

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA *CAMPUS* GOVERNADOR  
VALADARES**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR (PMBQBM)**

**Thiago Mourão de Miranda**

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO  
COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM *Staphylococcus aureus***

Governador Valadares

2020

**Thiago Mourão de Miranda**

COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO COM  
 $\beta$ -CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Governador Valadares

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Miranda, Thiago Mourão de.

Composições nanoestruturadas de cloreto de cetilpiridínio com  $\beta$  ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da interação com *Staphylococcus aureus* / Thiago Mourão de Miranda. - 2020.

89 f. : il.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2020.

1. Cloreto de Cetilpiridínio. 2.  $\beta$ -ciclodextrinas. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Interação com membranas. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite, orient. II. Título.

Thiago Mourão de Miranda

COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO COM  $\beta$ -  
CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
DA INTERAÇÃO COM *Staphylococcus aureus*

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares.

Aprovada em 06/12/2019

BANCA EXAMINADORA



Doutor Angelo Márcio Leite Denadai (Orientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora



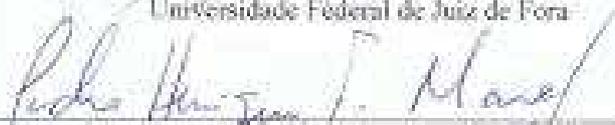
Doutor Fernando Castro de Oliveira  
Centro Federal de Educação Tecnológica – Timóteo – MG



Doutora Luciana Souza Guzzo Costa  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Doutor Michel Rodrigues Moreira  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Doutor Pedro Henrique Ferreira Maçal  
Universidade Vale do Rio Doce

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos,  
minha base, que desde sempre me incentivaram  
e acreditaram. Amo vocês!

## **Agradecimentos**

A Deus, pela sabedoria e proteção, pelo amparo nos momentos de dificuldades, por me mostrar os melhores caminhos e a forma de percorrê-los.

A minha esposa Priscilla, minha oncinha, minha companheira, que não apenas compreendeu minha ausência e distância em diversos momentos, como também sempre me incentivou.

A meu orientador Prof. Dr. Ângelo, que aceitou o desafio de me orientar mesmo sendo um estudante que não poderia oferecer dedicação exclusiva. Obrigado pelos ensinamentos e amizade. Juntos entramos para a história, como docente e discente da primeira tese de Doutorado defendida na cidade de Governador Valadares realizada em um programa de pós graduação local.

A Profa. Dra. Gabriella, que colaborou na realização dos testes microbiológicos, sempre disponível para acrescentar seus conhecimentos e enriquecer nosso estudo.

A Profa. Dra. Lúcia, que abriu as portas desde curso para mim, me orientando no projeto de pesquisa para o processo seletivo. Sem a sua ajuda e incentivo certamente eu não teria chegado aqui.

A Profa. Dra. Cibele, coordenadora deste programa de pós-graduação, pela dedicação ao mesmo, e por me fazer encantar ainda mais com a Biologia Molecular e Genética Humana.

A Prof. Dra. Sandra e ao Prof. Dr. Jeferson, nas pessoas das quais estendo minha gratidão aos demais professores do programa, que contribuíram com seus conhecimentos e experiência.

Aos colegas mestrandos e doutorandos pela saudosa convivência ao longo desses 4 anos.

Aos estudantes de Iniciação Científica (Alan, Larissa, Guilherme e Pedro) pela ajuda nos laboratórios durante os experimentos.

Aos técnicos de laboratório e administrativos que nos auxiliaram em diversos momentos.

Aos colaboradores externos Dra. Ivana da UFMG e Dr. Clébio da UFSJ pelo auxílio nos experimentos.

Ao Instituto Carlos Chagas, que flexibilizando horários de trabalho e férias possibilitou que eu conciliasse minhas responsabilidades na empresa e no doutorado. Em especial a Juliana Lima que esteve disponível sempre que precisei.

Ao ensino PÚBLICO, GRATUITO e de QUALIDADE. Menção especial à Escola Estadual Sabino Barroso, na minha querida Sabinópolis-MG, onde tudo começou. Agradeço de forma especial a minhas primeiras professoras: Tia Isabel, Tia Betânia, Tia Maria Miranda e Tia Édina. Vocês foram responsáveis pelo alicerce que me permitiu chegar até aqui. A vocês meu respeito, consideração e gratidão! Deus lhes pague!

A todos que torceram e incentivaram, muito obrigado.

Aos que vierem, que possam ir além, buscar novos conhecimentos e difundi-los, almejar um crescimento sustentável, através de uma conduta idônea e equilibrada, preservando os melhores valores que se podem cultivar.

## RESUMO

A alta ocorrência de microrganismos multirresistentes é considerada um problema de saúde global, sendo a presença e disseminação desses organismos documentada com mais frequência nas últimas décadas. Visando diminuir o número desses patógenos, o uso de antissépticos tornou-se um importante aliado, reduzindo os riscos de contaminação. O Cloreto de Cetilpiridínio – CCP é um surfactante catiônico já utilizado nos Estados Unidos da América como colutório há mais de 70 anos, possuindo atividade biocida contra um largo espectro de bactérias. Dentre elas, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que apesar de constituir frequentemente a microbiota habitual humana, é um importante patógeno que causa uma grande variedade de infecções clínicas. No intuito de se tentar reduzir os inconvenientes da resistência bacteriana e potencializar o efeito do CCP, foi proposto no presente trabalho, a complexação do composto com a  $\beta$ -ciclodextrina. O trabalho teve como objetivo inicial, a síntese e caracterização físico-química (FTIR, análise térmica, RMN, ZP, DLS, ITC) de composição nanoestruturada do CCP/ $\beta$ CD, dando especial atenção ao processo de complexação CCP/ $\beta$ CD frente à possibilidade de auto-organização do surfactante na forma de micela. Na sequência, foi avaliada a atividade antimicrobiana do CCP, na ausência e na presença de  $\beta$ CD, frente a cepas clínica e padrão (ATCC) de *S. aureus*. Ao fim, foi investigada a interação direta do complexo CCP/ $\beta$ CD com membranas de *S. aureus*, com vistas à compreensão do mecanismo de interação. Os resultados obtidos demonstraram formação espontânea do complexo de inclusão entre a  $\beta$ CD e CCP, o qual foi preferencial ao processo de micelização do CCP puro, sendo que a  $\beta$ CD atrasa o processo de micelização. Quanto à sua atividade biológica, observou-se que na presença da  $\beta$ CD houve redução da  $DL_{50}$  e alteração nos parâmetros termodinâmicos e coloidais, sugerindo que o modelo de encapsulamento molecular proposto pode ser uma ferramenta promissora.

Palavras chave: Cloreto de Cetilpiridínio.  $\beta$ -ciclodextrinas. *Staphylococcus aureus*. Interação com membranas.

## ABSTRACT

The high occurrence of multiresistant microorganisms is considered a global health problem, and the presence and dissemination of these organisms has been documented more frequently in recent decades. In order to reduce the number of these pathogens, the use of antiseptics has become an important ally, reducing the risks of contamination. Cetylpyridinium Chloride – CPC is a cationic surfactant that has been used in the United States as a mouthwash for over 70 years and has biocidal activity against a broad spectrum of bacteria. Amongst them, *Staphylococcus aureus* stands out, that although it is often the usual human microbiota, is an important pathogen that causes a wide variety of clinical infections. In order to try to reduce the inconvenience of bacterial resistance and potentiate the effect of CPC, the complexation of the compound with  $\beta$ -cyclodextrin was proposed in the present work. The initial objective of this work was the synthesis and physicochemical characterization (FTIR, thermal analysis, NMR, ZP, DLS, ITC) of CPC/ $\beta$ CD nanostructured composition, paying special attention to the process of CPC/ $\beta$ CD complexation in face of the possibility self-organization of surfactant in micelle form. Subsequently, the antimicrobial activity of CPC was evaluated, in the absence and presence of  $\beta$ CD, against clinical and standard strains (ATCC) of *S. aureus*. Finally, the direct interaction of the CPC/ $\beta$ CD complex with *S. aureus* membranes was investigated in order to understand the mechanism of interaction. The results showed spontaneous formation of the inclusion complex between  $\beta$ CD and CPC, which was preferable to the pure CPC mycelization process, and  $\beta$ CD delays the mycelization process. Regarding its biological activity, it was observed that in the presence of  $\beta$ CD there was a reduction of LD<sub>50</sub> and alteration in thermodynamic and colloidal parameters, suggesting that the proposed molecular encapsulation model may be a promising tool.

Keywords: Cethylpyridine chloride.  $\beta$ -cyclodextrin. *Staphylococcus aureus*. Interaction with membranes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do Cloreto de Cetilpiridínio. ....	20
Figura 2 – Fórmulas estruturais das ciclodextrinas naturais.....	23
Figura 3 – Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira. ....	24
Figura 4 – Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa. ....	29
Figura 5 – Esquema do experimento para obtenção dos espectros de infravermelho. ....	30
Figura 6 – Orientações iniciais propostas para as estruturas 1:1 e 1:2 CCP/ $\beta$ CD para o DFT. ....	32
Figura 7 – Representação esquemática do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal. ...	34
Figura 8 – Preparo das diluições para teste de atividade antimicrobiana. ....	35
Figura 9 - Desenho de placa utilizada para determinação da DL <sub>50</sub> . ....	37
Figura 10 – Zetasizer Nano ZS90 da Malvern.....	39
Figura 11 – Espectro de infravermelho do CCP, $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD, na região 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> em pastilhas de KBr. ....	42
Figura 12 – (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Análise térmica diferencial (DTA) do CCP, $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD. ....	46
Figura 13 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da $\beta$ CD em D <sub>2</sub> O.....	50
Figura 14 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do CCP em D <sub>2</sub> O. ....	51
Figura 15 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (a 400 MHz) em D <sub>2</sub> O a 27 °C comparando as substâncias puras e CCP/ $\beta$ CD: (a) $\beta$ CD e CCP/ $\beta$ CD e (b) CCP e CCP/ $\beta$ CD. ....	52
Figura 16 – Mapa de contorno ROESY (a 400 MHz) do complexo CCP/ $\beta$ CD em D <sub>2</sub> O a 27 °C. ....	54
Figura 17 – Conformações teóricas do CCP/ $\beta$ CD obtidas pelo B97D/6-31G(d,p): (a) 1:1 forma A, (b) 1:1 forma B e (c) forma 1:2.....	55
Figura 18 – Condutividade do CCP e CCP/ $\beta$ CD em função da concentração. ....	57
Figura 19 – (a) Titulação da $\beta$ CD 10,0 mM em água pura e em solução de CCP 0,5 mM e (b) curva de titulação final após a subtração do branco. ....	60
Figura 20 – Estudo de agregação do CCP a 30,0 mM na ausência e na presença de $\beta$ CD em diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0; 4,0 mM). ....	62
Figura 21 – (a) Concentração micelar crítica (cmc) e (b) parâmetros termodinâmicos da cmc do CCP na ausência e na presença de diferentes concentrações de $\beta$ CD. .	64
Figura 22 – Titulação condutimétrica do CCP a 30 mM na ausência e na presença de $\beta$ CD em diferentes concentrações (0, 1,0, 2,0, 4,0 mM) ....	65
Figura 23 – Representação esquemática da micelização do CCP puro (a) e na presença de $\beta$ CD (b). ....	66
Figura 24 – Determinação da DL <sub>50</sub> do CCP e do CCP/ $\beta$ CD contra <i>S. aureus</i> cepas ATCC (a) e clínica (b).....	68
Figura 25 – DL <sub>50</sub> do CCP e CCP/ $\beta$ CD em $\mu$ g/mL contra <i>S. aureus</i> .....	69
Figura 26 – Cinética de morte bacteriana do CCP e do CCP/ $\beta$ CD, ambos na concentração de 4 $\mu$ g/mL, contra <i>S. aureus</i> cepas ATCC e clínica. ....	70
Figura 27 – Diâmetro hidrodinâmico de células de <i>S. aureus</i> ATCC e clínica em função da concentração do CCP e CCP/ $\beta$ CD.....	73

Figura 28 – Potencial zeta de células de <i>S. aureus</i> ATCC e clínica em função da concentração do CCP e CCP/ $\beta$ CD.....	74
Figura 29 – Titulação do CCP (a) e CCP/ $\beta$ CD (b) a 122,87 $\mu$ M em suspensão de <i>S. aureus</i> cepa ATCC.....	75
Figura 30 – Titulação do CCP (a) e CCP/ $\beta$ CD (b) a 122,87 $\mu$ M em suspensão de <i>S. aureus</i> cepa clínica. ....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas naturais. ....	24
Tabela 2 – Principais bandas ( $\text{cm}^{-1}$ ) observadas nos espectros de infravermelho de CCP, $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD. ....	44
Tabela 3 – Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a $\beta$ CD, CCP, MM e CCP/ $\beta$ CD. ....	48
Tabela 4 – Sinais de RMN de $^1\text{H}$ (a 400 MHz) do CCP e CCP na presença de $\beta$ CD em $\text{D}_2\text{O}$ a $27^\circ\text{C}$ . ....	53
Tabela 5 – B97D/6-31G(d,p) Energia de complexação ( $\Delta_{\text{dft}}E$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta_{\text{dft}}G$ ) do complexo formado pelo CCP e $\beta$ CD calculados em fase aquosa. ....	56
Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos da interação de $\beta$ CD 10,0 mM titulado em CCP 0,5 mM. ....	60
Tabela 7 – Variáveis cinéticas do contato do CCP e CCP/ $\beta$ CD contra <i>S. aureus</i> cepas ATCC e clínica. ....	71
Tabela 8 – Parâmetros termodinâmicos da interação de CCP e CCP/ $\beta$ CD a 122,87 $\mu\text{M}$ em suspensões de <i>S. aureus</i> cepas ATCC e clínica. ....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta$ CD	$\beta$ -ciclodextrina
ATCC	American Type Culture Collection
CCP	Cloreto de Cetilpiridínio
CD	Ciclodextrina
CI	Complexo de inclusão
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração micelar crítica
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DLS	Espalhamento de Luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Análise térmica diferencial
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
ITC	Titulações Calorimétricas Isotérmicas
KBr	Brometo de potássio
MELD	Micro-eletoforese laser-doppler
MH	Caldo Mueller Hinton
MM	Mistura mecânica
MRSA	<i>S. aureus</i> Meticilina Resistentes

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
PBS	Phosphate buffered saline ou tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial zeta
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	Rotating frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
SAMR	<i>S. aureus</i> Meticilina Resistentes
TGA	Termogravimetria
UFC	Unidade formadora de colônia

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
$\alpha$	Grau de dissociação micelar
$\nu$	Estiramento
$\delta$	Deformação
$\eta$	Viscosidade dinâmica (Pa.s)
$\Delta\delta$	Varição no deslocamento químico dos hidrogênios
$\Delta m$	Varição da massa
$\Delta_{mic}G^\circ$	Varição da energia livre de Gibbs de micelização
$\Delta_{mic}S^\circ$	Varição da entropia de micelização
$\Delta_{inj}H^\circ$	Varição da entalpia de micelização
°C	Grau Celsius
cm	Centímetros
D	Coeficiente de difusão translacional
$dV\%/dt$	Taxa (velocidade) de redução da viabilidade
g	Gramas
H	Hidrogênio
$K_a$	Constante de equilíbrio aparente
$K_B$	Constante de Boltzmann
kJ	Kilojoules
mL	Mililitros
mg	miligrama
$\mu\text{L}$	Microlitro
mM	Milimolar

Nap	Estequiometria aparente
nm	Nanômetro
R <sub>h</sub>	Raio hidrodinâmico da partícula ou agregado molecular
T	Temperatura
V <sub>%t</sub>	Percentual de viabilidade celular em um tempo $t$ qualquer
V <sub>%(t=0)</sub>	Porcentagem de viabilidade celular no tempo $t = 0$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	ANTIMICROBIANOS VERSUS MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES	19
1.2	O CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO	20
1.3	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	21
1.4	SACARÍDEOS COMO DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
3.1	MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES UTILIZADOS	28
3.2	DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS	28
3.3	PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO E MISTURA MECÂNICA	29
3.4	CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS	30
3.4.1	<b>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b>	30
3.4.2	<b>Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)</b>	31
3.4.3	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b>	31
3.4.4	<b>Modelagem molecular</b>	32
3.5	CARACTERIZAÇÕES TERMODINÂMICA	33
3.5.1	<b>Titulações condutimétricas</b>	33
3.5.2	<b>Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)</b>	33
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS	34
3.6.1	<b>Teste de atividade antimicrobiana</b>	34
3.6.2	<b>Cinética de morte bacteriana</b>	37
3.6.3	<b>Estudo coloidal da interação fármaco-membrana</b>	38
3.6.4	<b>Estudo termodinâmico de interação fármaco-membrana</b>	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO	41
4.1.1	<b>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b>	41
4.1.2	<b>Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)</b>	45
4.1.3	<b>Caracterização estrutural por RMN</b>	49

4.1.4	Modelagem Molecular .....	55
4.1.5	Titulações condutimétricas .....	56
4.1.6	Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC) – estudo de complexação: Titulação da $\beta$ CD em CCP .....	57
4.1.7	Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC) – estudo de micelização do CCP na ausência e na presença de $\beta$ CD .....	61
4.2	ESTUDO DAS INTERAÇÕES DO CCP COM MICRORGANISMOS.....	67
4.2.1	Teste de atividade antimicrobiana .....	67
4.2.2	Cinética de morte bacteriana.....	69
4.2.3	Estudos de interação fármaco-membrana .....	71
4.2.4	Estudo termodinâmico de interação fármaco-membrana.....	74
5	CONCLUSÃO .....	79
	BIBLIOGRAFIA .....	81

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ANTIMICROBIANOS VERSUS MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

A alta ocorrência de microrganismos multirresistentes é considerada um problema de saúde global, sendo a presença e disseminação desses organismos documentada com mais frequência nas últimas décadas, principalmente em ambientes destinados ao cuidado da saúde das pessoas (GONTIJO FILHO et al., 2016; MAAMAR; HU; HARTMANN, 2019). Nesse contexto, os antimicrobianos representam uma preciosa reserva terapêutica, sendo necessário sua proteção através de programas e medidas políticas que limitem seu uso inadequado não apenas em humanos como também em animais e na produção de alimentos. Isso porque existe possibilidade real para o século XXI do estabelecimento de uma era pós-antibiótico, em que infecções comuns e simples lesões poderão se tornar graves problemas de saúde pública em função da resistência dos microrganismos aos antibióticos disponíveis (PINCUS et al., 2015; SWITZERLAND, 2014).

