inhibitor. An inhibition of state 3, particularly when succinate was the substrate, became evident within the stimulatory concentration range of state 4. This kind of effect has also been described for other compounds (Moreland, 1994; Cadena et al., 1998). The TRN concentration that caused uncoupling was higher when glutamate was the substrate, than that when succinate was the oxidizable substrate. This is not surprising,

since in other mitochondrial phenomena respiratory substrate selectivity is also observed. It is significant that the effect of respiratory inhibitors and uncouplers on the opening of the permeability transition pore and cytochrome *c* release, that were more sensitive and responsive to FADH-linked succinate than to NADH-linked glutamate as substrate (Huang et al., 2001).

Mitochondrial swelling essentially reflects osmotic parameters arising from the solute flux across the inner mitochondrial membrane, so that shrinkage gives an approximation of elasticity of the inner membrane. Under energized conditions, TRN promoted an accentuated decrease of the amplitude of the substrate oxidation-dependent swelling and its respective shrinkage. Since the de-energized swelling was also inhibited by TRN, the modification of fluidity of the inner membrane is an effect that cannot be excluded. In agreement, this proposal is also supported by observations of others authors that showed that TRN interacts with eukaryotic membrane lipids (Lygre et al., 2003), decrease the onset temperature of the gel to liquid crystalline phase transition of bacterial membrane lipids (Villalain et al., 2001), besides being aligned in a nearly perpendicular orientation with respect to the phospholipid molecules (Guillen et al., 2004).

In conclusion, this work demonstrates that TRN over a range of concentrations, which is much lower than those generally used, may induce substantial alterations on the cellular energetic charge. The mitochondrial depolarization induced by TRN could also be important as an early event in the promotion of apoptosis. Taken together, these results suggest that, besides its inhibitory effect on a defined bacterial target in the bacterial fatty acid biosynthetic pathway (enoil-[acyl carrier protein] reductase – ENR), TRN can also impair mitochondrial function, so that these effects must be taken into account before its use. In this context, further experiments are being carried out in our laboratory order to evaluate possible deleterious effects of TRN on oral epithelium.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Akerman, K., Wikstrom, M., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191–197.
- Bhargava, H.N., Leonard, P.A., 1996. Triclosan: applications and safety. *Am. J. Infect. Control.* 24, 209–218.
- Cadena, S.M.S.C., Carnieri, E.G.S., Echevarria, A., Oliveira, M.B.M., 1998. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 440, 46–50.
- Chance, B., Williams, G.R., 1955. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217, 383–393.
- Chow, A.Y.K., Hirsch, G.H., Buttar, H.S., 1977. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of triclosan and chlorhexidine in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42, 1–10.
- Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.* 10, 41–47.
- Guillen, J., Bernabeu, A., Shapiro, S., Villalain, J., 2004. Location and orientation of triclosan in phospholipid model membranes. *Eur. Biophys. J. Biophys.* 33, 448–453.
- Hanioka, N., Omae, E., Nishimura, T., Jinno, H., Onodera, S., Yoda, R., Ando, M., 1996. Interaction of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether with microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in rat liver. *Chemosphere* 33, 265–276.
- Heath, R.J., Rubin, J.R., Holland, D.R., Zhang, E., Snow, M.E., Rock, C.O., 1999. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 1110–1114.
- Heath, R.J., Li, J., Roland, G.E., Rock, C.O., 2000. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoic-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *J. Biol. Chem.* 275, 4654–4659.
- Hovander, L., Malmberg, M., Athanasiadou, I., Athanassiadis, S., Ralm, A., Bergman, E., Klasson Wheler, E., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 105–117.
- Huang, X., Zhai, D., Huang, Y., 2001. Dependence of permeability transition pore opening and cytochrome *C* release from mitochondria on mitochondria energetic status. *Mol. Cell Biochem.* 224, 1–7.
- Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lee, A.S., 2000. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am. J. Infect. Control* 28, 184–186.
- Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E., Okui, T., Kaneshima, H., 1988. Disposition and excretion of Irgasan DP300 and its chlorinated derivatives in mice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 637–644.
- Kanetoshi, A., Katsura, E., Ogawa, H., Ohyama, T., Kaneshima, H., Miura, T., 1992. Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP 300) and its chlorinated derivatives. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 91–98.
- Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P., Stutje, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., Rafferty, J.B., 1999.

- Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 398, 383–384.
- Lin, Y.J., 2000. Buccal absorption of triclosan following topical mouthrinse application. *Am. J. Dent.* 13, 215–217.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, S.Y., Archer, M.C., 2005. Fatty acid synthase is a potential molecular target for chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis* 26, 153–157.
- Lygre, H., Moe, G., Skalevik, R., Holmsen, H., 2003. Interaction of triclosan with eukaryotic membrane lipids. *Eur. J. Oral Sci.* 111, 216–222.
- Lyman, F.L., Furia, T., 1969. Toxicology of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether. *Ind. Med. Surg.* 38, 42–52.
- Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C., Schatz, G., 1973. Cytochrome *c* oxidase from bakers yeast. I. Isolation and properties. *J. Biol. Chem.* 248, 1346–1354.
- McMurray, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531–532.
- Moran, J., Addy, M., Newcombe, R.G., Marlow, I., 2000. A study to access the plaque inhibitory activity of a new triclosan mouthrinse formulation. *J. Clin. Periodontol.* 27, 806–809.
- Moreland, D.E., 1994. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Hodgson, E., Levi, P.E. (Eds.), *Introduction to Biochemical Toxicology*. Appleton and Lange, Norwalk, pp. 345–366.
- Moreno, A.J.M., Madeira, V.M.C., 1990. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 361–367.
- Nakashima, R.A., Garlid, K.D., 1982. Quinine inhibition of Na⁺ and K⁺ transport provides evidence for two cation/H⁺ exchange in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 287, 9252–9254.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2002. *Bioenergetics*, vol. 3. Academic Press, London, pp. 29–30.
- Parikh, S.L., Xiao, G., Tonge, P.J., 2000. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* 39, 7645–7650.
- Parone, P.A., James, D., Martinou, J.C., 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105–111.
- Pullman, M.E., Penefski, H.S., Datta, A., Racker, E., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235, 3322–3329.
- Regos, J., Zak, O., Solf, R., Vischer, W.A., Weirich, E.G., 1979. Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum anti-microbial agent for topical application. 2. Comparison with some other anti-microbial agents. *Dermatologica* 158, 72–79.
- Rossi, E., Azzone, G.F., 1969. Ion transport in liver mitochondria – energy barrier and stoichiometry of aerobic K⁺ translocation. *Eur. J. Biochem.* 7, 418–426.
- Sepalla, A.J., Wikström, M.K.F., Saris, N.E.L., 1973. Damping of mitochondrial volume oscillations by propanolol and related compounds. In: Chance, B., Pye, E.K., Ghosh, A.K., Hess, B. (Eds.), *Biological and Biochemical Oscillators*. Academic Press, New York, pp. 115–124.
- Stewart, M.J., Parikh, S., Xiao, G., Tonge, P.J., Kisker, C., 1999. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *J. Mol. Biol.* 290, 859–865.
- Singer, T.P., 1974. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. In: Glick, D. (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 22. John Wiley, New York, p. 123.
- Somlo, M., 1965. Induction des lactico-cytochrome *c* reductases (D- et L-) de la levure aerobie par le lactates (D- et L-). *Biochim. Biophys. Acta* 97, 183–201.
- Sumner, J.B., 1944. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100, 413–414.
- Suroliia, N., Suroliia, A., 2001. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat. Med.* 7, 167–173.
- Villalain, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S., Micol, V., 2001. Membranotropic effects of the antibacterial agent triclosan. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 128–136.
- Voss, D.O., Campello, A.P., Bacila, M., 1961. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48–51.
- Wallace, K.B., Starkov, A.A., 2000. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 353–388.
- Wang, L.Q., Falany, C.N., James, M.O., 2004. Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1162–1169.
- Weickowski, M.R., Wojtczak, L., 1998. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 423, 339–342.

**Effect of chlorhexidine and triclosan on mercury release from dental
amalgam: an *in vitro* study**

Ana Paula N. Newton, Silvia M. S. C. Cadena, Maria Eliane M. Rocha, Eva G.
S. Carnieri and *Maria Benigna M. Oliveira.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of
Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

*Corresponding author. C.P. 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail address: mbmo@ufpr.br or Fax: (55) (41) 266-2042.

Abstract

Objectives: The effect of chlorhexidine (CHX) and triclosan (TRN), two antiseptics largely used in dentistry, on mercury release from dental amalgam was determined *in vitro*. **Methods:** Samples of two brands of commercially available dental amalgams were used: Permite C and GS80. Amalgam specimens, elaborated following ADA specifications, were incubated for 24 h at 37°C in a phosphate buffer (pH 6.5), in the absence (control) or presence of CHX (0.12%) or TRN (0.3%). Presence of Hg was evaluated in supernatants of amalgam specimens through atomic absorption spectrometry. **Results:** Hg was found in all samples, but in the presence of CHX, there was a statistically significant ($p < 0.05$) increase of Hg release for both brands (~100%). **Significance:** The knowledge that certain substances routinely used in dentistry are able to increase Hg release from amalgam fillings, overexposing the patients to deleterious effects of Hg, must be considered at the moment of their use.

Key Words: Chlorhexidine, triclosan, amalgam fillings, mercury release.

