

# PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DE SULFADIAZINA DE PRATA COM $\beta$ -CICLODEXTRINA<sup>1</sup>

## PREPARATION, CHARACTERIZATION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND COMPUTATIONAL SIMULATION OF THE INCLUSION COMPLEX OF SILVER SULFADIAZINE WITH $\beta$ -CYCLODEXTRIN

Fernanda Pés de Camargo<sup>2</sup>, Renata Raffin<sup>3</sup>, Jussane Rossato<sup>4</sup>, Ivana Zanella da Silva<sup>4</sup> e Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel<sup>5</sup>

### RESUMO

A Sulfadiazina de prata (SDAg) é o fármaco de escolha para tratamento de queimaduras por sua ação cicatrizante, bem como pela sua ação antimicrobiana. Apresenta baixa solubilidade em água e sofre oxidação quase total em apenas 12 h quando exposta a luz e umidade. A Ciclodextrina tem sido utilizada como uma alternativa para aumentar a solubilidade de fármacos através da formação de complexo de inclusão. Este trabalho teve como objetivo preparar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, bem como a simulação computacional do complexo de inclusão da Sulfadiazina de prata com  $\beta$ -Ciclodextrina. O método de preparação utilizado foi de suspensão na razão molar 1:2 e caracterizado por espectroscopia na região do Infravermelho (IV) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A análise dos espectros IV demonstrou que houve diminuição das bandas características do fármaco, sugerindo que houve uma interação da  $\beta$ -Ciclodextrina com Sulfadiazina de Prata (SDAg). A formação do complexo de inclusão foi confirmada pela análise de DSC, demonstrando pico endotérmico na faixa de temperatura de 32,67 a 42,62 °C, com ponto máximo em 42,31°C, caracterizando a temperatura de fusão da amostra (Tm). A quantificação da SDAg complexada com  $\beta$ -Ciclodextrina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) variou de 0,16 a 0,23%. Os resultados obtidos pelo método microbiológico comprovam que a sulfadiazina de prata complexada com  $\beta$ -Ciclodextrina apresentou atividade frente bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida albicans*, mostrando, assim, que o fármaco incluso, mesmo com baixa concentração, foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. Para analisar a interação da Sulfadiazina de prata com a  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD), foram utilizados cálculos de primeiros princípios baseado na Teoria Funcional da Densidade. Os resultados da simulação mostram que há interação da  $\beta$ -Ciclodextrina com a Sulfadiazina de Prata.

**Palavras-chave:** Ciclodextrina, atividade antibacteriana, complexação de fármacos.

### ABSTRACT

*Silver sulfadiazine is the chosen drug for the treatment of burning for its cicatrizing action, as well as for its anti-microbial action. It presents low solubility in water and it suffers almost total oxidation in only 12 hours when displayed at light and humidity. Cyclodextrin has been used as an alternative to increase the solubility of drugs by the formation of inclusion complexes. This work has as objective to prepare, to characterize and to evaluate the anti-*

<sup>1</sup>Trabalho de Mestrado - Centro Universitário Franciscano.

<sup>2</sup>Aluna do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

<sup>3</sup>Coorientadora - Centro Universitário Franciscano.

<sup>4</sup>Colaboradores - Centro Universitário Franciscano.

<sup>5</sup>Orientadora - Centro Universitário Franciscano.

microbial activity with *Pseudomonasaeruginosa* e *Candidaalbicans*, as well as the inclusion of complex of the Silver sulfadiazine with  $\beta$ -cyclodextrin. The method of preparation was of suspension in the molar rate 1:2 characterized by Infrared and Differential Exploratory Heatmetry. The analysis of the spectros of IV demonstrated that there was a reduction of the characteristic bands of the drug suggesting that it had an interaction of the  $\beta$ -cyclodextrin Silver sulfadiazine (SDAg). The formation of the inclusion complex was confirmed by the DSC analysis, demonstrating an endothermic peak in the temperature band of 32.67° C until 42.62° C, with maximum point in 42.31° C, characterizing the fusion temperature of the sample ( $T_m$ ). The quantification of the SDAg complexed with  $\beta$ -cyclodextrin for High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC) varied from 0,16 until 0,23%. The results obtained with the microbiological method prove that the Silver sulfadiazine complexed with  $\beta$ -cyclodextrin presents activity with the *Pseudomonasaeruginosa* and *Candidaalbicans*. It shows that the enclosed medicine, even with a low concentration, was able to inhibit the growth of the tested microorganisms. To analyze the interaction of sulfadiazine with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) it was used first-principles calculations based on the Density Functional Theory. The simulation results show that there is interaction of  $\beta$ -Cyclodextrin with Silver Sulfadiazine.

**Keywords:** Silver Sulfadiazine, cyclodextrin, antibacterial activity, complexation of drugs.

## INTRODUÇÃO

As queimaduras são lesões da pele, geralmente provocadas pela exposição a agentes químicos, térmicos, radiantes, elétricos, e podem ser classificadas de acordo com a camada da pele atingida, 1º, 2º e 3º (AZEVEDO et al., 2002; PATEL et al., 2008 ). As pessoas que sofrem queimaduras são consideradas imunossuprimidas, pois, após o trauma, ocorre uma série de alterações orgânicas que modificam seu mecanismo de defesa, facilitando a colonização do ferimento por microrganismos oportunistas (RAGONHA et al., 2005).

Nos Centros de Tratamento de Queimados, a infecção é responsável por 75 a 80% das taxas de mortalidade. Além da extensão da superfície corporal queimada, que acarreta alteração estrutural na cobertura cutânea com grande carga de colonização bacteriana, entre elas destacam-se a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e entre os fungos a espécie de *Candida* spp. Outros fatores que também favorecem as complicações infecciosas nos queimados são a imunossupressão decorrente da lesão térmica, a possibilidade de translocação bacteriana gastrointestinal, internação prolongada e o uso inadequado de antimicrobianos (MACEDO, 2007; FERREIRA et al., 2003).