Os benefícios proporcionados pelo uso dos antimicrobianos no controle dos patógenos humanos é difícil de se estimar. Contudo, o uso contínuo e indiscriminado desses compostos leva à pressão seletiva pelo desenvolvimento de mecanismos de tolerância e/ou resistência. Tais mecanismos incluem especialmente, dentre outras formas de adaptações, mutações específicas em genes, aquisição de mecanismo de resistência de outros microrganismos via troca de material genético. Nas últimas décadas tem-se percebido um enorme crescimento na incidência de resistência aos antibióticos frente à descoberta de novos compostos (ITO et al., 2003; LANGDON; CROOK; DANTAS, 2016; LEVIN-REISMAN et al., 2017; MEOUCHE; DUNLOP, 2018).

Estima-se que em 2015, os patógenos resistentes a antibióticos causaram mais de 50.000 mortes na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA.), devendo chegar a 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo até 2050 (LANGDON; CROOK; DANTAS, 2016).

Alternativas devem ser encontradas com uso restrito desses compostos a situações em que estes forem imprescindíveis, buscando estratégias de formulações

com mínimos efeitos adversos e que tenham suas ações direcionadas ao patógeno de interesse, aos seus mecanismos de virulência, preservando inclusive os microrganismos comensais importantes para a homeostase do hospedeiro (LANGDON; CROOK; DANTAS, 2016).

## 1.2 O CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO

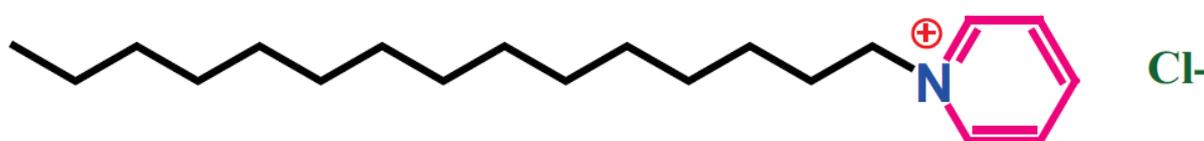
Surfactantes são compostos caracterizados por apresentarem na mesma molécula, uma região hidrocarbônica, de baixa solubilidade aquosa e um grupamento hidrofílico, com elevada afinidade à água (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Essa dualidade lhes confere a capacidade de interagir simultaneamente com substâncias polares e apolares, se adsorvendo em superfícies e se auto-organizando em estruturas como as micelas, vesículas e bicamadas. Por essas razões, os surfactantes são capazes de reduzir a energia livre de Gibbs superficial (tensão superficial) entre as fases líquido-líquido, líquido-sólido e líquido-gás, favorecendo a dissolução de substâncias hidrofóbicas como drogas, corantes, polímeros e óleos (ALVES et al., 2014; KARAYIL et al., 2016).

Os compostos de amônio quaternário são largamente utilizados em indústrias de alimentos e domicílios como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbicida (por exemplo, desinfecção pré-operatória de pele íntegra, aplicação em mucosas e desinfecção de superfícies não críticas) (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O Cloreto de Cetilpiridínio – CCP (Figura 1) é um surfactante catiônico, já utilizado nos EUA como colutório há mais de 70 anos, possuindo atividade biocida contra um largo espectro de bactérias da cavidade oral (ALVES et al., 2012; RASIC et al., 2019).

Figura 1 – Fórmula estrutural do Cloreto de Cetilpiridínio.



Fonte: Karayil et al. (2016).

Por ser catiônico, o surfactante CCP pode interagir com a membrana celular bacteriana através de interações eletrostáticas com fosfolipídios negativamente carregados, resultando na perda de componentes celulares, perturbação do metabolismo, inativação de canais iônicos, inibição do crescimento celular e consequente morte da célula (PARASKEVAS, 2005; ALVES et al., 2012; ALVES et al., 2014).

Salton (1968) propôs a seguinte sequência de eventos com microrganismos expostos a agentes surfactantes (detergentes): (i) adsorção e penetração através dos poros da parede celular (no caso de microrganismos que possuem esta estrutura); (ii) interação com a membrana lipoproteica seguida da desorganização da membrana citoplasmática; (iii) perda de metabólitos de baixo peso molecular como aminoácidos, purinas, pirimidinas, nucleotídeos e íons; (iv) degradação de proteínas e ácidos nucléicos e (v) lise da parede causada por enzimas autolíticas. Com isso, acontece a perda da estrutura organizacional e integridade da membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e enzimas, juntamente com outros efeitos prejudiciais à célula bacteriana (ALVES et al., 2012; SALTON, 1968).

### 1.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dentre as bactérias Gram positivas, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que apesar de constituir frequentemente a microbiota humana normal é um importante patógeno que causa uma grande variedade de infecções clínicas. É uma das principais causas de bacteremias e outras infecções como endocardite, osteoarticulares, de pele e de tecidos moles, pulmonares, meningites, relacionadas a dispositivos invasivos, podendo ser oportunista e frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem disseminar para diferentes tecidos provocando focos metastáticos (TONG et al., 2015).

Os tratamento efetivo contra os *S. aureus* tem se tornado desafiador devido à crescente incidência de cepas multidrogas resistentes, com destaque para os *S. aureus* Meticilina resistentes – SAMR ou MRSA. A resistência pode ser adquirida por

influência do meio onde estão inseridos ou transferida de uma bactéria para outra quando os mecanismos de resistência são incorporados ao material genético, possibilitando a seleção destes microrganismos e sua disseminação nos diversos ambientes hospitalares e extra hospitalares (HIBBITTS; O'LEARY, 2018; HUANG et al., 2006; JOHNSON, 2011; JONES et al., 2007; PINCUS et al., 2015).

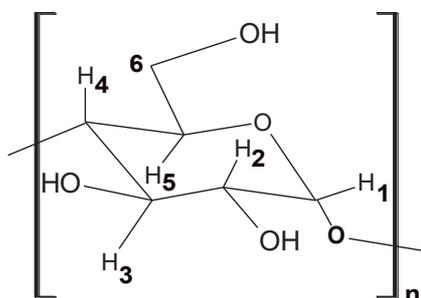
O *S. aureus* é um microrganismo capaz de produzir adaptações na composição de sua membrana e parede celular, modulando carga positiva de superfície como forma de protegê-los contra a interação e inserção de antimicrobianos catiônicos. Além disso, podem alterar seu perfil de carotenóides, modificando a consistência da membrana (fluidez *versus* rigidez) para uma melhor resistência contra peptídeos antimicrobianos (BERTSCHE et al., 2011; JONES et al., 2007; MISHRA; BAYER, 2012; MISHRA et al., 2009). Dessa forma, o entendimento dos mecanismos de interação de fármacos com membranas celulares, com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para controle desses microrganismos pode ser potencialmente promissora.

#### 1.4 SACARÍDEOS COMO DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Para reduzir os inconvenientes da resistência bacteriana e instabilidade química de substâncias bem como minimizar os efeitos prejudiciais, têm sido propostos sistemas de encapsulação molecular de antimicrobianos baseados nos mais diversos tipos de matrizes, como lipossomas, cerâmicas, compósitos, biomoléculas, polímeros iônicos e não iônicos, complexos de coordenação, ciclodextrinas (CDs), nanoesferas, etc. No entanto, o desenvolvimento eficiente desses sistemas requer um minucioso estudo visando compreender a adsorção molecular e interação que existe entre a membrana de uma célula alvo e o medicamento. Diante da busca pelo aprimoramento de formulações existentes, a fim de melhorar a sua ação e do desenvolvimento de compostos mais potentes e menos tóxicos, uma estratégia promissora é a complexação desses com CDs (SUÁREZ et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014).



Figura 3 – Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira.



Fonte: Paula et al. (2011).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas naturais.

Propriedades	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25°C)	14,5	18,5	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	13,7	15,3	16,9
Altura da estrutura (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Volume aproximado da cavidade (Å)	174	262	427
pKa (25°C)	12,33	12,20	12,08

Fonte: Moreira (2016).

Nas CDs, a face externa apresenta um maior número de hidroxilas, conferindo a esta região um caráter hidrofílico. A presença de uma cavidade em sua estrutura permite recepcionar uma variedade de moléculas em seu interior, conferindo vantajosas modificações nas características físicas e químicas da molécula hóspede, como maior estabilidade térmica e química, baixa toxicidade e maior solubilidade, preservando a natureza de sua composição (GALVÃO et al., 2015; VYAS; SARAF; SARAF, 2008).

Esses complexos formados pelas CDs são conhecidos como do tipo hóspede/hospedeiro ou ainda, complexos de inclusão (CI). Na formação destes complexos, as moléculas de água presentes na cavidade da CD hospedeira são trocadas pelas moléculas da substância hóspede, mais hidrofóbicas, obtendo uma associação mais estável energeticamente. Nenhuma ligação covalente é quebrada ou originada durante este processo (SZEJTLI, 1998; THOMPSON, 1997).

Esta tecnologia possui um amplo espectro de aplicações em várias áreas, como por exemplo, na identificação seletiva de espécies químicas, adsorção de moléculas bioativas a tecidos, detoxificação, atenuação de sabores e/ou odores desagradáveis, redução da volatilidade, além de aplicações na área farmacêutica visando a melhoria nas propriedades físico-químicas de fármacos e/ou a liberação controlada (ASANUMA et al., 2001; CATHUM et al., 2005; DEL VALLE, 2004; LI; PURDY, 1992; VIGLIANTI et al., 2006).

Considerando que a complexação molecular altera propriedades físico-químicas de fármacos como solubilidade e capacidade de interação com o ambiente, o presente trabalho tem como objetivo o encapsulamento molecular do CCP em  $\beta$ CD, uma vez que o complexo assim formado pode interagir com membranas bacterianas através de novos mecanismos, com perspectivas ao aumento na eficiência do fármaco (melhorar a potência, reduzir os efeitos adversos).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização físico-química da composição nanoestruturada do antimicrobiano Cloreto de Cetilpiridínio com  $\beta$ -ciclodextrina, bem como a avaliação da atividade antimicrobiana e mecanismo de interação do complexo com membranas bacterianas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o complexo de inclusão entre o antimicrobiano CCP e a  $\beta$ CD;
- Caracterizar a formação dos complexos, em fase sólida, por meio de análise térmica e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR);
- Através de titulações condutimétricas comparar a condutividade do CCP e CCP/ $\beta$ CD, monitorar o processo de micelização e determinar a concentração micelar crítica (cmc) do CCP, bem como avaliar o grau de dissociação das micelas ( $\alpha$ ) na ausência e na presença de  $\beta$ CD;
- Avaliar as interações intermoleculares no complexo de inclusão, em solução, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e ROESY- Rotating frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy);
- Avaliar alterações nas propriedades termodinâmicas em decorrência da complexação do CCP com  $\beta$ CD por microcalorimetria – Titulações Calorimétricas Isotérmicas (ITC);
- Através de cálculos teóricos propor a modelagem molecular mais provável para o sistema CCP/ $\beta$ CD;
- Executar testes de atividade antimicrobiana da formulação CCP/ $\beta$ CD com *S. aureus*;

- Avaliar a interação do CCP com a membrana celular de *S. aureus* na ausência e na presença da  $\beta$ CD;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES UTILIZADOS

A amostra de CCP foi comprada da Dinâmica, fórmula  $C_{21}H_{38}ClN.H_2O$ , massa molar 358,00 g/mol, de qualidade P.A. e utilizada sem nenhum tratamento.

A  $\beta$ CD foi comprada da Sigma-Aldrich, fórmula  $C_{42}H_{70}O_{35}$ , massa molar 1134,98 g/mol, com pureza para fins analíticos.

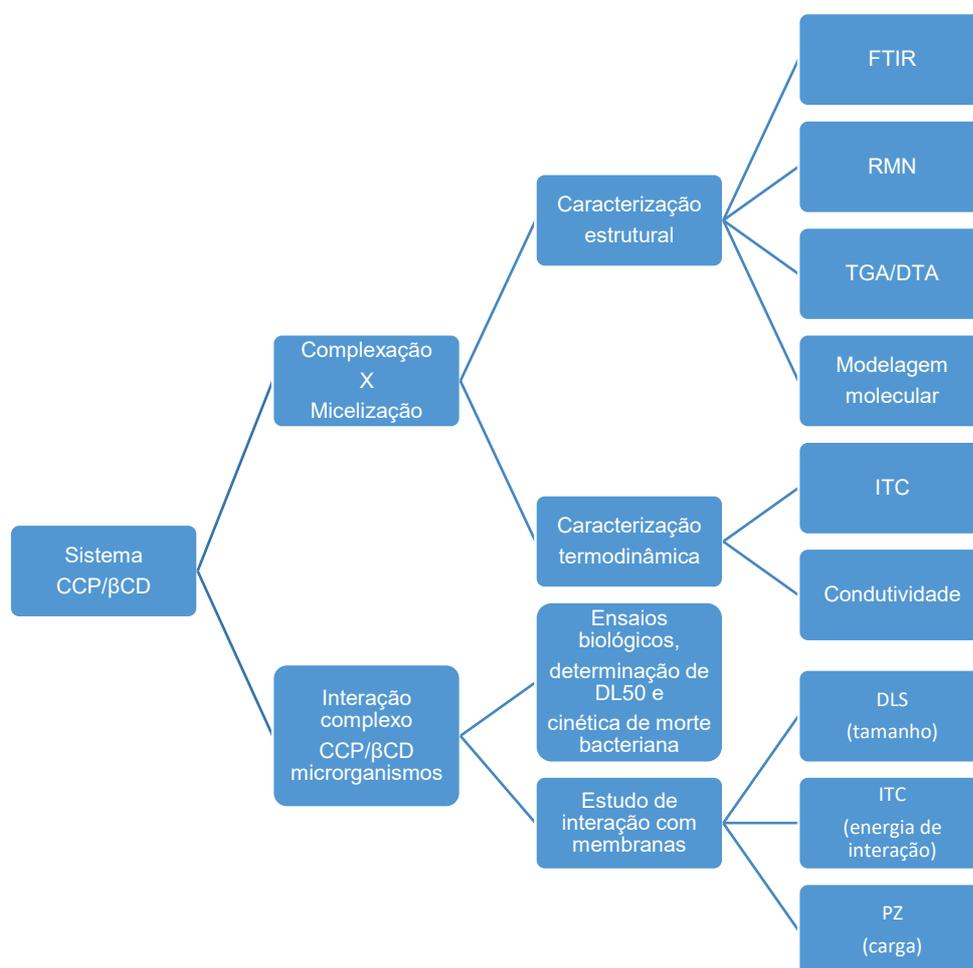
O solvente dimetilsulfóxido P.A./ACS – DMSO foi adquirido da empresa NEON (NEON COMERCIAL LTDA), fórmula  $(CH_3)_2SO$ , peso molecular 78,13 g/mol.

Os demais reagentes utilizados nos experimentos foram todos com grau P.A. Sempre que a água era utilizada como diluente, a mesma era obtida imediatamente antes de seu uso, em processo de filtração para obtenção de água reagente Tipo I (Merck Millipore). Todos os reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento.

#### 3.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

De forma a facilitar o entendimento do trabalho, foi elaborado um fluxograma no qual estão apresentadas as etapas de síntese, caracterização e os ensaios biológicos que foram desenvolvidos (Figura 4). Para uma melhor organização do projeto ele foi estruturado em duas partes – caracterização e ensaios biológicos. Na etapa de caracterização do complexo de inclusão, as análises foram separadas de acordo com o estado físico da amostra. Os ensaios biológicos são aqueles que avaliaram a atividade antimicrobiana e a análise da interação da membrana bacteriana com o CCP na ausência e presença de  $\beta$ CD.