Introduction

Dental plaque has long been a matter of concern, especially in public health. It is recognized that chemical antiplaque agents may be of value for inhibiting or reducing plaque formation and thus gingival inflammation and dental caries development [1,2]. Among these agents, mouthrinses containing antibacterial agents such as chlorhexidine (CHX) and/or phenolic derivatives, such as triclosan (TRN), have been particularly cited [3].

CHX (Figure 1) is a bis-bis-guanide broad-spectrum antiseptic that has been widely used in several skin and mucosa affections [4]. Developed as a preservative in pharmaceutical preparations [5], it was first reported as an effective antiplaque agent by LÖE & SCHIOTT [6] and, apparently, no other agent besides fluorides has received more attention in dentistry. CHX is mainly used against periodontal diseases, but also in oral pre-operative procedures, such as tooth extractions [7] and dental implants [8]. The antibacterial activity of CHX arises from its positive charge at physiological pH, which produces non-specific binding to the negatively charged membrane phospholipids of bacteria [9]. Alteration in bacterial osmotic equilibrium also appears to be involved in the CHX mechanism of action, with potassium and phosphorus leakage and, as the CHX concentration increases, the cytoplasmic contents precipitate, triggering cell death. CHX inhibits fructan synthesis by cell-free β -D-fructosyltransferases (FTF) [10] and alters the molecular size of the fructans synthesized by FTF. This change can alter the properties of the synthesized fructans, which may result in a change of virulence of the dental plaque biofilm [11].

In spite of the extensive literature about the safe use of CHX by humans, there are several studies showing its deleterious effects. It has been demonstrated that both protein synthesis [12] and cell proliferation [13, 14] are negatively affected in different degrees by CHX. Adverse dose-dependent effects of CHX also include increased dental calculus formation [15], impairment of taste perception [16], sensitization, and oral mucosa desquamation [17]. Another side effect of CHX treatment is the formation of a cosmetically undesirable staining of the teeth [18], which seems to be a consequence of protein denaturation accompanied by exposure of sulfhydryl groups that would react with metals such as iron and sulfur, forming coloured sulfides [19, 20]. The interaction of CHX with metals, particularly iron, was recently confirmed by assays involving iron release from ferritin and iron-dependent mitochondrial lipid peroxidation [21]. They have also shown that CHX is involved in the opening of the mitochondrial permeability transition pore, since its effects could be prevented by cyclosporin A, suggesting that one cytotoxic mechanism of CHX could be mitochondrial injury [9, 21].

TRN (Figure 2) is a synthetic, broad-spectrum antimicrobial agent, which was first introduced in the health care industry in a surgical scrub in 1972, and in toothpaste in Europe in 1985 [22]. Approximately 65% as effective as CHX [23], TRN is non-ionic, hence being compatible with dentifrice ingredients. By itself, TRN does not have good substantivity, but this can be increased in formulations containing one of two chemicals, zinc citrate or the co-polymer polyvinyl methyl ether/maleic acid (PVM/MA) [24]. TRN mouthrinses containing zinc citrate have been proven to reduce plaque and gingivitis in both short and

long term studies [25, 26]. Similarly, in short-term clinical studies carried out with both TRN and PVM/MA mouthrinses, reductions in plaque of 45% compared to a placebo rinse have been recorded using a 4-day plaque regrowth model [27].

TRN was thought as a non-specific biocide that attacked bacterial membranes [28], but studies have revealed that TRN acts on a defined bacterial target, in the bacterial fatty acid biosynthetic pathway: NADH-dependent enoil-[acyl carries protein] reductase (FabI) [29, 30]. TRN is also able to block the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) in human gingival fibroblasts cultures, which were stimulated by interleukin 1 β (IL-1 β), suggesting a pronounced effect on the production of specific mediators of inflammation [31].

The use of antibacterial agents to inhibit dental plaque has become very popular over the last years. However, since there are no studies about the possible interactions of these agents to dental restorations, the purpose of the present research was to investigate the possible interaction of CHX and TRN with dental amalgam Hg, an important component of this very commonly dental filling material.

Materials and Methods

Chemicals: CHX-digluconate was from Acofarma (Llobregat, Spain) and TRN (IRGASAN DP 300) from Galena (Campinas, São Paulo/ Brazil). All other chemicals were of the highest purity commercially available.

Chlorhexidine and triclosan solutions: A 20% CHX (CHX-digluconate) stock solution was used to prepare fresh dilutions in phosphate buffer, obtaining a final concentration of 0.12%. A TRN stock concentrated solution was primarily prepared in ethanol and then diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), to a final concentration of 0.3%. This procedure eliminated possible interference from other components commonly used in commercially available formulations, such as flavors or colorings. For controls (antiseptic-free), 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) was used [32].