Na tentativa de um melhor tratamento, têm-se buscado estabelecer e avaliar novas drogas eficazes e com melhor tolerância e segurança. Assim sendo, a sulfadiazina de prata é utilizada com sucesso há muitos anos no tratamento de queimaduras, por possuir propriedades cicatrizantes, oferecendo aumento na sobrevida dos pacientes queimados através da ampla proteção antimicrobiana. É usado na forma de um creme a 1% e exige várias aplicações diárias, interferindo no processo de cicatrização, pois a troca de curativos expõe os pacientes aos agentes infecciosos, além do trauma e da dor, porém, o creme de sulfadiazina não é biodegradável e requer a remoção antes da reaplicação (LICHTENSTEIN; MARGALIT, 1995; FERREIRA et al., 2003).

As Ciclodextrinas (CDs) constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos que visa à complexação de fármacos para aumentar a solubilidade, estabilidade, taxa de absorção ou reduzir a toxicidade do fármaco nele associado (IRIE; UEKAMA, 1997; SZEJTLI, 2004; UEKAMA; HIRAYAMA; ARIMA, 2006; LOFTSSON; BREWSTER, 2007; CUNHA; BARRETO, 2007;). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1-4), podem ser consideradas moléculas anfífilas, por apresentarem duas regiões de comportamento diferentes, o exterior das CDs é formado por grupos hidroxilas sendo altamente polar, enquanto seu interior da cavidade é relativamente apolar. Dessa forma, as CDs são capazes de interagir com diversas espécies, formando complexos estabilizados por ligações não covalentes, os quais são denominados complexos de inclusão (CUNHA; BARRETO, 2007; VENTURINI et al., 2008). Esses complexos são caracterizados pela penetração parcial ou total de moléculas na cavidade das CDs, e avaliação da complexação é realizada por métodos físicos de análises, como espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A combinação dessas técnicas com estudos teóricos, através da simulação computacional, permitem predizer a energia de ligação e estruturas de equilíbrio entre o complexo e a molécula hospede, sendo, portanto, uma ferramenta bastante útil no estudo de inclusão de fármacos em ciclodextrinas.

A complexação da sulfadiazina em CD pode melhorar sua solubilidade ou sua cinética de dissolução. Uma elevada constante de estabilidade do complexo favorece a passagem do princípio ativo através da membrana celular, visando assim à obtenção de maiores concentrações intracelular do fármaco com menor toxicidade e à maior eficiência no tratamento das infecções fúngicas, as quais levam ao desenvolvimento de lesões irreversíveis nos pacientes acometidos por períodos mais prolongados (SZEJTLI, 1998, 2004; CUNHA; BARRETO, 2007).

Considerando tais aspectos, a avaliação da atividade antimicrobiana do fármaco complexado em CD, assumindo importância no sentido de ser uma opção viável para contornar tais problemas de solubilidade do fármaco e uma melhor dissolução, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar complexos de Sulfadiazina de prata com b-CD e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da Sulfadiazina de prata complexada em CD, frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, bem como realizar a simulação computacional do complexo de inclusão da sulfadiazina com a b-CD, através de cálculos *Ab initio*.

## **METODOLOGIA**

### **ORIGEM E PREPARAÇÃO**

A inclusão da Sulfadiazina de prata e a preparação da amostra foram obtidas nos laboratórios do Centro Universitário Franciscano - UNIFRA. As cepas utilizadas foram cedidas pelo laboratório LAPEMI (Laboratório de Pesquisa de Micologia) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

## PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

O complexo de inclusão de Sulfadiazina de prata com  $\beta$ -ciclodextrina foi obtido pelo método de suspensão. O fármaco (5mg) foi suspenso em 10 mL de solução salina ( $\text{NaCl } 120 \text{ mM}^{-1}$ ) e o pH ajustado para pH 7,4 com  $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}^{-1}$ . A mistura assim obtida foi adicionada a uma solução aquosa de  $\beta$ -CD nas proporções molares de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:5, sob agitação constante em ambiente escuro a  $25^\circ\text{C}$  por 4 horas. As suspensões obtidas foram centrifugadas por 15 min a 3000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore). O filtrado obtido foi submetido à liofilização em ambiente escuro (VENTURA et al., 2005; RODRIGUEZ-PEREZ et al., 2006). As amostras liofilizadas foram armazenadas em dessecador até o momento de uso.

## ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO (IV)

A caracterização foi realizada pela técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros vibracionais, na região do infravermelho, foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1420, em pastilhas de KBr. O aparelho foi calibrado usando a banda padrão de transmitância de filme de poliestireno a  $1601 \text{ cm}^{-1}$ , usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

## CARACTERIZAÇÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As amostras foram caracterizadas no equipamento DSC - 60 (Shimadzu), com intervalo de análise de 30 a  $300^\circ\text{C}$ , a taxa de aquecimento foi de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , em atmosfera gasosa com nitrogênio a  $50 \text{ mL}/\text{min}$ . Para calibração, utilizou-se o padrão de índio. A análise foi realizada na Central Analítica da FEEVALE - Novo Hamburgo - RS.

## PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO

Pesaram-se 250 mg de Sulfadiazina de prata que foram transferidas para o balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com dimetilsulfóxido (DMSO). Aliquotas desta solução foram diluídas em DMSO para obter as soluções trabalho nas concentrações de 50, 100 e  $150 \mu\text{g}/\text{mL}$  (P1, P2 e P3), as quais foram utilizadas no ensaio, segundo as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002).

## DOSEAMENTO DA SULFADIAZINA DE PRATA COMPLEXADA COM CICLODEXTRINA POR CLAE

O doseamento da Sulfadiazina de prata foi realizado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Foroutan et al. (2002). As análises foram realizadas em cromatógrafo YL9100 HPLC, utilizando-se detector ultravioleta 254 nm, coluna C<sub>18</sub> (Lichrospher® 100 RP 18250 mm x 40 cm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de água, acetonitrila e ácido fosfórico em uma proporção 900: 99: 1 (v/v), com fluxo de 2,0 mL por minuto. Para o doseamento, foi pesado o equivalente a 0,07g de amostra em um balão volumétrico de 100 ml, adicionaram-se 30 ml da fase móvel (água, acetonitrila e ácido fosfórico, 900:99:1 v/v) e foram submetidas a agitação em vórtex por 5 min, completou-se o volume do balão com a fase móvel, colocando em banho de ultrassom por 20 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos para separar as fases. Posteriormente, realizou-se a leitura. O procedimento foi realizado em triplicata.

