

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

Priscila Veloso da Silva

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de
Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e
Ciclodextrinas

Itajubá/MG
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

Priscila Veloso da Silva

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de
Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e
Ciclodextrinas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Materiais para Engenharia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de Concentração: Não-Metals

Orientadora: Daniela Sachs

Co-orientador: Frederico Barros de Sousa

Itajubá/MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

Priscila Veloso da Silva

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de
Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e
Ciclodextrinas

Dissertação aprovada por banca examinadora em 17 de agosto de 2015, conferindo a Priscila Veloso da Silva o título de **Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia.**

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Sachs (UNIFEI)

Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos (UNIFEI)

Prof. Dr. Joel José dos Passos (LABFAR/BH-TEC)

Itajubá/MG

2015

Dedico à minha mãe, Laudelina ou simplesmente Nina, meu grande amor e maior exemplo de vida. Diante de toda boa educação jamais me esquecerei desse ensinamento: “a maior herança que se pode deixar a um filho é o estudo, o conhecimento ninguém te tira” e assim permaneço estudando.

Dedico aos meus sobrinhos amados, para que lhes sirvam de exemplo.

Amo vocês!

Agradecimentos

À Deus por permitir e me dar forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, Nina e Pedro, responsáveis pela minha vida e toda minha formação.

Às minhas irmãs, Juliana e Alice, que contribuíram desde sempre para o meu crescimento.

Aos meus grandes amores, minhas eternas crianças, meus sobrinhos: Maria Clara, Miguel e Bernardo, por todos os olhares, abraços e sorrisos sinceros, especialmente nos momentos que eu mais precisei.

Ao meu amor e grande parceiro, Luam, que há anos me acompanha, compartilhando os melhores momentos e os mais difíceis. Meu maior incentivador, obrigada por tudo!

Aos meus sogros, Sandra e Aidê, figuras espetaculares que a vida se encarregou de me presentear. Grandes exemplos e garantia de boas risadas.

À minha orientadora, Daniela, pela oportunidade e conhecimento fornecido.

Ao meu co-orientador, Fred, que sempre se fez presente e me proporcionou um vasto conhecimento. Muito obrigada!

Aos grandes amigos que o mestrado me proporcionou, pessoas maravilhosas e que contribuíram muito para que esse projeto fosse concluído, com certeza vocês foram peças-chave. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela ajuda com as técnicas e análises, pelas descontrações que tornaram os meus dias mais alegres. Todos vocês contribuíram com o meu desenvolvimento, cada um com sua experiência e “jeitinho” especial de ser. São vocês, meus amigos dos programas de materiais e de química e aos demais do prédio de Biomateriais.

Aos meus amigos de sempre e familiares que sempre torceram e nunca desistiram de mim, entendendo minha ausência em muitos momentos.

Ao Professor Ângelo Denadai da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas, ambos pela disponibilidade e ajuda técnica.

Ao apoio financeiro da CAPES, que me forneceu bolsa nesses dois anos e à FAPEMIG, ao CNPq e a Rede Mineira de Química RQ-MG que contribuíram para conclusão do mestrado.

Resumo

Os biomateriais são materiais capazes de interagir com os sistemas biológicos e aplicados em dispositivos médicos, podendo liberar fármacos controladamente, com intuito de melhorar ação terapêutica deste por meio de alteração nas propriedades físicas e químicas. Administrar agentes antimicrobianos por meio desses dispositivos pode auxiliar no tratamento de infecções, melhorar a solubilidade, estabilidade e especificidade dos mesmos, além de serem promissores sistemas para superar a resistência de micro-organismos. O presente trabalho visa o estudo *in vitro* da ação antimicrobiana da sulfadiazina de sódio quando incluída em diferentes ciclodextrinas comparando-as com a ação do fármaco isolado. A sulfadiazina de sódio, um quimioterápico de amplo espectro, foi complexada às ciclodextrinas, que podem fornecer o aumento da solubilidade e estabilidade, alterando propriedades físico-químicas e biológicas da molécula hóspede. Para o estudo foram utilizadas a β -ciclodextrina e dois de seus derivados: metil- β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. As técnicas para caracterização físico-química, espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análises térmicas (DSC e TGA) sugeriram a interação hóspede/hospedeiro. Os espectros dos compostos apresentaram as bandas referentes ao fármaco e ciclodextrinas e as análises térmicas a diferença do perfil térmico dos compostos de inclusão comparado aos perfis das substâncias quando isoladas. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) forneceu informações termodinâmicas que confirmaram uma interação não covalente entre sulfadiazina de sódio e β -ciclodextrina e sulfadiazina de sódio e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, sendo a primeira a mais favorável. Além disso, ambos os processos demonstraram espontaneidade ($\Delta G < 0$) e baixa constante de afinidade (K), os valores de ΔG são -15,87 e -15,44 kJ/mol e constantes iguais a 604 e 507 para sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina para sulfadiazina de sódio/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, respectivamente. Dentre as técnicas de caracterização, a principal capaz de confirmar a interação é a ressonância magnética nuclear (RMN) por meio de variação nos deslocamentos químicos e ainda através da utilização de técnicas bidimensionais de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY. As amostras (sulfadiazina de sódio, ciclodextrinas e compostos) foram diluídas na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, quantidade determinada pela ANVISA com base nos testes de sensibilidade antimicrobiana do Instituto de Padrão Clínico e Laboratorial (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) e submetidas ao estudo antimicrobiano com o teste de disco difusão com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*

pneumoniae. De acordo com o tamanho dos halos todos os compostos fármaco/ciclodextrinas apresentaram maior inibição do crescimento bacteriano quando comparado à ação do fármaco isolado, exceto *S. epidermidis* que foi resistente a todos os discos. Para análise estatística da atividade antimicrobiana, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$. Estatisticamente, comparando sulfadiazina de sódio isolada e compostos de inclusão, os compostos tiveram maior ação antimicrobiana para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto que, para *E. coli* o composto sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina apresentou maior atividade e os demais não tiveram diferença significativa na atividade em relação a sulfadiazina de sódio isolada. Para *K. pneumoniae* não houve diferença significativa entre as amostras. O aumento da atividade do fármaco incluído propõe a elaboração de dispositivos de liberação do mesmo, através da associação com matrizes poliméricas, que contribuem, também, para a sustentação tecidual. Foram produzidas fibras por técnica de eletrospinning. As fibras foram formadas a partir da incorporação de sulfadiazina de sódio, β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e seus compostos ao polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL), solubilizadas em dimetilformamida (DMF) e tetrahidrofurano (THF) na proporção 60:40 (v/v) e variando os parâmetros, tais como taxa do fluxo (mL/h), distância da ponta da agulha até a placa coletora (cm) e voltagem (kV). Posteriormente, foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e quantificadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis), fornecendo assim, a quantidade de sulfadiazina de sódio presente nas fibras.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Sulfadiazina de sódio; Ciclodextrina; Composto de inclusão.

Abstract

Biomaterials are materials capable of interacting with biological systems, being applied in medical devices and can release drugs molecules, aiming to improve therapeutic action of this through changes in physical and chemical properties. Administering antimicrobial agents by these devices may aid in the treatment of infections, improving solubility, stability and specificity thereof, and are promising systems to overcome the resistance of microorganisms. This work aims to study the *in vitro* antimicrobial activity of sodium sulfadiazine, included in different cyclodextrins comparing their activity with pure drug. Sulfadiazine sodium, a chemotherapeutic broad spectrum was included into cyclodextrins providing increased solubility and stability, changing the physical-chemical and biological properties of the guest molecule. For the study, β -cyclodextrin and its derivatives (methyl- β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) was used. The techniques for physicochemical characterization as absorption spectroscopy in the infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR) and thermal analysis (DSC and TGA) suggested the interaction guest/host. The spectrum of the compounds showed the bands related to the drug and cyclodextrin and thermal analysis showed difference in thermal profile of inclusion compounds compared to the profiles of the of isolated substances. The isothermal titration calorimetry (ITC) provided thermodynamic information confirmed that a non-covalent interaction between sodium sulfadiazine with β -cyclodextrin and and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, being the most favorable for β -cyclodextrin. Moreover, both processes have demonstrated spontaneous ($\Delta G < 0$) and low affinity constant (K), ΔG values are -15.87 and -15.44 kJ/mol and constant 604 and 507 to sodium sulfadiazine/ β -cyclodextrin to sodium sulfadiazine/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, respectively. Among the characterization techniques, capable of confirming the main interaction is the nuclear magnetic resonance (NMR) by variation in chemical shifts and through the use of two-dimensional correlation techniques $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY. Samples (sodium sulfadiazine, cyclodextrins and compounds) were diluted at a concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, determined by ANVISA amount based on the antimicrobial susceptibility testing of Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI and subjected to antimicrobial study with the disk diffusion test with different bacteria, they are *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. According to the size of the halos all compound drug/cyclodextrin showed greater inhibition of bacteria when compared to the pure drug action, except that *Staphylococcus epidermidis* was resistant to all discs. Statistical analysis of antimicrobial activity, we used the Analysis of

Variance (ANOVA) and Tukey's test with significance level set at $p < 0.05$. Statistically comparing pure sodium sulfadiazine and inclusion compounds, the compounds had higher antimicrobial activity for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, whereas *E. coli* sodium sulfadiazine compound/methyl- β -cyclodextrin showed greater activity and others had no significant difference in activity compared to pure sodium sulfadiazine and *K. pneumoniae* was no significant difference between samples. The increase in drug activity included proposes that release devices of the same, through association with polymer matrices, which also contribute to tissue support. Fibers were produced by electrospinning technique. Fibers were formed from the incorporation of sodium sulfadiazine, β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and its compounds to the poly- ϵ -caprolactone polymer (PCL), solubilized in dimethylformamide (DMF) and tetrahydrofuran (THF) in the 60:40 (v/v) and varying parameters such as flow rate (mL/h), the needle tip distance to the collector plate (cm) and voltage (kV). Later, they were viewed by scanning electron microscopy (SEM) and quantified by absorption spectroscopy in the region of the ultraviolet-visible (UV-vis), providing thus the amount of sodium sulfadiazine present in the fibers.

Keywords: Antibacterial activity; Sodium Sulfadiazine; Cyclodextrin; Compound inclusion.

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 2. 1– a) Estrutura tridimensional da ciclodextrina e b) monômero das ciclodextrinas naturais (α , β e γ), com os carbonos enumerados.	24
Figura 2. 2 – a) Esquema da formação do composto de inclusão (razão molar 1:1), b) Representação gráfica da solubilidade, em água, em função da concentração molar de fármaco e ciclodextrina. As linhas em vermelho e verde representam a formação de um composto cuja solubilidade é limitada e a linha laranja representa um composto totalmente solúvel em água.	25
Figura 2. 3 – Tabela de classificação para os fármacos de acordo com a solubilidade e permeabilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica	26
Figura 2. 4 – Estrutura química a) prontosil, b) sulfadiazina, c) sulfanilamida e	29
Figura 2. 5 – Estrutura química da sulfadiazina de sódio.....	30

Capítulo 4

Figura 4. 1 – Curvas do DSC da (a) β -ciclodextrina, (b) 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e (c) metil- β -ciclodextrina	39
Figura 4. 2 – Curva do DSC da sulfadiazina de sódio.....	40
Figura 4. 3 – Curva do DSC do composto de inclusão (a) sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina (SDS/ β CD), (b) sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (SDS/HP β CD) e (c) sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina (SDS/M β CD)	41
Figura 4. 4 – Curva termogravimétrica da (a) β -ciclodextrina, (b) 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e (c) metil- β -ciclodextrina	42
Figura 4. 5 – Curva termogravimétrica da sulfadiazina de sódio até 1000 °C.....	43
Figura 4. 6 – Curva termogravimétrica do composto (a) sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina, (b) sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e (c) sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina	43
Figura 4. 7 – Estrutura química das ciclodextrinas: β CD, M β CD e HP β CD	44
Figura 4. 8 – Espectro do infravermelho da β -ciclodextrina	45
Figura 4. 9 – Espectro do infravermelho da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	46
Figura 4. 10 – Espectro do infravermelho da metil- β -ciclodextrina	46
Figura 4. 11 – Estrutura química da SDS	47

Figura 4. 12 – Espectro do infravermelho da sulfadiazina de sódio.....	47
Figura 4. 13 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina	49
Figura 4. 14 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	49
Figura 4. 15 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina	50
Figura 4. 16 – Comparação das técnicas (a) DSC, (b) TGA e (c) FTIR para o composto SDS/ β CD quando liofilizado e mistura física	52
Figura 4. 17 – Curva calorimétrica a) SDS 60mM em água e em β CD 4 mM e b) após a subtração do branco e ajuste não-linear.....	53
Figura 4. 18 – Curva calorimétrica a) SDS 60mM em água e em HP β CD 4 mM e b) após a subtração do branco e ajuste não-linear.....	54
Figura 4. 19 – Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz em D ₂ O para sulfadiazina de sódio.....	56
Figura 4. 20 - Espectros de RMN de ^1H a 600 MHz em D ₂ O para β -ciclodextrina	57
Figura 4. 21 – Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz em D ₂ O para composto sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina na razão 1:1.....	57
Figura 4. 22 - a) mapa de contorno 2D ROESY 1H/1H a 400 MHz em D ₂ O para o sistema 1:1 SDS/ β CD e b) aumento das regiões correlacionadas no 2D ROESY.	59
Figura 4. 23 – Disco difusão: 1) <i>Staphylococcus aureus</i> , 2) <i>Escherichia coli</i> , 3) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 4) <i>Klebsiella pneumoniae</i> e 5) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	60
Figura 4. 24 – Comparação das médias dos halos da sulfadiazina de sódio e compostos de inclusão para cada bactéria. Dados tratados, estatisticamente, por análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, com significância $p < 0,05$. * Diferença significativa da sulfadiazina de sódio em relação aos compostos. ** Diferença significativa da metil- β -ciclodextrinas em relação aos demais.....	63
Figura 4. 25 – Esquema da eletrofiliação	64
Figura 4. 26 – Micrografia das fibras de PCL 30% (m/m) associadas à ciclodextrinas, sulfadiazina de sódio e compostos de inclusão. Magnificação 4000x	66
Figura 4. 27 – Curva de calibração para quantificação de fibras com sulfadiazina de sódio...	66

Lista de Tabelas

Tabela 4. 1 - Parâmetros termodinâmicos de SDS/ β CD e SDS/HP β CD, obtidos por calorimetria de titulação isotérmica.....	55
Tabela 4. 2 – Valores de deslocamentos químicos para SDS e SDS/ β CD na razão 1:1, obtidos por ^1H RMN a 400MHz em D_2O	58
Tabela 4. 3 - Média dos dados da quantificação (em triplicata) de fibras contendo sulfadiazina de sódio, considerando o desvio padrão	67

Lista de Quadros

Quadro 4. 1 - Diâmetros dos halos de inibição para bactérias gram negativas	61
Quadro 4. 2 - Diâmetros dos halos de inibição para bactérias gram positivas	62

Lista de abreviaturas e siglas

2-hidroxipropil- β -ciclodextrina: HP β CD

β -ciclodextrina: β CD

Ácido paraminobenzoico: PABA

Análise termogravimétrica: TGA

Calorimetria de titulação isotérmica: ITC

Calorimetria exploratória diferencial: DSC

Ciclodextrina: CD

Constante de afinidade: K

Deslocamento químico: δ

Diidropteroato sintetase: DIPS

Dimetilformamida: DMF

Energia livre de Gibbs: ΔG

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier: FTIR

Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível: UV-vis

Estequiometria: N

Metil- β -ciclodextrina: M β CD

Microscopia eletrônica de varredura: MEV

Poli- ϵ -caprolactona: PCL

Ressonância magnética nuclear: RMN

Sulfadiazina de sódio: SDS

Sulfadiazina de sódio/ 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina: SDS/HP β CD

Sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina: SDS/ β CD

Sulfadiazina de sódio/ Metil- β -ciclodextrina: SDS/M β CD

Tetrahidrofurano: THF

Varição de deslocamento químico: $\Delta\delta$

Varição entrópica: ΔS

Varição entálpica: ΔH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos gerais	19
1.2 Objetivos específicos	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Biomateriais e os sistemas de liberação.....	21
2.2 Química supramolecular	22
2.2.1 Ciclodextrinas	23
2.3 Sulfonamidas/Sulfadiazina	27
2.3.1 Sulfadiazina de sódio	30
2.4 As bactérias.....	30
3 MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA.....	34
3.1 Materiais	34
3.2 Preparo das amostras	34
3.2.1 Compostos de inclusão.....	34
3.2.2 Discos para o antibiograma.....	35
3.3 Métodos	35
3.3.1 Análises térmicas.....	35
3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier	36
3.3.3 Calorimetria de titulação isotérmica	36
3.3.4 Ressonância magnética nuclear.....	36
3.3.5 Teste antimicrobiano: Disco difusão.....	36
3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
3.3.7 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis).....	37
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	39
4.1 Análises térmicas	39

4.1.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	39
4.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)	41
4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier ..	44
4.3 Misturas físicas	51
4.4 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	53
4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	56
4.6 Disco difusão	59
4.7 Fibras poliméricas e perspectivas	64
5 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	70

Capítulo 1
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os materiais usados em dispositivos médicos, comumente conhecidos como biomateriais, têm se tornados sofisticados, pois apresentam informações, tais como reconhecimento molecular, e podem liberar compostos biologicamente ativos. Os biomateriais tendem a assumir um papel cada vez mais importante, avançando para além da aplicação médica, como produzir e transformar matérias-primas para a indústria química (HUEBSCH, 2009). A administração de agentes antimicrobianos através desses dispositivos pode auxiliar no tratamento de infecções, melhorando a solubilidade, estabilidade, prolongando o tempo de meia-vida do fármaco e aumentando a especificidade, pois ao direcionar o fármaco ao seu sítio de ação os efeitos colaterais podem ser minimizados (ZHU, 2014). Na classe dos biomateriais, nanocarreadores têm se tornado promissores para superar a resistência de agentes patogênicos (HUH, 2011). Neste sentido, as ciclodextrinas (CDs) são importantes candidatos para exercer a função de carreadores e compor biomateriais (SOUSA, 2008b).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos que apresentam cavidade hidrofóbica e interagem com diferentes moléculas formando compostos de inclusão e vêm sendo muito utilizadas nas diversas áreas da ciência. Estas são capazes de modificar propriedades físicas, químicas e biológicas de moléculas hóspedes, proporcionando características como o aumento da solubilidade e estabilidade, química e biológica. Dentre as principais ciclodextrinas naturais (α -, β - e γ -ciclodextrina), a β -ciclodextrina é a mais utilizada principalmente pelo seu menor custo e maior volume de produção. As hidroxilas primárias e secundárias da β -ciclodextrina podem ser modificadas por meio do acréscimo de grupamentos metil (metil- β -ciclodextrina) ou hidroxipropil (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), alterando propriedades como, solubilidade, biodisponibilidade e toxicidade (DAVIS, 2004; SZEJTLI, 1998; UEKAMA, 1998, VENTURINI, 2008).

Estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de compostos de inclusão formados entre ciclodextrinas e agentes antimicrobianos mostram o aumento da atividade, como é o caso do triclosan/ciclodextrinas que tem uma melhor atividade antimicrobiana comparada com o triclosan isolado (CELEBIOGLU, 2014) e o hidrócloridrato de ciprofloxacina associado à β -ciclodextrina ligada a fibras de celulose, cuja atividade é proporcional a quantidade de ciclodextrina (DONG, 2014).

Nesse projeto, a sulfadiazina de sódio (SDS) foi o agente antimicrobiano complexado à β -ciclodextrina e seus derivados (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina). A

SDS pertence ao grupo das sulfonamidas, que são fármacos sintéticos com ação antimicrobiana, de uso humano e veterinário e cuja estrutura se assemelha ao ácido para-aminobenzoico (PABA). Este se incorpora a enzima diidropterato sintetase na formação do ácido diidrofólico (ácido fólico) – crucial na síntese do DNA bacteriano, ou seja, as sulfonamidas exibem um efeito bacteriostático, pois inibem a sintetase provocando a supressão proteica, sendo assim, o micro-organismo não se multiplica (HARDMAN, 2003; SKÖLD, 2000). Antimicrobianos desse grupo são de amplo espectro, inibem tanto bactérias gram positivas como gram negativas, além de alguns protozoários (*Toxoplasma* sp, por exemplo) (VICENTE, 2010).