Dental amalgam specimens: They were made from two brands of commercially available dental amalgam: GS80 (SDI Limited, Bayswater, Victoria/ Australy) and Permite C (SDI Limited, Bayswater, Victoria/ Australy). The manufacturer's alloy specifications are described in Table 1. Eighteen specimens of each brand, measuring 4 mm diameter by 8 mm long, were elaborated according to the procedures of ADA Specification n° 1. Capsules of each brand were automatically mixed in a dental amalgamator (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo/ Brazil) and the freshly prepared amalgam mix was condensed into silicon embedding molds with identical cavities by using hand condensers. The specimens were left for initial setting in the molds for 60 min. After final setting, specimens were left unpolished [32] and were randomly divided into the experimental and control groups.

Mercury release assay in vitro: This was carried out as described by ROTSTEIN *et al.* [32]. Six specimens of each amalgam brand were sealed in individual glass assay tubes containing 5 ml of either a solution of 0.12% CHX or 0.3% TRN, previously prepared in phosphate buffer (pH 6.5). The remaining six specimens of each amalgam brand were sealed in similar assay tubes containing 5 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), which served as a control. Solutions of 0.12% CHX, 0.3% TRN and 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) were also used as additional controls. After the incubation period (24 h at 37°C), the mercury concentration of each solution sample was measured by cold vapor atomic absorption (Atomic Absorption Spectrometer, PERKIN ELMER 4100) [33].

Spectrophotometric measures: Possible interactions between CHX or TRN with mercury were evaluated by differences in the UV-VIS absorption spectra, performed in a HITACHI spectrophotometer (mod. 2001). An incubation system consisting of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), HgCl₂ and TRN or CHX at different concentrations was incubated for 20 min before UV-VIS scan.

Statistical analysis: Statistical analysis of the data was carried out as student's *t* test. Mean values \pm S.D. were used.

Results

Figure 3 shows results following 24 h exposure to CHX (0.12%), TRN (0.3%) or phosphate buffer (control) of two amalgam brands, under the same experimental conditions and, as can be observed, Hg was detected in all supernatants. In dental amalgam specimens exposed to phosphate buffer for 24 h (control), there was 196 and 232.5 $\mu\text{g Hg. ml}^{-1}$, for GS80 and Permite C, respectively. There was a significant ($p < 0.05$) increase in Hg release observed in supernatants of specimens exposed to CHX: it was detected 438 and 436 $\mu\text{g Hg. ml}^{-1}$, for GS80 and Permite C, respectively. These values were higher than those obtained from supernatants of specimens exposed to TRN (200 $\mu\text{g Hg. ml}^{-1}$ for both brands) (Figure 3). Mercury release induced by CHX reached an increase of 123.5% for GS80 amalgam brand and 87.5% for Permite C, when compared to control values. When compared to those values obtained in the presence of TRN, the Hg release induced by CHX reached ~120% for both amalgam brands.

In order to evaluate the possibility that Hg liberation from amalgam specimens could be a result of an interaction of CHX with Hg, an UV-VIS spectral analysis was performed. The results shown in Figure 4 demonstrate that spectra of HgCl_2 and phosphate buffer overlap, showing a maximal absorbance up to 320 nm and then turning down abruptly, so that at 360 nm there was no light absorption. In the CHX plus HgCl_2 spectrum, there is a broadening of the absorption region up to 360 nm, also followed by an absorption decrease, although the absorption is maintained around 1.0 until 600 nm. This result suggests that an interaction between Hg and CHX is possible,

thus justifying the expressive increase in Hg release from dental amalgam specimens, when incubated with CHX.

Discussion

Dental amalgams, one of the oldest materials used in restorative dentistry, have been used in the treatment of decayed teeth because of the ease of manipulation and their adequate mechanical properties. However, dental fillings contain approximately 0.2-0.6 g in weight of elemental mercury mixed with amalgam alloy [34]. Several metal ions, including Hg, are constantly released from amalgam by electrochemical reactions, and this may have an adverse impact on human health [35].

Ingestion, inhalation, or absorption of mercury at certain levels by patients may be toxic to body tissues, causing a variety of systemic adverse effects that are dose-related [36]. From the toxicological point of view, several categories of mercury compounds are relevant, such as elemental mercury vapor, inorganic mercury salts, and organic mercury compounds. Dental amalgam contains inorganic mercury bound to intermetallic compounds. Mercury is released from amalgam either as mercury vapor or mercuric ions [37]. In fact, mercury vapor released in the mouth leads to an increased uptake of mercury in the body tissues. In studies on humans, Hg vapor was detected in the oral cavity from amalgam placement in teeth, and the release rate of Hg increased drastically when the amalgam was stimulated by continuous chewing [38, 39]. Furthermore, other studies found that Hg levels in tissues of subjects with amalgam fillings were higher than those of amalgam-free subjects [40]. While for TRN there was no increase in Hg liberation, we have shown that CHX increased the Hg release from amalgam specimens. In spite of the evidence of an interaction between CHX and mercury ions, as suggested by Hg-CHX

spectra, to date the mechanism of such Hg liberation was not known. Since CHX also stimulated iron release from ferritin [21], an iron storage protein, a study involving the interaction of CHX with other divalent metal ions would be of interest.