## MICROORGANISMOS E PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

As cepas padrões de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231 foram selecionadas para os ensaios. Colônias foram transferidas assepticamente para o meio de cultura Agar Mueller Hinton (*Pseudomonas aeruginosa*) incubadas por 48 horas a 37°C e Sabouraud Dextrose (*Candida albicans*), por 24 horas a 37°C. Repiques da cultura inicial foram realizados em tubos contendo 10 mL do meio de cultura específico para cada uma das amostras analisadas, inclinados e incubados a 37°C, durante 24 e 48 horas antes do ensaio. Após o repique das culturas, colônias foram transferidas para uma solução salina 0,85% estéril e padronizadas conforme o padrão de turbidez da escala 0,5 de Mc Farland, que corresponde a  $1,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Os inóculos foram preparados escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de ~1mm, a partir de cultura de 24 horas para espécies de *Candida* ou cultura de 48 horas para *Pseudomonas aeruginosa*. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril  $0,145 \text{ mol/L}^{-1}$  (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%). As condições experimentais para o desenvolvimento do ensaio microbiológico para avaliação de potência de Sulfadiazina de prata foram testadas e ajustadas para proporcionar um bom desempenho do método.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Pesou-se uma quantidade de 150mg da Sulfadiazina de prata e transferiu-se para balão volumétrico de 100ml e completou-se o volume com dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se concentração final de 1500µg/mL. Solução utilizada no ensaio de microdiluição, segundo as recomendações da Clinical Laboratory Standards (CLSI).

## MICRODILUIÇÕES PARA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O teste de suscetibilidade para Sulfadiazina de prata foi realizado conforme o protocolo M7-A6 do CLSI, sendo realizada a técnica de microdiluição. O meio de cultura utilizado foi Mueller Hinton. A amostra liofilizada (SDAg e  $\beta$ -CD) e o fármaco foram conservados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento do uso. As diluições das amostras foram realizadas em caldo Mueller Hinton a fim de se obter nos tubos testes concentrações que variaram de 0,25-32 mg/mL. Os inóculos foram preparados a partir de colônias com crescimento de 24 h. A solução de inóculo foi realizada conforme a escala de Mc Farland, obtendo uma turbidez correspondente a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Esta suspensão foi diluída 1:50, seguida de uma nova diluição 1:20 em caldo Muller Hinton. As placas de microdiluições foram incubadas a 37°C por 48 h, para posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O critério de leitura considerou que a CIM seria a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

## MICRODILUIÇÃO PARA *CANDIDA ALBICANS*

O teste de suscetibilidade para Sulfadiazina de prata foi realizado conforme o protocolo M-27A2 do CLSI, sendo realizada a técnica de microdiluição. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) 1,65 M pH 7,2. A amostra liofilizada (SDAg e  $\beta$ -CD) e o fármaco foram conservados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento do uso. As diluições das amostras foram realizadas com o meio RPMI 1640 a fim de se obter nos tubos testes concentrações que variaram de 0,25-32  $\mu$ g/ml. Os inóculos foram preparados a partir de colônias com crescimento de 24 h em meio de ágar Saboraud as quais foram ressuspensas em solução salina estéril, a fim de se obter uma turbidez correspondente a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Essa suspensão foi diluída 1:50, seguida de uma nova diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640. As placas de microdiluições foram incubadas a 37°C por 48 h, para posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O critério de leitura considerou que a CIM seria a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano.

## SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA COMPLEXAÇÃO

Para analisar a interação da Sulfadiazina com a  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD) foi utilizado cálculos de primeiros princípios fundamentados na Teoria do Funcional de Densidade (DFT - *Density Functional Theory*) (HOHENBERG; KOHN, 1964; KOHN; SHAM, 1965). Essa teoria permite determinar as propriedades de um sistema físico ou químico a partir do conhecimento de sua densidade eletrônica. A DFT associada com o método de pseudopotenciais, que consiste em descrever os elétrons que participam

efetivamente das ligações químicas, encontra-se implementada no código SIESTA (*Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousand of Atoms*) (SOLER et al., 2002), com o qual realizaram-se os cálculos autoconsistentes. O código SIESTA utiliza uma base numérica obtida a partir dos pseudo-orbitais atômicos para descrever as funções de onda dos sistemas em estudo. Para descrever a interação de troca e correlação, utilizou-se a aproximação da Densidade Local (*Local Density Approximation – LDA*) (PERDEW; ZUNGER, 1981). A base utilizada foi uma combinação Linear de Orbitais Atômicos *Double-Zeta* (LCAO-DZP) mais funções de polarização. A interação entre os elétrons de valência e os caroços iônicos foi descrita pelos pseudopotenciais de norma conservada de Troullier-Martins (TROULLIER; MARTINS, 1991), sendo que para representar a densidade de carga no espaço real, utilizou-se um *grid cutoff* de 200 Ry. Todas as estruturas foram otimizadas até que as forças sobre todas as coordenadas atômicas atingissem valores menores que 0,05 eV/Å. Um *energy shift* de 0,05 eV foi utilizado para definir os raios de corte para os orbitais da base.

Para avaliar a interação da  $\beta$ -Ciclodextrina com Sulfadiazina de prata, usou-se a simulação *ab initio* em que a Sulfadiazina de prata contém 27 átomos e a  $\beta$ -Ciclodextrina 147 átomos. Analisou-se a interação por meio de três configurações diferentes em que a sulfadiazina interage internamente com a  $\beta$ -CD. Todas essas configurações estavam dispostas em uma caixa com condições periódicas de contorno.