As inclusões de sulfadiazina de sódio utilizando as diferentes ciclodextrinas foram feitas, de acordo com outras metodologias, pelo método de liofilização (SOUSA, 2008b). Para confirmar essas interações, foi necessária a caracterização físico-química por meio de técnicas como a espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e ressonância magnética nuclear (RMN). A técnica de FTIR proporciona informações para a ocorrência de complexação pela variação do espectro, seja no deslocamento, formato ou mudança na intensidade das bandas de absorção (HEDGES, 1998). As análises térmicas, DSC e TGA, estão relacionadas à caracterização, avaliação de pureza e estabilidade do material (HEDGES, 1998; OLIVEIRA, 2011). O ITC é um equipamento usado para determinar os parâmetros termodinâmicos, permitindo saber se a interação ocorre espontaneamente, suas constantes de formação e estequiometria (VELAZQUEZ-CAMPOY, 2006; WSZELAKA-RYLIK, 2013). E a técnica de RMN é fundamental na identificação de compostos orgânicos, assim como para os compostos de inclusão (HEDGES, 1998; SCHNEIDER, 1998). Os compostos caracterizados foram submetidos ao estudo antimicrobiano com o teste de disco difusão (ou antibiograma), neste, o halo de inibição é a região sem crescimento, macroscopicamente detectável (ANVISA, 2003). As amostras utilizadas para a comparação da atividade antimicrobiana foram: o disco para antibiograma de sulfonamida (comercialmente não há disco de sulfadiazina), usado como controle; e discos com soluções de sulfadiazina de sódio e de sulfadiazina de sódio/ciclodextrinas na concentração de 300µg/mL de fármaco (ANVISA, 2005).

O presente trabalho visa o estudo *in vitro* da ação antimicrobiana da sulfadiazina de sódio quando incluída às diferentes ciclodextrinas comparando-as com a ação do fármaco isolado. Até o presente momento, foram realizados diversos estudos envolvendo

antimicrobianos do grupo das sulfonamidas, inclusive a sulfadiazina e ciclodextrinas, que mostraram, por meio de diferentes técnicas, que a formação de um composto de inclusão é viável (ARAÚJO, 2008; DELRIVO, 2012; PREMAKUMARI, 2011; RAJENDIRAN, 2014a; RAJENDIRAN, 2014b; VENKATESH, 2013; ZOPPI, 2010). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura de pesquisa com a sulfadiazina de sódio e ciclodextrinas, correlacionado a avaliação antimicrobiana desse composto.

1.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antimicrobiana de compostos de inclusão formados entre o fármaco, sulfadiazina de sódio, juntamente com a β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina, previamente caracterizados.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar compostos de inclusão fármaco/ciclodextrinas,
- Caracterização físico-química dos compostos de inclusão, pelos métodos de espectroscopia no infravermelho, análises térmicas (TGA e DSC), calorimetria de titulação isotérmica e ressonância magnética nuclear,
- Propor uma estrutura formada pela interação das moléculas hóspede e hospedeira,
- Avaliação antimicrobiana por disco difusão com diferentes espécies de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*,
- Comparação entre os resultados obtidos,
- Propor sistemas poliméricos através da produção fibras, incorporando poli- ϵ -caprolactona e compostos de inclusão,
- Caracterização das fibras por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.

Capítulo 2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomateriais e os sistemas de liberação

Os biomateriais são combinações de materiais orgânicos ou inorgânicos capazes de interagir com os sistemas biológicos a fim de tratar, reconstituir ou substituir tecidos, órgãos ou mesmo exercer alguma função vital (BURG, 2000; WILLIAMS, 2014). Embora sejam usados desde a antiguidade, foi o conhecimento interdisciplinar da biologia molecular à compreensão da importância das ciências físicas, que contribuiu para criação de biomateriais avançados e com função biológica específica (DAW, 2009; HUEBSCH, 2009). Entre suas aplicações está a elaboração de dispositivos biomédicos (BURG, 2000), que tem sua atividade biológica aceita pela norma ISO 10993 a partir de um processo de gerenciamento de risco para saúde (JOSEPH, 2009). São desenvolvidos biomateriais com alto desempenho, com a finalidade de alterar as propriedades indesejáveis, além de proporcionar a quantidade precisa e eficaz do fármaco no sítio de ação, por meio de sistemas de liberação de fármacos (UEKAMA, 1998). Administrar fármacos de maneira controlada por meio de sistemas nanométricos pode auxiliar na sua especificidade. Além das vantagens biológicas, o desenvolvimento de sistemas de liberação, em escala nanométrica, oferece vantagens econômicas. O projeto de um novo medicamento envolve, em média, 500 milhões de dólares e um longo tempo de desenvolvimento, em torno de dez anos, além do maior risco de falha nos ensaios clínicos; enquanto que, um nanocarreador tem um custo e tempo de desenvolvimento reduzido para 20-50 milhões e 3-4 anos, respectivamente; além do menor risco de falha clínica. Em 2009 o mercado desses dispositivos movimentou 53 bilhões e tem previsão de 136 bilhões para 2021 (FELICE, 2014).

A nanotecnologia se revelou uma importante alternativa para novas descobertas no combate aos micro-organismos que estão desenvolvendo resistência, alternativa por meio da elaboração de biomateriais que possuam propriedades antimicrobianas e no desenvolvimento de dispositivos de liberação de antibióticos. A resistência dos micro-organismos origina cepas mais virulentas e coloca em risco a eficácia do tratamento, o que reflete em impactos para a saúde e em nível socioeconômico, pois exige avanços que combatam as infecções microbianas e resistam ao tempo. A administração de agentes antimicrobianos através de dispositivos também pode superar problemas inerentes ao tratamento das infecções, como efeitos colaterais, por direcionar o fármaco ao seu sítio de ação; prolongar seu tempo de meia-vida, conseqüentemente, seu tempo de liberação e inibir a formação de biofilmes em

infecções crônicas (matriz que envolve a célula bacteriana e a protege contra a difusão do fármaco) (ZHU, 2014). Os nanocarreadores são materiais promissores para superar a resistência de agentes patogênicos e podem ser ativados mediante estímulos (pH, temperatura, radiação eletromagnética ou ainda a agentes externos) (HUH, 2011), além de apresentarem potencialidades terapêuticas e estabilidade em fluidos biológicos, por essas características se tornam interessantes para muitos pesquisadores (VENTURINI, 2008). A interação fármaco/material é extremamente importante para desenvolver um dispositivo de liberação e características como estrutura química, peso molecular hidrofobicidade e hidrofiliabilidade são fundamentais para determinar esta interação (FELICE, 2014). Sistemas supramoleculares são muito usados na construção desses nanomateriais (NARDELLO-RATAJ, 2014).

2.2 Química supramolecular

Em 1987, Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen ganharam o Prêmio Nobel de Química devido aos estudos sobre interações moleculares altamente seletivas, que Lehn propôs chamar de química supramolecular (ARIGA, 2006; LEHN, 2007). A química supramolecular é responsável pelo estudo das características básicas de uma interação, do tipo enzima-substrato, fármacos e sítio de ligação, propagação dos sinais entre células e todos outros processos controlados por interações altamente seletivas. Características como o reconhecimento, reatividade e transporte são básicas das espécies supramoleculares (LEHN, 1993). Os sistemas supramoleculares são essenciais em diversas funções biológicas, como na formação da membrana celular, síntese dos ribossomos, transcrição do DNA, entre outras. Para funções biológicas mais complexas os processos são cineticamente controlados ou longe do equilíbrio, por exemplo, a manutenção de gradientes de concentração. Estudos com esses sistemas não só ajudam entender agregação e reconhecimento molecular como também servem de precursores para nanomateriais eletrônicos, biomédicos e na aplicação farmacêutica (LI, 2008).

Para exercer a função de carreador de fármacos são necessárias moléculas capazes de formar sistemas supramoleculares e as ciclodextrinas (CDs) são candidatas em potencial, pois interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas formando compostos de inclusão (SOUSA, 2008b), usadas no reconhecimento molecular, tanto para catálise quanto para inibição de reações (VENTURINI, 2008).

2.2.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, sintetizados a partir da degradação do amido pela glicosiltransferase. As CDs naturais são α , β e γ -CD, que apresentam 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, responsáveis pela assimetria e rigidez relativas das CDs (DAVIS, 2004; SZEJTLI, 1998), o monômero das CDs naturais está representado na Figura 2.1b. Essa classe de moléculas foi descoberta por Villiers no fim do século XIX (1891) e, doze anos mais tarde, estudadas por Schardinger, que observou a mesma formação de produtos cristalinos; identificando-os como ciclodextrinas. Os estudos baseados nas CDs tiveram continuação por Freudenberg e colaboradores, por volta de 1930 e intensificados a partir de então. O conhecimento sobre as propriedades físico-químicas, estrutura e capacidade de formar compostos aliados ao domínio da preparação das CDs em escala laboratorial foram suficientes para aumentar o interesse nas ciclodextrinas, avaliando suas possíveis aplicações. A partir dos anos 70 as ciclodextrinas começaram a ser produzidas em escala industrial (SZEJTLI, 1998; VENTURINI, 2008).

As interações não covalentes ou intermoleculares, tais como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações dipolo-dipolo, efeito hidrofóbico, efeitos estéreo e transferência de cargas são responsáveis pelo reconhecimento molecular. O que facilita a interação é a estrutura química das CDs, o formato de cone truncado, cavidade hidrofóbica e parte externa hidrofílica, com presença de hidroxilas primárias na região de maior diâmetro e secundárias na de menor (Figura 2.1a) (SZEJTLI, 1998). A cooperação de diversas interações fracas leva a uma forte interação, o que não ocorre com interações fracas individualmente (VENTURINI, 2008). Fatores como concentração e tipo de ciclodextrina, pH e o modo de preparo da solução são determinantes para que as CDs naturais possam formar agregados moleculares nanométricos de 150-300nm (SOUSA, 2010). O tamanho e aspecto estrutural são características importantes para os diversos substratos que interagem formando compostos de inclusão com as CDs, para que consigam se adaptar a cavidade das mesmas, ainda que parcialmente. Este fato influencia diretamente na estequiometria do composto; que podem apresentar diferentes razões estequiométricas entre as moléculas hóspede e hospedeira: 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2. Além de também influenciar na força de interação, levando em consideração o tipo de ciclodextrinas escolhido, seu diâmetro e a distância entre as moléculas (VENTURINI, 2008).

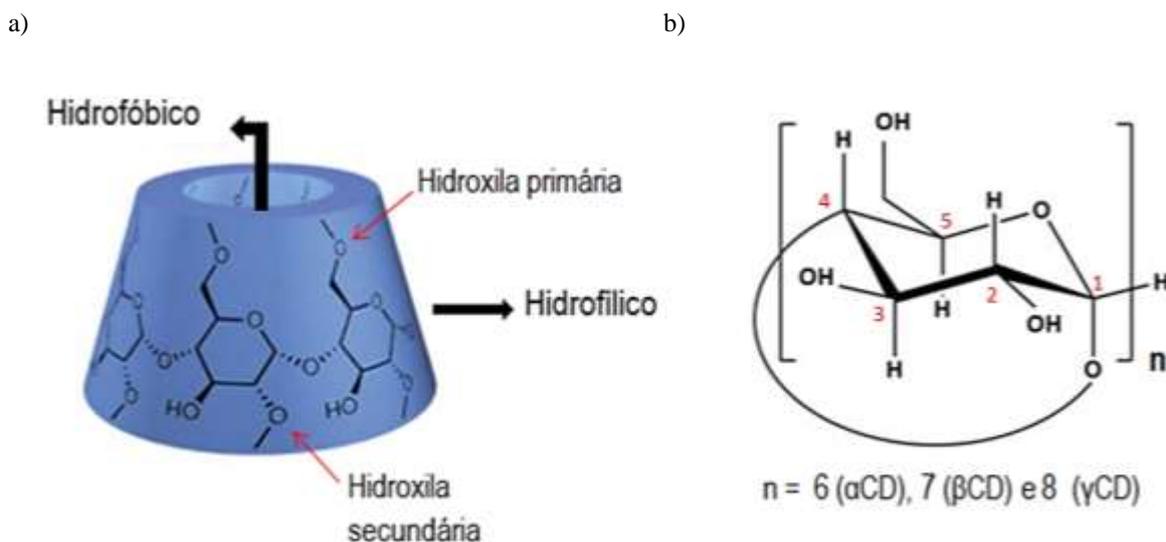


Figura 2. 1– a) Estrutura tridimensional da ciclodextrina e b) monômero das ciclodextrinas naturais (α , β e γ), com os carbonos enumerados.

Dentre as CDs naturais, a γ apresenta maior solubilidade em água (23,2 g/100mL H₂O), a α solubilidade intermediária (14,5 g/100mL H₂O) e a β a menor (1,85 g/100mL H₂O). A solubilidade de cada uma está intimamente relacionada com o tamanho do diâmetro e as interações intramoleculares. Numa mesma molécula de CD, a hidroxila ligada ao carbono 2 pode formar ligação de hidrogênio com o hidrogênio do carbono 3, impossibilitando que estejam livres para interagir em meio aquoso, isso justifica a baixa solubilidade da β CD. A α e γ com menor e maior cavidade, respectivamente, apresentam distorção, o que impede a formação da ligação intramolecular (SZEJTLI, 1998). As extremidades da cavidade das ciclodextrinas isoladas são abertas e, quando em solução aquosa, essa cavidade (levemente apolar) é ocupada por moléculas de água (polar), enquanto que, na presença de substratos cuja polaridade seja menor do que a água, estes a substituem facilmente, formando um composto energeticamente favorável com a ciclodextrina (VENTURINI, 2008). Conhecer a termodinâmica do composto de inclusão é essencial para entender o reconhecimento molecular de sistemas supramoleculares (BOUCHEMAL, 2012). As moléculas de água liberadas do interior da cavidade da ciclodextrina e a formação do composto de inclusão contribuem com a variação entálpica. Enquanto que, a variação de entropia se dá pela dessolvatação da molécula hóspede, que resulta na maior liberdade de movimentação translacional e rotacional das moléculas de água e, também, pela formação de uma estrutura

rígida na complexação, cujos movimentos da molécula hóspede e ciclodextrina diminuem (SOUSA, 2008b).

As CDs apresentam características vantajosas para atuarem como carreadores de fármaco: uma estrutura química bem definida, variedade de CDs com diferentes tamanhos, baixa toxicidade dependendo da CD, diferentes solubilidades em meio aquoso que pode, em alguns casos, levar a proteção das moléculas incluídas (UEKAMA, 1998). Algumas propriedades são alteradas quando uma molécula hóspede se complexa à ciclodextrinas. A solubilidade pode ser aumentada ou diminuída, isso ocorre porque a molécula se encaixa na cavidade da ciclodextrina e sua região hidrofóbica não mantém contato com o solvente e sim a parte hidrofílica da CD (HEDGES, 1998). O aumento da solubilidade é avaliado em função das concentrações do fármaco e da ciclodextrina e depende do tipo de composto formado e estequiometria da reação, que é governada por uma constante de equilíbrio K_C , variando de uma solubilidade limitada até a solubilidade completa (Figura 2.2). A solubilidade aliada à permeabilidade são características essenciais no desenvolvimento de fármacos e responsáveis por mais de 40% de falhas no mesmo. Diante disso, órgãos responsáveis por regulamentar medicamentos, incluindo o *Food and Drug Administration* (FDA), definiram um Sistema de Classificação Biofarmacêutico que divide os fármacos em quatro grupos diferentes de acordo com sua solubilidade e permeabilidade (Figura 2.3) (DAVIS, 2004).

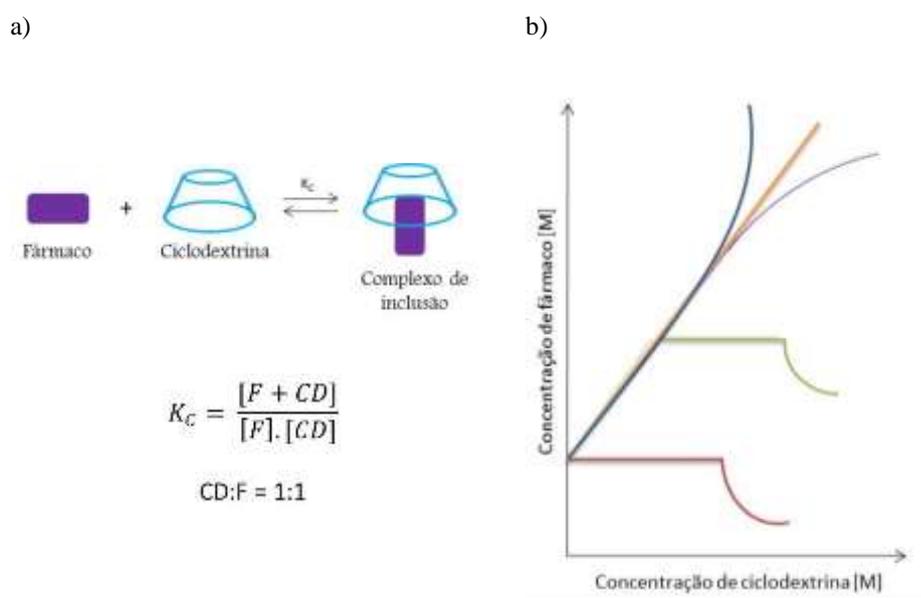


Figura 2. 2 – a) Esquema da formação do composto de inclusão (razão molar 1:1), b) Representação gráfica da solubilidade, em água, em função da concentração molar de fármaco e ciclodextrina. As linhas em vermelho e verde representam a formação de um composto cuja solubilidade é limitada e a linha laranja representa um composto totalmente solúvel em água.



Figura 2. 3 – Tabela de classificação para os fármacos de acordo com a solubilidade e permeabilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Grupos adicionados à ciclodextrinas determinam as possíveis mudanças na solubilidade, grupos neutros (hidroxipropil) ou grupos iônicos (carboxilato de metila e amina e quaternária) aumentam a solubilidade para 60% ou mais em água, enquanto que grupos alifáticos, como hexil, ou pequenas cadeias, como acetil, diminuem a solubilidade em água e aumentam em solventes orgânicos (HEDGES, 1998). As ciclodextrinas podem auxiliar em processos industriais, por exemplo, na remoção de gordura dos produtos de origem animal devido sua alta afinidade com o colesterol, assim como para evitar o escurecimento de frutas e vegetais causado por compostos fenólicos e na bioconversão de compostos orgânicos. Compostos podem ser estabilizados por meio de complexação, tanto pela interação com a cavidade, quanto com as hidroxilas que a cercam, tornando as moléculas hóspedes menos reativas. Ciclodextrinas atuam como protetores contra degradação de substâncias por micro-organismos, proteção de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação. Quando um hóspede é incluído na ciclodextrina, ele não entra em contato direto com as superfícies do organismo, sendo assim, evita irritação ou sabor desagradável; além de ser lentamente liberado. A volatilidade é uma propriedade que pode ser diminuída através da complexação com CDs (HEDGES, 1998; VENTURINI, 2008).

Essas macromoléculas vêm sendo utilizadas durante muitos anos em produtos alimentares, com a finalidade de disfarçar sabores e odores, em produtos cosméticos para aumentar a estabilidade, solubilidade, odores, prolongar a liberação de perfumes e na indústria farmacêutica para aumentar solubilidade e estabilidade de fármacos, inibir irritações e também disfarçar odores e sabores. Embora as CDs tenham o uso mais limitado nos Estados Unidos do que no Japão e na Europa (STELLA, 2008), países como Hungria, Bélgica, Inglaterra, Alemanha e Itália (HEDGES, 1998). Em geral, as CDs são promissoras no reconhecimento de moléculas quirais - fator importante no desenvolvimento de fármacos, usadas como seletores quirais, sendo que, seus derivados mais polares, como a 2-

hidroxipropil- β -ciclodextrina, oferecem uma melhor seletividade. Existem outras aplicações, tais como em química ambiental, pois as CDs são eficientes moléculas receptoras e auxiliam na captação de poluentes do solo, complexando à poluentes hidrofóbicos e os tornando mais solúveis, o que facilita a degradação por micro-organismos, além de reduzir a toxicidade de compostos. Em química analítica, na identificação seletiva de diferentes substâncias químicas (VENTURINI, 2008).