Although the values for Hg release in the presence of CHX were very expressive, they were lower than those found when amalgam were incubated with 10% carbamide peroxide [32]. It must be emphasized that they used different amalgam brands in their experiments, but taken together, the results indicate that some substances commonly used in the dental practice, such as CHX and carbamide peroxide, can increase Hg release from dental amalgam, and dentists should be aware of the dangerous effects and consequences of this fact.

Mercury (II) is involved in several nephrotoxic effects, in which renal proximal tubule cell mitochondria seem to be a main target, as indicated by mitochondrial swelling [41], impairment of oxidative phosphorylation [42] and ATP depletion [43]. Lipid peroxidation [44], DNA damage [45] and depletion of reduced glutathione (GSH) [46] by Hg(II) support an oxidative stress-like mechanism for Hg(II) toxicity. Moreover, recent findings from our laboratory showed that CHX is able to stimulate iron-induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition [21]. Therefore, a CHX: Hg interaction could be involved in an exacerbation of effects of both agents on these biological processes.

The mercury matrix phase is a major phase in any set amalgam and therefore represents a potential source for continuous and sometimes

prolonged mercury release, which may be increased by exposure to heat, acids or other agents [38]. From the present results, amalgam exposure to CHX may increase Hg release. Although a 24 h continuous exposure to CHX is a longer period than the usual intermittent exposure in patients, our results obtained are of great clinical significance because treatments using CHX usually requires multiple applications and CHX is able to be retained in the oral cavity for long periods of time.

Alterations in the UV-VIS spectra of HgCl_2 and CHX reinforce the possibility of a CHX: Hg interaction. This would suggest that CHX might cause mercury release not only from non-reacted mercury in the amalgam (Hg), but also from Ag_2Hg_3 and Sn_{7-8}Hg . If this possibility is correct, the continuous use of CHX may contribute for degradation of amalgam restorations, potentially enabling more Hg to be released. In fact, measurements of the amount of Hg vapor emitted from dental amalgam have been conducted *in vitro* under various test conditions [47, 48, 49, 50]. In some cases, these results have been used as a basis for determining the level of Hg vapor emission *in vivo* and relating it to the maximum acceptable requirements stipulated by WHO [51] and OSHA [52]. Because mercury released from dental amalgam during CHX treatments may increase the total mercury body burden, the clinician must exercise caution and take measures to minimize undesirable mercury release.

Acknowledgements:

This investigation was supported by CNPq and CAPES, Brazil. The authors would like to thank LACTEC/UFPR, for the cold vapor atomic absorption analysis and SDI Limited for their kind donation of amalgam.

References

1. Addy M and Renton-Harper P. Local and systemic chemotherapy in the management of periodontal disease: an opinion and review of the concept. *J Oral Rehab*, 1996; 23: 219-231.
2. Moran J, Addy M, Newcombe RG and Marlow I. A study to assess the plaque inhibitory activity of a new triclosan mouthrinse formulation. *J Clin Periodontol*, 2000; 27: 806-809.
3. Addy M and Moran JM. Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontology* 2000, 1997; 15: 40-51.
4. Lafforgue C, Carret L, Falson F, Reverdy ME and Freney J. Percutaneous absorption of a chlorhexidine digluconate solution. *Int J Pharm*, 1997; 147: 243-246.
5. Jaminet FR, Delatre L, Delporte JP and Moes A. Influence de la temperature de sterilization et du pH sur la stabilité de la chlorhexidine en solution. *Pharm Acta Helvetiae*, 1970; 45: 60-63.
6. Loe H and Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*, 1970; 5: 79-83.
7. Bonine FL. Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1995; 79: 154-157.
8. Lambert PM, Morris HF and Ochi S. The influence of 0.12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success. *J Oral Maxillofac Surg*, 1997; 55 (Suppl. 5): 25-30.
9. Hidalgo E and Domingues C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 2001; 15: 271-276.
10. Steinberg D, Bachrach G, Gedaia I, Abu-Ata S and Rozen R. Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci*, 2002; 110: 374-379.
11. Rozen R, Bachrach G, Zaks B, Bronshteyn M, Gedaia I and Steinberg D. Effect of chlorhexidine on molecular weight distribution of fructans produced by

fructosyltransferase in solution and immobilized on surface. *Carbohydr Res*, 2003; 338: 571-575.

12. Pucher JJ and Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 1993; 62: 526-532.

13. Lucarotti ME, White H, Deas J, Silver IA and Leaper DJ. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to conservation therapy? *Ann R Coll Surg Engl*, 1990; 72: 388-392.

14. Mariotti AJ and Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblasts collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol*, 1999; 70: 1443-1448.