As energias de ligação ( $E_b$ ) foram calculadas, usando-se a correção de erro de sobreposição de bases (BSSE) (BOYS; BERNARDI, 1970). Essa correção é feita através do método de contagem utilizando átomos “fantasmas”, conforme a equação abaixo:

$$E_b = -[E_T(\text{sulfa} + \beta - CD) - E_T(\text{sulfa} + \beta - CD_{\text{fantasma}}) - E_T(\text{sulfa}_{\text{fantasma}} + \beta - CD)] \quad (1)$$

em que,  $E_T(\text{sulfa} + \beta - CD)$  é a energia total da sulfadiazina interagindo com a  $\beta$ -ciclodextrina,  $E_T(\text{sulfa} + \beta - CD_{\text{fantasma}})$  é a energia total da sulfadiazina interagindo com a  $\beta$ -ciclodextrina “fantasma”,  $E_T(\text{sulfa}_{\text{fantasma}} + \beta - CD)$  é a energia total da sulfadiazina “fantasma” interagindo com a  $\beta$ -ciclodextrina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi utilizado o método de suspensão para a formação do complexo de inclusão da Sulfadiazina de prata com a  $\beta$ -CD com razão molar de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:5. A avaliação da cinética de formação do complexo de inclusão foi analisada observando o melhor espectro no IV para a amostra.

### ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros no IV da  $\beta$ -Ciclodextrina (Figura 1) foram comparados com os espectros de IV Sulfadiazina de prata (Figura 2) e do complexo de inclusão da  $\beta$ -CD com Sulfadiazina de prata

(Figura 3) na razão molar 1:2. Como podemos observar por meio da figura 2, os picos característicos da Sulfadiazina de prata que estão entre 1325 a 1140  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a ligação S=O e entre 3350 a 3250  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a N=H. Os espectros dos compostos de inclusão de Sulfadiazina de prata e  $\beta$ -Ciclodextrina nas quatro razões molares foram muito semelhantes, porém quando comparamos o espectro da Sulfadiazina de prata com os espectros obtidos das diferentes razões molares, observamos que os picos característicos da sulfadiazina não foram detectados no complexo liofilizado obtido na razão molar 1:2. Esta observação foi devido ao tipo de interação entre o hospedeiro ( $\beta$ -Ciclodextrina) e o fármaco (Sulfadiazina de prata) (SZEJTLI, 1998, 2004).

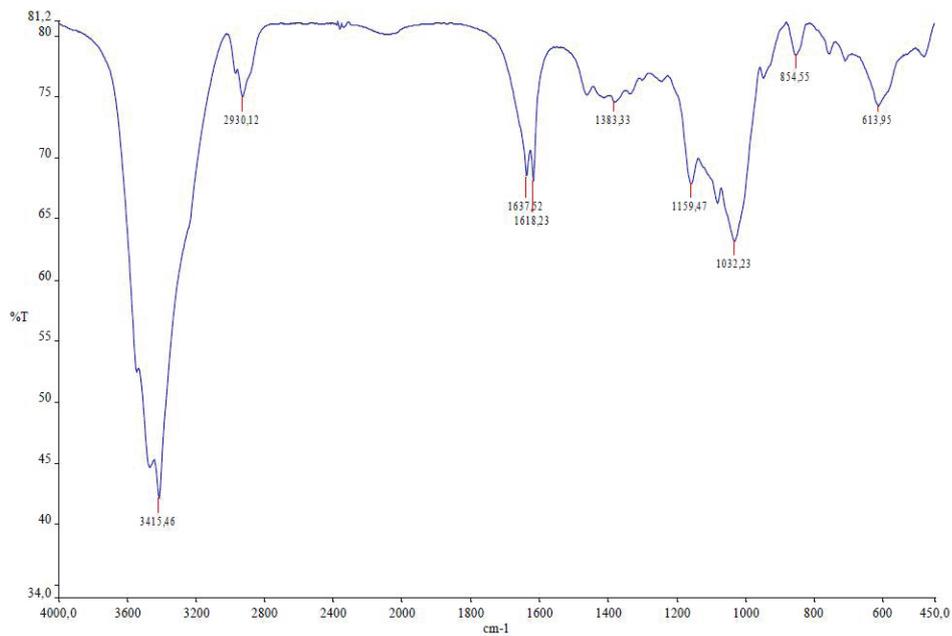


Figura 1 - Espectro no infravermelho para  $\beta$ -Ciclodextrina.

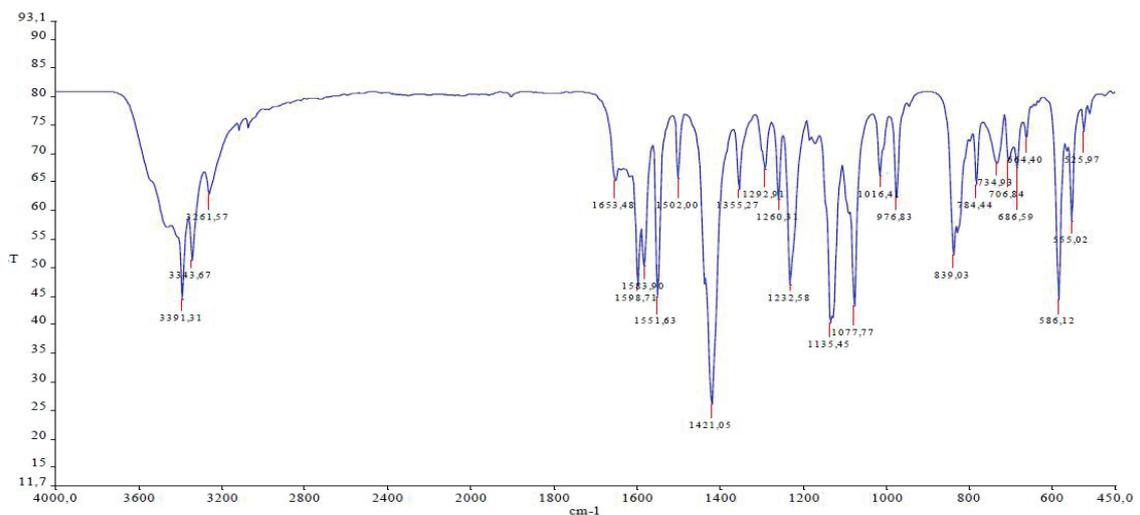
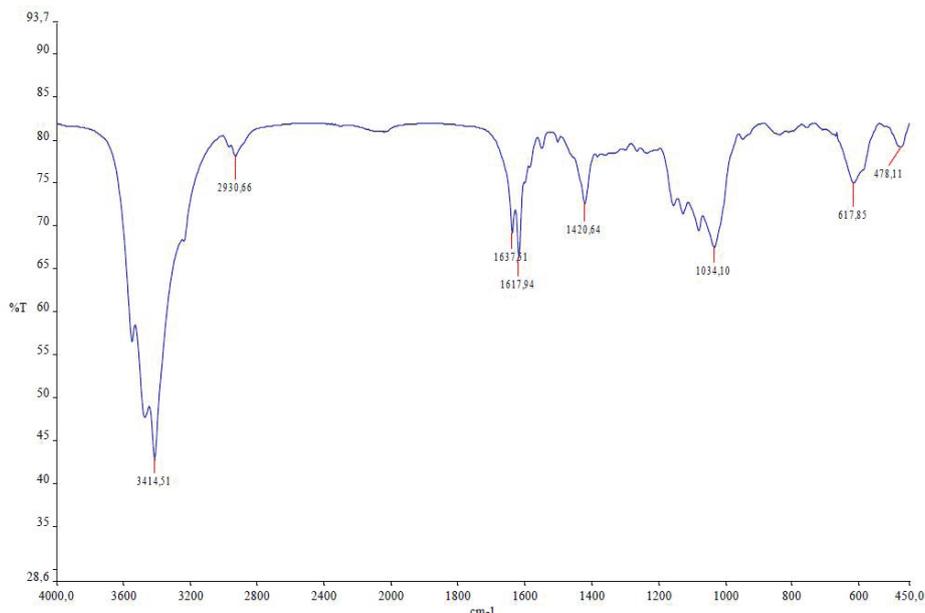