Em 2012, a área de aplicação líder foi a farmacêutica, seguido de produtos químicos e biotecnológicos (CYCLOLAB, 2013). São bastante aplicadas no uso farmacêutico pela biocompatibilidade e por proporcionarem vantagens que aumentam a biodisponibilidade de formulações farmacêuticas (SOUSA, 2008b). A biodisponibilidade do fármaco está intimamente relacionada com sua estabilidade (DAVIS, 2004), esta, por sua vez, é extremamente importante para o armazenamento e para evitar possíveis reações que o tornam inativo ou menos ativo, o que reflete na eficácia terapêutica (UEKAMA, 1998).

A toxicidade das ciclodextrinas está relacionada com a via de administração. A β -ciclodextrina é a ciclodextrina natural mais comum, possui 21 hidroxilas, sendo 7 primárias e 14 secundárias (UEKAMA, 1998), porém sua menor solubilidade em comparação com as outras CDs principais e a alta afinidade com o colesterol impossibilita a administração parentérica por precipitar nos rins, ocasionando danos aos túbulos renais. Sendo lipofílicas as nossas células, a β CD administrada, em grande quantidade, por via intravenosa pode romper células provocando hemólise. A modificação na molécula, como o acréscimo de grupos funcionais, da CD pode reduzir esses problemas (DAVIS, 2004). Esta modificação ocorre por meio da substituição das hidroxilas primárias ou secundárias, levando em consideração a nucleofilicidade das hidroxilas e possibilidade das CDs formarem compostos com reagentes. Dependendo do reagente podem atacar a hidroxila na posição 6, 2 ou 3, mostradas na Figura 2.1b, que são as menos ácida, mais ácida e mais difícil de reagir, respectivamente (SOUSA, 2010).

2.3 Sulfonamidas/Sulfadiazina

As sulfonamidas representam o grupo precursor de quimioterápicos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. São antimicrobianos de amplo espectro, de uso humano (SKÖLD, 2000) e veterinário (GRAVE, 2010). Sua estrutura (SO_2NH) é muito usada no desenvolvimento de novos medicamentos (PERLOVICH, 2014). Também denominada de sulfa, tiveram atividade antimicrobiana descoberta na década de 1930 a partir de estudos com

o prontossil (Figura 2.4a), um corante azo sintético, cujo metabólito ativo (sulfanilamida, Figura 2.4c) o tornava eficiente contra estreptococos. Sua atividade contra outras bactérias foi comprovada após o sucesso do tratamento de septicemia estafilocócica e infecções meningocócicas com o prontossil. Em 1939, Domagk ganhou o prêmio Nobel de Medicina pela descoberta do valor quimioterápico do prontossil, porém foi preso por soldados nazistas e não pode receber o prêmio. Só em 1947, quando foi libertado, veio a receber a medalha e o diploma (HARDMAN, 2003; SKÖLD, 2010). As sulfas já foram muito usadas contra infecções estreptocócicas, estafilocócicas, gonocócicas, meningocócicas e pneumocócicas (FOCKS, 2010; SKÖLD, 2010). Atualmente, quimioterápicos da classe das sulfonamidas são associados à trimetoprim e pirimetamina e têm ação contra *Nocardia* spp. e *Toxoplasma gondii*, respectivamente, inclusive em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (VICENTE, 2010).

Em geral, as sulfonamidas sofrem absorção rápida no trato gastrointestinal, principalmente no intestino delgado. O percentual de fármaco absorvido chega a 70-100 %, tem nível plasmático máximo no intervalo de 2-6 horas e são detectadas na urina cerca de 30 minutos após a administração por via oral. Penetram facilmente nos líquidos corporais (pleural, peritoneal, sinovial, ocular, entre outros), onde se encontram na forma ativa. Podem ser excretadas pelas fezes, bile, secreções e, principalmente, pela urina (HARDMAN, 2003). Atuam como inibidores competitivos do ácido ρ -aminobenzóico (PABA) (LIANG, 2013), Figura 2.4d, pela similaridade entre suas estruturas. A diidropteroato sintetase (DIPS) é responsável por catalisar o PABA e ácido 7,8-di-hidro-6-hidroxipteterina-pirofosfato para a biossíntese do folato. Os derivados do folato são extremamente importantes na formação dos ácidos nucleicos e, conseqüentemente, na síntese do DNA. Quando essa via é interrompida pelas sulfonamidas, ocorre supressão na síntese proteica e inibição do crescimento microbiano, caracterizando um efeito bacteriostático (FOCKS, 2010; VICENTE, 2010; VINNICOMBE, 1999). Os humanos não tem sua síntese de DNA afetada, pois não sintetizam o folato e sim o adquire por ingestão de alimentos que contém o ácido fólico (SKÖLD, 2000). As sulfonamidas tem maior efetividade na fase aguda das infecções, quando as bactérias se multiplicam rapidamente. Além disso, o efeito bacteriostático cessa em altas concentrações de PABA ou concentração de sulfonamidas abaixo da dose inibitória (FRASER, 1996). O sistema imunológico é responsável por erradicar a infecção (HARDMAN, 2003).

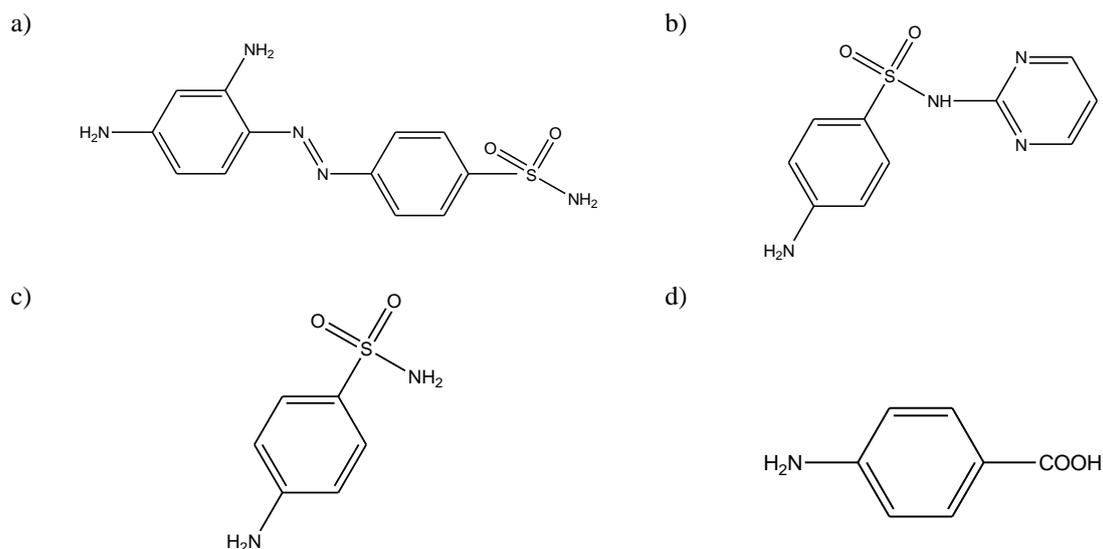


Figura 2. 4 – Estrutura química a) prontosil, b) sulfadiazina, c) sulfanilamida e d) ácido para-aminobenzóico (PABA)

As sulfonamidas e seus derivados podem ser classificados de acordo com a sua duração no organismo e indicações, tais como, as de uso padrão, para infecções sistêmicas provocadas por bactérias suscetíveis; as altamente solúveis no caso de infecções do trato urinário e fracamente solúveis em infecções intestinais; sulfonamidas potencializadas, ou seja, o sinergismo entre classes diferentes de fármacos, como é o caso de diaminopirimidinas (trimetoprim, por exemplo) e sulfonamidas, esta associação bloqueia os sistemas enzimáticos microbianos provocando um efeito bactericida; e as de uso tópico (FRASER, 1996).

No início dos anos 40 já se falava em cepas de bactérias sulfonamidas-resistente levando em consideração as infecções mais susceptíveis, como queimaduras em vítimas de guerra. Além de ressaltar a importância de não utilizar sulfonamidas em casos não justificáveis de gravidade, quando necessária usá-la na dosagem adequada e por pouco tempo (MORGAN, 1943). A resistência bacteriana pode ocorrer devido a mutação ou por transferência de plasmídios, e resulta em uma (1) menor afinidade com a diidropteroato sintetase, (2) diminuição da permeabilidade ou efluxo do fármaco, (3) via metabólica alternativa para síntese do folato ou (4) aumento na produção do folato ou de antagonista do fármaco (HARDMAN, 2003). Embora as sulfonamidas não sejam muito utilizadas atualmente, principalmente pela existência de antibióticos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e pela resistência de micro-organismos perante as sulfas, estudos recentes com esse grupo podem ser interessantes pelo seu baixo custo e ausência do uso por muitos anos, o que

coloca em questão a reversibilidade da resistência; considerando a resistência aos antibióticos em geral (SKÖLD, 2000).

A sulfadiazina (Figura 2.4b) é uma sulfonamida rapidamente absorvida e excretada, com meia-vida de 10h. Atinge nível plasmático máximo de 3-6 horas e após administrada em doses adequadas chega ao líquido cefalorraquidiano em concentrações eficazes contra meningites; além de facilmente excretada pelos rins (HARDMAN, 2003). Sais sódicos, como a sulfadiazina de sódio (SDS), são mais solúveis em meio aquoso (FRASER, 1996). Enquanto a sulfadiazina possui baixa solubilidade (0,074 mg/mL água), a sulfadiazina de sódio possui uma solubilidade bem mais elevada (50 mg/mL água) (DELRIVO, 2012).

2.3.1 Sulfadiazina de sódio

A sulfadiazina de sódio (Figura 2.5) é uma sulfonamida de ação rápida, usada para tratar infecções ocorridas em queimaduras (MUZZALUPO, 2014) e, juntamente, com a pirimetamina é usada no tratamento da toxoplasmose em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida e infecções congênitas em recém-nascidos (GENG, 2012). Pesquisas recentes utilizaram a sulfadiazina de sódio associada à niossomas para distribuição transdérmica controlada (MUZZALUPO, 2014; TAVANO, 2013). Além disso, Geng e colaboradores (2012) propõe a interação da sulfadiazina de sódio com albumina humana e DNA por meio de métodos espectroscópicos, a fim de obter informações sobre o efeito terapêutico e a farmacologia da SDS a nível molecular.

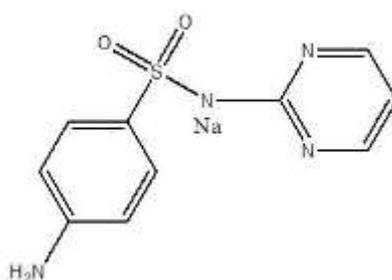


Figura 2. 5 – Estrutura química da sulfadiazina de sódio

2.4 As bactérias

No último século, as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte e isso se deve a descoberta dos antibióticos. Entretanto, atualmente, a resistência a agentes antimicrobianos tem sido cada vez mais preocupante, pois as cepas se tornam resistentes rapidamente (HUH, 2011). Pode-se considerar que a resistência das bactérias ocorre em

consequência ao amplo uso de antibióticos, que também está presente no meio ambiente. As bactérias trocam material genético entre si, mesmo entre espécies diferentes e por isso são consideradas facilmente adaptáveis a agentes químicos e outros fatores. Antigamente a resistência era predominante em ambientes hospitalares, entretanto, atualmente pode atingir indivíduos sem qualquer doença e ocorre por alguns fatores básicos, como modificação do alvo (antibiótico não reconhece), inativação do antibiótico, variação na permeabilidade e inativação de enzima (GUIMARÃES, 2010). Alguns cuidados devem ser adotados para evitar a resistência bacteriana: prevenir contra infecções, controle e prevenção da disseminação de bactérias resistentes, uso consciente de antibióticos e o desenvolvimento de agentes antimicrobianos sejam estes novos ou modificações químicas em medicamentos já existentes. Porém, o grande desafio é elaborar um agente antimicrobiano capaz de agir por um longo prazo sem que a bactéria se torne facilmente resistente (GUIMARÃES, 2010; HUH, 2011).

Dentre a variedade de bactérias, essa pesquisa se propõe avaliar a atividade sobre bactérias que comumente provocam infecções, são elas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A principal causa de infecções nosocomiais é causada por bactérias do gênero *Staphylococcus*, principalmente, *S. aureus* ou *S. epidermidis*, ambos são cocos gram positivos e capazes de formar biofilmes tanto no organismo como na superfície de materiais, como implantes médicos. O biofilme formado mantém as bactérias em fase estacionária, ou seja, não crescem e se mantêm com metabolismo reduzido; são dificilmente combatidas por antibióticos e pelas células do sistema imune e por isso se tornam resistentes com mais facilidade. A formação de biofilmes e contaminação em dispositivos médicos podem ocasionar infecções crônicas, que dificultam o tratamento e o prolonga; isto reflete em um maior custo (LIU, 2015). Fatores como perda da barreira epitelial, baixa imunidade e presença de doenças como diabetes e AIDS facilitam a infecção por essas bactérias (CHAMBERS, 2009). O *S. epidermidis* representa 90% da microbiota normal da pele e o *Staphylococcus aureus* reside na pele e nas passagens nasais e causa diversas infecções, de espinhas e furúnculos a pneumonias, infecções em feridas cirúrgicas e intoxicações alimentares (TORTORA, 2012).

As bactérias gram negativas são mais resistentes devido a parede celular mais complexa, o que dificulta a passagem de antibióticos através da barreira lipídica e as tornam as principais bactérias causadoras de mortalidade, morbidade e exige maior custo no tratamento (AZZOPARDI, 2013; GUIMARÃES, 2010). A *Escherichia coli* é um bacilo

gram-negativo, que naturalmente se encontra no trato gastrointestinal, porém é capaz de provocar diarreias e doenças extra-intestinais. Existem as variantes patogênicas da *E. coli*, são elas: enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteroagregativa, enterotoxigênica, enteropatogênica e a difuso aderente. Apesar de haver semelhanças entre essas variantes para colonizar a mucosa intestinal e causar doenças, as complicações variam significativamente. Por ser causa de morbidade e mortalidade por todo o mundo, afetando países desenvolvidos e em desenvolvimento, a *E. coli* patogênica é de grande preocupação para a saúde pública, por isso muito estudada em humano, animais, ambiente e comida (CROXEN, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete gram negativo que faz parte da microbiota humana, também são comuns no solo e em ambientes naturais. Porém é uma bactéria oportunista e pode causar doenças e formar biofilmes que atacam o sistema imune, pois colonizam os pulmões de pacientes com fibrose cística podendo levá-lo a morte, além de provocar infecção urinária, em feridas e queimaduras, septicemia, abscessos e meningite (RASAMIRAVAKA, 2015; TORTORA, 2012). A *Klebsiella pneumoniae* é comumente encontrada na água e no solo, porém pode provocar pneumonia grave em humanos. Possui uma camada de polissacarídeo que a reveste e impede a fagocitose por células do sistema imune, isso permite sua adesão no trato respiratório (TORTORA, 2012). Avaliar a atividade de antimicrobianos sobre essas bactérias é de extrema importância, pois propõe soluções para o tratamento que é difícil, na maioria das vezes, pelo potencial patogênico de todas elas.

Capítulo 3

MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA

3 MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA

3.1 Materiais

1. β -ciclodextrina: Cyclolab
2. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina: Cyclolab
3. Metil- β -ciclodextrina: Cyclolab
4. Sulfadiazina de sódio: Sigma-Aldrich
5. Discos brancos estéreis (6mm): Laborclin
6. Discos padrão de sulfonamidas: Laborclin
7. Meios de cultura (Ágar Müller Hinton, Biolacin e Tioglicolato): BioMérieux
8. Discos de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*): NewProv
9. Poli- ϵ -caprolactona: PolySciences
10. Dimetilformamida: Sigma-Aldrich
11. Tetrahidrofurano: Nuclear

3.2 Preparo das amostras

3.2.1 Compostos de inclusão

Foram preparados três compostos de inclusão diferentes, entre o fármaco (sulfadiazina de sódio) e as ciclodextrinas (β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina) pelo método de liofilização (SOUSA, 2008b; PASSOS, 2012), na razão molar 1:1. As amostras foram solubilizadas em água e mantidas sob agitação por quatro horas, tempo necessário para que ocorra o equilíbrio e forme o composto de inclusão. Posteriormente, foram rapidamente congeladas à -20°C , aproximadamente, e quando totalmente congeladas foram colocadas no liofilizador (Liofilizador LJJ04, JJ Científica) até toda que água fosse retirada e obtivesse uma amostra sólida seca.

3.2.2 Discos para o antibiograma

Como padrão para o teste de disco difusão usou sulfonamida, disponível comercialmente, e não sulfadiazina. O conteúdo de sulfonamida presente nos discos deve ser de 300µg/mL, quantidade determinada pela ANVISA com base nos testes de sensibilidade antimicrobiana do Instituto de Padrão Clínico e Laboratorial (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*). Diante disso, os discos preparados com os compostos de inclusão apresentaram essa mesma quantidade de fármaco; determinados na proporção 1 mol de composto para 1 mol de sulfadiazina de sódio. Pesou-se 0,3 mg, 1,54 mg, 1,83 mg e 1,73 mg para cada disco de sulfadiazina de sódio, sulfadiazina de sódio/β-ciclodextrina, sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil-β-ciclodextrina e sulfadiazina de sódio/metil-β-ciclodextrina, respectivamente. A técnica de preparo é uma adaptação do que se encontra na literatura (OSTROSKY, 2008; SCHUCK, 2001). As amostras devidamente pesadas foram diluídas em 10µL de água destilada e ficaram sob agitação no vórtex (MS 3 digital, IKA®) por 5 minutos a 2000 rpm. As soluções foram transferidas para discos brancos estéreis de 6mm. Cada disco foi armazenado em um Eppendorf® previamente exposto a luz UV por 20 minutos. O teste só foi realizado depois de 24 horas.

3.3 Métodos

3.3.1 Análises térmicas

3.3.1.1 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas da calorimetria diferencial exploratória foram obtidas por equipamento DSC-60, Shimadzu, utilizando cadinho de alumina. As amostras foram de aproximadamente 5 mg. A técnica foi realizada em temperatura de 25 a 550 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Os parâmetros foram os mesmos para todas as amostras.

3.3.1.2 Análise termogravimétrica

A termogravimetria foi obtida por equipamento METTLER TG50, utilizando cadinho de porcelana. A temperatura de trabalho foi de 25 a 550 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, gás nitrogênio como atmosfera a 30 mL/min.

3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros foram obtidos pelo equipamento do modelo Spectrum 100, Perkin Elmer, por reflectância atenuada, com cristal de seleneto de zinco. Foram realizadas 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente. O intervalo de absorção foi de 4000 a 650 cm^{-1} . Todas as amostras foram analisadas em pó e dispersas sobre o cristal, posterior a leitura do branco com mesma varredura e resolução.

3.3.3 Calorimetria de titulação isotérmica

O calorímetro isotérmico de titulação utilizado foi o microcalorímetro VP-ITC da marca MicroCal acoplado ao monitor planar (PL 1711M). O experimento foi realizado a 25°C e as curvas foram obtidas por injeções com 300s de intervalo, totalizando 50 pontos com volume de $5\text{ }\mu\text{L}$ da solução aquosa de sulfadiazina de sódio (60 mM) em solução aquosa de β -ciclodextrina (4 mM) e em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (4 mM), separadamente. O primeiro ponto teve volume de $1\text{ }\mu\text{L}$ da solução titulante. O branco foi feito sob mesmos parâmetros, porém sem a presença dos titulados. O fluxo de calor que ocorre durante a interação fármaco/ciclodextrinas resulta em picos que, após tratados, fornecem os parâmetros termodinâmicos desta interação (BOUCHEMAL, 2012).

3.3.4 Ressonância magnética nuclear

Os compostos de inclusão foram dissolvidos em D_2O e utilizados para verificar o processo de inclusão usando os deslocamentos químicos de hidrogênio (^1H). Os espectros de RMN foram obtidos a 27°C em equipamento Bruker DRX 400 – AVANCE operando a 400 MHz, em tubos de quartzo de 5 mm. Os experimentos de ^1H foram adquiridos com a técnica de supressão de água residual (WATERGATE) e os dados de ROESY através de experimentos padrões da biblioteca do espectrômetro com um tempo de mistura de 500 ms. Em todos os experimentos de RMN, o deslocamento químico da água foi utilizado como referência, com um valor de $\delta = 4,80\text{ ppm}$.