Figura 4 – Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 3.3 PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO E MISTURA MECÂNICA

O complexo de inclusão foi preparado usando quantidades equimolares da molécula hóspede e de  $\beta$ CD baseados nos métodos de co-precipitação/liofilização (CAO; GUO; PING, 2005; CHOWDARY; SHANKAR; TANNIRU, 2014; LULA et al., 2012).

Em béqueres separados, foram preparadas soluções da  $\beta$ CD e do CCP de mesma concentração molar. As substâncias foram dissolvidas em água,

separadamente. As soluções foram misturadas e mantidas sob agitação por 24h e em seguida congeladas e rotaevaporadas.

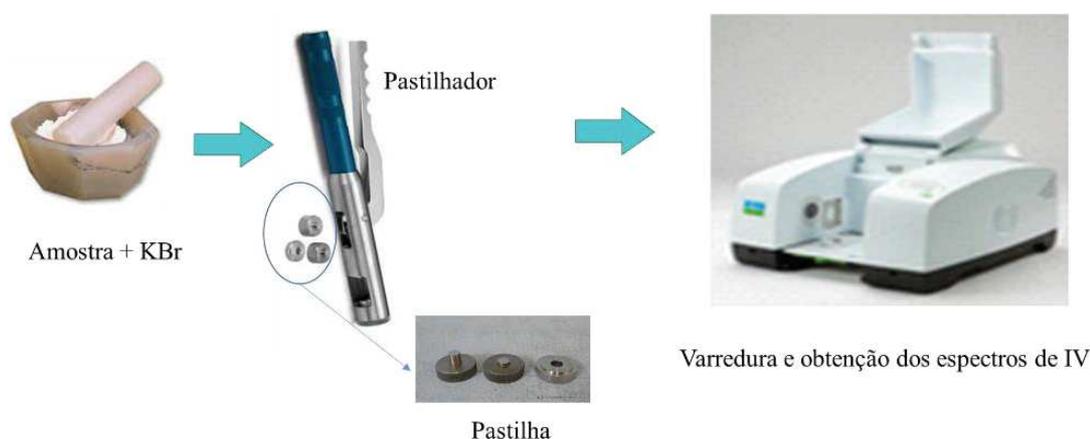
A mistura mecânica (MM) do CCP com a  $\beta$ CD foi preparada também na proporção molar de 1:1, sendo homogeneizada mecanicamente.

### 3.4 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS

#### 3.4.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho médio ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) da molécula hóspede CCP, da  $\beta$ CD, da MM e do CCP/ $\beta$ CD foram obtidos em equipamento de Infravermelho da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM. Foram preparadas pastilhas em KBr contendo a  $\beta$ CD, o CCP, o CCP/ $\beta$ CD e a mistura mecânica. Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , e intervalo de onda de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA) para edição.

Figura 5 – Esquema do experimento para obtenção dos espectros de infravermelho.



Fonte: Almeida (2018).

### 3.4.2 Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)

A análise térmica da  $\beta$ CD, CCP, do CCP/ $\beta$ CD e da MM foi realizada em um módulo termogravimétrico TGA/DTA STA 7200 RV da Hitachi. As condições de análises foram: atmosfera de ar, a 300,0 mL/min, com rampa de temperatura de 35 a 800 °C e uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, e massa aproximada de  $\approx$  6,0 mg do analito em cadinho de platina. Como referência foi utilizado o cadinho de platina vazio.

### 3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas utilizadas para a caracterização estrutural de moléculas e complexos de moléculas tanto em solução quanto no estado sólido. Essa técnica é capaz de fornecer parâmetros relacionados à disposição espacial de grupos funcionais de moléculas ou complexos, bem como dados relativos à dinâmica molecular (ALVES et al., 2014; PAULA et al., 2011; SCHNEIDER et al., 1998).

As análises de  $^1\text{H}$ -RMN do CCP, da  $\beta$ CD e CCP/ $\beta$ CD e experimento de 2D-ROESY do complexo foram realizadas por colaboradores do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker DRX400 – série AVANCE, a 400 MHz. As amostras foram dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os espectros foram editados utilizando o programa MestReC® (PAULA et al., 2011).

No presente trabalho foram realizados os seguintes experimentos de RMN:

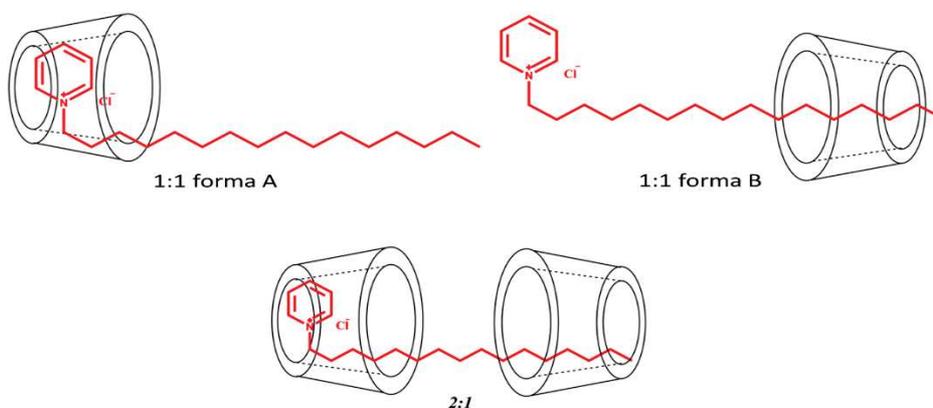
1. RMN de hidrogênio –  $^1\text{H}$ : caracterização estrutural das espécies utilizadas e análises de variações de deslocamento químico ( $\delta$ );
2. Experimentos de 2D-ROESY para avaliar a estrutura do complexo formado.

### 3.4.4 Modelagem molecular

A modelagem molecular foi realizada por colaboradores do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco. Os cálculos teóricos foram realizados via *Density Functional Theory* (DFT) utilizando a mecânica quântica através do programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009).

Foram assumidas duas orientações para a estequiometria 1:1 (CCP/ $\beta$ CD) na formação do complexo: a forma A quando o anel aromático do CCP estava dentro da cavidade da  $\beta$ CD e a forma B quando a cadeia hidrocarbônica do CCP estava dentro da cavidade da  $\beta$ CD. A orientação proposta para a relação 1:2 (CCP/ $\beta$ CD) tinha o CCP dentro de duas moléculas de  $\beta$ CD (Figura 6).

Figura 6 – Orientações iniciais propostas para as estruturas 1:1 e 1:2 CCP/ $\beta$ CD para o DFT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As geometrias iniciais para moléculas isoladas de CCP e  $\beta$ CD foram totalmente otimizadas via método DFT, com funcional B97D e conjunto de funções de base 6-31G(d,p) (GRIMME; EHRLICH; GOERIGK, 2011). Além disso, as três orientações dos complexos CCP/ $\beta$ CD foram também totalmente otimizadas no mesmo nível de teoria. B97D cálculos de frequência harmônica foram realizados para as três formas de CPC/ $\beta$ CD identificando valores mínimos da energia potencial de superfície.

O efeito do solvente (água) foi considerado utilizando o modelo contínuo polarizado (IEFPCM). No meio aquoso, o efeito do solvente é substituído por sua constante dielétrica (para água  $\epsilon = 78,39$ ). O soluto é inserido dentro da cavidade da molécula.

### 3.5 CARACTERIZAÇÕES TERMODINÂMICA

#### 3.5.1 Titulações condutimétricas

Titulações condutimétricas foram realizadas utilizando-se um condutivímetro Mettler Toledo, com 51 injeções manuais de 100,0  $\mu\text{L}$  de soluções contendo CCP a 30,0 mM em 30,0 mL de água ou em soluções de diferentes concentrações de  $\beta\text{CD}$  (1,0, 2,0 e 4,0 mM), com objetivo de se monitorar o processo de micelização, determinando tanto a cmc como o grau de dissociação das micelas ( $\alpha$ ) na ausência e na presença de  $\beta\text{CD}$ . O grau de dissociação foi determinado pela razão dos coeficientes angulares das curvas de titulação antes e após a cmc.

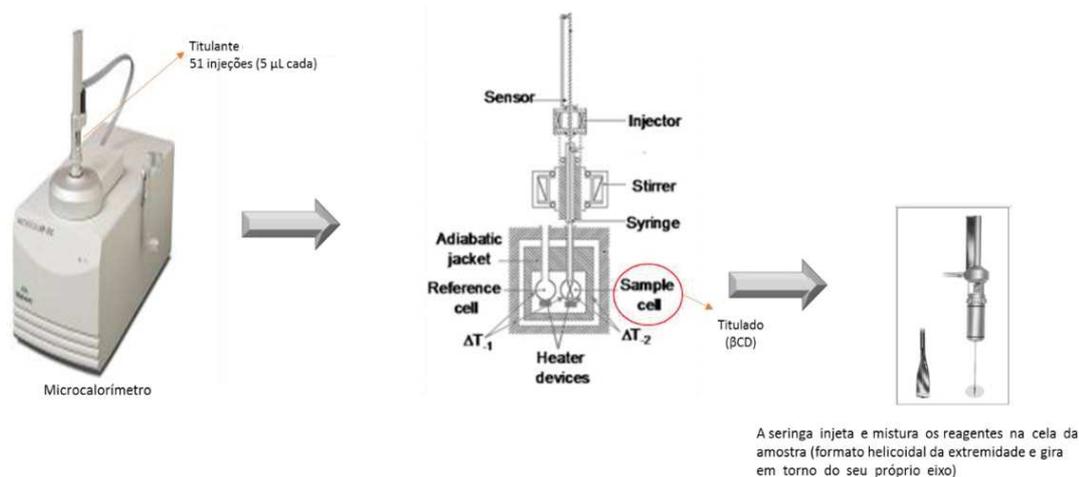
Titulações condutimétricas também foram usadas para avaliar a micelização do composto de inclusão. Para isso, foi realizada uma titulação condutimétrica com injeções de 200,0  $\mu\text{L}$  de soluções CCP/ $\beta\text{CD}$  ou CCP a 10,0 mM em 30,0 mL de água.

#### 3.5.2 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)

Titulações calorimétricas isotérmicas foram realizadas em um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal (Figura 7) utilizando os seguintes parâmetros experimentais: 51 injeções automáticas, sendo a primeira de 1,0  $\mu\text{L}$  e as demais de 5  $\mu\text{L}$  de titulante (solução aquosa de  $\beta\text{CD}$  a 10,0 mM) em 1,5 mL do titulado (solução aquosa de CCP a 0,5 mM) à temperatura de 25 °C. A primeira injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a cela e vice-versa. Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos a fim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos

compostos com o solvente. O experimento foi realizado em duplicata e os dados tratados com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 7 – Representação esquemática do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal.



Fonte: Almeida (2018).

Foram realizadas também as medidas de ITC invertendo as soluções de titulante e titulado, com o objetivo de se avaliar o efeito da  $\beta$ CD na cmc do CCP. Sendo assim, solução de CCP a 30,0 mM foi titulada em soluções de  $\beta$ CD em diferentes concentrações (0, 1,0, 2,0 e 4,0 mM), sendo os seguintes parâmetros experimentais: 51 injeções, sendo a primeira de 1,0  $\mu$ L e as demais de 5,0  $\mu$ L (solução aquosa de CCP a 30,0 mM) em 1,5 mL do titulado (solução aquosa de  $\beta$ CD). O experimento foi realizado em duplicata e os dados tratados com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0.

## 3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 3.6.1 Teste de atividade antimicrobiana

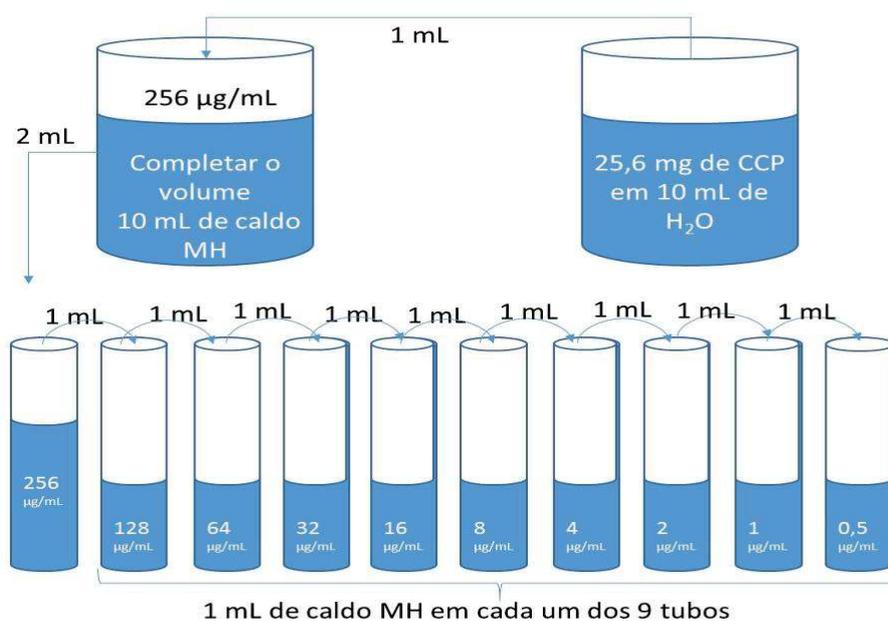
Os testes antimicrobianos foram realizados de acordo com os critérios do *Clinical & Laboratory Standards Institute* – CLSI, com a determinação da concentração

inibitória mínima necessária para reduzir em 50% a viabilidade (dose letal média –  $DL_{50}$ ) das bactérias por método de microdiluição.

O teste da  $DL_{50}$  foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan (1927) para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* - FDA, responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (VALADARES, 2006).

Foram testadas as seguintes concentrações de CCP e CCP/ $\beta$ CD em  $\mu\text{g/mL}$ : 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25. Para isso, pesou-se 25,6 mg de CCP dissolvendo em 10 mL de água, sendo essa solução posteriormente filtrada em filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$ . Em seguida foi feita a diluição 1:10 em Caldo Mueller Hinton (MH) estéril, obtendo-se o CCP na concentração de 256  $\mu\text{g/mL}$ , realizando diluições seriadas 1:2 até a concentração de 0,50  $\mu\text{g/mL}$ , esquematicamente descrito na Figura 8.

Figura 8 – Preparo das diluições para teste de atividade antimicrobiana.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Para preparo das soluções de CCP/ $\beta$ CD, foram pesados 106,8 mg deste complexo, peso este que correspondente à mesma massa nominal de CCP na solução final preparada com o CCP puro, visando fixar a concentração molar do composto, deixando como variável a ausência ou presença de  $\beta$ CD. Os diluentes, meio de cultura e procedimentos de preparo e diluições foram os mesmos utilizados para o CCP puro descrito no parágrafo anterior.

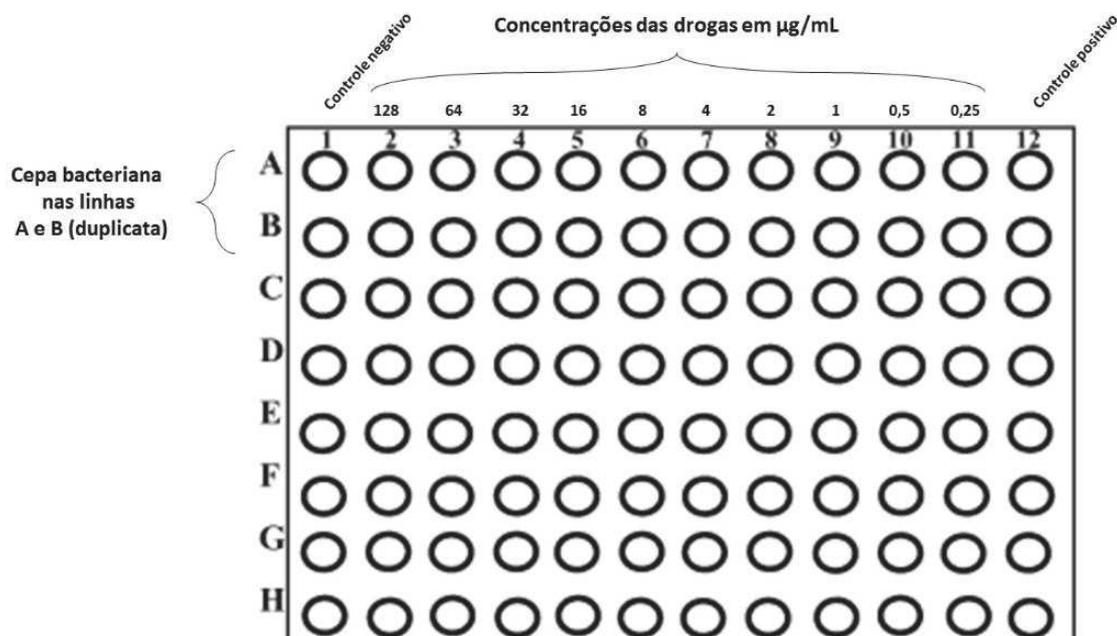
Foi transferido para cada poço da placa previamente identificada, 100  $\mu$ L das soluções das drogas em suas diversas diluições, sempre em ordem decrescente de concentração. Os testes para cada cepa testada com CCP e com CCP/ $\beta$ CD foram realizados em duplicata, sendo então utilizadas duas linhas de poços na placa.