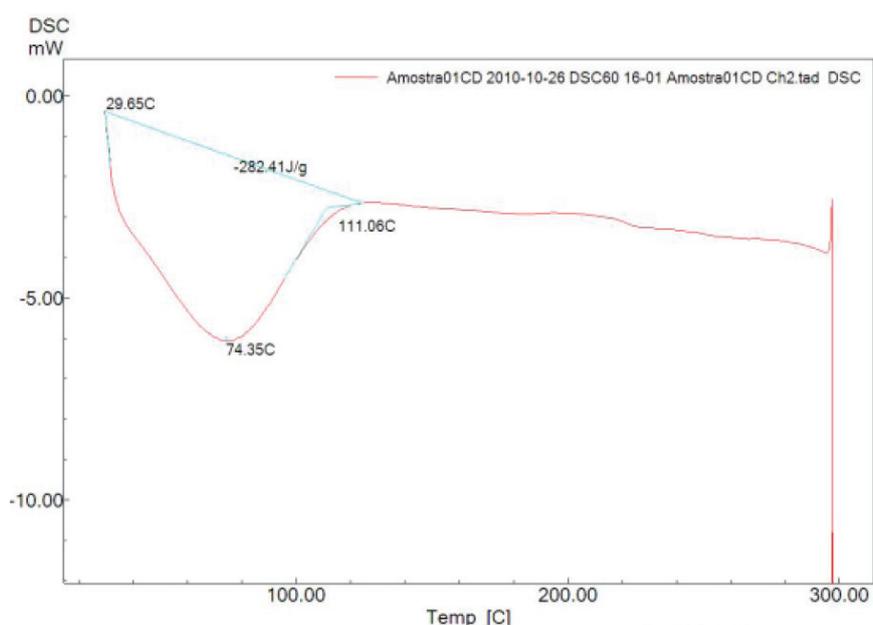
Figura 2 - Espectro no infravermelho para Sulfadiazina de prata.



**Figura 3** - Espectro de infravermelho para complexo liofilizado razão molar 1:2 Sulfadiazina de prata-  $\beta$ -Ciclodextrina.

### CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A técnica termoanalítica por meio de DSC foi utilizada para caracterização das propriedades térmicas das amostras, no que se refere à determinação do ponto de fusão, transição vítrea, calor específico, avaliação da presença ou não de polimorfos. Analisando o termograma obtido pela análise de DSC da amostra de  $\beta$ -CD (Figura 4), observou-se, durante o aquecimento da amostra, um pico endotérmico na faixa de temperatura de 29,65 °C a 111,06 °C, com ponto máximo em 74,35°C, caracterizando a temperatura de fusão da amostra ( $T_m$ ).



**Figura 4** - Termograma da curva de DSC da amostra de  $\beta$ -CD.

Na figura 5, mostra-se o termograma obtido pela análise de DSC da amostra de sulfadiazina de prata, com intervalo de análise RT 30°C a 300°C, indicando que não apresenta pico endotérmico e nem pico exotérmico na faixa de temperatura de análise. Apresentando um possível início de degradação próximo a 30°C.

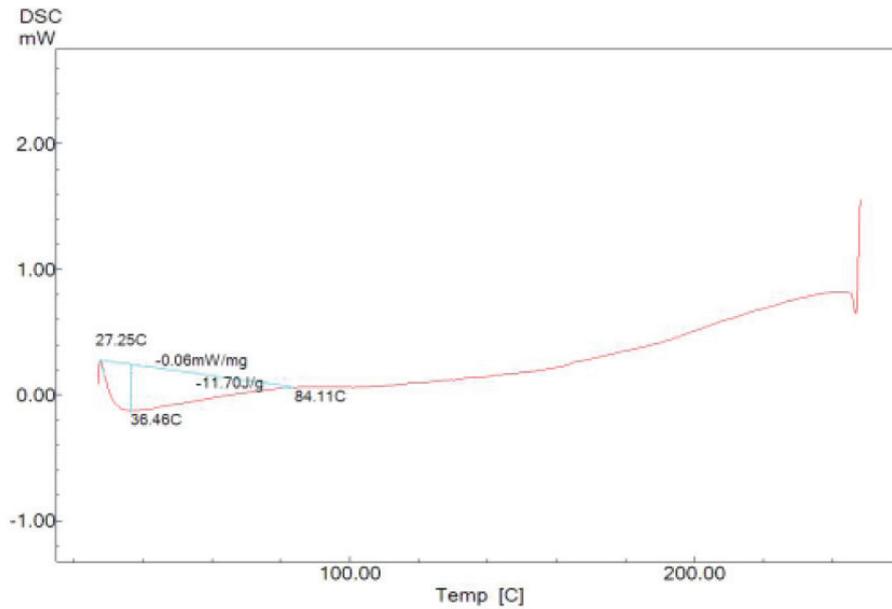


Figura 5 - Termograma da sulfadiazina de prata com intervalo de análise RT 30°C a 300°C.