3.3.5 Teste antimicrobiano: Disco difusão

Primeiramente, os discos de bactérias foram dispersos em tioglicolato e após 24 h foram cultivadas em biolacin também por 24 h a 37°C , só então foram suspensas em solução salina 0,5 McF para a confecção do antibiograma. A partir desta solução, as bactérias foram semeadas em ágar Müller Hinton, sobre o qual os discos preparados com as amostras foram

dispostos. Optou-se por duas cepas representantes das bactérias gram positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 0128), e três gram negativas, *Escherichia coli* (ATCC 0022), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 0053) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 0083). Os testes foram realizados em triplicata. Cada placa de Petri apresentou um disco padrão de sulfonamida para controle, um de sulfadiazina de sódio, um disco de cada ciclodextrina (β CD, HP β CD e M β CD) e um de cada composto de inclusão. Foram condicionadas na estufa à 37 °C e após 24 h foi realizada a leitura. De acordo com o diâmetro do halo formado em volta dos discos é possível determinar a inibição do crescimento bacteriano. Realizado de acordo com a “Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição”, (ANVISA, 2003; OSTROSKY, 2008). Os resultados foram submetidos a teste estatístico de análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativas entre a atividade antimicrobiana de SDS e compostos de inclusão. No caso de significância foi realizado o pós-teste de Tukey. Os valores foram expressos pela média e erro padrão da média com $n = 3$ e nível de significância ajustado para $p < 0,05$.

3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fibras obtidas utilizando o polímero poli- ϵ -caprolactona foram aderidas a um suporte metálico (stub) com auxílio de fita dupla face e recobertas com ouro em um Quorum Q150R ES por dois minutos e corrente elétrica de 6 mA. As micrografias das fibras foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo EVO MA15, com aumento de 4000x.

3.3.7 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros de absorção na região do UV-vis para a quantificação das fibras de sulfadiazina de sódio/PCL 30%, sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina/PCL 30% e sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina/PCL 30% foram obtidos em um espectrofotômetro de ultravioleta-visível Varian Cary 50 utilizando cubetas de quartzo. A curva de calibração foi realizada com solução de sulfadiazina de sódio nas concentrações de 0,0036, 0,0054, 0,0072, 0,009, 0,0108, 0,0126, 0,0144, 0,0162, 0,018, 0,0216 e 0,0252 g/L, somando onze pontos totais e com tendência linear. As fibras foram pesadas e colocadas em 2 mL de diclorometano e 2 mL de água destilada para extração da fase aquosa. Como branco foi utilizada água destilada. As leituras foram realizadas em 240 nm, referente à banda de absorção da sulfadiazina de sódio.

Capítulo 4
ANÁLISE DOS RESULTADOS

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Análises térmicas

A caracterização térmica permite a determinação da pureza e umidade, a avaliação da estabilidade, transição de fase, calores específicos, cinética da reação, estudos de compatibilidade entre formulações farmacêuticas pela determinação das entalpias das formas cristalinas, entre outras (IONASHIRO, 2005; OLIVEIRA, 2011). As técnicas termoanalíticas utilizadas no presente trabalho foram a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), frequentes em estudos de formação de compostos de inclusão por fornecer informações sobre propriedades desses materiais (DELRIVO, 2012). Ambas foram realizadas em atmosfera inerte de gás nitrogênio para que não houvesse reação com a amostra e também para remover gases liberados na decomposição da mesma, que, por sua vez, influenciam na velocidade da decomposição (IONASHIRO, 2005).

4.1.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria diferencial exploratória mede a diferença do fluxo de calor entre a amostra e um material referência, submetidos a uma temperatura controlada e está associado a alterações químicas e físicas, como transição de fase e reações de decomposição, desidratação ou dissociação (MOTHÉ, 2009). A análise de calorimetria exploratória diferencial é uma ferramenta analítica importante para caracterizar interações, no estado sólido, entre ciclodextrinas e fármacos e têm sido amplamente utilizada (MURA, 2003).

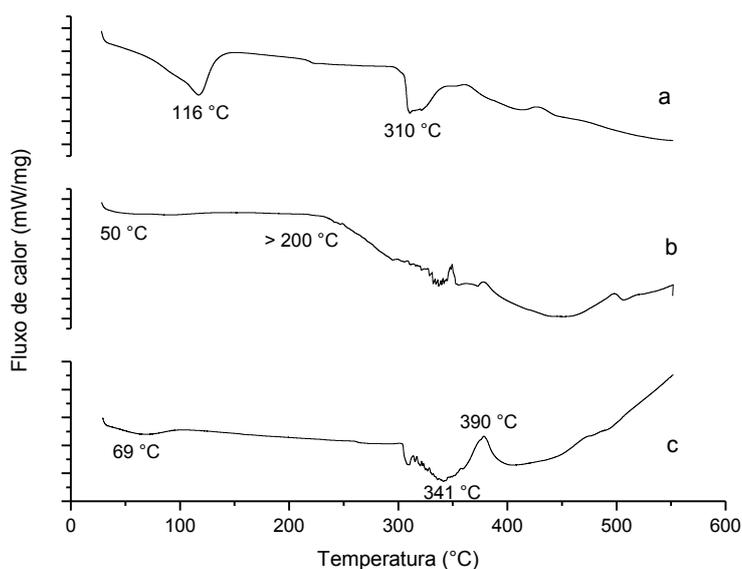


Figura 4. 1 – Curvas do DSC da (a) β -ciclodextrina, (b) 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e (c) metil- β -ciclodextrina

A curva DSC para as ciclodextrinas (β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina) apresentam um pico inicial que corresponde à perda de água e um posterior referente à decomposição (DELRIVO, 2012). Na curva da β CD (Figura 4.1a) há um pico inicial endotérmico em aproximadamente 116 °C referente à perda de água e outro em 310 °C indicando a decomposição da β -ciclodextrina. A HP β CD (Figura 4.1b) apresenta um decaimento em 50 °C, por causa da perda de água, e outro a partir de 200 °C caracterizando sua decomposição. A M β CD (Figura 4.1c) apresenta um pico endotérmico em 69 °C correspondente a perda de água e inicia sua decomposição em 341 °C com pico endotérmico e, posterior, pico exotérmico (390 °C).

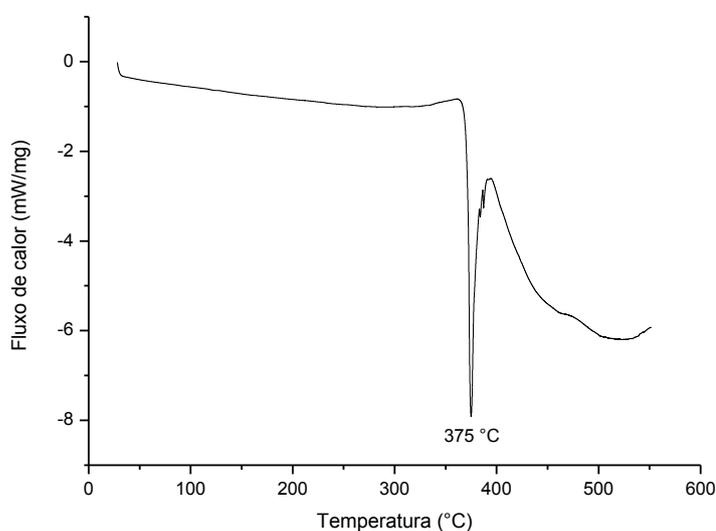


Figura 4. 2 – Curva do DSC da sulfadiazina de sódio

Os fármacos, assim como as substâncias cristalinas anidras, apresentam em sua curva calorimétrica um pico endotérmico acentuado, típico de ponto de fusão, que, logo em seguida, se decompõe. Essa decomposição é indicada por comportamentos endo ou exotérmicos (MURA, 2003). Confirmando este perfil, a curva calorimétrica da sulfadiazina de sódio (Figura 4.2) apresenta um pico endotérmico referente à fusão em 375 °C seguido por sua decomposição.

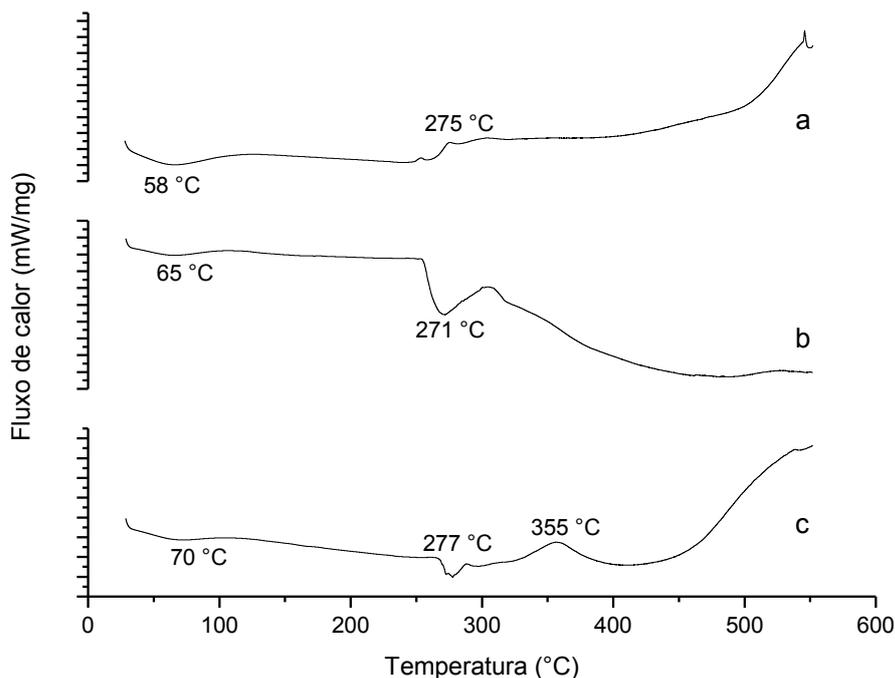


Figura 4. 3 – Curva do DSC do composto de inclusão (a) sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina (SDS/ β CD), (b) sulfadiazina de sódio/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (SDS/HP β CD) e (c) sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina (SDS/M β CD)

O perfil térmico dos compostos de inclusão se diferencia dos perfis das substâncias quando isoladas, sendo que, a ausência do pico característico do fármaco sugere sua interação (MURA, 2003; RAJENDIRAN, 2014b). Nota-se que, nas curvas dos compostos, mostradas pela Figura 4.3, SDS/ β CD apresentou uma menor temperatura de desidratação, 58 °C, quando comparada à β -ciclodextrina; enquanto o composto SDS/HP β CD e SDS/M β CD apresentaram temperatura de 65 e 70 °C, respectivamente, maiores que a temperatura para as ciclodextrinas isoladas. O segundo pico ou decaimento referente à decomposição ocorre em 275 e 271 °C para SDS/ β CD e SDS/HP β CD, respectivamente, e um pico endotérmico em 277 °C e exotérmico em 355 °C para SDS/M β CD, assim como a M β CD isolada, o composto apresenta dois picos referentes à decomposição, porém em temperaturas diferentes. Comparando as curvas dos compostos com as curvas da sulfadiazina de sódio e ciclodextrinas, os compostos apresentaram comportamento térmico diferente e o pico típico da sulfadiazina de sódio, referente à fusão em 375 °C, não apareceu em nenhuma delas, sugerindo que houve interação hóspede/hospedeiro.

4.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A curva termogravimétrica fornece informações quanto à variação de massa em função temperatura (MOTHÉ, 2009). As moléculas de ciclodextrinas apresentam curva

termogravimétrica com decomposição em apenas um estágio (ARAÚJO, 2008; DELRIVO, 2012).

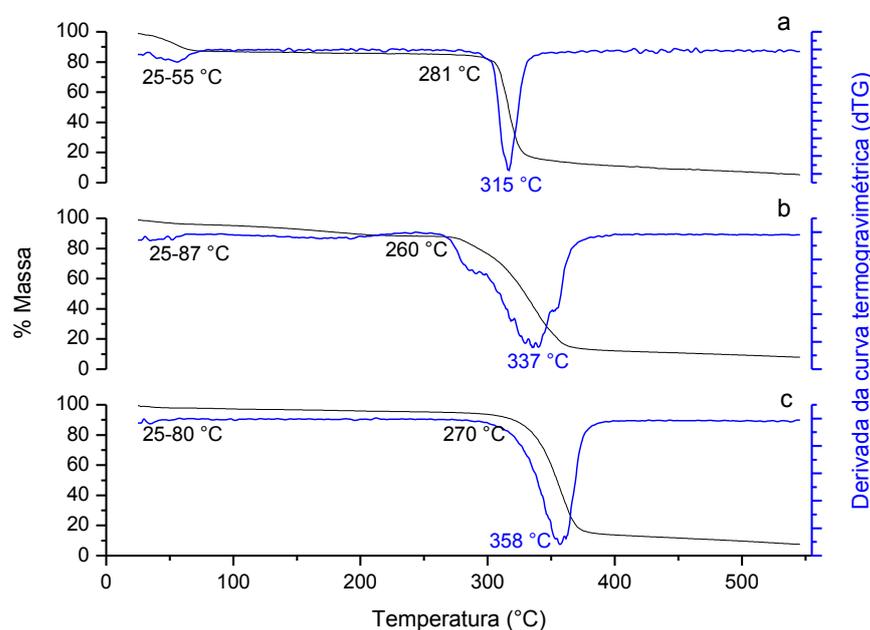


Figura 4. 4 – Curva termogravimétrica da (a) β -ciclodextrina, (b) 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e (c) metil- β -ciclodextrina

A primeira curva termogravimétrica (Figura 4.4a) apresenta uma queda entre as temperaturas 25 e 55 °C, que corresponde à desidratação (perda de água), cerca de 7% da massa total. A β CD se apresenta estável até 281 °C, temperatura na qual se inicia a decomposição. A temperatura máxima é melhor observada pela derivada da curva (dTG), essa temperatura promove a velocidade máxima de perda de massa (IONASHIRO, 2005), neste caso, 315 °C. A perda de massa pode ser calculada pela área do pico da dTG, que corresponde à 70% de perda para a β CD, salientado que essa perda continua, gradativamente, até a temperatura final da análise (550 °C) com 5% da massa inicial. A HP β CD (Figura 4.4b) também tem perda de água, porém, comparando com a β CD, perde menos massa, 4 %, em um intervalo maior de temperatura de 25 °C até aproximadamente 87 °C. A perda é menos acentuada e assim se mantém até a temperatura na qual a HP β CD é estável, em 260 °C, perdendo 76% da sua massa inicial. Até a temperatura de 550 °C a HP β CD perdeu 93% da massa total. A perda de água também é menos acentuada para a M β CD (Figura 4.4c), pois possui o menor número de hidroxilas em sua composição, por isso a perda de água não é aparente na curva termogravimétrica (VALENTE, 2015). A M β CD é estável até 270 °C, aproximadamente, com perda de 82% de massa. Ao final da análise restam apenas 7% da massa inicial.

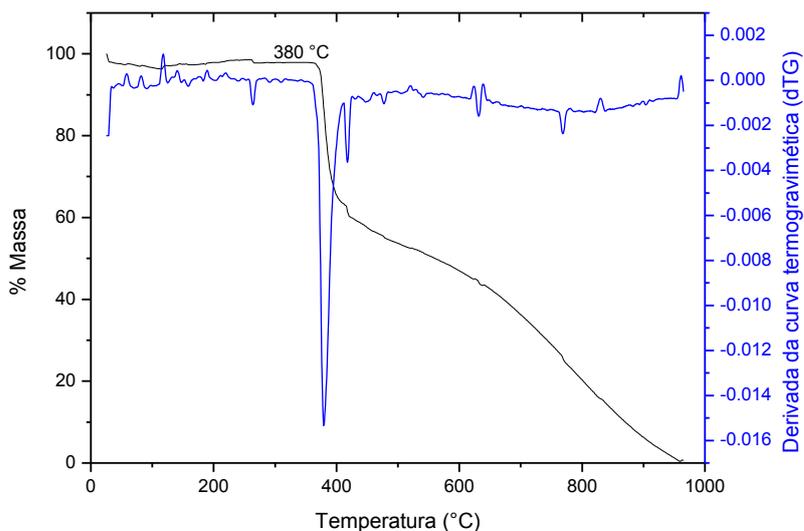


Figura 4. 5 – Curva termogravimétrica da sulfadiazina de sódio até 1000 °C

Ressaltando que em transição de fase não ocorre perda de massa, a curva termogravimétrica da sulfadiazina de sódio confirma sua curva de DSC, pois apresenta perda de massa a partir de 380 °C correspondente à decomposição, enquanto que, a temperatura de fusão em 375 °C referente à transição de fase não apresenta perda de massa. Diferente das ciclodextrinas, a SDS (Figura 4.5) apresenta fase intermediária de decomposição e, enquanto as CDs praticamente se decompuseram até 550 °C, para a SDS foi necessário uma temperatura até 1000 °C.

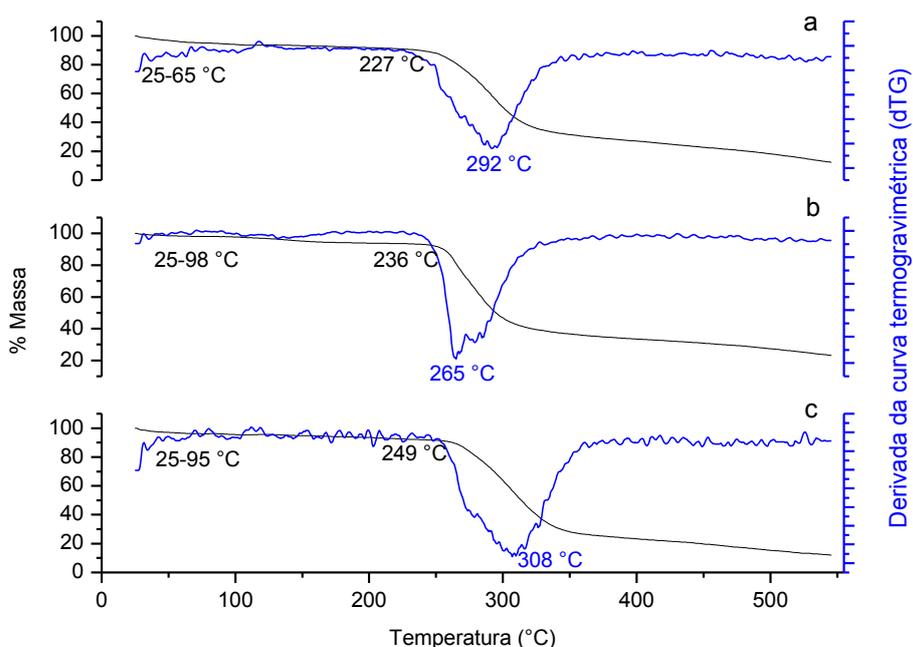


Figura 4. 6 – Curva termogravimétrica do composto (a) sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina, (b) sulfadiazina de sódio/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e (c) sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina

Ocorreu variação no comportamento térmico dos compostos (Figura 4.6) em relação à sulfadiazina de sódio e ciclodextrinas analisadas anteriormente. Os compostos possuem um decaimento inicial correspondente à desidratação, que se inicia com a temperatura ambiente e permanece até 65 °C para SDS/ β CD, 98 °C para SDS/HP β CD e 95 °C para SDS/M β CD (mais aparente que a desidratação da M β CD), todas as temperaturas finais de desidratação foram maiores comparando-as com as CDs isoladas. As temperaturas iniciais da decomposição dos compostos SDS/ β CD, SDS/HP β CD e SDS/M β CD foram 227, 236 e 249 °C, respectivamente, restando a esses compostos 40, 58 e 33 % das massas totais. Todos os compostos não obtiveram decomposição total até 550 °C por influência da sulfadiazina de sódio. A estabilidade térmica dos compostos ocorreu em uma temperatura inferior à apresentada pelas moléculas de CDs e SDS isoladas, porém não influencia na aplicabilidade do mesmo, considerando que a estabilidade de formulações farmacêuticas é avaliada a 25-30 °C em testes de longa duração e 40 °C para estudo acelerado (ANVISA, 2011). Diante de perfis térmicos diferentes, pode-se sugerir que ocorreu a interação fármaco/ciclodextrinas (DELRIVO, 2012).