Para determinação da  $DL_{50}$ , os inóculos bacterianos de *S. aureus* cepa de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) de número 29923 e cepa clínica (obtida de cultura de amostra biológica humana) foram preparados em solução salina estéril com colônias de bactérias repicadas 24 horas antes do experimento, tendo como referência o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL. Essa suspensão foi então diluída 1:10 (ou seja,  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) no meio de cultura Caldo Mueller Hinton estéril, estando pronta para ser colocada nas placas. Como nos poços das placas os inóculos foram novamente diluídos 1:2 com o meio MH contendo a droga teste, a concentração final bacteriana foi de  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL.

Foi adicionado a cada poço contendo o CCP e o CCP/ $\beta$ CD em diferentes concentrações, 100,0  $\mu$ L da suspensão do inóculo bacteriano. Em todos os testes antimicrobianos foram realizados os controles positivo e negativo, sendo os poços preenchidos respectivamente pelo inóculo mais o meio de cultura, e apenas o meio de cultura. Na Figura 9 tem-se o desenho de montagem de uma placa teste.

As placas foram submetidas à incubação durante 24 horas em estufa a 37 °C permitindo o contato das suspensões bacterianas com o CCP na ausência e na presença da  $\beta$ CD.

Figura 9 - Desenho de placa utilizada para determinação da DL<sub>50</sub>.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Passado o período de incubação, foram retirados de cada poço da placa teste 100,0 µL de suspensão, sendo este volume desprezado. Com proteção de exposição direta à luz, foram então adicionados em cada poço 20,0 µL de solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) na concentração de 2,5 mg por mL de PBS (*phosphate buffered saline* ou tampão fosfato-salino) previamente filtrados em filtro seringa de 0,22 µm. A placa foi então envolvida por papel alumínio e novamente incubada durante 2 horas em estufa a 37 °C.

Terminado o novo período de incubação, foram adicionados em cada poço 100,0 µL de DMSO, para posterior medição de absorbância no comprimento de onda 570 nm em leitor de placas, sendo considerado a DL<sub>50</sub> a concentração que reduziu em 50% a viabilidade celular.

### 3.6.2 Cinética de morte bacteriana

Os inóculos bacterianos de *S. aureus* cepa de referência ATCC de número 29923 e cepa clínica foram preparados em solução salina estéril tendo como

referência o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL. Esta suspensão foi então diluída a 1:10 (ou seja,  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) no meio de cultura MH estéril, estando pronta para ser colocada nas placas. Como nos poços das placas os inóculos foram novamente diluídos 1:2 com o meio MH contendo a droga teste, a concentração final bacteriana foi de  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL.

Após os procedimentos, foram testadas as seguintes concentrações de CCP e CCP/ $\beta$ CD (considerando a massa do complexo correspondente ao CCP) em  $\mu\text{g/mL}$ : 32, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5. Também foram realizados em cada placa controles negativo e positivo para validação dos testes. As diluições foram preparadas do mesmo modo como aquelas utilizadas no teste de  $DL_{50}$  anteriormente descritas.

Os tempos em horas de incubação em estufa a  $37^\circ\text{C}$  utilizados foram de 0, 4, 8, 12, 18 e 24, período este em que a suspensão bacteriana ficava em contato com as soluções contendo o CCP na ausência e na presença de  $\beta$ CD. Após o término de cada período de incubação, era realizada a leitura assim como descrito na determinação da  $DL_{50}$ , ou seja, resumidamente era adicionada a solução de MTT, realizada nova incubação, adicionado o DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro.

### **3.6.3 Estudo coloidal da interação fármaco-membrana**

A avaliação da interação fármaco-membrana, do ponto de vista coloidal, foi realizada através da medida do diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ), do potencial zeta (PZ) das células, na ausência e na presença do fármaco e seu complexo de inclusão, de acordo com metodologia descrita na literatura (MONTEIRO et al., 2011; SUÁREZ et al., 2014).

Os experimentos foram realizados no módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern (figura 10), a  $25^\circ\text{C}$ , com termostatização via sistema Peltier. As amostras contendo as suspensões bacterianas foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de  $90^\circ$ . O  $D_h$  das bactérias foi determinado pela média de quatro medidas independentes, cada uma delas obtida a

partir da média de cinco contagens. Para os experimentos, foram preparadas soluções a 122,87  $\mu\text{M}$  em solução de CCP e CCP/ $\beta\text{CD}$ . Foram realizadas 30 injeções de 10,0  $\mu\text{L}$  desta solução em 1,5 mL de suspensão de bactérias.

Figura 10 – Zetasizer Nano ZS90 da Malvern.



Fonte: Almeida (2018).

A concentração molar do CCP e do CCP/ $\beta\text{CD}$  foram calculadas de forma que na metade das injeções, ou seja, após a adição de 150,0  $\mu\text{L}$ , a concentração das drogas na cubeta fosse de 4  $\mu\text{g/mL}$  de CCP, correspondente à concentração inibitória mínima – CIM, encontrada para a bactéria em estudo. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina estéril com turvação equivalente ao tubo 1 da escala Mc Farland, sendo posteriormente diluídas com salina estéril 1:3, obtendo-se um número aproximado de  $10^8$  bactérias por mL. As suspensões foram preparadas com colônias de bactérias repicadas 24 horas antes do experimento, sendo que os testes com CCP e CI foram realizados em sequência em uma mesma suspensão de origem, no mesmo dia, como forma de evitar a variável número de bactérias/mL. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

Na determinação do PZ foram preparadas suspensões similares às utilizadas no experimento de tamanho hidrodinâmico citado acima. Cada uma das suspensões bacterianas foi vertida em uma cubeta de vidro na qual é imersa a célula de medida (Dip Cell) e avaliada pelo módulo Zetasizer Nano-ZS 90 por meio da técnica de micro-

eletroforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a  $173^\circ$  e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski. O valor final do potencial foi calculado como a média de cinco medidas independentes com cinco contagens cada e o tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

#### **3.6.4 Estudo termodinâmico de interação fármaco-membrana**

Experimentos termodinâmicos de interação fármaco-membrana foram realizados através da medida do calor envolvido na interação do fármaco e seu respectivo composto de inclusão com as membranas bacterianas, de forma similar ao descrito na literatura (MONTEIRO et al., 2011; SUÁREZ et al., 2014). Através de medidas de calor de interação, foi possível investigar o mecanismo pelo qual o fármaco e seu composto de inclusão afetam as membranas celulares. Os experimentos foram realizados em um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal.

Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: 51 injeções automáticas, sendo a primeira de 1,0  $\mu\text{L}$  e as demais de 5,0  $\mu\text{L}$  de titulante (solução em salina de CCP e Cl a 3,685 mM) em 1,5 mL do titulado (suspensão bacteriana em salina estéril preparada com turvação equivalente ao tubo 10 da escala de Mc Farland, com número aproximado de  $30,0 \times 10^8$  bactérias por mL) à temperatura de 25  $^\circ\text{C}$ . A primeira injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a cela e vice-versa. Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos a fim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos compostos com o solvente. O experimento foi realizado em duplicata e os dados tratados com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

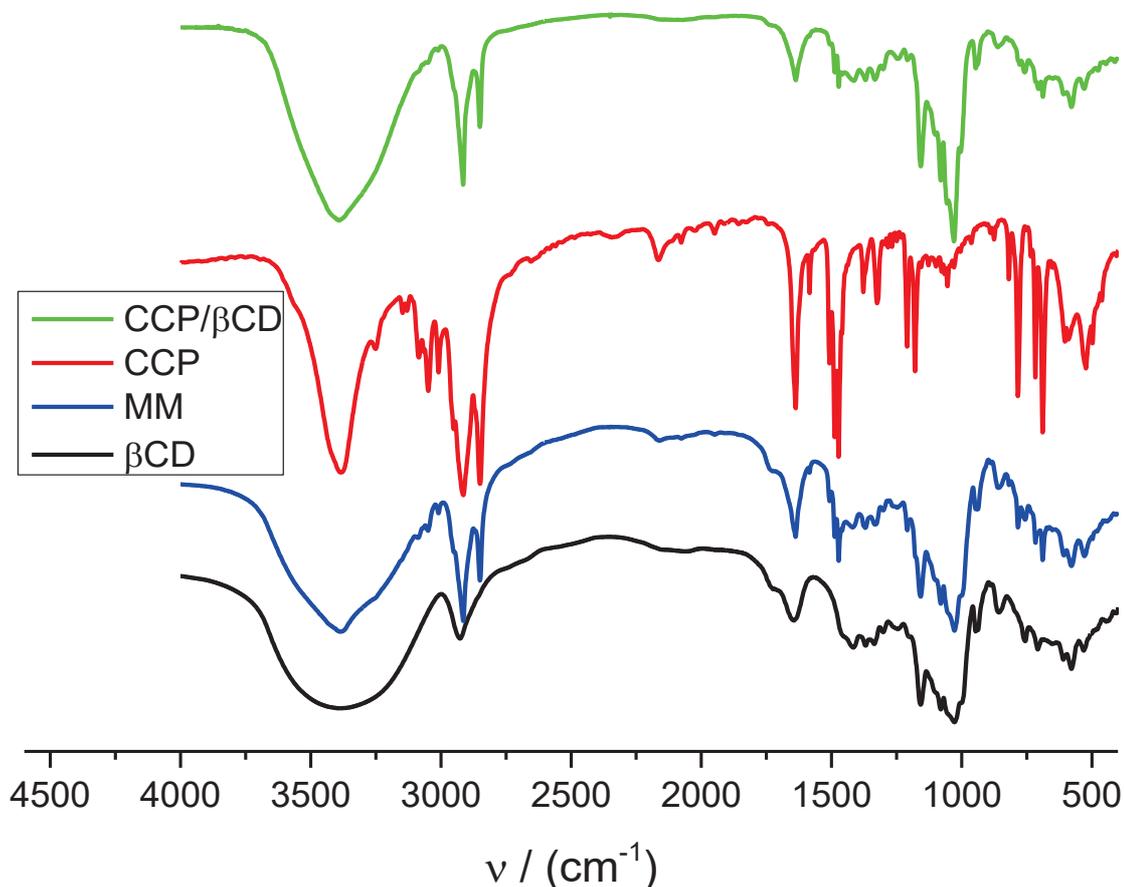
O complexo de inclusão obtido pelo método de liofilização foi caracterizado no estado sólido, por espectroscopia na região do infravermelho e análise térmica. Em solução, foi caracterizado por titulações condutimétricas, espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e ROESY. Também em solução, o processo de formação do composto de inclusão, bem como as interações intermoleculares envolvidas no processo, foram avaliadas por ITC. Foi também proposto a modelagem molecular mais provável de acordo com as características das moléculas de CCP e  $\beta\text{CD}$ .

#### 4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As interações entre a ciclodextrina com moléculas hóspede leva a alterações no momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais destas moléculas pela penetração das moléculas na cavidade da ciclodextrina, alterando conseqüentemente o estado de vibração de cada ligação química. Por essa razão, a espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta importante na caracterização dos complexos de inclusão, devido ao fato de que essas alterações podem se refletir no aumento, redução ou deslocamento das bandas nos espectros de FTIR no estado sólido (LI et al., 2019; RODRÍGUEZ et al., 2015). Neste trabalho, as interações entre o CCP e a  $\beta\text{CD}$  foram identificadas através da comparação dos espectros de FTIR das moléculas livres, da mistura mecânica e do complexo de inclusão.

Na Figura 11 estão apresentados os espectros de infravermelho da  $\beta\text{CD}$ , CCP, MM e CCP/ $\beta\text{CD}$  na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . A MM foi preparada para demonstrar que o produto obtido (CI) apresenta características físico-químicas diferentes da mistura dos dois componentes isolados, sendo necessário um tempo de contato entre as espécies em fase líquida, para que a interação ocorra.

Figura 11 – Espectro de infravermelho do CCP,  $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD, na região 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em pastilhas de KBr.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

No espectro da  $\beta$ CD podemos observar suas bandas características, sendo elas: uma banda associada aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação O-H com mínimo em 3387  $\text{cm}^{-1}$ ; uma banda associada aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-H com mínimo em 2925  $\text{cm}^{-1}$ ; uma banda em 1643  $\text{cm}^{-1}$  associada a deformações O-H de moléculas de água de hidratação; bandas em torno de 1160  $\text{cm}^{-1}$  associada ao estiramento C-O e 1024  $\text{cm}^{-1}$  associada ao estiramento C-O-C; as bandas de absorção na região 950  $\text{cm}^{-1}$  a 650  $\text{cm}^{-1}$  pertencem a deformação das ligações C-H observada para a maioria dos sacarídeos e atribuída às vibrações do anel da piranose e aos estiramentos assimétricos das ligações glicosídicas (NEACŞU et al., 2013; RIZZI et al., 2016).

No espectro do CCP pode-se observar bandas com mínimo em  $3381\text{ cm}^{-1}$  características do estiramento das ligações N-H; banda em  $3050\text{ cm}^{-1}$  que caracteriza C-H de aromáticos, bandas em  $2914\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , que caracterizam o estiramento das ligações C-H de alcanos; bandas em  $1636\text{ cm}^{-1}$  e  $1472\text{ cm}^{-1}$ , que caracterizam as ligações C=C do anel aromático; bandas em  $1210\text{ cm}^{-1}$ ,  $1178\text{ cm}^{-1}$ ,  $785\text{ cm}^{-1}$ ,  $716\text{ cm}^{-1}$  e  $690\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam as dobramento fora do plano de ligações C-H do anel aromático.

No complexo CCP/ $\beta$ CD mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, sugerindo a formação do complexo no estado sólido. Dentre as principais, destacam-se: afinamento da banda de  $\beta$ CD a  $3387\text{ cm}^{-1}$  (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; desaparecimento da banda a  $3050\text{ cm}^{-1}$  do CCP e diminuição das bandas  $1636\text{ cm}^{-1}$  e  $1472\text{ cm}^{-1}$  do CCP, sugerindo confinamento do anel aromático na cavidade da  $\beta$ CD; atenuação de bandas do CCP em torno de  $2850\text{ cm}^{-1}$ ; desaparecimento da banda  $1210\text{ cm}^{-1}$  do CCP; mudança no perfil da banda  $1024\text{ cm}^{-1}$  associada a  $\beta$ CD; diminuição com quase desaparecimento das bandas do CCP na região de  $785\text{ cm}^{-1}$  a  $690\text{ cm}^{-1}$ .

Na MM as mudanças foram menos significativas nas posições das principais bandas observadas para o CCP e a  $\beta$ CD isolados, sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas do CCP e da  $\beta$ CD. Algumas alterações de bandas encontradas podem ser justificadas à interação intermolecular do CCP com a  $\beta$ CD promovida pela pressão exercida no momento de formação da pastilha para análise no equipamento.

Na Tabela 2 estão apresentadas as principais bandas observadas para a  $\beta$ CD, CCP, MM e CCP/ $\beta$ CD.

Tabela 2 – Principais bandas ( $\text{cm}^{-1}$ ) observadas nos espectros de infravermelho de CCP,  $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD.