No termograma da  $\beta$ -Ciclodextrina e Sulfadiazina de prata (Figura 6), observou-se, durante o aquecimento da amostra, um pico endotérmico na faixa de temperatura de 32,67°C a 42,62°C, com ponto máximo em 42,31°C, caracterizando a temperatura de fusão da amostra ( $T_m$ ).

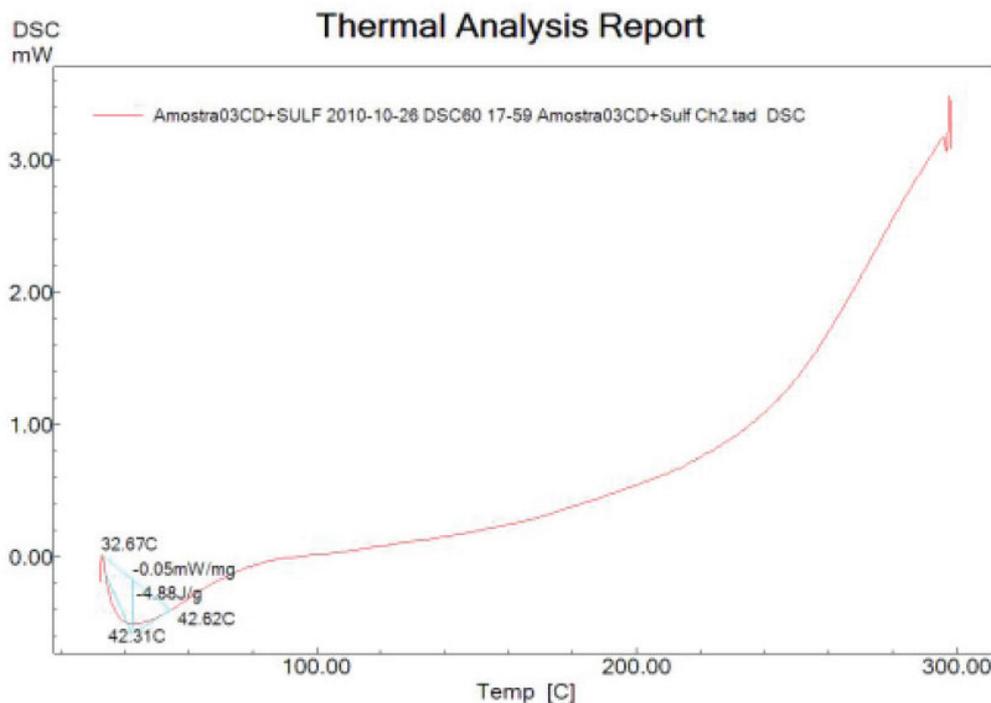


Figura 6 - Termograma do complexo Sulfadiazina de prata-  $\beta$ -Ciclodextrina.

Bilensoy (2006) realizou caracterização por DSC com amostra de clotrimazol,  $\beta$ -ciclodextrina e clotrimazol:  $\beta$ -ciclodextrina liofilizado. O termograma DSC indicou claramente endoterma, que o clotrimazol tem fusão bem definido em 148 ° C e desidratação da  $\beta$ -ciclodextrina é observada entre 50 e 120 ° C. Al-Marzouqi et al. (2009) observaram o desaparecimento do pico de fusão indicando complexação das amostras de itraconazol, econazol e fluconazol em  $\beta$ -CD.

### DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Na tabela 1, apresentam-se as áreas referentes às diferentes concentrações de Sulfadiazina de prata, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em um comprimento de onda de 254 nm. As amostras foram analisadas seguindo a metodologia da Farmacopeia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

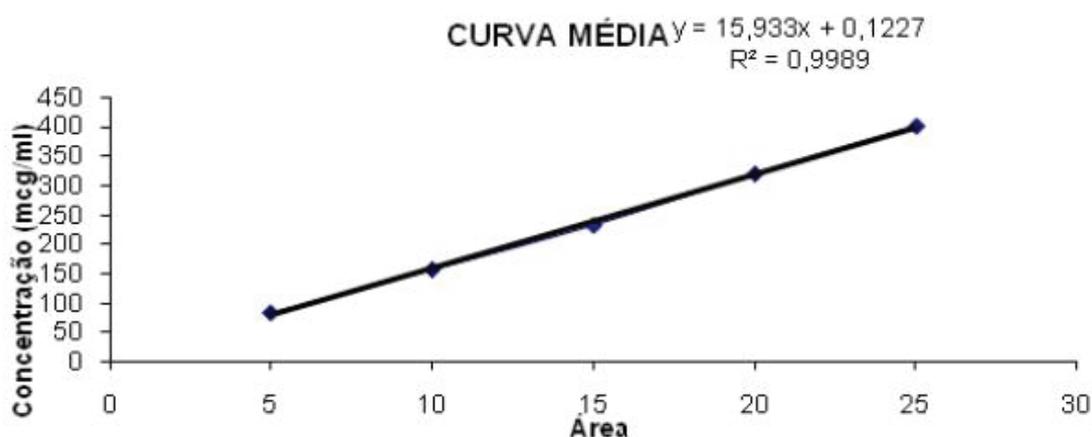
**Tabela 1** - Valores referentes à construção da curva analítica da SDAg.

	Áreas			Médias $\pm$ DP	DPR (%)
5	85.620,5	86.620,5	79.910,5	84.050,5 $\pm$ 3,61	4.93
10	162.952	154.548	155.236	157.579,2 $\pm$ 4,66	2.94
15	231.486	229.092	237.546	232.708,2 $\pm$ 4,35	1.87
20	332.442	318.577	309.344	320.121,3 $\pm$ 11,62	3.63
25	434.879	391.375	377.021	401.092 $\pm$ 30,13	7.51

DP = Desvio Padrão

DPR (%) = Desvio Padrão Relativo

Na figura 7, representam-se a curva de calibração e a equação da reta obtidas por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para SDAg.



**Figura 7** - Curva analítica da sulfadiazina de prata.

Na tabela 2, apresentam-se as concentrações das amostras obtidas a partir da curva de calibração.