15. Moghadam BKH, Drisko CL and Gier RE. Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71: 431-434.

16. Helms JA, Della-Fera MA, Mott AE and Frank ME. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Arch Oral Biol*, 1995; 40: 913-920.

17. Sonis ST, Clark WB and Shklar G. Chlorhexidine-induced lingual keratosis and dysplasia in rats. *J Periodontol*, 1978; 49: 585-591.

18. Sheen S, Banfield N and Addy M. The propensity of individual saliva to cause staining in vitro – a developmental method. *J Dent*, 2001; 29: 99-102.

19. Ellingsen JE, Rolla G and Eriksen HM. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *J Clin Periodontol*, 1982; 9: 317-322.

20. Warner RR, Myers MC, Burns J and Mitra S. Analytical electron microscopy of chlorhexidine-induced tooth stain in humans: direct evidence for metal-induced stain. *J Periodontol Res*, 1993; 28: 255-265.

21. Newton APN, Cadena SMSC, Rocha MEM, Carnieri EGS and Oliveira MBM. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol Lett*, 2004; 151: 407-416.

22. Jones RD, Jampani HB, Newman JL and Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*, 2000; 28: 184-186.

23. Jenkins S, Addy M and Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. I. Effects on 4-day plaque regrowth. *Am J Dent*, 1989; 2: 211-214.
24. Ciancio SG. Agents for management of plaque and gingivitis. *J Dent Res*, 1992; 71: 1450-1454.
25. Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Saxton CA and Cummins D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation and development of gingivitis in a 3-week clinical test. *J Clin Periodontol*, 1994; 21: 360-364.
26. Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Saxton CA and Cummins D. Effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation, development of gingivitis and formation of calculus in a 28 week clinical test. *J Clin Periodontol*, 1996; 23: 465-470.
27. Moran J, Addy M and Newcombe R. A 4-day plaque regrowth study comparing an essential oil mouthrinse with a triclosan mouthrinse. *J Clin Periodontol*, 1997; 24: 636-639.
28. Regos J and Hitz HR. Investigations on mode of action of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A*, 1974; 226: 390-401.
29. Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, Baker P, Stuitje AR, Slabas AR, Rice DW and Rafferty JB. Molecular basis of triclosan activity. *Nature*, 1999; 398: 383-384.
30. Parikh SL, Xiao G and Tonge PJ. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry*, 2000; 39: 7645-7650.
31. Gaffar A, Sherl D, Afflitto J and Coleman EJ. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J Clin Periodontol*, 1995; 22: 480-484.
32. Rotstein I, Dogan H, Avron Y, Shemesh H and Steinberg D. Mercury release from dental amalgam after treatment with 10% carbamida peroxide in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000; 89: 216-219.

33. Hatch WR and Ott WL. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Anal Chem*, 1968; 40: 2085-2087.
34. Takahashi Y, Tsuruta S, Hasegawa J, Kameyama Y and Yoshida M. Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues. *Toxicology*, 2001; 163: 115-126.
35. Souza AP, Gerlach RF and Line SRP. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials*, 2001; 22: 2025-2030.
36. Berglund A. Mercury vapor release from dental amalgam in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings. *Eur J Oral Sci*, 1996; 104: 56-63.
37. Eley BM and Cox SW. Renal cortical mercury levels associated with experimental amalgam tattoos: effects of particle size and amount of implanted material. *Biomater*, 1987; 8: 401-403.
38. Vimy MJ and Lorscheider FL. Intraoral air mercury released from dental amalgam. *J Dent Res*, 1985; 64: 1069-1071.
39. Aronsson AM, Lind B, Nylander M and Nordberg M. Dental amalgam and mercury. *Biol Met*, 1989; 2: 25-30.
40. Nylander M, Friberg L and Lind B. Mercury concentrations in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings. *Swed Dent J*, 1987; 11: 179-187.
41. Fowler BA and Woods JS. Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria following chronic oral methyl mercury exposure: the relationship to renal function. *Exp Mol Pathol*, 1977; 27: 403-412.
42. Weinberg JM, Harding PG and Humes HD. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. I. Direct effects of in vitro mercuric chloride on renal cortical mitochondrial function. *J Biol Chem*, 1982; 257: 60-67.
43. Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B and Lemasters JJ. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1990; 265: 2399-2408.