4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho fornece informações sobre a estrutura e interação das moléculas, por isso é utilizada para analisar compostos de inclusão com ciclodextrinas (HEDGES, 1998). Quando se deseja saber a ocorrência da inclusão é necessário saber a estrutura de cada molécula em estudo, neste caso, a estrutura das ciclodextrinas (Figura 4.7) e sulfadiazina de sódio (Figura 4.11).

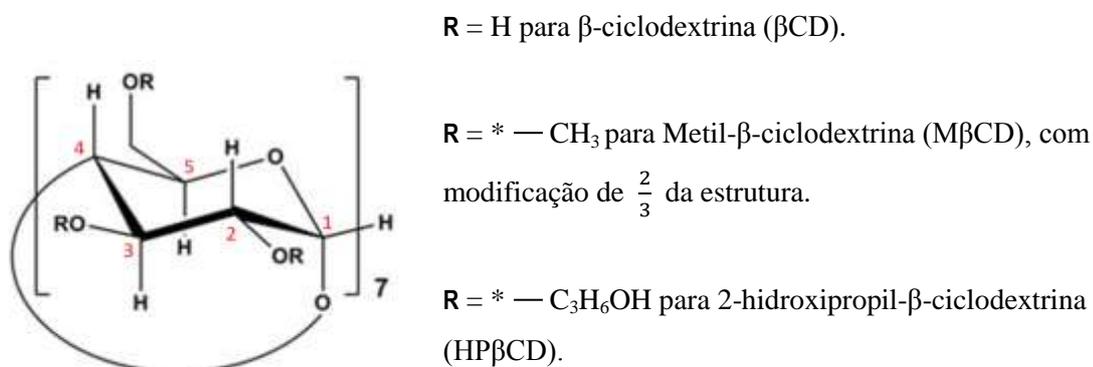


Figura 4. 7 – Estrutura química das ciclodextrinas: β CD, M β CD e HP β CD

Os espectros das ciclodextrinas são identificados pelas suas hidroxilas, ligações carbono-hidrogênio e carbono-oxigênio (PASSOS, 2012). De acordo com as figuras 4.8, 4.9 e 4.10, a absorção relativa à ligação O-H tem sua banda de estiramento (deformação axial) em 3289, 3340 e 3403 cm^{-1} para βCD , $\text{HP}\beta\text{CD}$ e $\text{M}\beta\text{CD}$, respectivamente. As bandas se apresentam largas, pois as moléculas estão envolvidas em interações intra e intermoleculares por ligação de hidrogênio. O deslocamento das bandas de OH entre as ciclodextrinas ocorre devido as diferentes quantidades de hidroxilas presentes em cada uma delas. Como as ciclodextrinas apresentam álcoois primários e secundários; é correto descrever o estiramento C-O, sendo estiramento da ligação C-C-O, pois essa região de absorção acopla a vibração da ligação C-C (BARBOSA, 2008). Os álcoois primários absorvem em região de menor energia que os secundários, portanto a absorção relativa ao estiramento C-O de álcool primário ocorre em 1080 cm^{-1} para βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$ e 1077 cm^{-1} para $\text{M}\beta\text{CD}$, enquanto que o estiramento C-O de álcool secundário ocorre em 1154, 1148 e 1151 cm^{-1} para βCD , $\text{HP}\beta\text{CD}$ e $\text{M}\beta\text{CD}$, respectivamente. Além da ligação C-O dos álcoois, se encontra presente nas ciclodextrinas a ligação C-O do éter e resultante das ligações glicosídicas (C-O-C) que apresentam absorção relativa ao estiramento em 1022 cm^{-1} para βCD e $\text{M}\beta\text{CD}$ e 1023 cm^{-1} para $\text{HP}\beta\text{CD}$.

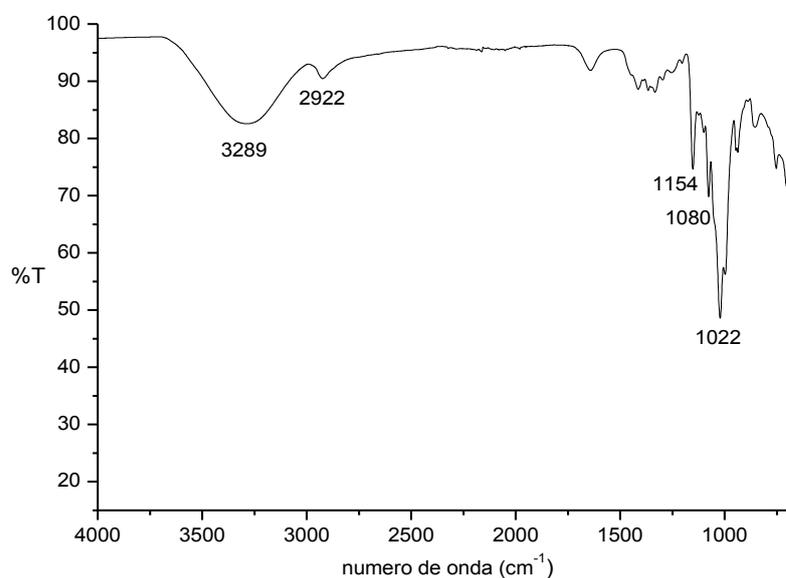


Figura 4. 8 – Espectro do infravermelho da β -ciclodextrina

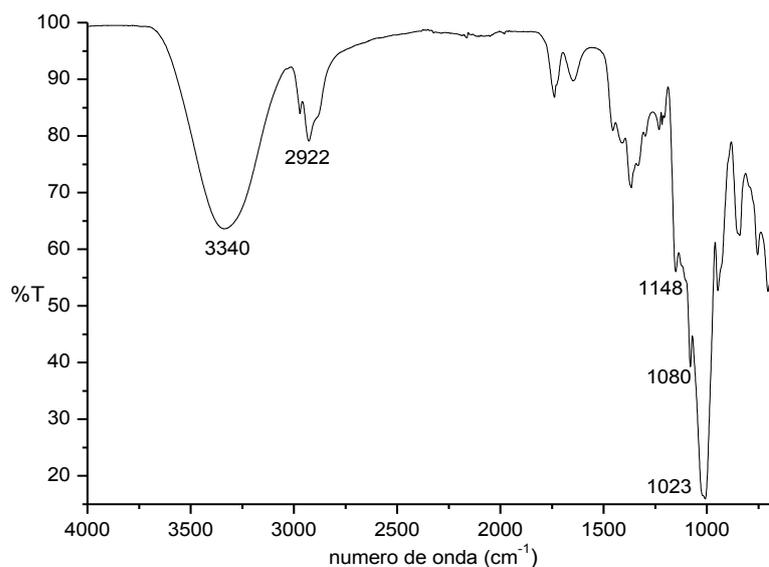


Figura 4. 9 – Espectro do infravermelho da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

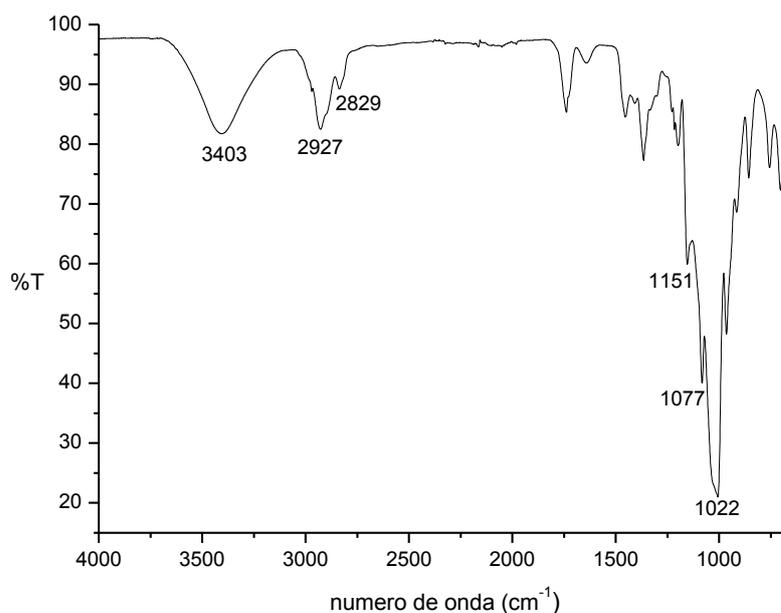


Figura 4. 10 – Espectro do infravermelho da metil- β -ciclodextrina

A diferença entre as CDs está no grupo funcional acrescido à molécula de β -ciclodextrina. A β CD (Figura 4.8) apresenta uma banda em 2922 cm^{-1} , cuja absorção é relativa ao estiramento assimétrico (ν_{ass}) da ligação C-H, referente ao Csp^3 de CH_2 . A HP β CD (Figura 4.9) apresenta bandas em 2967 e 2922 cm^{-1} correspondentes à absorção relativa ao estiramento assimétrico de Csp^3 da ligação C-H de CH_3 e CH_2 , respectivamente. As bandas referentes ao estiramento simétrico (ν_s) das mesmas, possivelmente, se sobrepuseram aos assimétricos. Observa-se, pelo espectro da M β CD (Figura 4.10), bandas de absorção em 2927

e 2829 cm^{-1} correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H de CH_2 , estes sobrepõe as bandas referentes à ligação C-H de CH_3 .

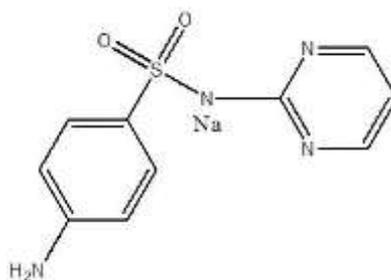


Figura 4. 11 – Estrutura química da SDS

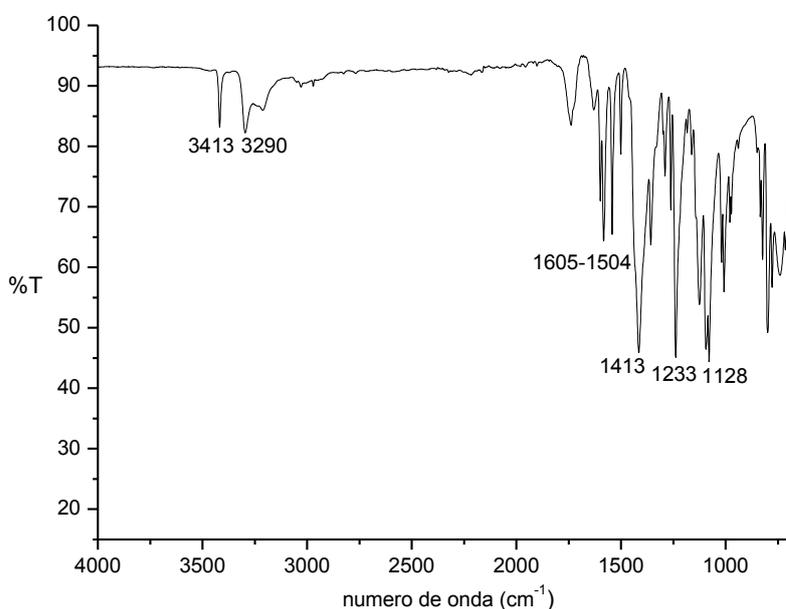


Figura 4. 12 – Espectro do infravermelho da sulfadiazina de sódio

O espectro de absorção da sulfadiazina de sódio (Figura 4.12) apresenta duas bandas devido ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação N-H da amina primária na região de 3413 e 3290 cm^{-1} , estas são bandas mais fracas e agudas devido à ausência de ligações intermoleculares. A sulfadiazina de sódio também apresenta anéis aromáticos em sua molécula. Para interpretar compostos aromáticos consideram-se os modos vibracionais da ligação C=C. As vibrações de estiramento da ligação C=C ocorrem na região de 1625 - 1430 cm^{-1} e sobrepõe o estiramento da ligação C=N do anel heterocíclico nitrogenado, pois absorvem na mesma região (BARBOSA, 2008), no espectro está representada pela região 1605 - 1504 cm^{-1} . Sulfonamidas absorvem fortemente na região de 1370 - 1335 cm^{-1} e de 1170 - 1155 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico de SO_2 (SILVERSTEIN,

2012). Normalmente os pares de elétrons não compartilhados do nitrogênio se comprometem por ressonância com a sulfonamida e isso provoca um deslocamento para região de menor frequência (efeito batocrômico), porém, neste caso, parte da ressonância está comprometida com o anel pirimidina o que resulta no deslocamento da absorção para região de maior frequência (efeito hipsocrômico), sendo assim, os estiramentos assimétrico e simétrico da ligação S=O correspondem a 1413 e 1233 cm^{-1} , respectivamente.

Na complexação podem ocorrer mudanças no espectro (HEDGES, 1998), como o deslocamento ($> \pm 4 \text{ cm}^{-1}$) de bandas (PREMAKUMARI, 2011). É importante observar se as ligações presentes nas ciclodextrinas e sulfadiazina de sódio aparecem nos espectros dos seus respectivos compostos, mesmo que sejam sobrepostas (indicado pela assimetria da banda em relação à mesma região na amostra isolada), pois a presença dessas ligações sugere a interação; o que não ocorre é o aparecimento de um novo pico, pois na associação do sistema supramolecular não ocorre quebra ou formação de ligação química (PASSOS, 2012).

As Figuras 4.13, 4.14 e 4.15 correspondem ao composto de inclusão sulfadiazina de sódio/ β CD; sulfadiazina de sódio/HP β CD e sulfadiazina de sódio/M β CD, respectivamente. A radiação infravermelha provoca alteração nos movimentos vibracionais e rotacionais, os últimos presentes em menor número de onda (100 cm^{-1}) (BARBOSA, 2008). Nota-se no espectro dos compostos de inclusão que a região referente à vibração do anel aromático ($1625\text{-}1475 \text{ cm}^{-1}$) tem menor intensidade comparada ao pico de absorção de S=O em 1413, 1416 e 1419 cm^{-1} para SDS β CD, SDSHP β CD e SDSM β CD, respectivamente, do mesmo espectro. Diferente do que acontece com essa mesma região no espectro da sulfadiazina de sódio, os quais apresentam menor diferença de intensidade. Possivelmente, isso ocorre por causa da diminuição dos movimentos vibracionais quando a molécula de SDS está incluída às de ciclodextrinas.

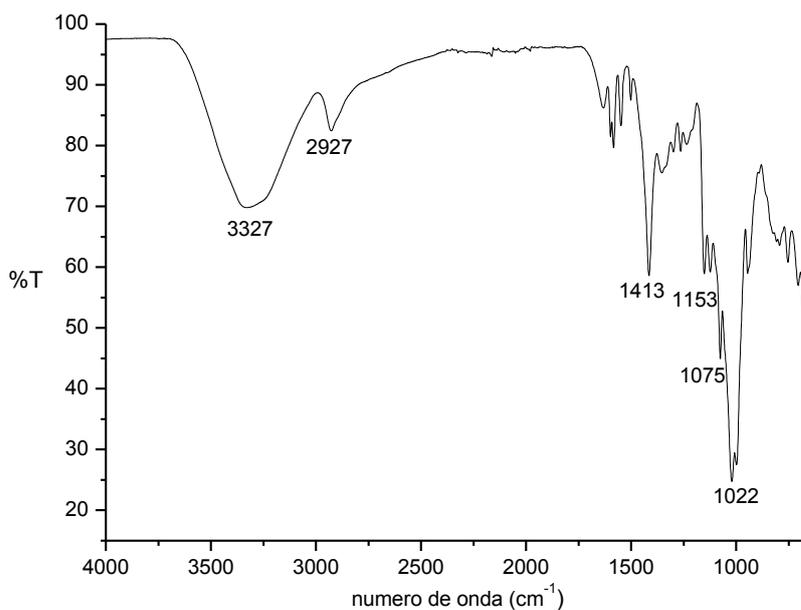


Figura 4. 13 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina

O composto sulfadiazina de sódio/ β CD (Figura 4.13) apresenta apenas uma banda, 3327 cm^{-1} , que corresponde à sobreposição das bandas de absorção de O-H e N-H. Entre β CD e composto ocorreu um deslocamento de 2922 para 2927 cm^{-1} da banda de absorção de Csp^3 de CH_2 e também para absorção referente ao estiramento de C-O da hidroxila primária que deslocou de 1080 para 1075 cm^{-1} . Não foi observada a intensa banda de absorção relativa ao estiramento simétrico de S=O em 1233 cm^{-1} , sugerindo que os movimentos vibracionais da molécula de sulfadiazina de sódio diminuíram devido à interação com a β -ciclodextrina.

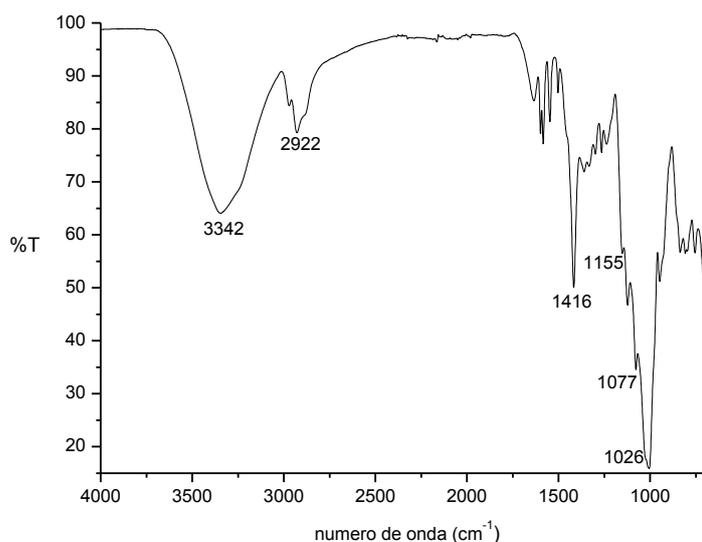


Figura 4. 14 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina

Pelo espectro do composto sulfadiazina de sódio/HP β CD (Figura 4.14) observa-se também a sobreposição das absorções relativas ao estiramento de O-H e N-H, apresentando apenas uma banda em 3342 cm^{-1} . O perfil da região correspondente à absorção do estiramento de Csp^3 da ligação C-H de CH_2 e CH_3 permanece o mesmo. Nesse espectro houve deslocamento da banda de absorção relativa ao estiramento de C-O da hidroxila secundária de 1148 para 1155 cm^{-1} . Assim como a complexação com β -ciclodextrina, no composto sulfadiazina de sódio/HP β CD a banda de absorção referente ao estiramento simétrico de S=O não foi observada.

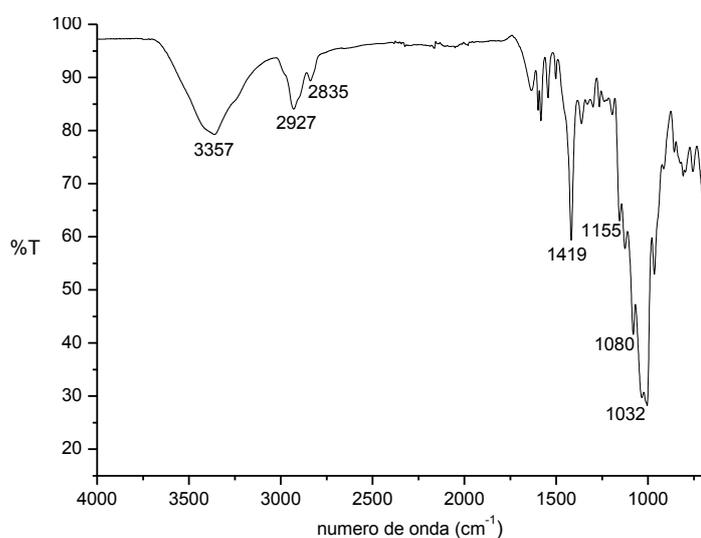


Figura 4. 15 – Espectro do infravermelho do composto sulfadiazina de sódio/metil- β -ciclodextrina

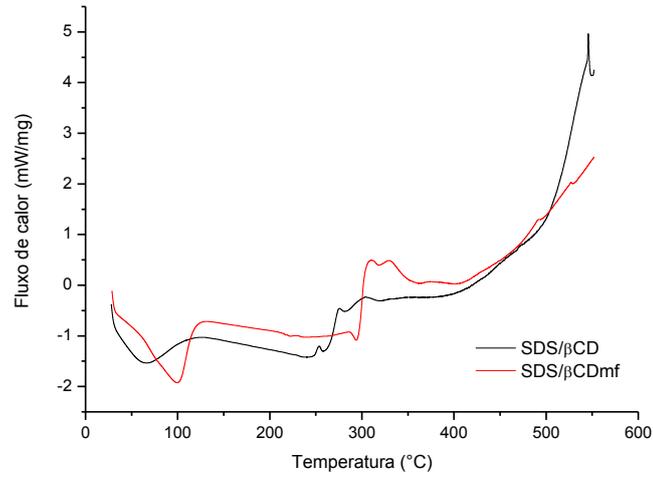
O composto de inclusão sulfadiazina de sódio/M β CD (Figura 4.15) apresenta uma banda em 3357 cm^{-1} referente à sobreposição das absorções relativas ao estiramento de O-H e N-H. A banda de absorção do estiramento simétrico da ligação C-H de CH_2 deslocou de 2829 para 2835 cm^{-1} . A banda de absorção relativa ao estiramento simétrico de S=O também não foi observada, porém o composto sulfadiazina de sódio/M β CD apresentou deslocamento da banda referente ao estiramento assimétrico de 1413 para 1419 cm^{-1} .