**Tabela 2** - Valores referentes à concentração da amostra de SDAg complexada com  $\beta$ -CD.

Amostra	área 1	área 2	Média	[ ] $\mu\text{g/ml}$	[ ] %
1	307	236,6	<b>271,8</b>	0,025	0,16
2	367,8	422	<b>394,9</b>	0,032	0,22
3	387,1	459,3	<b>423,2</b>	0,034	0,23

O teor de inclusão do complexo de  $\beta$ -CD/SDAg foi determinado por CLAE, utilizando a curva padrão. A concentração da amostra injetada no cromatográfico foi calculada utilizando-se a área e a equação da reta da tabela 2. O teor de inclusão do complexo variou de 0,16 a 0,23%.

Melo et al. (2007) Al-Marzouqi et al. (2009) estudaram a preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona (NF) e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina; para a quantificação do teor de fármaco, foi utilizada a curva analítica determinada por CLAE. Para o autor, a concentração de NF diminuiu em uma taxa de decomposição quando comparado ao fármaco em ausência de ciclodextrina.

#### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PARA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *CANDIDA ALBICANS*

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da Sulfadiazina de prata (SDAg) e Sulfadiazina de prata complexada com ciclodextrina ( $\beta$ -CD/SDAg), frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* evidenciadas no estudo, estão representadas na tabela 3.

**Tabela 3** - Valores das CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de SDAg e  $\beta$ -CD/SDAg frente à *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

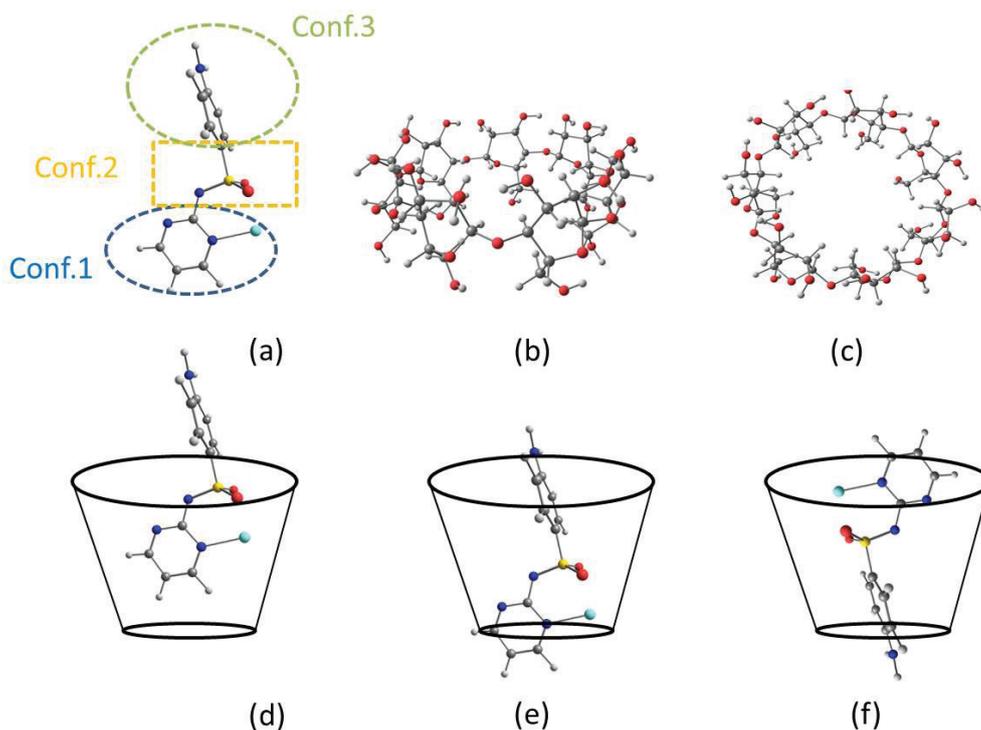
AMOSTRA	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
SDAg	4	2
$\beta$ -CD/SDAg	1	2

A levedura *Candida albicans* requereu CIMs de 4  $\mu\text{g/mL}$  e 1  $\mu\text{g/mL}$  para SDAg e  $\beta$ -CD/SDAg, respectivamente, para serem inibidas. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* requereu CIMs iguais para sua inibição, em que a CIM foi igual a 2  $\mu\text{g/mL}$  tanto para SDAg quanto para  $\beta$ -CD/SDAg.

Segundo Cochoran et al. (2002), Sulfadiazina de prata é um antimicrobiano com eficácia elevada contra vários microrganismos, até mesmo frente a leveduras do gênero *Candida* spp. No presente estudo, as CIM de Sulfadiazina de prata necessárias para inibir o crescimento de *C. albicans* foram igual a 4  $\mu\text{g/mL}$ . No estudo realizado por Cochoran et al. (2002) onde CIM foi de 2  $\mu\text{g/mL}$ . A CIM capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* frente à sulfadiazina de prata isoladamente encontrada neste estudo foi CIM = 2  $\mu\text{g/mL}$ . Em um estudo, Aujoulat et al. (2011) encontraram CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$  de Sulfadiazina de prata capaz de inibir o crescimento de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, em pacientes com feridas, revelando semelhança com o estudo realizado.

## SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA COMPLEXAÇÃO

As configurações para o estudo da  $\beta$ -ciclodextrina com a sulfadiazina de prata foram três, conforme ilustra a figura 8 (d), (e) e (f). A imagem (a) representa a configuração da Sulfadiazina de prata juntamente com as configurações 1, 2 e 3 usadas para interagir com a  $\beta$ -CD, (b) vista lateral da  $\beta$ -CD, (c) vista de cima da  $\beta$ -CD, (d)  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 1, (e)  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 2 e a (f)  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 3. Para todas estas configurações, a molécula de sulfadiazina foi colocada na cavidade interna da  $\beta$ -Ciclodextrina. As configurações otimizadas apresentaram energias de ligação de 2,92 eV para a  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 1, 2,68 eV para a  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 2 e 2,68 eV para a  $\beta$ -CD interagindo com a sulfadiazina pela configuração 3. As distâncias mínimas de ligação encontradas foram: 1,98 Å, 1,6 Å e 1,8 Å para a interação da  $\beta$ -CD com sulfadiazina pelas configurações 1, 2 e 3, respectivamente.