44. Lund B, Miller DM and Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vitro and in vivo in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 1991; 42: S181-S187.
45. Cantoni O, Evans RM and Costa M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 108: 614-619.
46. Gstraunthaler G, Pfaller W and Kotanko P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol*, 1983; 32: 2969-2972.
47. Holland RI. Release of mercury vapor from corroding amalgam in vitro. *Dent Mater*, 1993; 9: 99-103.
48. Mahler DB, Adey JD and Fleming MA. Hg emission from dental amalgam as related to the amount of Sn in the Ag-Hg (gamma 1) phase. *J Dent Res*, 1994; 73: 1663-1668.
49. Okabe T, Yamashita T, Nakajima H, Berglund A, Zhao L, Guo I and Ferracane JL. Reduced mercury vapor release from dental amalgams prepared with binary Hg-in liquid alloys. *J Dent Res*, 1994; 73: 1711-1716.
50. Pioch T and Mathias J. Mercury Vapor release from dental amalgam after laser treatment. *Eur J Oral Sci*, 1998; 106: 600-602.
51. WHO. Environmental health criteria. Inorganic mercury. World Health Organization, 1991; 118: 29-67.
52. OSHA. Mercury vapor in workplace atmospheres. <http://www.osha-slc.gov>, 1991.

Table 1: Compositions (%) of the two amalgam alloys tested, according to the manufacturers.

Components	GS80 (%)	Permite C (%)
Ag	40	56
Sn	31.1	27.9
Cu	28.7	15.4
In	---	0.5
Zn	---	0.2