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho não é um teste conclusivo (PASSOS, 2012), sendo assim, não confirma a interação da sulfadiazina de sódio com as ciclodextrinas. Porém, é um teste complementar às demais técnicas e auxilia na caracterização do composto de inclusão.

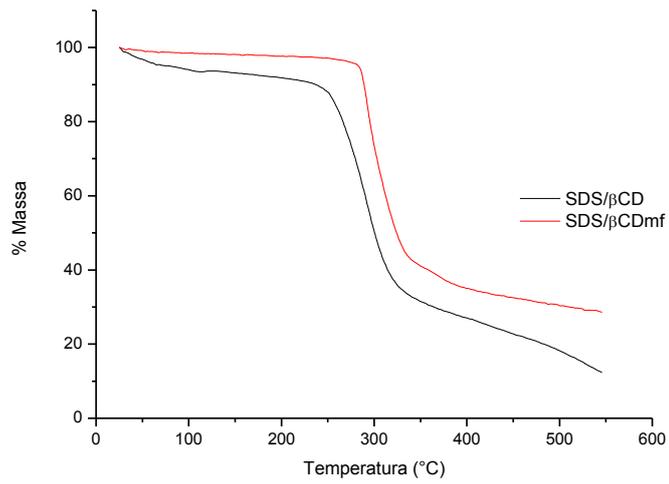
4.3 Misturas físicas

Existem vários métodos de preparo para compostos de inclusão, dentre eles: a mistura física (mf), na qual as amostras são combinadas e cuidadosamente homogeneizadas por maceração, por exemplo, e a liofilização, a qual é realizada em solução e agitada até que o equilíbrio seja atingido, posteriormente congelada e liofilizada. Embora a melhor técnica esteja relacionada com rendimento e baixo custo, dentre outros, o método convencional combina hóspede e hospedeiro em soluções aquosas; sendo a liofilização um método amplamente usado devido suas vantagens, como estabilidade química e biológica (MAYUR, 2012; PASSOS, 2013). A Figura 4.16 apresenta as curvas calorimétrica e termogravimétrica e espectro de absorção na região do infravermelho, todos correspondentes ao composto sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina por mistura física. O perfil térmico (DSC e TGA) das misturas físicas se diferencia do perfil das amostras liofilizadas. Nas curvas de DSC e TGA da mistura física ocorreu apenas sobreposição dos perfis das amostras isoladas, indicando a não-interação entre moléculas hóspede e hospedeira (DELRIVO, 2012). Sugere-se que a semelhança dos espectros se deve a possível e fraca interação que ocorre ao manter a amostra pressionada durante a análise. Por isso as técnicas realizadas em solução são extremamente importantes para confirmar a interação. O mesmo foi observado para as misturas físicas de SDS/HP β CD e SDS/M β CD comparando com o composto de inclusão de cada uma.

(a)



(b)



(c)

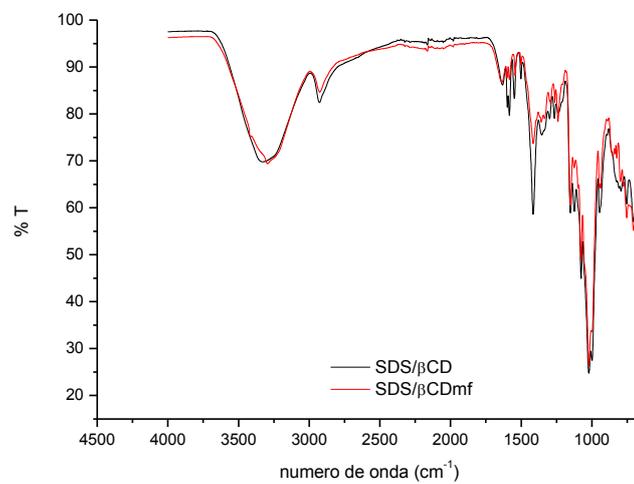


Figura 4. 16 – Comparação das técnicas (a) DSC, (b) TGA e (c) FTIR para o composto SDS/βCD quando liofilizado e mistura física

4.4 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

O ITC é um método quantitativo que permite a investigação da estabilidade termodinâmica de compostos de inclusão em solução, pois determina a afinidade e entalpia de ligação, proporcionando uma caracterização termodinâmica completa (estequiometria (N), constante de ligação (K), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) de inclusão). Essa técnica é realizada sob mesmas condições experimentais durante todo o procedimento (BERTAUT, 2014; VELAZQUEZ-CAMPOY, 2006). Os parâmetros termodinâmicos da interação fármaco/ciclodextrinas são fundamentais na compreensão do reconhecimento molecular (BOUCHEMAL, 2012).

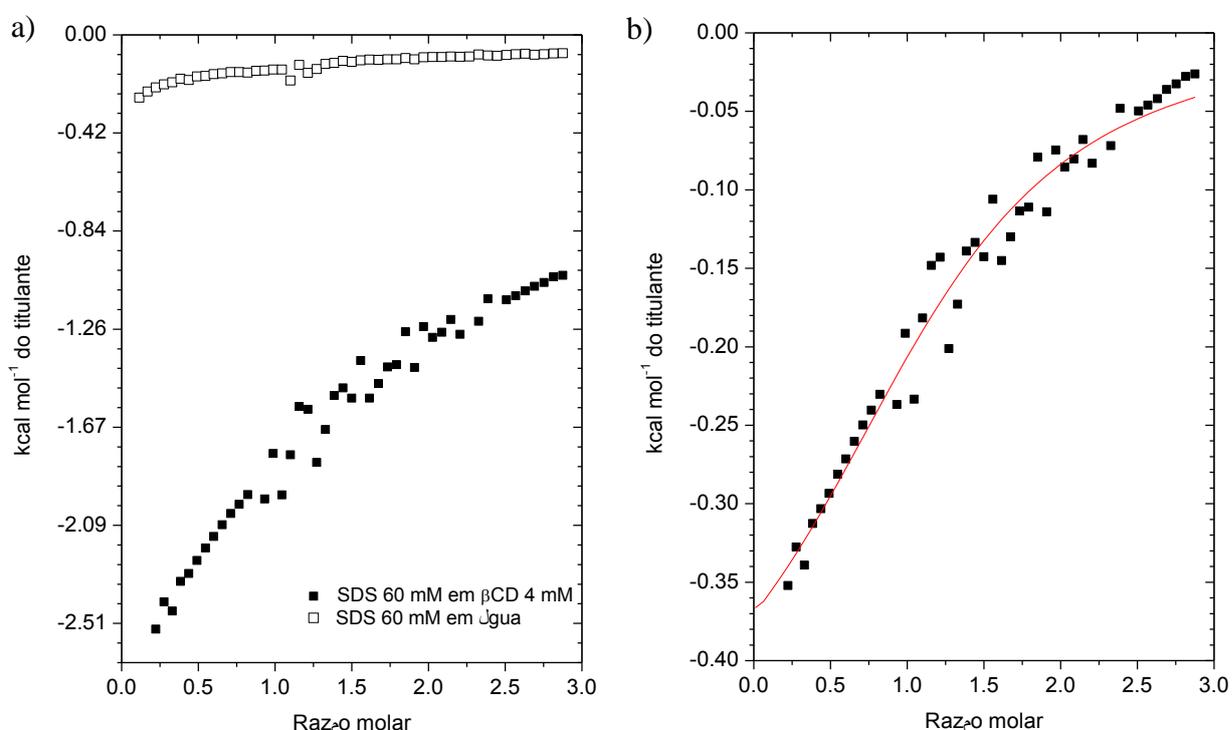


Figura 4. 17 – Curva calorimétrica a) SDS 60mM em água e em β CD 4 mM e b) após a subtração do branco e ajuste não-linear

A formação de compostos de inclusão resulta na liberação de calor, ou seja, comportamento exotérmico. Após cada injeção de sulfadiazina de sódio (titulante), a quantidade de moléculas de ciclodextrina (titulado) diminui, conseqüentemente, ao longo da titulação, menos compostos são formados e menos calor liberado (BERTAUT, 2014). A concentração das soluções envolvidas na titulação é ajustada de acordo com diferentes fatores, como afinidade e solubilidade das moléculas (BOUCHEMAL, 2012). Diante disso, as concentrações foram 60 mM de SDS em 4 mM de β CD (Figura 4.17), o mesmo para HP β CD (Figura 4.18). Optou-se pela ciclodextrina como titulado (em menor concentração), pois

ciclodextrinas em altas concentrações podem induzir auto-agregação e elevado calor de diluição (BERTAUT, 2014). As curvas de titulação foram obtidas por ajuste não-linear com isoterma de Wiseman como modelo matemático (SOUSA, 2008a).

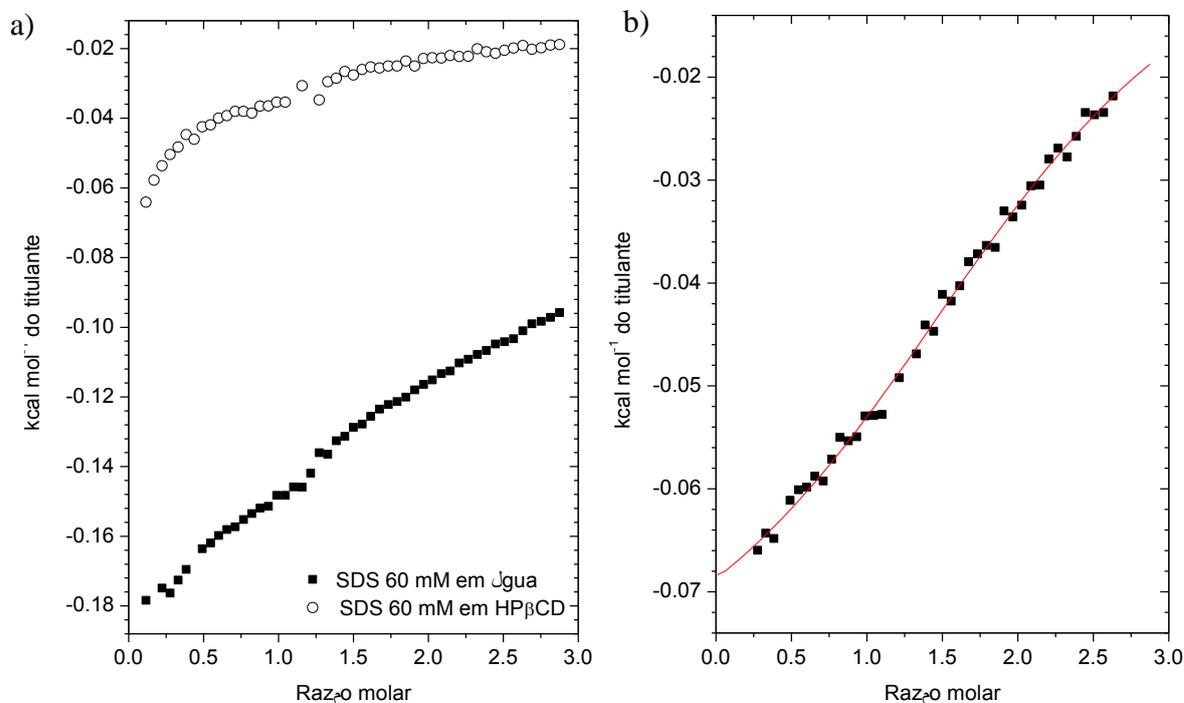


Figura 4. 18 – Curva calorimétrica a) SDS 60mM em água e em HP β CD 4 mM e b) após a subtração do branco e ajuste não-linear

A subtração do branco ou diluição da sulfadiazina de sódio em água é importante para eliminar sua possível auto-agregação. O perfil sigmoidal é apresentado em casos de alta constante de afinidade ($k > 7000$, por exemplo) e constante de equilíbrio bem definidos. Ambas interações estudadas não mostraram esse perfil, indicando uma fraca interação hóspede/hospedeiro (LULA, 2007; SOUSA, 2010). A inflexão da curva de titulação de SDS 60 mM em β CD 4 mM (Figura 4.17) representa a estequiometria de 1:1 para o composto de inclusão, enquanto que para titulação em solução de HP β CD (Figura 4.18) a estequiometria é 2:1, embora a inflexão não seja tão aparente como a em β CD, pois a curva de SDS em HP β CD aparenta um comportamento ascendente mesmo depois de terminada a titulação, ou seja, pode-se sugerir que a interação continua por mais tempo.

Tabela 4. 1 - Parâmetros termodinâmicos de SDS/ β CD e SDS/HP β CD, obtidos por calorimetria de titulação isotérmica

Titulação	N	K	ΔH (kJ/mol)	T ΔS (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
SDS em β CD	1,21 \pm 0,0693	604 \pm 111	-2.061	13,84	-15,87
SDS em HP β CD	2,11 \pm 0,0189	507 \pm 38,6	-0,353	15,09	- 15,44

Sistemas com maior valor para constante de afinidade (K) refletem em interações mais fortes e, geralmente, possuem maior valor para energia livre de Gibbs (ΔG), ou seja, são processos mais espontâneos (BOUCHEMAL, 2012). Diante dos valores apresentados na Tabela 4.1, observa-se que há afinidade entre sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina e sulfadiazina de sódio/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, que, embora sejam fracas, são interações espontâneas de acordo com os valores negativos de ΔG . A formação do composto é resultante do rearranjo e remoção das moléculas de água, inicialmente solvatadas na cavidade da ciclodextrina. Sugere-se que a sulfadiazina de sódio, mais hidrofóbica, substitui a água presente na cavidade, resultando em um estado de menor energia, portanto mais estável. Além disso, a dessolvatação das moléculas de água proporciona a elas maior liberdade de movimentação (rotacional e translacional), enquanto que, a complexação resulta em menor liberdade de movimento para molécula hóspede e hospedeira. Tais mudanças variam a energia (ΔH) e desordem do sistema (ΔS) (BOUCHEMAL, 2012; SOUSA, 2008a; SOUSA, 2008b). Nota-se pela variação de calor que os processos são exotérmicos, o que caracteriza uma interação não covalente, sendo esta mais favorável para SDS/ β CD (ΔH -2.061) do que para SDS/HP β CD (ΔH -0,353), conforme Tabela 4.1. Estudo teórico realizado com a sulfadiazina/ β -ciclodextrina mostrou que, além do ΔG negativo e variação da entalpia indicando um processo espontâneo para a complexação, os orbitais HOMO e LUMO confirmam o aumento da estabilidade depois da formação do composto (VENKATESH, 2013).

4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é utilizada na investigação de sistemas supramoleculares, pois permite o entendimento de interações não covalentes e a disposição espacial das moléculas nos compostos de inclusão. Embora muitas técnicas sejam utilizadas para caracterizar a formação do composto, somente a técnica de RMN é capaz de comprovar a inclusão da molécula hóspede, por meio de variação nos deslocamentos químicos e ainda através da utilização de técnicas bidimensionais de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ ROESY ou NOESY, que envolvem o efeito nuclear Overhauser (HACKET, 1998; HEDGES, 1998; SOUSA, 2007).

Os espectros de hidrogênio da sulfadiazina de sódio, β -ciclodextrina e composto, ambos a 400 MHz e utilizando D_2O como solvente, estão apresentados nas Figuras 4.19, 4.20 e 4.21, assim como a representação dos hidrogênios em suas estruturas. Salientando que, hidrogênios ligados às hidroxilas não aparecem no espectro devido sua labilidade, logo esses são substituídos por átomos de deutério. Foram realizadas análises uni e bidimensional. A análise bidimensional por ROESY (Figura 4.22) correlaciona hidrogênios próximos entre si, a distâncias $\leq 4,5 \text{ \AA}$ no espaço (SILVERSTEIN, 2012). Essa técnica permite que sejam observadas as correlações entre os hidrogênios da ciclodextrina, no caso a βCD , e da molécula hóspede, permitindo inferir sobre a possível estrutura que forma o composto de inclusão. Mais ainda, permite inferir sobre a região da molécula hóspede que estará incluída ou não na cavidade da ciclodextrina.