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{N-H})$	C-H aromáticos	C=C aromáticos	$\nu(\text{C-H})$ alcanos	$\delta(\text{O-H})$ H <sub>2</sub> O hidratação	$\nu(\text{C-O})$	$\delta(\text{C-H})$ vibrações do anel da piranose
$\beta$ CD	3387	----	----	----	2925	1643	1160; 1024	950; 650
CCP	----	3381	$\nu$ 3050; $\delta$ 1210; $\delta$ 1178; $\delta$ 785; $\delta$ 716; $\delta$ 690	1636; 1472	2914; 2850	----	----	----
MM	3387	3381	1178; 785; 716; 690	1636; 1472	2914; 2850	1643	1160; 1024	----
CCP/ $\beta$ CD	3387	3381	785; 716; 690	1636; 1472	2850	1643	1160; 1024	----

$\nu$  - estiramento ;  $\delta$  - deformação

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.1.2 Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)

A análise térmica são métodos analíticos que avaliam mudanças nas propriedades térmicas de amostras quando expostas a uma varredura de temperatura. A análise termogravimétrica (TGA) é um método que baseia-se na medida da alteração da massa em função da temperatura ou do tempo, permitindo verificar fenômenos de perda de massa em geral, como decomposição, desidratação, dessorção, etc; intimamente relacionados à estabilidade de compostos. A partir da curva TGA é comum também se trabalhar com sua derivada, a dTGA, que permite observar com maior precisão, a partir de máximos e mínimos, as temperaturas em que ocorre determinada perda de massa da amostra (DENADAI et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2015),

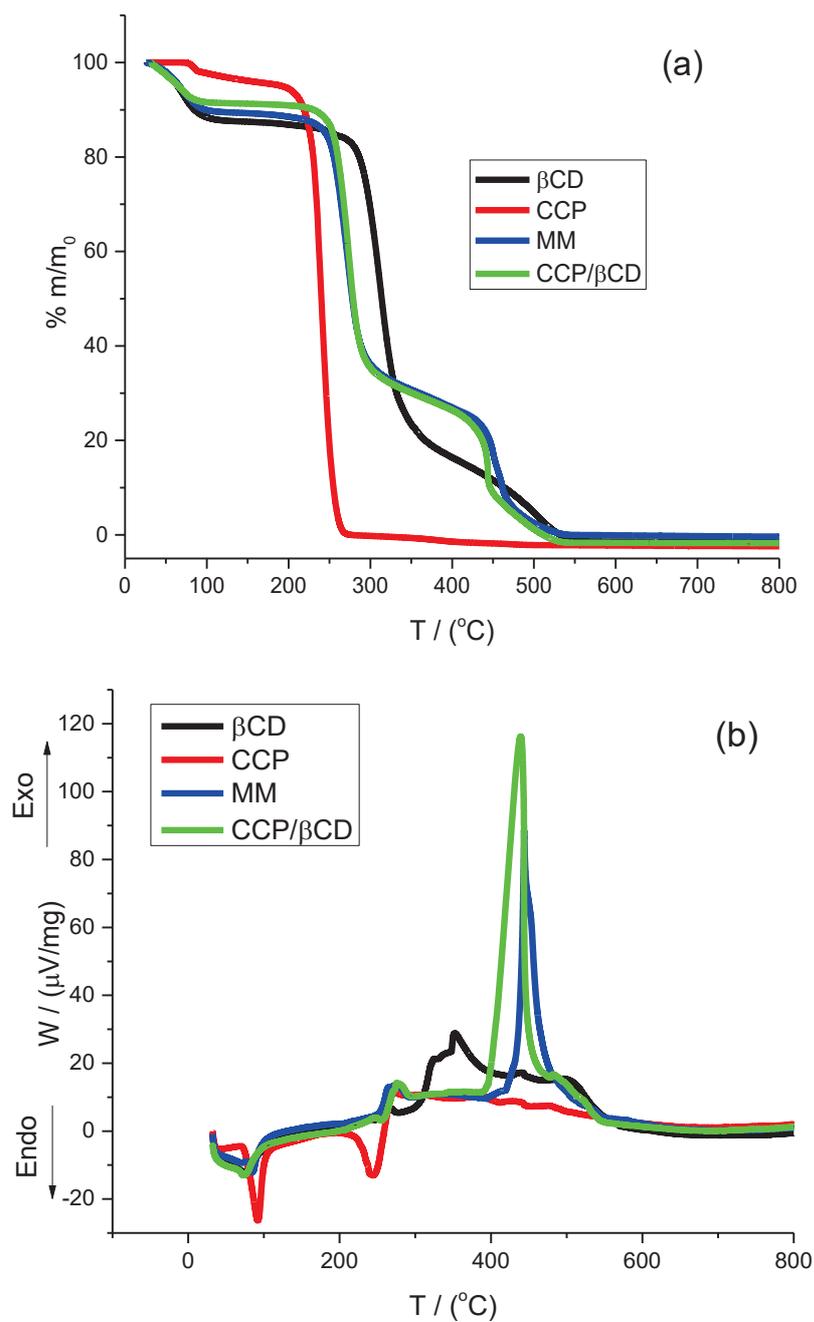
Já a análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica de monitoramento contínuo das temperaturas da amostra e da referência (material termicamente inerte), à medida que ambas vão sendo aquecidas ou arrefecidas em um forno. Ela fornece o fluxo de calor resultante da diferença entre a temperatura da referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo e permite determinar a natureza dos eventos (endotérmicos/exotérmicos) (REDING; SHIFLETT, 2019).

Ambas as técnicas, TGA e DTA, são comumente utilizadas para avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão e compará-los com seus precursores (KIM et al., 2016; LI; HOU; LI, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2015). Este tipo de avaliação é importante visto que ao ser formado o complexo de inclusão podem ocorrer modificações tanto na transição de fases (fusão, ebulição, sublimação, decomposição, etc), quanto relacionadas às reações de desidratação, levando a uma alteração do comportamento térmico do material (YAO et al., 2014).

Na Figura 12 estão apresentadas as curvas de TGA (a) e DTA (b) da  $\beta$ CD, CCP, MM e CCP/ $\beta$ CD. Na curva TGA da  $\beta$ CD livre observa-se uma perda de massa de 11,8% no intervalo de 34 a 104 °C atribuída ao processo de

desidratação. Seguem-se dois eventos de perda de massa iniciados em 244 a 460°C atribuído à decomposição/calцинаção do composto.

Figura 12 – (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Análise térmica diferencial (DTA) do CCP,  $\beta$ CD, MM e CCP/ $\beta$ CD.



Exo: processo exotérmico; Endo: processo endotérmico

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na curva TGA do CCP observam-se dois eventos de perdas de massa sugestivos de desidratação, um iniciando 74 °C e finalizando em 89 °C, com máximo em 84 °C; o segundo iniciando 91 °C e finalizando em 198 °C, com máximo em 136 °C. Outro evento, com perda de massa mais significativa, se inicia a 198 °C, com máximo em 241 °C e finalizando em 272 °C, atribuído ao processo de decomposição do composto. Já na curva de DTA observa-se dois picos endotérmicos, sendo um atribuído à fusão e outro à decomposição do composto.

Nas curvas TGA e DTA da MM observa-se eventos relacionados à  $\beta$ CD e ao CCP, porém com mudanças no perfil térmico em relação às substâncias livres sugerindo interação durante o aquecimento (ver Tabela 3).

O CCP/ $\beta$ CD apresenta um perfil térmico diferente dos compostos isoladamente e da própria MM. Observa-se que no complexo de inclusão existem moléculas de água residuais, já que apresentam desidratação na mesma faixa de temperatura da  $\beta$ CD livre. Além disso, ocorre a mudança em todas as faixas de decomposição o que reafirma que as interações no composto são diferentes das demais. O evento de decomposição da molécula de CCP que ocorre próximo a 240°C, temperatura esta inferior às observadas na MM e no CCP/ $\beta$ CD (próximo a 270°C), confirmando que as interações intermoleculares estabelecidas entre as moléculas promovem uma maior estabilidade térmica ao complexo.

Os eventos de decomposição da MM e do CCP/ $\beta$ CD ocorrem em sua maior parte em temperaturas intermediárias entre as identificadas para as moléculas de CCP e  $\beta$ CD livres, como resultado direto das novas interações intermoleculares estabelecidas entre as moléculas no complexo.

Tabela 3 – Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a  $\beta$ CD, CCP, MM e CCP/ $\beta$ CD

Composto	TGA				Atribuição	DTA			
	Eventos			$\Delta m$ (%)		Eventos			Atribuição
	T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>máx</sub>			T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>máx</sub>	
$\beta$ CD	34	104	71	11,8	Desidratação	34	123	74	Processo endotérmico de desidratação
	244	446	309	73,7	Decomposição	257	572	352	Processos decomposição
	460	551	499	10,4					
CCP	74	89	84	1,8	Desidratação	72	112	92	Processo endotérmico de desidratação
	91	198	136	3,4	Decomposição	208	271	245	Processos decomposição
	198	272	241	94,8					
MM	32	112	65	10,4	Desidratação	36	120	85	Processo endotérmico de desidratação
	227	352	269	57,4	Decomposição	253	295	272	Processos atribuídos a decomposição do CCP e da $\beta$ -CD
	387	541	451	27,3					
CCP/ $\beta$ CD	34	102	56	8,4	Desidratação	35	73	78	Processo endotérmico de desidratação
	232	345	273	59,5	Decomposição	258	295	276	Processos atribuídos a decomposição do complexo.
	397	537	443	26,6					

Legenda: T<sub>i</sub> - temperatura inicial do evento, T<sub>f</sub> - temperatura final do evento,  $\Delta m$  – variação percentual de massa,

T<sub>máx</sub> - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

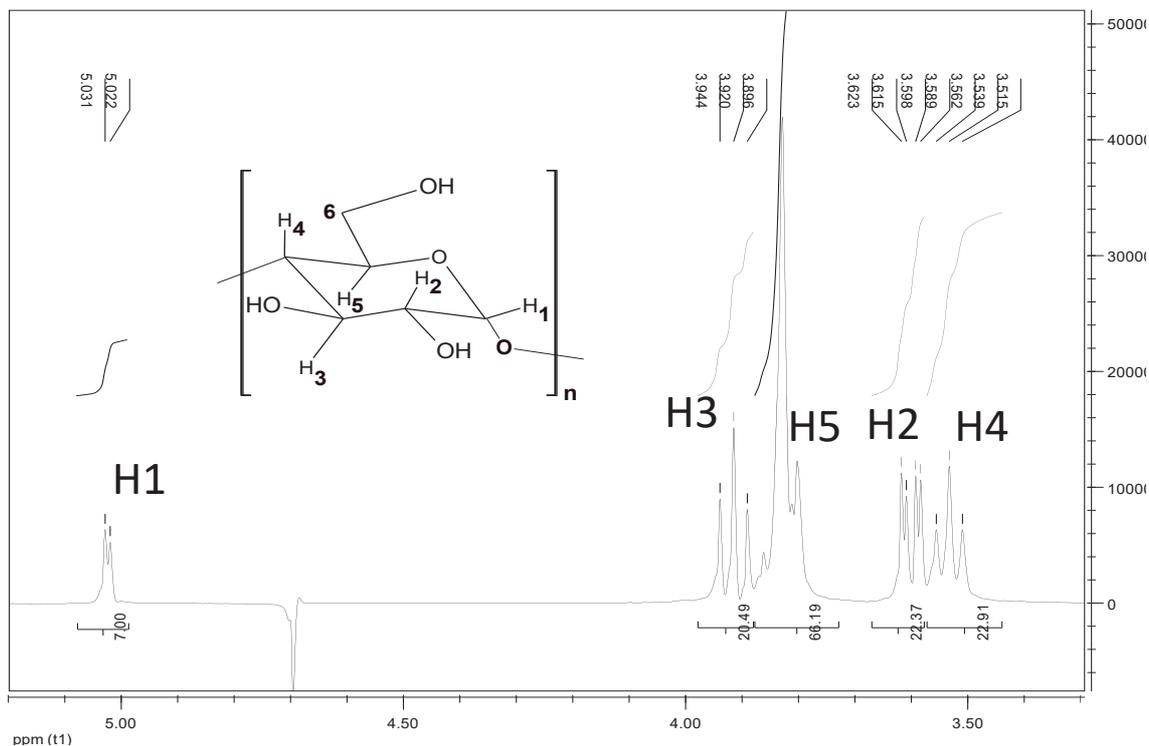
### 4.1.3 Caracterização estrutural por RMN

A espectroscopia de RMN está baseada na absorção de energia e radiofrequências pelos núcleos numa molécula submetida a um campo magnético externo. As transições detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados voltam ao estado fundamental geral são então captados pelo instrumento de medição e, após a aplicação de uma transformada de Fourier, gera-se os sinais de RMN (ALVES, 2010).

A espectroscopia unidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  aplicada ao estudo de compostos de inclusão, especialmente através das medidas de deslocamentos químicos, fornecem informações fundamentais sobre a complexação, como, por exemplo, orientação molecular da substância hóspede dentro da cavidade da  $\beta\text{CD}$  (ALVES et al., 2014; RIZZI et al., 2016; SCHNEIDER et al., 1998). Nesse caso, as modificações nos sinais de ambas as moléculas se devem às alterações causadas pela associação com o hóspede, visto que ocorre alteração no ambiente químico ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade da  $\beta\text{CD}$ .

Na Figura 13 está apresentado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta\text{CD}$ . A  $\beta\text{CD}$ , sendo um oligômero simétrico de 7 unidades idênticas, apresentou sinais de RMN de  $^1\text{H}$  referentes aos hidrogênios 1-6 como se fosse de um monômero glicopiranosídico. Os hidrogênios das hidroxilas são trocados espontaneamente pelos átomos de deutério do solvente, não sendo observados no espectro.

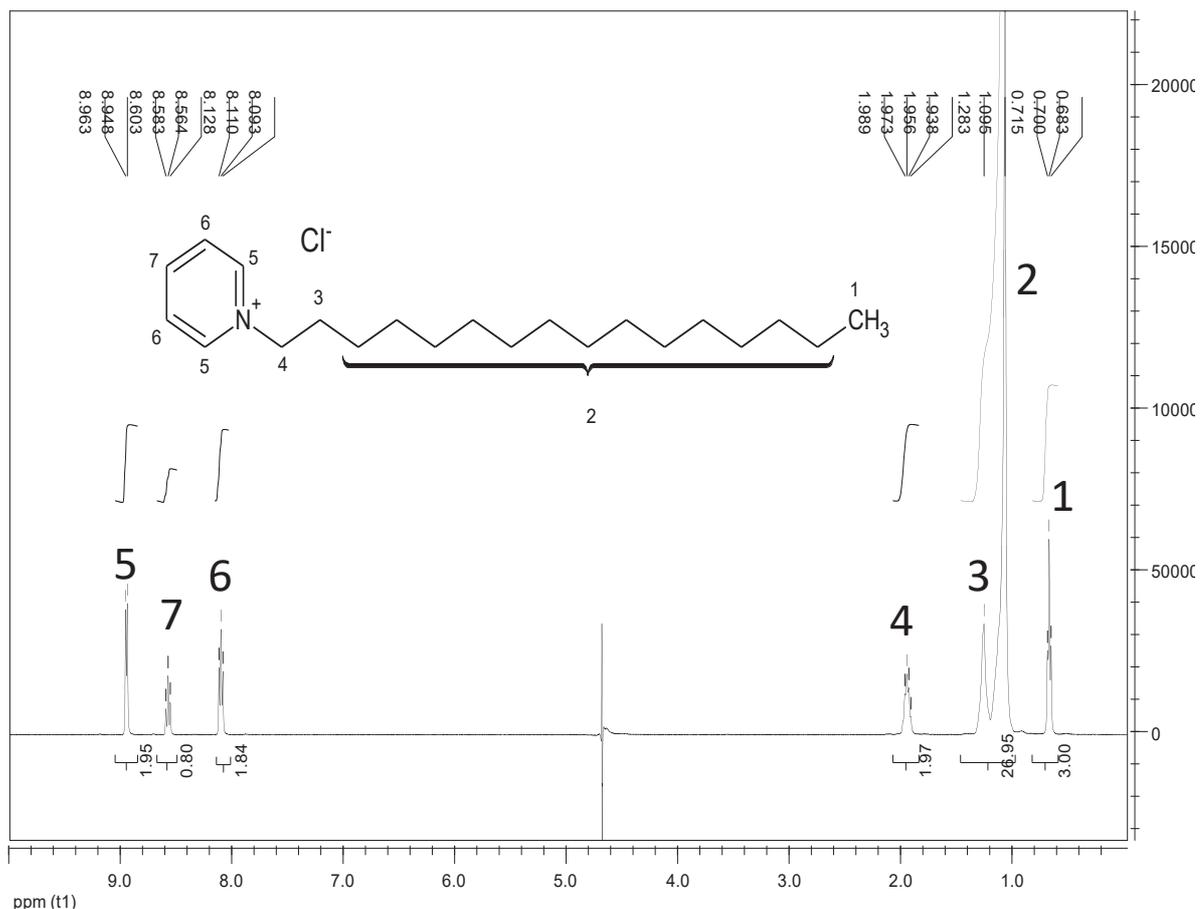
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta\text{CD}$  está de acordo com a literatura (SCHNEIDER et al., 1998). Os sinais de ressonância dos hidrogênios 3, 5 e 6 estão sobrepostos na região entre  $\delta \approx 3,7$  a 4,0, enquanto os sinais dos hidrogênios 2 e 4 estão sobrepostos na região entre  $\delta \approx 3,4$  a 3,6. A intensidade das integrais concorda com o número de hidrogênios presentes na unidade monomérica da molécula, comprovando também a pureza da amostra (Figura 13).

Figura 13 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta\text{CD}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na Figura 14 está apresentado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do CCP. O CCP apresentou sinais de RMN de  $^1\text{H}$  referentes aos hidrogênios 1-7, sendo o sinal dos hidrogênios 1 do grupo metil na região entre  $\delta \approx 0,6$  a  $0,8$ , os hidrogênios 2 da cadeias de hidrocarbonetos na região  $\delta \approx 1,1$ , os hidrogênios 3 e 4 com sinais nas regiões  $\delta \approx 1,3$  e  $2,0$ , respectivamente. Os hidrogênios 5-7 ligados aos carbonos do anel aromático apresentaram sinais na região  $\delta \approx 8,0$  a  $9,0$ .