**Figura 8** - Em (a) Sulfadiazina de prata, (b) e (c)  $\beta$ -Ciclodextrina, (d), (e) e (f) configurações da Sulfadiazina de prata e  $\beta$ -Ciclodextrina.

## CONCLUSÕES

A caracterização do complexo de inclusão foi realizada por IV e DSC. A análise dos espectros de IV demonstrou que houve deslocamentos dos picos característicos da Sulfadiazina de prata ( $1325$  a  $1140\text{cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{S}=\text{O}$ ;  $3350$ -  $3250\text{cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{N}=\text{H}$ ), sendo esses dois picos utilizados como um indicador da formação do complexo de inclusão da SDAg e  $\beta$ -Ciclodextrina na razão molar 1:2;

As amostras obtidas em diferentes razões molares (1:1, 1:3 e 1:5) apresentaram espectro de IV muito semelhantes, esta observação pode ser devido ao tipo de interação que ocorre entre a Sulfadiazina de prata e  $\beta$ -Ciclodextrina. A espectroscopia no IV utilizado neste estudo foi o método de escolha para avaliar a formação do complexo de inclusão da Sulfadiazina de prata/  $\beta$ -Ciclodextrina;

Em relação ao DSC utilizado na caracterização de Sulfadiazina de prata incluída na  $\beta$ -ciclodextrina, observou-se um pico endotérmico na faixa de temperatura de 32,67°C a 42,62°C, com ponto máximo em 42,31°C; e foi comparado com o comportamento térmico da  $\beta$ -Ciclodextrina que apresentou um pico endotérmico na faixa de 29,65 a 111,06 °C, indicando uma possível perda de água da Sulfadiazina de prata.

O doseamento realizado por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) apresentou um teor que variou de 0,16 a 0,23%.

Os resultados obtidos pelo método microbiológico comprovam que a Sulfadiazina de prata incluída em  $\beta$ -Ciclodextrina embora com baixo teor apresentou-se ativa contra bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida albicans*, mostrando, assim, que o fármaco incluso mesmo com baixa concentração apresentou o mesmo efeito antimicrobiano do fármaco.

Com relação aos dados obtidos da simulação computacional, podemos confirmar que do ponto de vista teórico há complexação entre a  $\beta$ -Ciclodextrina e Sulfadiazina de prata, pois a energia de ligação entre os dois compostos varia de 2,68 eV a 2,92 eV. Estes dados corroboram com os dados encontrados no espectro de infravermelho que mostram uma interação da Sulfadiazina de prata na cavidade interna da  $\beta$ -Ciclodextrina.

## REFERÊNCIAS

AL-MARZOUQI, A. H. et al. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. **J Pharm Biomed Anal**, v. 49, p. 227-233, 2009.

AUJOULAT, F. et al. Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in burns care. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 10, n. 27, p. 1-10, 2011.

AZEVEDO, A., M., Z.; MACHADO, M., J.; CHASSOT, G., C. Assistência de enfermagem nos pacientes queimados com curativo aberto na unidade de internação. **Revista Técnico-Científica do Grupo Hospitalar Conceição**, v. 15, p. 54-59, 2002.

BILENSOY, E. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal clotrimazole: $\beta$ -cyclodextrin complex. **Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-7, 2006.

BOYS, S.F.; BERNARDI, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. **Mol. Phys**, v. 19, n. 4, p. 553-566, 1970.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: **15º Suplemento Informativo**. M2-A8 E M7-A6, 2002.

COCHRAN, A. et al. Systemic Candida Infection in Burn Patients: A Case-Control Study of Management Patterns and Outcomes. **Surgical Infections**, v. 3, n. 4, p. 367-374, 2002.

CUNHA, F. M. S. S.; BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 28, p. 1-9, 2007.

FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: Uma revisão de literatura. **Revista escolar de enfermagem da USP**, v. 37, n. 1, p. 44 - 51, 2003.

FOROUTAN, S. M., ETTEHADI, H. A, TORABI, H. R.; Formulation and In Vitro Evaluation of Silver Sulfadiazine Spray. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1, p. 47-49, 2002.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Phys. Rev.**, v. 136, p. B864-B871, 1964.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .3. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.**, v. 87, p.147-162, 1997.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Phys. Rev.**, v. 140, p. A1133-A1138, 1965.

LICHTENSTEIN, A.; MARGALIT, R. Liposome-encapsulates silver sulfadiazine (SSD) for the topical treatment of infected burns: thermodynamics of drug encapsulation and kinetics of drug release. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 60, p. 187-198, 1995.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. Physicochemical properties of water and its effect on drug delivery: a commentary. **Int J Pharmaceutics**, v. 47, p. 53, 2007.

MACEDO, J. L. S. Complicações infecciosas e fatores preditivos de infecção em pacientes queimados **Comun Ciênc Saúde**, v. 1, p. 63-65, 2007.

MELO, N. F. S. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2007.

PATEL, P. P. et al. Topical antimicrobials in pediatric burn wound management. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 4, p. 913- 922, 2008.

PERDEW, J. P.; ZUNGER, A. Self-interaction correction to density functional approximations for many-electron systems. **Phys Rev. B**, v. 23, p. 5048-5079, 1981.

RAGONHA, A. C. O. et al. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadizina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 13, p. 514-521, 2005.

RODRIGUEZ-PEREZ, A. I. et al. Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-pluronic aggregates. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, n. 9/10, p. 3179-86, 2006.

SOLER, J. M. et al. The SIESTA method for ab-initio order-N materials simulation. **J. Phys.: Condens. Matter**, v. 14, n. 11, p. 2745-2779, 2002.

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

\_\_\_\_\_. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure Appl. Chem.** v. 7, n. 610, p. 1825-1845, 2004.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. **Rockville**: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

TROULLIER, N.; MARTINS, J. L. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. **Phys. Rev. B**, v. 43, p. 1993-2006, 1991.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins and Their Derivatives. In: DODZIUK, H. (Ed.). **Cyclodextrins and their Complexes**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Pharmaceutical applications of Cyclodextrins and Their Derivatives, p. 381-422, 2006.

VENTURA, C. A. et al. Preparation of celecoxib-dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study. **Eur J Med Chem**, v. 40, n. 7, p. 624-631, 2005.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 132-143 2008.