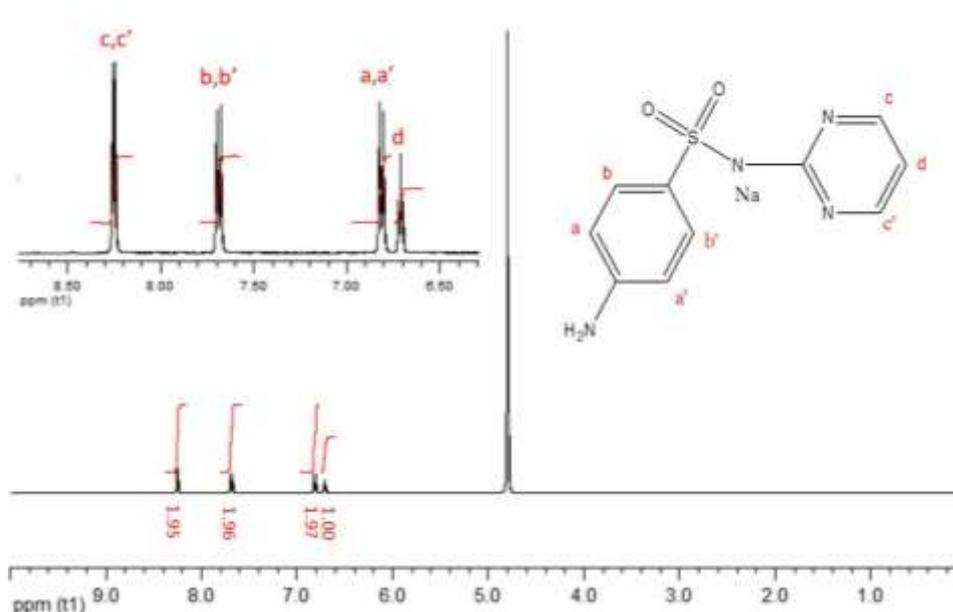


Figura 4. 19 – Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz em D_2O para sulfadiazina de sódio

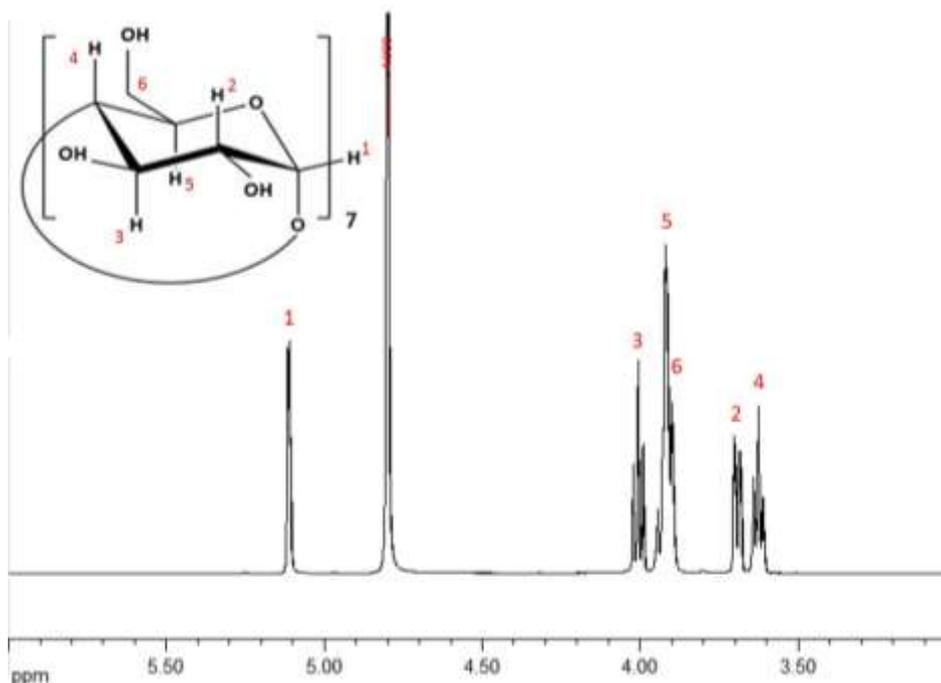


Figura 4. 20 - Espectros de RMN de ^1H a 600 MHz em D_2O para β -ciclodextrina

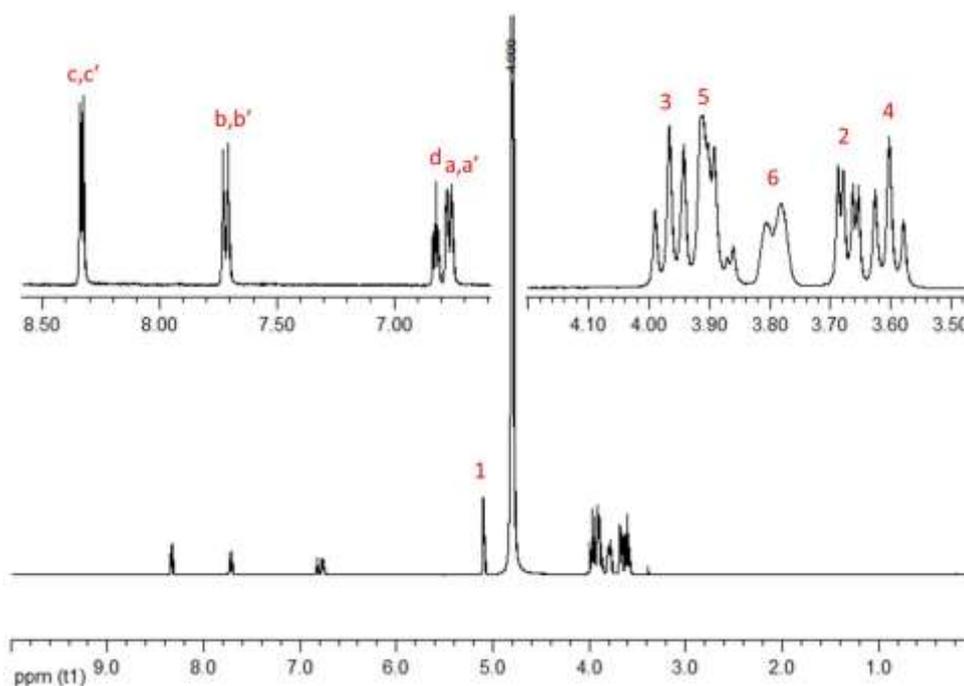


Figura 4. 21 – Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz em D_2O para composto sulfadiazina de sódio/ β -ciclodextrina na razão 1:1

As variações de deslocamento químico são mais significativas quando os núcleos estão sob maior influência de densidade eletrônica, ou seja, estão interagindo efetivamente, resultando na complexação das espécies (SOUSA, 2007). Uma vez que as ciclodextrinas apresentam grande quantidade de densidade eletrônica voltada para seu interior, devido aos

oxigênios referentes às ligações glicosídicas, a região da molécula hóspede que estiver interagindo com essa cavidade hidrofóbica apresentará maior variação nos deslocamentos químicos referentes a seus hidrogênios.

Tabela 4. 2 – Valores de deslocamentos químicos para SDS e SDS/ β CD na razão 1:1, obtidos por ^1H RMN a 400MHz em D_2O

Hidrogênios	Multiplicidade	δ_{SDS}	$\delta_{\text{SDS}/\beta\text{CD}}$	$\Delta\delta$
Ha	duplete	6,815	6,767	0,048
Hb	duplete	7,689	7,720	- 0,031
Hc	duplete	8,252	8,334	- 0,082
Hd	triplete	6,712	6,810	- 0,098

De acordo com a Tabela 4.2 verificou-se que a maior variação nos deslocamentos químicos são apresentados para os hidrogênios Hc e Hd, o que sugere que essa região da molécula esteja incluída na cavidade da ciclodextrina. Entretanto, comparado com outros sistemas supramoleculares na literatura, percebe-se que a variação de deslocamento químico para os outros hidrogênios, aqueles no anel aromático, também é significativa (ARAÚJO, 2008; DELRIVO, 2012; ZOPPI, 2010). Esse resultado indica que essa região da molécula também sofre influência da ciclodextrina, o que está de acordo com a literatura que evidencia a grande afinidade da cavidade de ciclodextrinas por anéis aromáticos (DAVIS, 2004; SOUSA, 2008b), o que pode ser confirmado pela inversão na posição dos sinais de hidrogênio quando comparado o espectro da SDS isolada com o composto de inclusão.

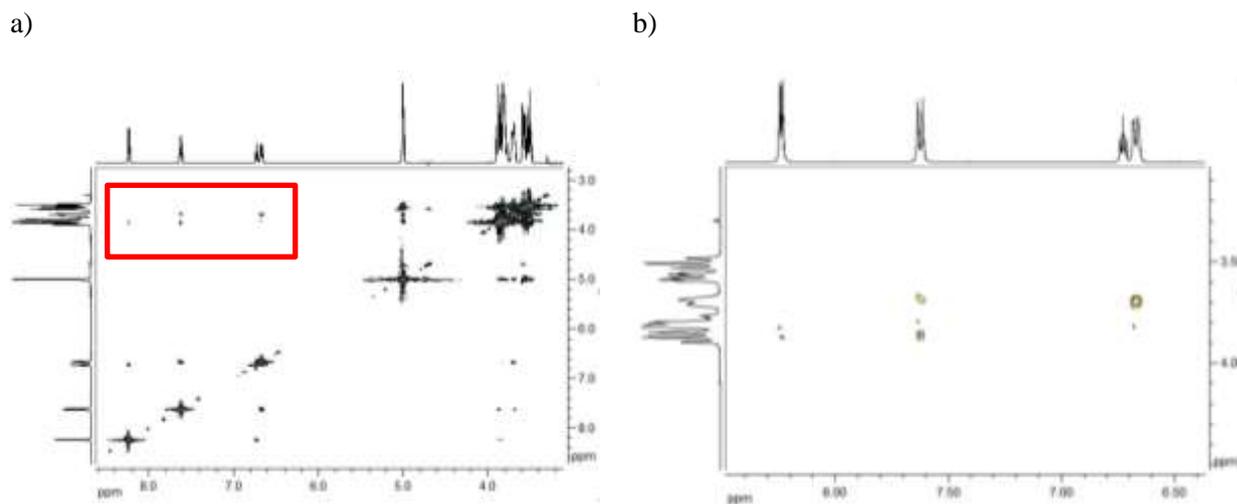


Figura 4. 22 - a) mapa de contorno 2D ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ a 400 MHz em D_2O para o sistema 1:1 SDS/ β CD e b) aumento das regiões correlacionadas no 2D ROESY.

Com o intuito de confirmar a formação do composto de inclusão, o experimento de 2D ROESY foi realizado (Figura 4.22). Com base nos sinais de correlação dipolar (proximidade espacial menor do que 5 \AA) entre os hidrogênios da molécula hóspede e hospedeira (fármaco e ciclodextrina) a interação entre ambas pode ser confirmada. Entretanto, uma fraca correlação pode ser observada, confirmado os resultados obtidos por ITC, no qual uma baixa constante de formação foi determinada. Isso porque, com base na integral dos sinais de correlação essas são próximas aos ruídos observados no espectro 2D ROESY. Porém, uma maior intensidade de correlação que confirma a inclusão, com base na área, é observada entre os hidrogênios da β -ciclodextrina e os hidrogênios b e b' da SDS, indicando que o anel aromático está incluído na cavidade da macromolécula. Mas, sinais de correlação também são observadas para os outros hidrogênios, indicando que um equilíbrio entre diferentes espécies químicas pode ser observado, com têm sido relatado na literatura (SOUSA, 2008a; SOUSA, 2008b; PASSOS, 2011).

4.6 Disco difusão

Testes de suscetibilidade aos micro-organismos são extremamente importantes para microbiologia clínica, de tal maneira, que influenciam na escolha do melhor antibiótico. O método de disco difusão é qualitativo e baseia-se na difusão de um agente antimicrobiano presente no disco para o meio de crescimento (água) do micro-organismo, ocasionando a formação de um halo de inibição (SEJAS, 2003). Este trabalho avaliou a ação da sulfadiazina de sódio complexada a três diferentes ciclodextrinas comparando-a com a ação da

sulfadiazina de sódio. Como disco padrão para o experimento utilizou-se o disco de sulfonamidas, comercialmente disponível.

Os resultados do disco difusão (Figura 4.23) classificam bactérias como suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) a determinado antimicrobiano (SEJAS, 2003). De acordo com as normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana da ANVISA, quimioterápicos da classe das sulfonamidas apresentam halo igual ou superior a 17 mm para sensibilidade, se for inferior ou igual a 12 mm a bactéria é resistente e intermediário se o halo estiver de 13 a 16 mm.

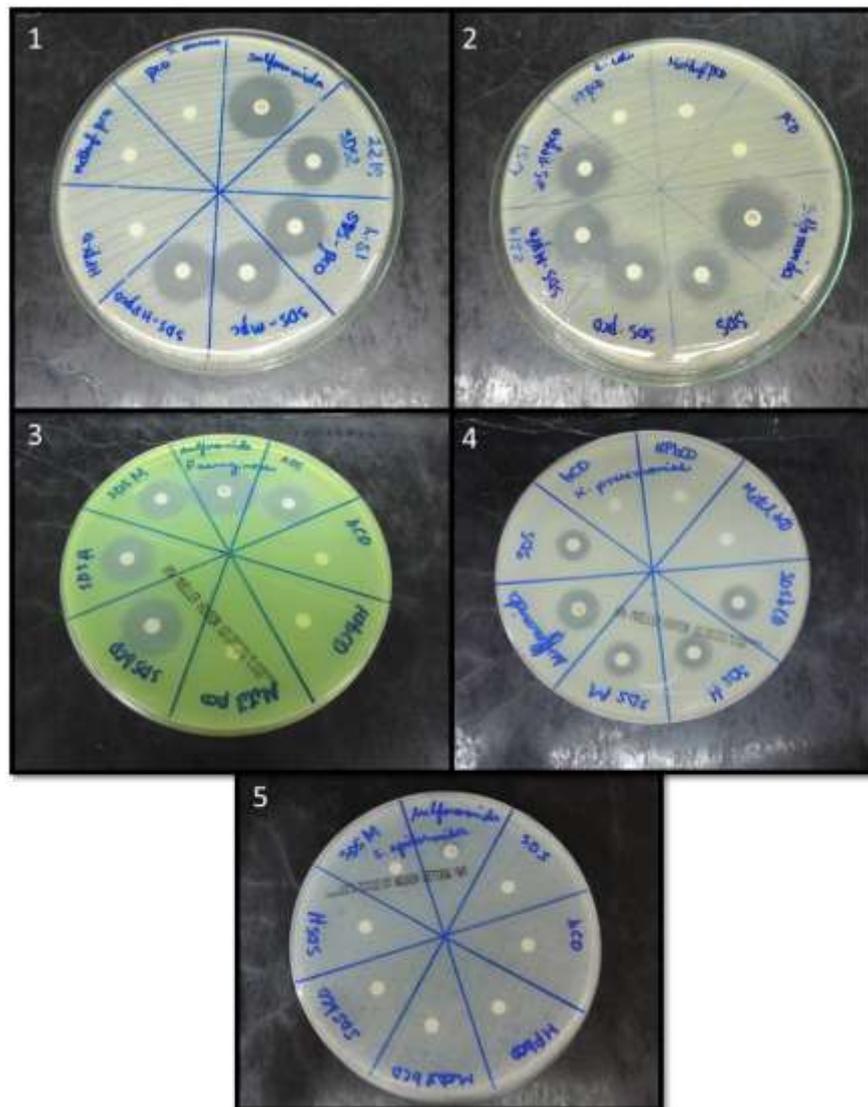


Figura 4. 23 – Disco difusão: 1) *Staphylococcus aureus*, 2) *Escherichia coli*, 3) *Pseudomonas aeruginosa*, 4) *Klebsiella pneumoniae* e 5) *Staphylococcus epidermidis*

O disco padrão de sulfonamida apresentou o halo maior e todas as bactérias em estudo foram suscetíveis a ele, exceto *Staphylococcus epidermidis*. Porém, vale ressaltar que a comparação relevante para este trabalho deve ser feita entre a sulfadiazina de sódio e compostos. Dentre as bactérias gram positivas, *Staphylococcus aureus* se apresentou suscetível, enquanto *Staphylococcus epidermidis* foi resistente a todos os discos antimicrobianos, o que não era esperado considerando que bactérias gram positivas são mais suscetíveis que as gram negativas (AZZOPARDI, 2013; GUIMARÃES, 2010). Entretanto, as bactérias gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram suscetíveis e *Klebsiella pneumoniae* intermediária a ação da sulfadiazina de sódio e compostos. Como esperado as ciclodextrinas (β CD, HP β CD e M β CD) isoladas não tiveram efeito antimicrobiano. Os diâmetros dos halos referentes a cada amostra se encontram nos Quadros 4.1 e 4.2 (diâmetro do halo igual à zero refere-se a não inibição do crescimento bacteriano, desconsiderando o diâmetro do disco).

Quadro 4. 1 - Diâmetros dos halos de inibição para bactérias gram negativas

Amostra	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	Diâmetro do halo (mm)			Média	Diâmetro do halo (mm)			Média	Diâmetro do halo (mm)			Média
Sulfonamida	27	27	27	27	18	20	20	19,3	26	26	26	26
SDS	21	22	22	21,7	15	16	15	15,3	21	19	20	20
SDS/ β CD	24	23	24	23,7	15	16	16	15,7	24	21	23	22,7
SDS/HP β CD	23	23	23	23	16	16	16	16	24	23	22	23
SDS/M β CD	23	23	23	23	16	17	16	16,3	25	23	23	23,7
β CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HP β CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M β CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 4. 2 - Diâmetros dos halos de inibição para bactérias gram positivas

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	Diâmetro do halo (mm)			Média	Diâmetro do halo (mm)		
Sulfonamida	28	28	28	28	0	0	0
SDS	21	21	21	21	0	0	0
SDS/ β CD	25	24	25	24,7	0	0	0
SDS/HP β CD	24	25	25	24,7	0	0	0
SDS/M β CD	25	26	26	25,7	0	0	0
β CD	0	0	0	0	0	0	0
HP β CD	0	0	0	0	0	0	0
M β CD	0	0	0	0	0	0	0

Para comparar a ação antimicrobiana das amostras é necessária uma análise estatística, nesse caso, a análise de variância (ANOVA), uma ferramenta importante para estudos de grupos experimentais e controle. Porém, para compreender as diferenças entre os subgrupos em estudos são necessários testes de acompanhamento ao ANOVA, como o Tukey. O teste Tukey avalia todas as diferenças emparelhadas e reduz a probabilidade de erro tipo I, que é extremamente importante em estudos com antibióticos, pois este erro leva a conclusões de que antibióticos são mais eficazes do que realmente são, ocasionando resultados falso-positivos e, conseqüentemente, problemas terapêuticos (MCHUGH, 2011). As amostras foram comparadas aos pares para cada bactéria com intervalo de confiança de 95 %.

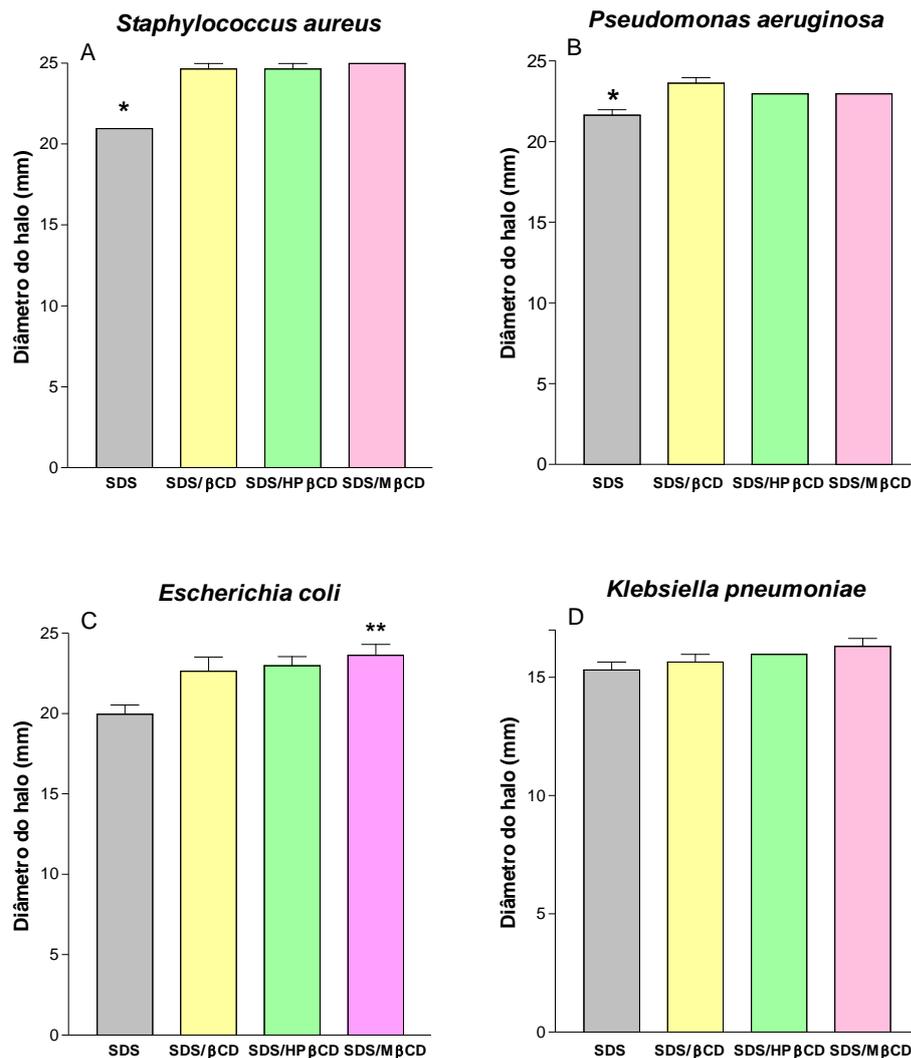


Figura 4. 24 – Comparação das médias dos halos da sulfadiazina de sódio e compostos de inclusão para cada bactéria. Dados tratados, estatisticamente, por análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, com significância $p < 0,05$. * Diferença significativa da sulfadiazina de sódio em relação aos compostos. ** Diferença significativa da metil-β-ciclodextrinas em relação aos demais.

Ao considerar um nível de significância de 5 %, rejeita-se a hipótese de igualdade entre as médias, ou seja, valores de $Pr > F_c$ menores que 0,05 indicam diferença significativa. A comparação estatística se apresenta na Figura 4.24. Para *S. aureus*, com $Pr > F_c$ 0,0000, os halos de todos os compostos foram significativamente maiores do que o halo da sulfadiazina de sódio, o mesmo ocorreu para *P. aeruginosa* com $Pr > F_c$ 0,0021, ambos sugerindo que a interação fármaco/ciclodextrina auxiliou na difusão do agente antimicrobiano para o meio, inibindo o crescimento bacteriano. Para o teste com *E. coli* ($Pr > F_c$ 0,0241), o composto SDS/MβCD obteve um halo maior comparando-o com a sulfadiazina de sódio, porém os demais compostos não tiveram diferença significativa, ou seja, o composto formado com

metil- β -ciclodextrinas apresentou uma melhor atividade contra a *E.coli* comparado com os demais compostos. Com $Pr > Fc$ 0,1631, os halos das amostras para *K. pneumoniae* não tiveram diferença significativa entre si. Entretanto, nota-se que, para todas as bactérias suscetíveis, a média do diâmetro do halo para os compostos foram maiores, ou seja, inibiram mais do que a sulfadiazina de sódio.