Na Figura 15 é possível comparar os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (a 400 MHz) em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $27^\circ\text{C}$  das substâncias puras e do CI, onde se percebe alteração nos sinais dos hidrogênios como reflexo de um novo ambiente químico devido às interações entre o CCP e a  $\beta\text{CD}$ .

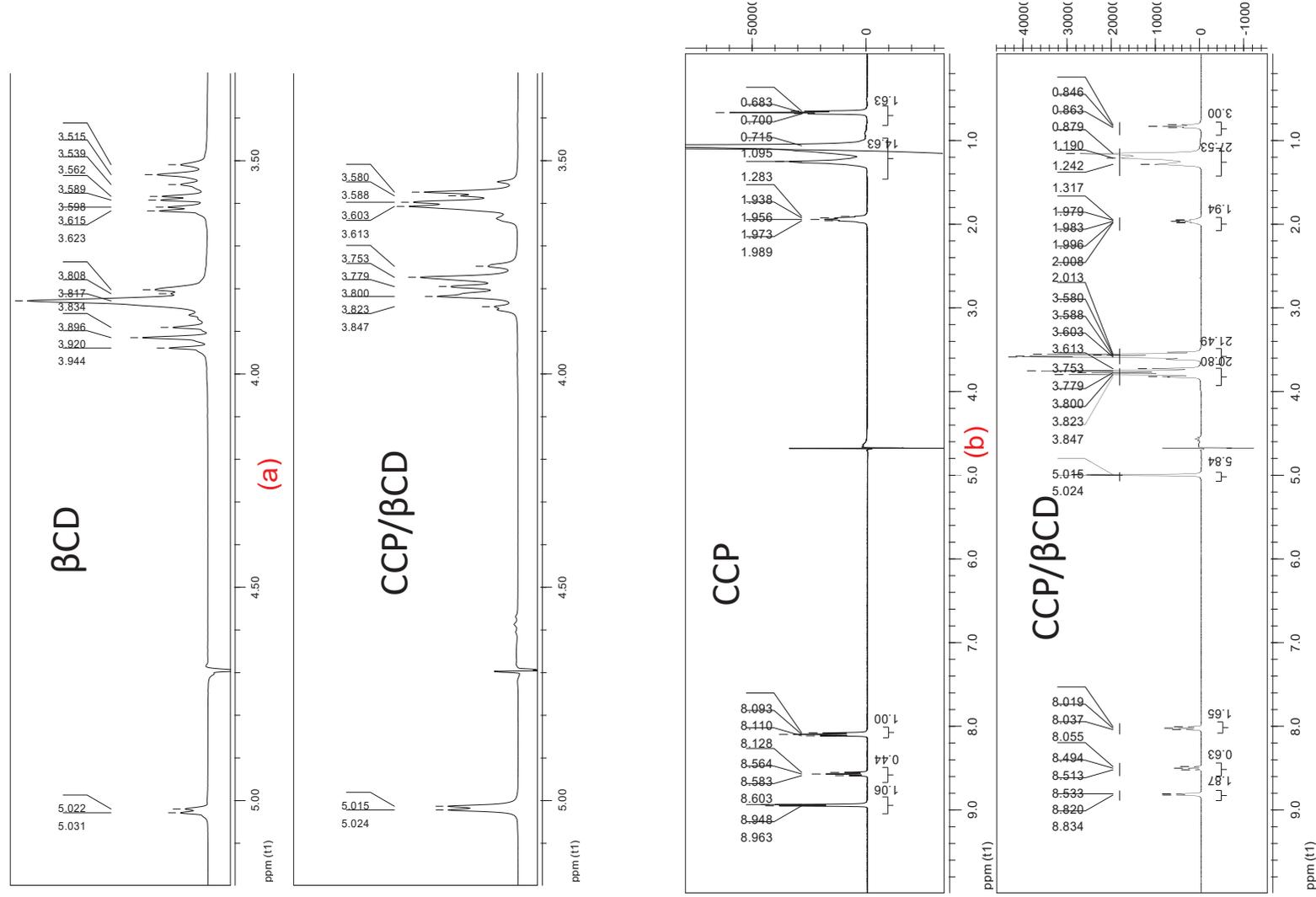
Figura 14 – Espectro de RMN de 1H do CCP em D<sub>2</sub>O.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Como mostrado na Tabela 4, a interação da molécula hóspede com a cavidade da ciclodextrina pode causar variação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula incorporada na cavidade.

É bem conhecido na literatura que a formação de complexos supramoleculares com ciclodextrinas gera alterações na densidade eletrônica dos núcleos de hidrogênio envolvidos nas interações, o que reflete nos espectros de RMN como alterações de deslocamento químico ou alargamento de sinais (LULA et al., 2012; RIZZI et al., 2016; SUÁREZ et al., 2014).

Figura 15 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (a 400 MHz) em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $27^\circ\text{C}$  comparando as substâncias puras e CCP/ $\beta\text{CD}$ : (a)  $\beta\text{CD}$  e CCP/ $\beta\text{CD}$  e (b) CCP e CCP/ $\beta\text{CD}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 4 – Sinais de RMN de  $^1\text{H}$  (a 400 MHz) do CCP e CCP na presença de  $\beta\text{CD}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $27^\circ\text{C}$ .

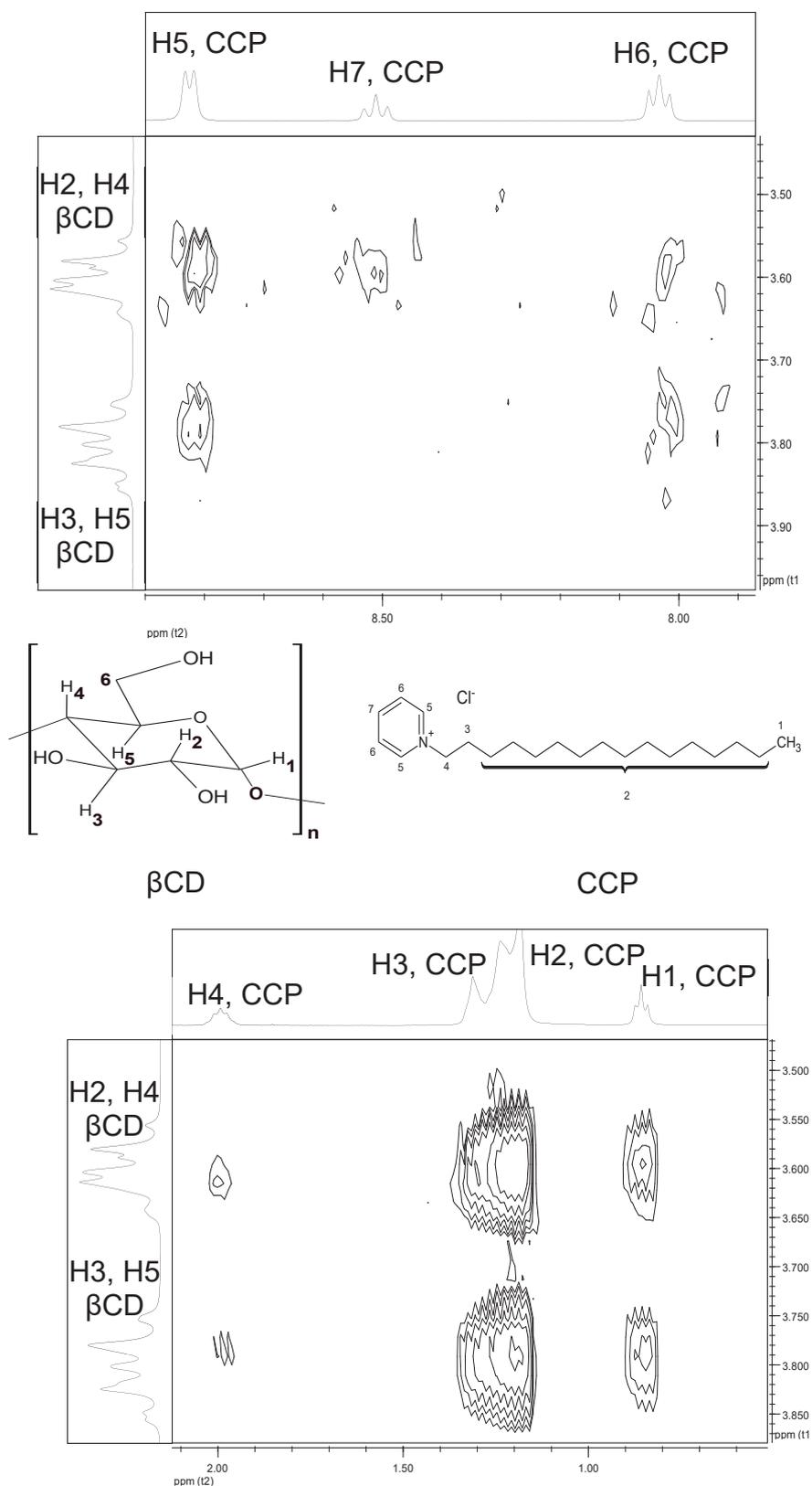
Hidrogênio	$\delta_{\text{CCP}}$	$\delta_{\text{CCP}/\beta\text{CD}}$	$\Delta\delta^a$
H1	0,70	0,86	-0,16
H2	1,09	1,19	-0,10
H3	1,28	1,28	0,00
H4	1,96	1,99	-0,03
H5	8,83	8,82	0,01
H6	8,04	8,04	0,00
H7	8,51	8,51	0,00

$$^a\Delta\delta = \delta_{\text{CCP}} - \delta_{\text{CCP}/\beta\text{CD}}$$

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Por meio da técnica de ROESY é possível avaliar as correlações entre hidrogênios que estão espacialmente próximos na interação supramolecular. Na Figura 16 pode se verificar no ROESY do complexo de inclusão  $\beta\text{CD}/\text{CCP}$  correlações dipolares entre os hidrogênios aromáticos H5 e H7 do CCP com os hidrogênios H3 e H5 da cavidade hidrofóbica da  $\beta\text{CD}$ , sugerindo a entrada do anel aromático do CCP dentro da cavidade da  $\beta\text{CD}$ . Percebe-se também que há correlação entre os hidrogênios H1, H2, H3 e H4 da cadeia apolar do CCP com os hidrogênios H3 e H5 da cavidade hidrofóbica da  $\beta\text{CD}$ , mostrando outra possibilidade de interação entre os compostos, ou seja, o CCP e a  $\beta\text{CD}$  se interagem de diferentes formas.

Figura 16 – Mapa de contorno ROESY (a 400 MHz) do complexo CCP/ $\beta$ CD em D<sub>2</sub>O a 27 °C.



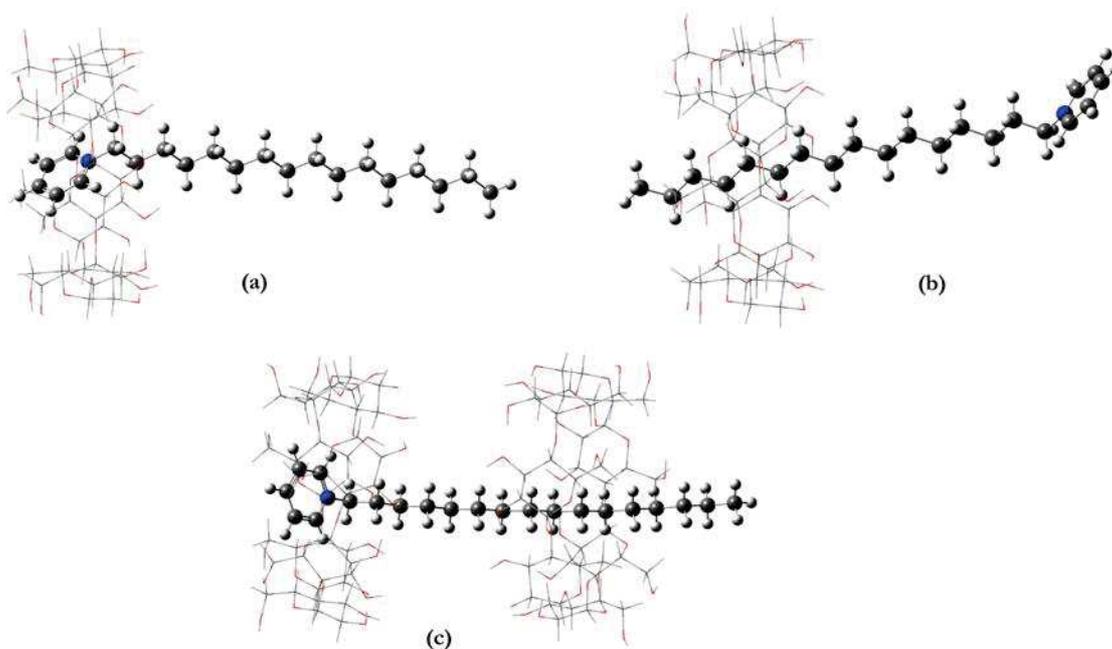
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.1.4 Modelagem Molecular

Os cálculos de DFT foram realizados para confirmar o arranjo preferido dos complexos de inclusão, formado a partir de CPC e  $\beta$ CD. Modos distintos de inclusão foram propostos com base nas orientações e proporções das espécies envolvidas nesses complexos. Nosso principal objetivo foi uma tentativa de modelar os aspectos estruturais e parâmetros energéticos dos complexos, que poderiam ser usados para prever a conformação do complexo CCP/ $\beta$ CD mais favorável. Um entendimento detalhado das interações entre o CPC e  $\beta$ CD em nível molecular pode ser muito relevante para auxiliar na interpretação dos resultados experimentais.

As estruturas respectivas das três conformações otimizadas no nível de teoria B97D/6-31G (d,p) estão representados na Figura 17. O cálculo da energia de complexação B97D/6-31G (d,p) ( $\Delta_{\text{dft}}E$ ), bem como Energia livre de Gibbs ( $\Delta_{\text{dft}}G$ ) para os três complexos CPC/ $\beta$ CD é fornecida na Tabela 5.

Figura 17 – Conformações teóricas do CCP/ $\beta$ CD obtidas pelo B97D/6-31G(d,p): (a) 1:1 forma A, (b) 1:1 forma B e (c) forma 1:2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Como pode ser visto na Tabela 5, dentre as três conformações propostas, o mínimo global encontrado são 1:1-CCP/ $\beta$ CD forma A (Figura 17a) e os complexos 1:2-CCP/ $\beta$ CD (Figura 17c), uma vez que são as orientações energeticamente mais favoráveis. Observando a Tabela 5 pode-se perceber que esses dois complexos apresentavam quase a mesmos valores de  $\Delta_{\text{dft}}E$  e  $\Delta_{\text{dft}}G$ , indicando que ambos os complexos devem ser as conformações preferidas na solução aquosa. Sendo assim, uma mistura desses dois complexos devem coexistir em equilíbrio.

Portanto, com essa análise baseada em cálculos teóricos, podemos descrever parâmetros energéticos para a formação do complexo CCP/ $\beta$ CD em nível molecular que estão de acordo com os achados experimentais, visto que na análise de RMN também foi demonstrado a interação entre as regiões dos compostos CCP e  $\beta$ CD que proporcionam as formas mais energeticamente favoráveis.

Tabela 5 – B97D/6-31G(d,p) Energia de complexação ( $\Delta_{\text{dft}}E$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta_{\text{dft}}G$ ) do complexo formado pelo CCP e  $\beta$ CD calculados em fase aquosa.

Complexos	B97D/6-31G(d,p) em fase aquosa	
	$\Delta_{\text{dft}}E$ (kcal/mol <sup>-1</sup> )	$\Delta_{\text{dft}}G$ (kcal/mol <sup>-1</sup> )
1:1 CCP/ $\beta$ CD (forma A)	-16.7	-3.9
1:1 CCP/ $\beta$ CD (forma B)	-8.8	3.7
1:2 CCP/ $\beta$ CD	-17.3	-4.4

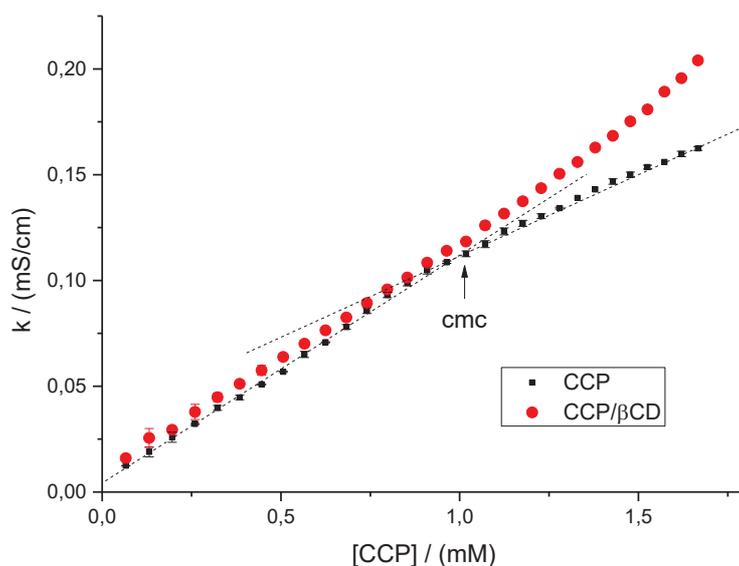
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.1.5 Titulações condutimétricas

Na Figura 18 estão apresentados valores de condutividade elétrica em função das concentrações de CCP e CCP/ $\beta$ CD. Como pode ser observado na curva de titulação do CCP, a taxa de variação da condutividade com a concentração sofre um pequeno declínio acima de aproximadamente 1,0 mM de CCP, devido à formação de micelas. As micelas, como são estruturas de maior volume e menor mobilidade, são menos condutivas. Além disso, na forma agregada, são capazes de atrair para a

superfície contraíons do meio, reduzindo ainda mais a contribuição para a condutividade total (BHATTARAI et al., 2017; KARAYIL et al., 2016).