Figure 1

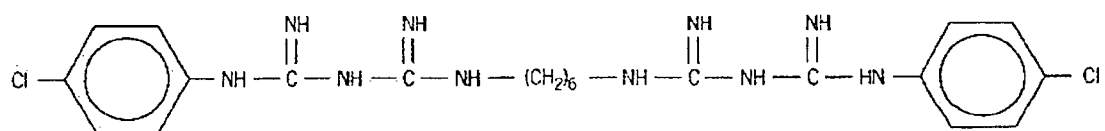


Figure 2

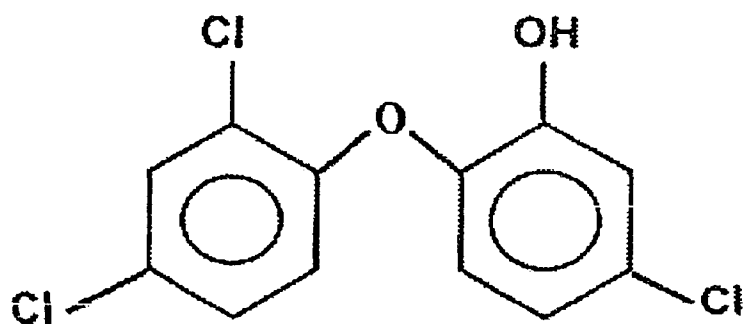


Figure 3

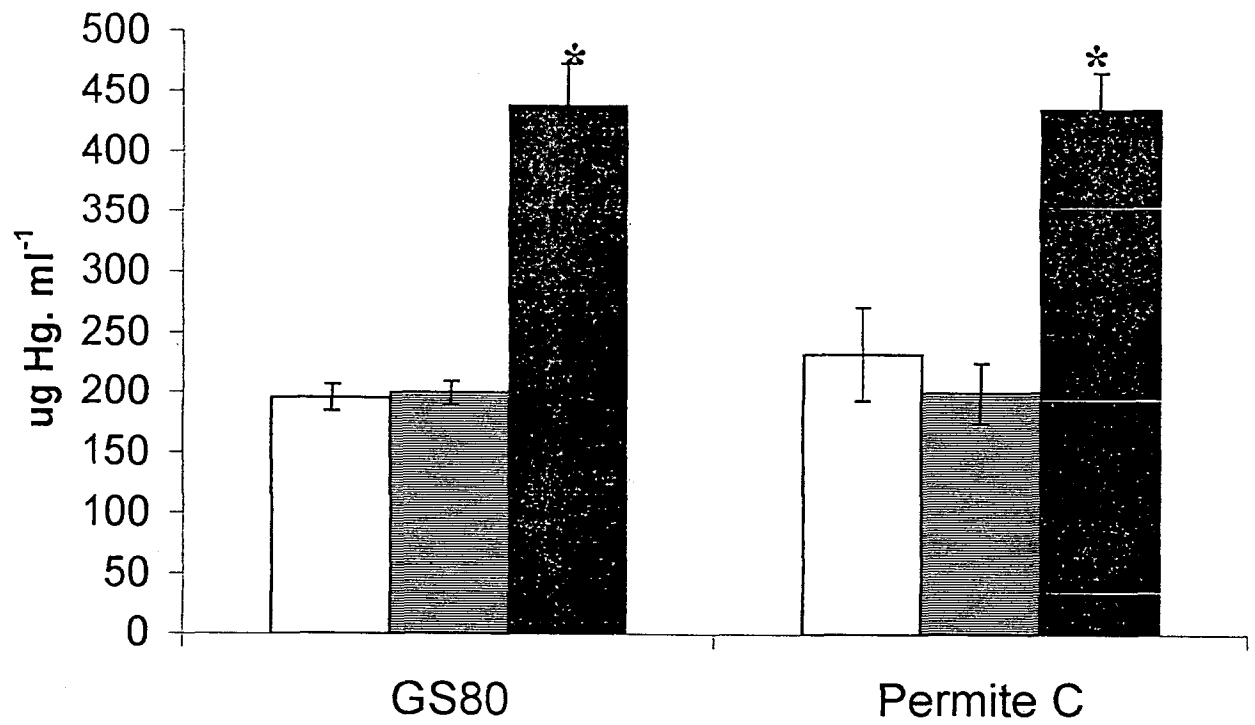
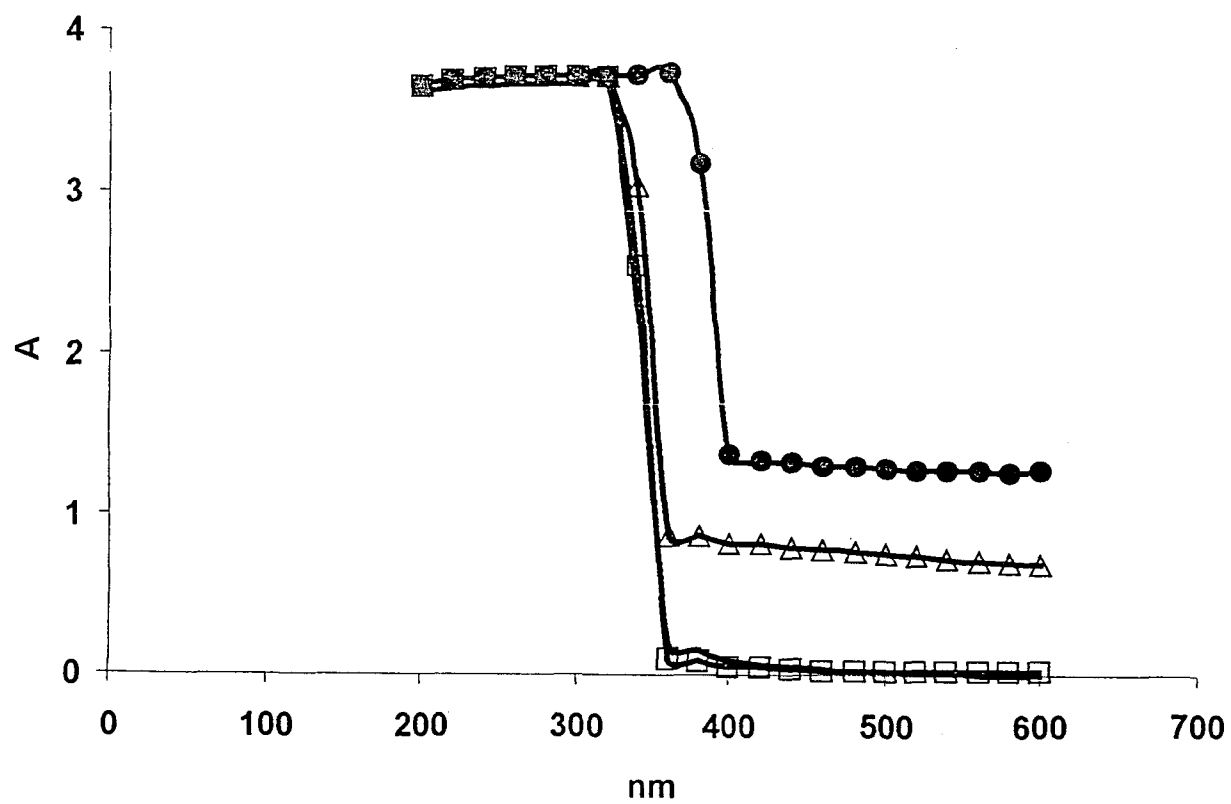


Figure 4



Legends

Figure 1: Structural formula of chlorhexidine.

Figure 2: Structural formula of triclosan.

Figure 3: Hg release from amalgam specimens.

Phosphate buffer 0.1 M (pH 6.5) (□) in the presence or absence of 0.12% CHX (■) or 0.3% TRN (▨), was incubated with the specimens for 24 h at 37°C, in a final volume of 5 ml. After removal of specimens, the Hg concentration of each supernatant was measured by cold vapor atomic absorption (Atomic Absorption Spectrometer, PERKIN ELMER 4100).

* represents significantly different ($p < 0.05$).

Figure 4: UV-VIS of HgCl₂ in the presence or absence of CHX.

Spectra of phosphate buffer 0.1 M (pH 6.5) only (—), phosphate buffer plus HgCl₂ (□), phosphate buffer plus CHX 0.12% (△) or phosphate buffer plus HgCl₂ and CHX (●) at final ratio 1:1 were made after a 20 min incubation period, at room temperature, in a final volume of 1 ml. Spectra were obtained using a HITACHI spectrophotometer mod. 2001.