4.7 Fibras poliméricas e perspectivas

Por meio da técnica de eletrofição, fibras de escala nanométrica podem ser produzidas, tais fibras podem ser utilizadas em aplicações biomédicas para sustentação tecidual e na liberação de fármacos. O fármaco pode estar revestindo ou embutido na fibra polimérica ou ser encapsulado pela mesma. A liberação ocorre por difusão do medicamento posterior, ou não, a degradação da fibra. A escala nanométrica é extremamente relevante para sistemas biológicos por causa da dimensão das proteínas e bactérias. A eletrofição, conforme apresentada na Figura 4.25, consiste no processo de formação de fibras a partir de uma solução polimérica, a qual é direcionada a uma placa coletora em função de uma diferença de potencial elétrico. Existem diversos fatores que influenciam na produção de fibras, os parâmetros moleculares, como peso molecular, solubilidade, densidade, ponto de fusão, transição vítrea, velocidade de cristalização, pH e volatilidade; além dos parâmetros do processo, tais como concentração, condutividade elétrica, tensão de superfície, taxa do fluxo, distância da agulha e placa coletora, distância entre os eletrodos, temperatura e umidade (DEITZEL, 2001; GREINER, 2007; LUU, 2003; SILL, 2008).

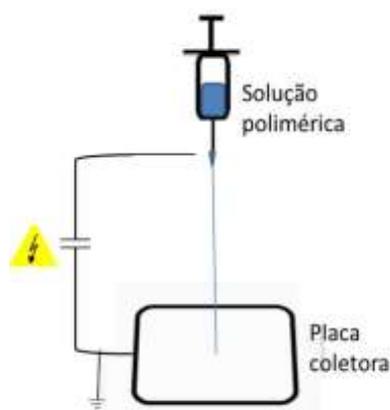


Figura 4. 25 – Esquema da eletrofição

O polímero escolhido para produção das fibras foi o poli- ϵ -caprolactona (PCL), um poliéster alifático, cuja biocompatibilidade, biodegradabilidade (baixo ponto de fusão),

ductilidade e alta plasticidade permitem seu uso como ‘arcabouços’ na engenharia tecidual (FERREIRA, 2014; PORTER, 2009). Associar o composto de inclusão fármaco/ciclodextrinas juntamente com um polímero em uma solução e eletrofiá-la, permite a formação de arcabouços que podem auxiliar na liberação do fármaco. O PCL auxilia também na reconstituição tecidual (TENG, 2014).

Nas últimas décadas, aumentou o interesse por sistemas de liberação de fármacos associados a novas técnicas de processamento. Por meio de sistemas a base de polímeros vinculados a fibras é possível obter uma maior área de superfície que promove liberação sistêmica ou local com maior eficácia e redução de efeitos colaterais (OLIVEIRA, 2015). Diante da formação de compostos de inclusão entre sulfadiazina de sódio e ciclodextrinas, o presente trabalho contribui para pesquisas na área de liberação de fármacos com produção de fibras contendo compostos. A Figura 4.26 apresenta micrografias adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmando a possibilidade de formação de fibras com solução polimérica de PCL 30 % (m/v) e compostos, solubilizados em dimetilformamida (DMF) e tetrahydrofurano (THF) na proporção 60:40 (v/v) e variação dos parâmetros, tais como taxa do fluxo (mL/h), distância da ponta da agulha até a placa coletora (cm) e voltagem (kV). A possibilidade de obtenção desses sistemas poliméricos associados com os compostos de inclusão de SDS com ciclodextrinas podem ser utilizados como sistemas de liberação de moléculas bioativas. Mais ainda, a distribuição homogênea confirmada pela quantificação do SDS na matriz polimérica, indica a viabilidade da técnica para a obtenção desses sistemas. Entretanto, para que trabalhos futuros na área de materiais poliméricos sejam aplicados utilizando tais tipos de sistemas, a busca por sistemas onde uma maior compatibilidade do fármaco de escolha e a matriz polimérica deve ser foco principal do estudo. Uma vez que a presença das moléculas bioativas de interesse podem e têm sido ponto determinante na forma de obtenção das nanofibras poliméricas obtidas por eletrofição. Dessa forma, a utilização de sistemas coaxiais têm modulado de forma mais adequada a liberação da molécula hóspede de interesse (OLIVEIRA, 2015).

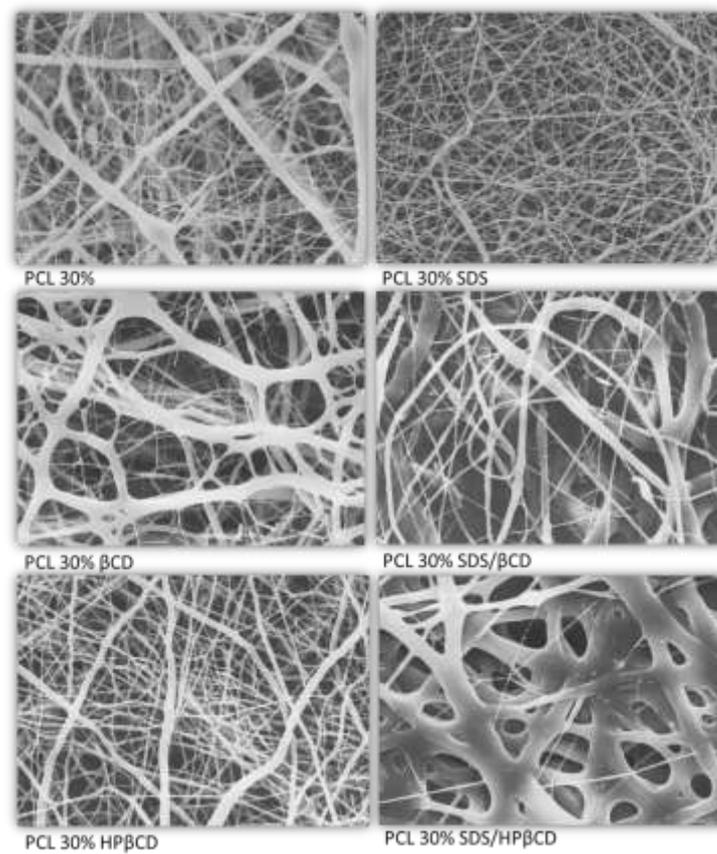


Figura 4. 26 – Micrografia das fibras de PCL 30% (m/m) associadas à ciclodextrinas, sulfadiazina de sódio e compostos de inclusão. Magnificação 4000x

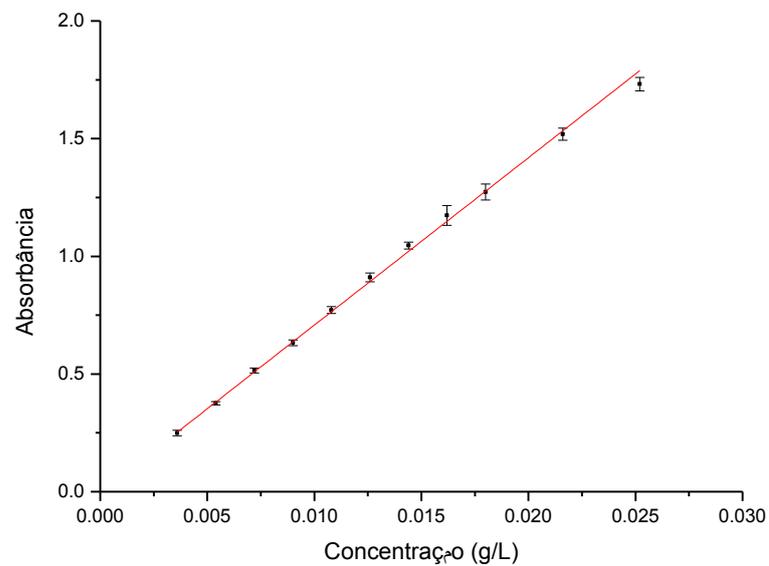


Figura 4. 27 – Curva de calibração para quantificação de fibras com sulfadiazina de sódio

A curva de calibração (Figura 4.27) realizada a partir de concentrações conhecidas de sulfadiazina de sódio, que variam de 0,0036 g/L à 0,0252 g/L e com coeficiente de correlação

linear igual a 0,9983, permite a quantificação do fármaco presente nas fibras, cujos dados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3 - Média dos dados da quantificação (em triplicata) de fibras contendo sulfadiazina de sódio, considerando o desvio padrão

Fibra com poli-ϵ-caprolactone 30%	Massa de fibra (mg)	Absorbância (u.a)	Quantidade de SDS (mg)	Quantidade de SDS (mg)/ 1 mg de fibra
SDS	0,768 \pm 0,56	0,716 \pm 0,59	0,010 \pm 0,008	0,0091
SDS/ β CD	1,421 \pm 0,31	0,710 \pm 0,20	0,010 \pm 0,003	0,0058
SDS/HP β CD	2,967 \pm 0,93	1,364 \pm 0,39	0,019 \pm 0,005	0,0064

Capítulo 5
CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Os compostos preparados por liofilização foram caracterizados. A caracterização por análises térmicas e espectroscopia de absorção na região do infravermelho indicou uma interação entre o fármaco e as diferentes ciclodextrinas. A calorimetria de titulação isotérmica confirmou essa interação, que, embora fraca, é resultado de um processo espontâneo ($\Delta G < 0$) e favorável ($\Delta H < 0$). A técnica de ressonância magnética nuclear foi fundamental para propor a estrutura supramolecular formada pela interação entre as moléculas hóspede e hospedeira confirmando a inclusão. A avaliação antimicrobiana por teste disco difusão realizada com as diferentes espécies de bactérias mostrou que os compostos de inclusão sulfadiazina de sódio/ciclodextrinas apresentaram uma maior média do halo de inibição comparada com a ação da sulfadiazina de sódio isolada; entretanto, estatisticamente, houve diferença significativa para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, para *K. pneumoniae* não ocorreu diferença significativa entre composto e fármaco isolado e *S. epidermidis* foi resistente à todos os discos, inclusive ao disco padrão de sulfonamida. Foram produzidas fibras associando sulfadiazina de sódio, β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e seus compostos ao polímero poli- ϵ -caprolactona, a fim de propor a elaboração de dispositivos de liberação. As amostras quantificadas mostraram a presença de sulfadiazina de sódio nas fibras.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Normas de Desempenho para testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento informativo*. Substitui a Norma M100-S14. v.25, n.1. Jan. 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição*. Norma M2-A8. v.23, n.1. Jan. 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 50*. Set. 2011.

ARAÚJO, M. V. G. et al. Sulfadiazine/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.10, p.5788-5794, 2008.

ARIGA, K.; KUNITAKE T. **Supramolecular Chemistry: Fundamentals and Applications**, 2006.

AZZOPARDI, E. A., FERGUSON, E. L.; THOMAS, D. W. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.2, p.257-274, 2013.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho**: Na caracterização de compostos orgânicos. Ed. UFV. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BERTAUT, E.; LANDY, D. Improving ITC studies of cyclodextrin inclusion compounds by global analysis of conventional and non-conventional experiments. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v.10, p.2630-2641, 2014.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, v.17, n.11-12, p.623-62, 2012.

BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, n.23, p.2347-2359, 2000.

CELEBIOGLU, A. et al. Antibacterial electrospun nanofibers from triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.116, n.0, p.612-619, 2014.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.9, p.629-641, 2009.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.822-880, 2013.

CYCLOLAB. **Statistical Evaluation Of The Cyclodextrin Related Literature Published In The Cyclodextrin News In 2012**. Publicado em 2013. Disponível em: http://cyclolab.hu/images/CDNews/cdn_2013_jan.pdf. Acesso em: 29 mar 2015.

DAVIS, M.E., BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based Pharmaceutics: Past, Present and Future. **Nature Reviews Drug Discovery**, California, v. 3, n.12, p.1023-1035, 2004.

DAW, R.; TONZANI, S. Biomaterials. **Nature**, v.462, n.7272, p.425-425. 2009.

DEITZEL, J. M. et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v.42, n.1, p.261-272, 2001.

DELRIVO, A.; ZOPPI, A.; LONGHI, M. R. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1980– 1988, 2012.

DONG, C. et al. Preparation of antimicrobial cellulose fibers by grafting β -cyclodextrin and inclusion with antibiotics. **Materials Letters**, v.124, n.0, p.181-183, 2014.

FELICE, B. et al. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. **Materials Science and Engineering**, v.41, p.178-195, 2014.

FERREIRA, J. L. et al. Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and In Vitro evaluation. **Journal of Applied Polymer Science**, v.131, n.22, 2014.

FOCKS, A.; KLASMEIER, J.; MATTHIES, M. Mechanistic link between uptake of sulfonamides and bacteriostatic effect: Model development and application to experimental data from two soil microorganisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, n.7, p.1445-1452, 2010.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária**. Roca. São Paulo, 1996.

GENG, S. et al. Molecular interaction of ctDNA and HSA with sulfadiazine sodium by multispectroscopic methods and molecular modeling. **Luminescence**, v.28, n.5, p.785-792, 2012.

GRAVE, K.; TORREN-EDO, J.; MACKAY, D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.9, p.2037-2040, 2010.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. **Angewandte Chemie International Edition**, v.46, n.30, p.5670-5703, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descobertas e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, p.667-679, 2010.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; *GILMAN, A. G.* **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. p.877-881, 2003.

HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2035-2044, 1998.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v.462, n.7272, p.426-432, 2009.

HUH, A. J., KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, n.2, p.128-145, 2011.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. Giz editorial, 2005.

JOSEPH, L. et al. Reference biomaterials for biological evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.20, n.1, p.9-17, 2009.

LEHN, J.-M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chemical Society Reviews**, v.36, n.2, p.151-160, 2007.

LEHN, J.-M. Supramolecular Chemistry. **Science**, v.260, p.1762-1763, 1993.

LI, J.; LOH, X. J.. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, n.9, p.1000-1017, 2008.

LIANG, X. et al. A proof-of-concept receptor-based assay for sulfonamides. **Analytical Biochemistry**, v.438, p.110-116, 2013.

LIU, H. et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. **Emerg Microbes Infect**, v.4, n.1, 2015.

LULA, I. et al. Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. **Peptides**, v.28, n.11, p.2199-2210, 2007.

LUU, Y. K. et al. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. **Journal of Controlled Release**, v.89, n.2, p.341-353, 2003.

MAYUR, A. C.; SENTHILKUMARAN, K. Cyclodextrin In Drug Delivery: A Review. **Research & Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.1, 2012.

MCHUGH, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica**, v.21, p.203-9, 2011.

MORGAN, J. R. E. Sulfonamide Chemotherapy. **Canadian Medical Association Journal**, v.49, n.2, p.127-138, 1943.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. Artliber, 2009.

MURA, P. et al. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.73, n.2, p.635-646, 2003.

MUZZALUPO, R. et al. Niosomes containing hydroxyl additives as percutaneous penetration enhancers: Effect on the transdermal delivery of sulfadiazine sodium salt. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.123, p.207-212, 2014.

NARDELLO-RATAJ, V.; LECLERCQ, L. Encapsulation of biocides by cyclodextrins: toward synergistic effects against pathogens. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v.10, p.2603-2622, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, p.1224-123, 2011.

OLIVEIRA, M. F. et al. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. **Materials Science and Engineering C.**, 2015.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PASSOS, J. J. et al. Double continuous injection preparation method of cyclodextrin inclusion compounds by spray drying. **Chemical Engineering Journal**, v.228, p.345-351, 2013.

PASSOS, J. J. et al. In vivo evaluation of the highly soluble oral β -cyclodextrin-Sertraline supramolecular complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1-2, p.478-485, 2012.

PASSOS, J. J. et al. Multi-equilibrium system based on sertraline and β -cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.1, p.24-33, 2011.

PERLOVICH, G. L. et al. Impact of Sulfonamide Structure on Solubility and Transfer Processes in Biologically Relevant Solvents. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.59, n.12, p.4217-4226, 2014.

PORTER, J. R.; HENSON, A.; POPAT, K. C. Biodegradable poly(E-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. **Biomaterials**, v.30, n.5, p.780-788, 2009.

PREMAKUMARI, J. et al. Spectral characteristics of sulphadiazine, sulphisomidine: effect of solvents, pH and beta-cyclodextrin. **Physics and Chemistry of Liquids**, v.49, n.1, p.108-132, 2011.

RAJENDIRAN, N.; SIVA, S. Inclusion complex of sulfadimethoxine with cyclodextrins: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.828-836, 2014a.

RAJENDIRAN, N.; VENKATESH, G.; SARAVANAN, J. Supramolecular aggregates formed by sulfadiazine and sulfisomidine inclusion complexes with alfa and beta-cyclodextrins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.129, p.157-162, 2014b.

RASAMIRAVAKA, T. et al. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **BioMed Research International**, v.2015, p.17, 2015.

SCHNEIDER, H.-J. R. et al. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1755-1786, 1998.

SCHUCK, V. J. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.1, p.45-49, 2001.

SEJAS, L. M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, p.27-35, 2003.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, n.13, p.1989-2006, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. p.490, 2012.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v.3, n.3, p.155-160, 2000.

SKÖLD, O. Sulfonamides and trimethoprim. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.8, n.1, p.1-6, 2010.

SOUSA, F. B. **Estudo e Caracterização Estrutural e Termodinâmica de Compostos de Inclusão Formados entre Antidepressivos e Ciclodextrinas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOUSA, F. B. **Estudo e Caracterização Físico-Química de Sistemas Supramoleculares Nanoagregados e de Matrizes Poliméricas Associadas à Ciclodextrina**. 2010. Tese (Doutorado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SOUSA, F. B. et al. Supramolecular complex of fluoxetine with b-cyclodextrin: An experimental and theoretical study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.353, n.1-2, p.160-169, 2008a.

SOUSA, F. B. et al. Supramolecular Self-Assembly of Cyclodextrin and Higher Water Soluble Guest: Thermodynamics and Topological Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.26, p.8426-8436, 2008b.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v.36, n.1, 2008, p.30-42, 2008.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1743-1753, 1998.

TAVANO, L. et al. Novel gel-niosomes formulations as multicomponent systems for transdermal drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.110, p.281-288, 2013.

TENG, S. H.; WANG, P.; DONG, J. Q. Bioactive hybrid coatings of poly(epsilon-caprolactone)-silica xerogel on titanium for biomedical applications. **Materials Letters**, v.129, p.209-212, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. F.; CASE, C. L. . **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2045-2076, 1998.

VALENTE, A. J. M.; CARVALHO, R. A.; SÖDERMAN, O. Do Cyclodextrins Aggregate in Water? Insights from NMR Experiments. **Langmuir**, v.31, n.23, p.6314-6320, 2015.

VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. **Nat. Protocols**, v.1, n.1, p.186-191, 2006.

VENKATESH, G. et al. Inclusion complexes of sulphanilamide drugs and β -cyclodextrin: a theoretical approach. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.77, n.1-4, p.309-318, 2013.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v.31, p.360-368, 2008.

VICENTE, D.; PÉREZ-TRALLERO, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.28, n.02, p.122-130, 2010.

VINNICOMBE, H. G.; DERRICK, J. P. Dihydropteroate Synthase from *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of Substrate Binding Order and Sulfonamide Inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.258, n.3, p.752-757, 1999.

WILLIAMS, D. F. Essential Biomaterials Science. **Cambridge texts in Biomedical engineering**. United Kingdom, 2014.

WSZELAKA-RYLIK, M.; GIERYCZ, P. Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.111, n.3, p.2029-2035, 2013.

ZHU, X. et al. Nanomedicine in the management of microbial infection - Overview and perspectives. **Nano Today**, v.9, p.478-498, 2014.

ZOPPI, A. et al. Complexation of sulfonamides with β -cyclodextrin studied by experimental and theoretical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.7, p.3166-3176, 2010.