Figura 18 – Condutividade do CCP e CCP/ $\beta$ CD em função da concentração.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Para a curva de titulação do Cl em água, não se observa com nitidez nenhuma declividade na curva, sugerindo que o CCP/ $\beta$ CD não sofre agregação nesta faixa de concentração.

#### 4.1.6 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC) – estudo de complexação: Titulação da $\beta$ CD em CCP

As alterações nas propriedades termodinâmicas em decorrência das interações entre espécies químicas podem ser medidas por microcalorimetria. Esta técnica mede diretamente o fluxo de calor liberado ou absorvido pelo sistema ao longo de uma reação, onde estão envolvidas interações inter e intramoleculares. Esta energia é registrada em função da concentração de reagente titulante, sendo o calor liberado ou absorvido proporcional à quantidade de reagente injetado (WISEMAN et al., 1989).

As variações de calor entre a amostra e a referência são devidas às interações que ocorrem durante a titulação, sendo determinadas por um sistema de resposta eletrônico, o qual garante que a temperatura no sistema seja sempre constante (MONTEIRO et al., 2011).

Por meio dos dados obtidos por uma titulação calorimétrica e utilizando a isoterma de Wiseman para modelar os dados conforme a equação 1 (Eq. 1), foi possível determinar as constantes de afinidade para os sistemas (K) e a estequiometria de reação (N). Com o emprego de equações termodinâmicas demonstradas nas equações 2 e 3 (Eq.2 e Eq. 3), a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta_{int}G^{\circ}$ ), variação da entalpia ( $\Delta_{int}H^{\circ}$ ) e variação da entropia ( $\Delta_{int}S^{\circ}$ ) podem ser determinadas, fornecendo assim, o perfil termodinâmico completo da interação molecular (DENADAI et al., 2011).

$$\overline{\Delta_{inj}H^{\circ}} = \left( \frac{dQ}{d[X]_{inj}} \right)_p = \Delta_{int}H^{\circ}Vo \left[ \frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right] \quad Eq. 1$$

$$\Delta_{int}G^{\circ} = -RT \ln K \quad Eq. 2$$

$$\Delta_{int}G^{\circ} = \Delta_{int}H^{\circ} - T\Delta_{int}S^{\circ} \quad Eq. 3$$

onde,  $\left( \frac{dQ}{d[X]_{int}} \right)_p$  relaciona a mudança gradual no calor do sistema normalizado em relação à concentração de titulante,  $X_R = [\beta CD]_t / [CCP]_t$ ,  $Vo$  o volume efetivo da solução na célula de titulação e  $r$  uma variável de composição  $1/[CCP]_t \cdot K$ ,  $R=8,314J/K$  e  $T$  temperatura em Kelvin.

Esta técnica tem sido amplamente adotada na caracterização de complexo de inclusão pois, quando ocorre a complexação, ocorrem uma série de interações, relacionadas com: 1) saída da água do interior da cavidade e sua liberação no meio; 2) dessolvatação da molécula hóspede; 3) transferência de calor para o ambiente externo; 4) alterações conformacionais; 5) inclusão da molécula hóspede com o estabelecimento de novas interações intermoleculares; 6) reorganização das moléculas de água em torno do complexo de inclusão e 7) redução da mobilidade de rotação em torno das ligações glicosídicas da ciclodextrina devido à presença da molécula hóspede dentro da cavidade. O balanço de todas essas interações pode resultar em um processo endotérmico ou exotérmico, com aumento ou redução de

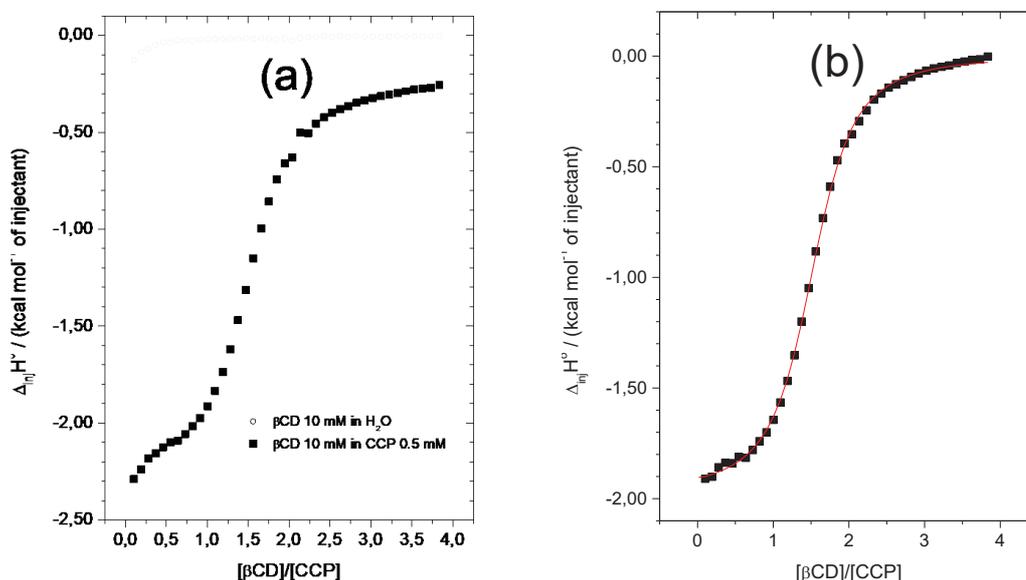
entropia. Considerando que o ITC monitora apenas processos espontâneos, a energia livre de Gibbs será sempre menor do que zero ( $\Delta G_0 < 0$ ) (DENADAI et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011; OHTA et al., 2008; SUN et al., 2006).

Com o objetivo de se avaliar as interações da  $\beta$ CD com o CCP não micelizado (abaixo da cmc), procedeu-se com titulação de solução de  $\beta$ CD 10,0 mM em solução de CCP 0,5 mM. Na Figura 19 estão apresentadas as curvas de titulação da  $\beta$ CD em água pura (branco da reação) e em solução de CCP 0,5 mM, como também a curva de titulação final após a subtração do branco. Esse procedimento visa excluir os efeitos de interação soluto-solvente, a fim de avaliar apenas as interações  $\beta$ CD/CCP (DENADAI et al., 2011). Na Tabela 6 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre  $\beta$ CD e CCP obtidos pelo experimento.

Na titulação calorimétrica após a subtração do branco, os parâmetros termodinâmicos obtidos demonstram que a espontaneidade da interação entre os compostos se deu de forma exotérmica ( $\Delta_{int}H^0 < 0$ ) e com aumento de entropia ( $T\Delta_{int}S^0 > 0$ ), com estequiometria aparente de  $N_{ap} = 1,45 \beta$ CD/CCP. Alterações exotérmicas de entalpia foram atribuídas à interação íon-dipolo do grupo piridínio do CCP com elétrons não ligados de átomos de oxigênio na cavidade da  $\beta$ CD, e pela formação de interações de Van der Waals cooperativas entre a cadeia alifática do CCP (DENADAI et al., 2011).

O valor de constante de equilíbrio aparente,  $K_a = 38300 \pm 1070$  foi considerado alto quando comparado ao descrito na literatura, sugerindo presença de fortes interações intermoleculares entre o CCP e a  $\beta$ CD na formação do complexo de inclusão (DENADAI et al., 2011; LULA et al., 2012; PAULA et al., 2011; SOUSA et al., 2010; SUÁREZ et al., 2014).

Figura 19 – (a) Titulação da  $\beta$ CD 10,0 mM em água pura e em solução de CCP 0,5 mM e (b) curva de titulação final após a subtração do branco.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos da interação de  $\beta$ CD 10,0 mM titulado em CCP 0,5 mM.

Parâmetros termodinâmicos	Média $\pm$ Desvio Padrão
$N_{ap}$	1,450 $\pm$ 0,004
$K$	38300 $\pm$ 1070
$\Delta_{int}H^{\circ}$ (cal/mol)	-2011,0 $\pm$ 9,0
$T\Delta_{int}S^{\circ}$ (cal/mol)	+4233,7
$\Delta_{int}G^{\circ}$ (cal/mol)	-6244,7

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A complexação também apresentou elevada contribuição entrópica, uma vez que  $T\Delta_{int}S^{\circ}$  foi responsável por 69,1% do valor de  $\Delta_{int}G^{\circ}$ , sendo os 30,9% restante devido ao  $\Delta_{int}H^{\circ}$ . A variação positiva de entropia ( $T\Delta_{int}S^{\circ}$ ) sugere que as moléculas sofram extensa dessolvatação no processo de inclusão. Durante esse processo

ocorre quebra da estrutura de solvatação dos grupos funcionais do CCP com consequente liberação de moléculas de água que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais gerando desta forma, uma elevação da entropia (desordem) do sistema (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

#### **4.1.7 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC) – estudo de micelização do CCP na ausência e na presença de $\beta$ CD**

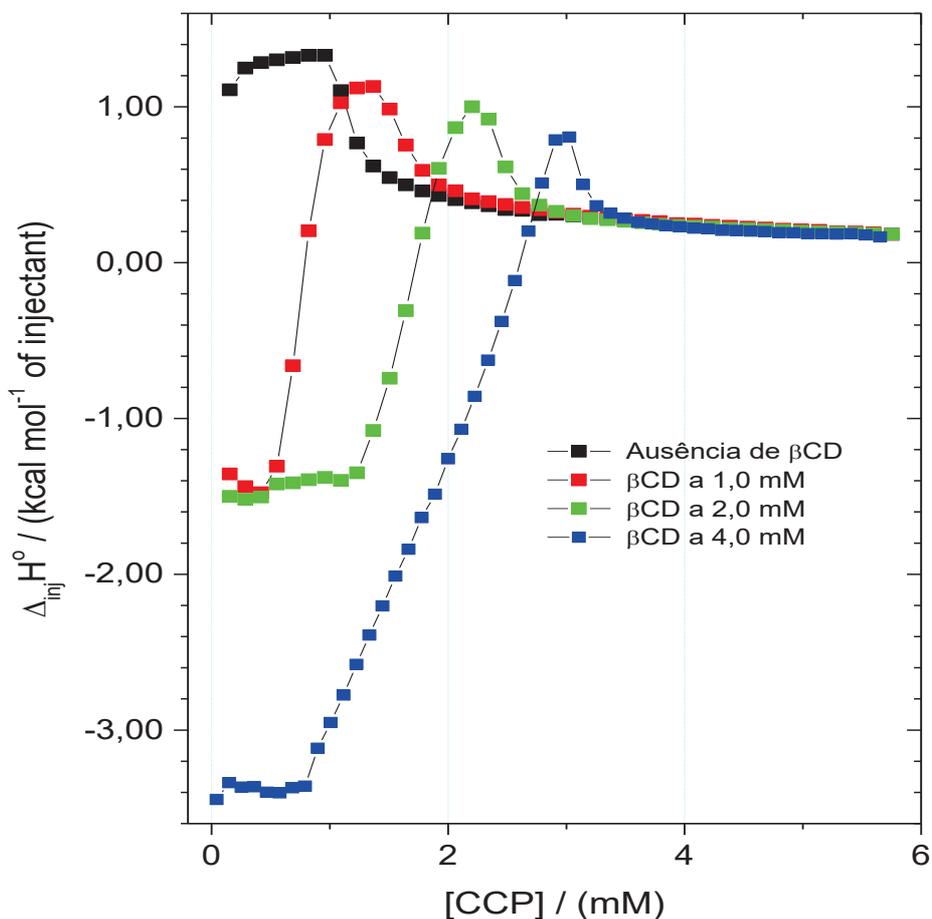
Considerando que o CCP é um surfactante, foi realizado o estudo do seu processo de micelização, na ausência e na presença de  $\beta$ CD, com o objetivo de avaliar as variáveis termodinâmicas e o efeito da ciclodextrina sobre a cmc do composto, bem como determinar a situação onde a interação entre a ciclodextrina com o CCP possa ser avaliada desconsiderando-se as micelas.

Como as cadeias longas hidrofóbicas dos surfactantes podem inserir dentro das cavidades das  $\beta$ CD, estudos demonstram que estas podem alterar a cmc dos surfactantes desestabilizando a formação das micelas (CASTIGLIONE et al., 2011; NAGARAJ; ARUNACHALAM, 2013).

Para isso, foram realizadas titulações de CCP 30,0 mM em água pura (ausência de  $\beta$ CD) e em diferentes concentrações  $\beta$ CD (1,0; 2,0 e 4,0 mM). Na Figura 20 estão apresentadas as curvas de titulação do CCP em  $\beta$ CD.

Como pode ser observado, a titulação do CCP em água apresenta um comportamento bastante característico de sistemas que sofrem agregação, com um ponto de inflexão atribuído à cmc do CCP em 1,0 mM (ALVES et al., 2014). Observa-se também que a adição de CCP em água tem inicialmente um comportamento endotérmico correspondendo ao processo de desmicelização, uma vez que a concentração do composto na solução titulante se encontrava acima da sua cmc. Após a cmc, os valores de entalpia de injeção, que se devem à diluição das micelas, tendem a zero, quando as micelas não mais se desfazem.

Figura 20 – Estudo de agregação do CCP a 30,0 mM na ausência e na presença de  $\beta$ CD em diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0; 4,0 mM).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na titulação do CCP em solução de  $\beta$ CD com concentrações crescentes, houve uma mudança de perfil, com manutenção dos ponto de inflexão devido à micelização. Porém, houve deslocamento da cmc para a direita, demonstrando um aumento da cmc do CCP na presença de  $\beta$ CD – Figura 21a. Este resultado sugere que a interação do CCP/ $\beta$ CD é preferencial ao processo de micelização, corroborando a ideia de que as interações CCP/ $\beta$ CD devem ser bem mais intensas que as interações CCP/CCP nas micelas. Sendo assim, inicialmente deve ocorrer a formação do composto de inclusão, e somente após a saturação das CDs, deve se iniciar o processo de micelização.

Com base nas curvas de titulação calorimétricas, a entalpia de desmicelização foi calculada pela diferença entre o valor de entalpia de injeção na cmc  $[\Delta_{inj}H^o]_{cmc}$  pelo último valor da entalpia de injeção  $[\Delta_{inj}H^o]_f$ , na região assintótica de concentração onde a micelização não mais ocorre.

O  $\Delta_{dem}H^o$  é obtido pela equação 4:

$$\Delta_{dem}H^o = \left( \frac{\partial \Delta_{inj}H^o}{\partial [SDS]} \right)_{cmc} - \left( \frac{\partial \Delta_{inj}H^o}{\partial [SDS]} \right)_0 \quad Eq. 4$$

Antes da cmc, a entalpia corresponde ao calor de solvatação dos monômeros após a quebra das micelas, enquanto que depois da cmc, é principalmente devido à diluição das micelas. Dessa forma, a entalpia de micelização pode ser calculada pela equação 5:

$$\Delta_{mic}H^o = -\Delta_{dem}H \quad Eq. 5$$

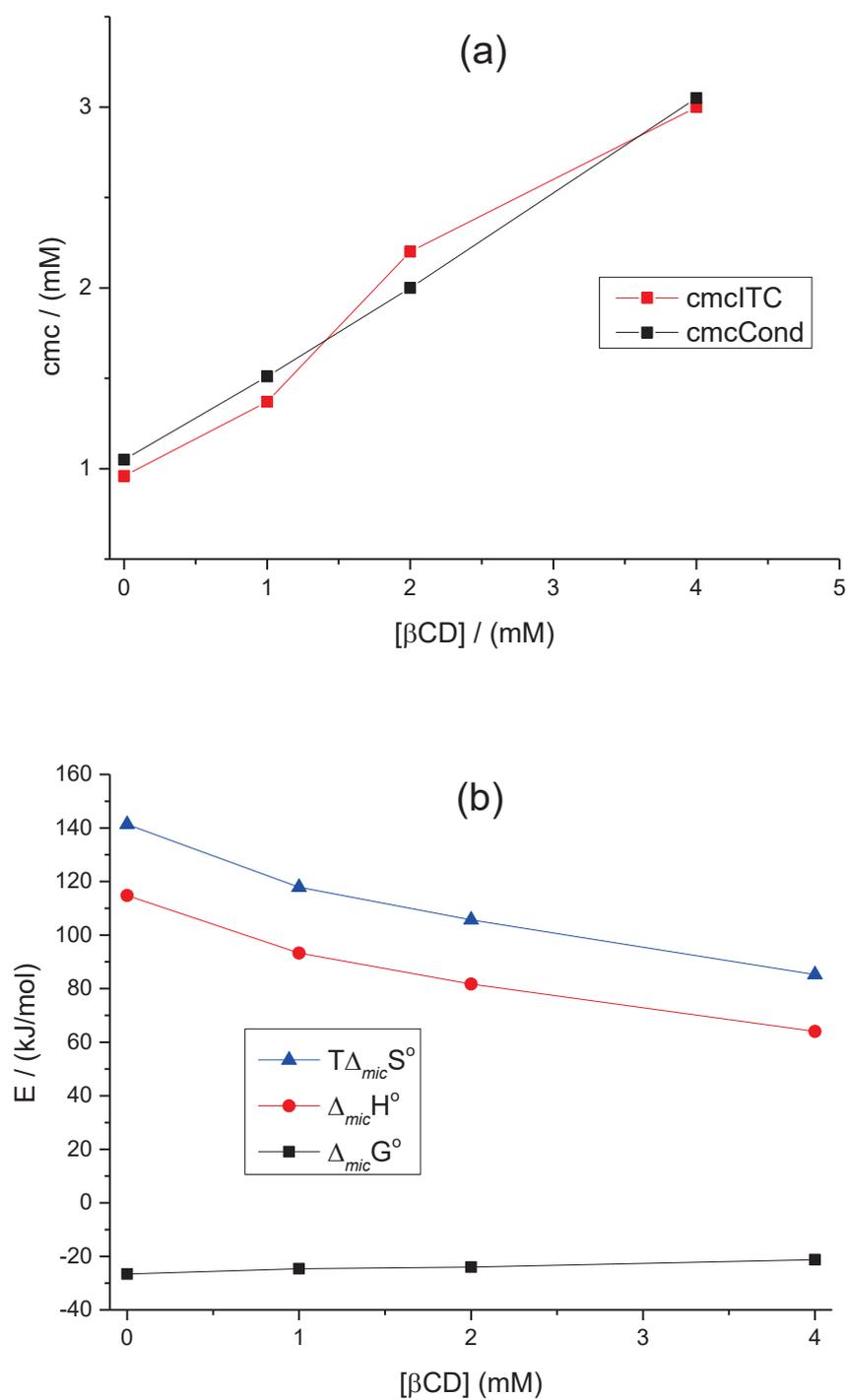
Os demais parâmetros termodinâmicos de micelização, variação da energia Livre de Gibbs de micelização ( $\Delta_{mic}G^o$ ), variação da entalpia de micelização ( $\Delta_{mic}H^o$ ) e variação da energia entrópica de micelização ( $T\Delta_{mic}S^o$ ) foram determinados segundo o modelo clássico denominado Pseudo-separação de fases (EVANS; WENNERSTRÖM, 1999). O comportamento das propriedades termodinâmicas de micelização em função da concentração de  $\beta$ CD são apresentados na Figura 21b.

$$\Delta_{mic}G^o = (2 - \alpha)RT \ln(cmc / [H_2O]) \quad Eq. 6$$

$$T\Delta_{mic}S^o = \Delta_{mic}H^o - \Delta_{mic}G^o \quad Eq. 7$$

O valor de  $\alpha$  da Eq. 6, que é o grau de dissociação micelar, foi obtido através de uma titulação condutimétrica (Figura 22) do CCP a 30,0 mM em água e em diferentes concentrações  $\beta$ CD (1,0, 2,0 e 4,0 mM), assim como realizado no ITC.

Figura 21 – (a) Concentração micelar crítica (cmc) e (b) parâmetros termodinâmicos da cmc do CCP na ausência e na presença de diferentes concentrações de  $\beta$ CD.

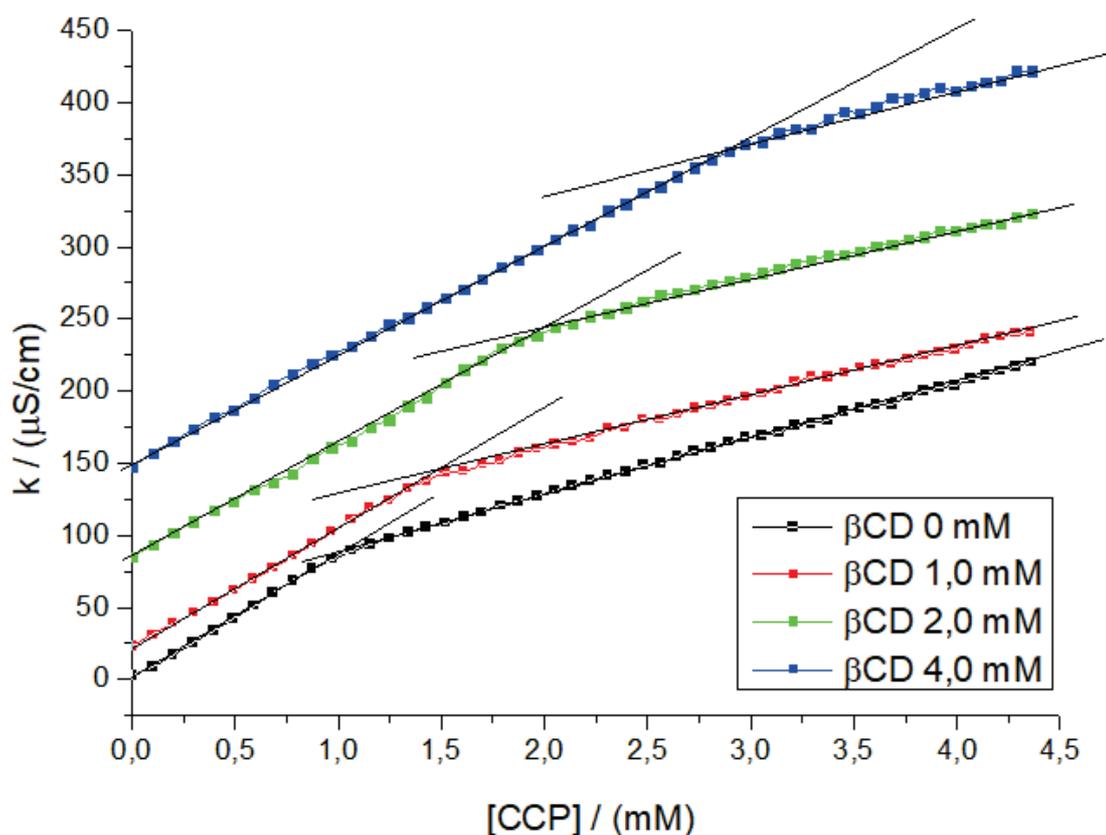


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Como observado na Figura 21b, a energia livre de Gibbs  $\Delta_{mic}G^{\circ}$  sofreu ligeiro aumento em função da concentração de  $\beta$ CD por ser uma grandeza proporcional à cmc, reforçando a hipótese de que a presença de  $\beta$ CD dificulta a micelização, pelo fato da formação do composto de inclusão ser um processo preferencial. Porém, os valores de  $\Delta_{mic}G^{\circ}$  foram baixos se comparados com as variações de  $\Delta_{mic}H^{\circ}$  e  $T\Delta_{mic}S^{\circ}$ , sugerindo compensação entálpico/entrópica.

O valor de  $\Delta_{mic}H^{\circ}$  na ausência de  $\beta$ CD foi de +114,8 kJ/mol. Porém, o aumento da concentração de  $\beta$ CD diminuiu o valor de  $\Delta_{mic}H^{\circ}$  tornando-o menos endotérmico, sugerindo que, do ponto de vista entálpico, a presença da ciclodextrina facilite a micelização por reduzir a repulsão eletrostática CCP/CCP por meio de interações específicas do tipo íon-dipolo.

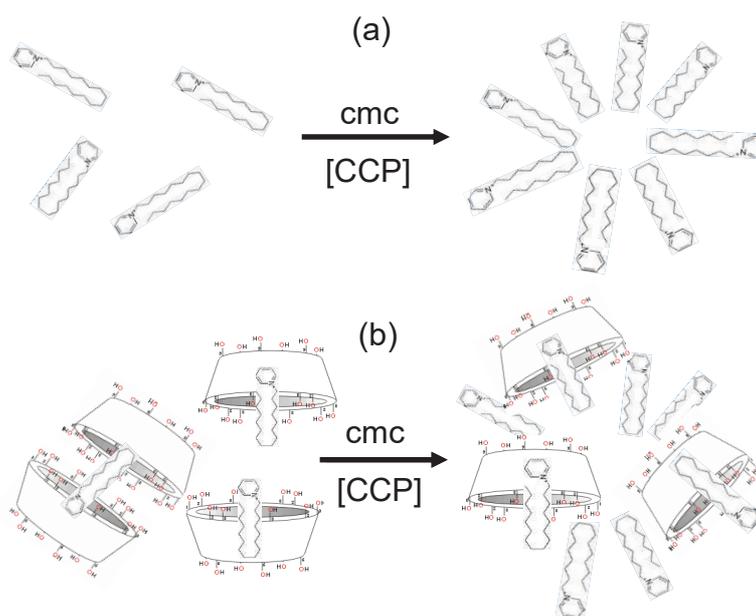
Figura 22 – Titulação condutimétrica do CCP a 30 mM na ausência e na presença de  $\beta$ CD em diferentes concentrações (0, 1,0, 2,0, 4,0 mM)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na Figura 23 está representada esquematicamente a micelização do CCP puro e na presença de  $\beta$ CD, neste último caso alterando a forma da micela do surfactante.

Figura 23 – Representação esquemática da micelização do CCP puro (a) e na presença de  $\beta$ CD (b).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Todavia, observa-se uma gradativa redução de  $T\Delta_{mic}S^{\circ}$  entropia à medida que a concentração de  $\beta$ CD aumenta, tornando o valor de  $\Delta_{mic}G^{\circ}$  menos negativo. Este comportamento foi atribuído à formação de estruturas supramoleculares altamente organizadas, resultantes do encapsulamento dos compostos de inclusão nas micelas.

## 4.2 ESTUDO DAS INTERAÇÕES DO CCP COM MICRORGANISMOS

### 4.2.1 Teste de atividade antimicrobiana

Novas tecnologias voltadas para desenvolvimento de fármacos, incluindo a genômica e biologia estrutural, abrem importantes possibilidades para a descoberta de antibióticos. No entanto, um esforço substancial para prosseguir a pesquisa e, além disso, incorporar a resultados na cadeia de produção são necessários para trazer novos antimicrobianos para o usuário final. No cenário das doenças emergentes e da disseminação rápida de resistência a antibióticos, torna-se de fundamental importância uma política ativa que possa atender essas demandas. Caso contrário, muitos programas promissores podem nunca ser totalmente desenvolvidos por falta de investimentos privados e públicos (MONNIER et al., 2018; NIU et al., 2019).

Diante das dificuldades na descoberta de novas moléculas com capacidade biocida, uma alternativa tem sido manipular as substâncias já conhecidas de forma a aprimorar sua utilização, estratégia esta já utilizada em alguns estudos com a  $\beta$ CD (SUÁREZ et al., 2014).

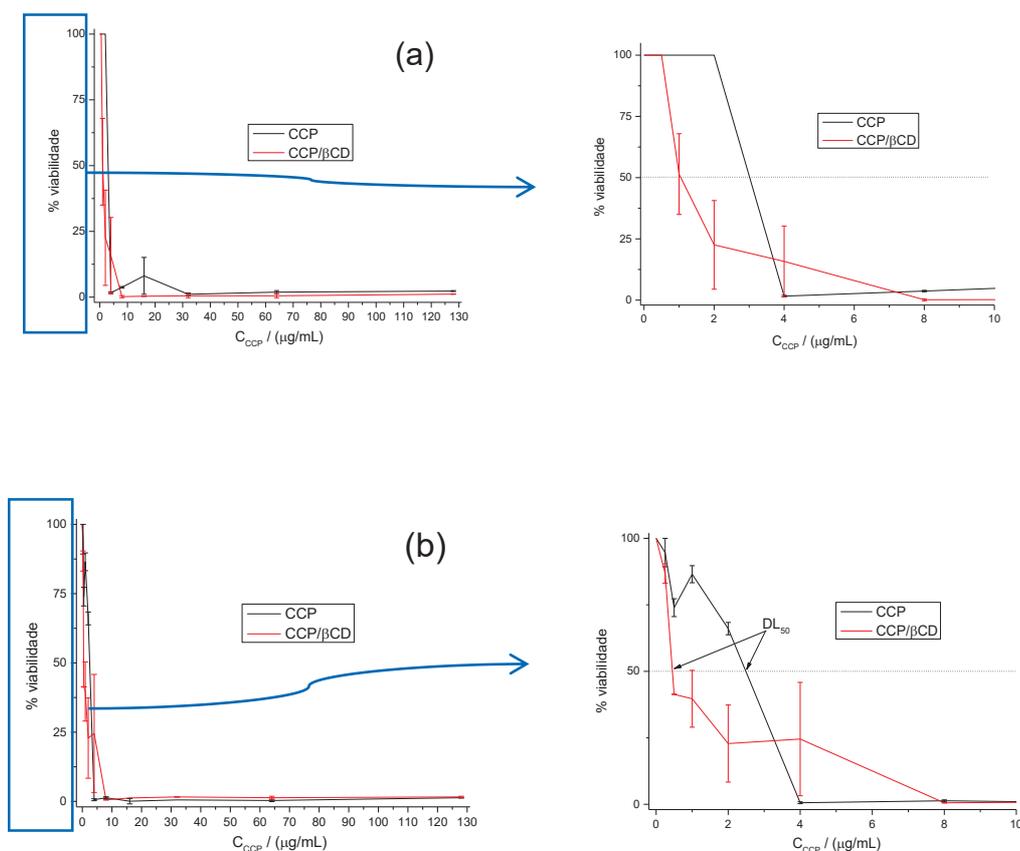
O teste de atividade antimicrobiana possibilita avaliar se a presença de  $\beta$ CD influencia na efetividade do CCP, uma vez que novos mecanismos de interação do CI com as membranas bacterianas podem potencializar a ação do antibiótico.

No presente trabalho, o teste antimicrobiano foi realizado testando as seguintes concentrações de CCP e CCP/ $\beta$ CD em  $\mu\text{g/mL}$ : 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 contra cepas ATCC e clínica de *S. aureus*. Os cálculos da concentração foram realizados levando sempre em consideração a massa do CCP, ficando como variável a presença ou ausência de  $\beta$ CD. A decisão de se testar duas cepas distintas, sendo uma cepa padrão (ATCC) destinada ao controle de qualidade bacteriológico, que apresenta resposta conhecida a uma série de provas laboratoriais e outra cepa isolada de amostra biológica humana (clínica) foi para evitar a possibilidade de uma resposta que fosse cepa-específica.

Na Figura 24 estão demonstrados os resultados obtidos na determinação da  $DL_{50}$  para a cepa ATCC (a) e clínica (b), sendo possível perceber que a concentração

de CCP necessária para reduzir a viabilidade de 50% de *S. aureus* em cultura foi menor na presença de  $\beta$ CD em ambas as cepas.

Figura 24 – Determinação da  $DL_{50}$  do CCP e do CCP/ $\beta$ CD contra *S. aureus* cepas ATCC (a) e clínica (b).

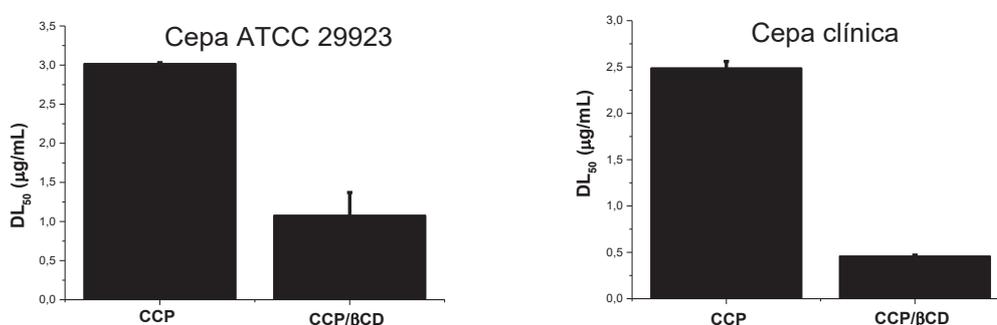


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Contudo, possivelmente o CCP esteja sendo liberado mais lentamente da cavidade da  $\beta$ CD, aumentado ligeiramente (apenas um título) a CIM do CCP/ $\beta$ CD se comparado ao CCP nas cepas de *S. aureus*. O valor da CIM de um composto se deve a um único ponto (concentração) onde houve a inibição total do crescimento do microrganismo, enquanto na determinação  $DL_{50}$  é considerado uma tendência (curva) baseada em diversos pontos (concentrações), podendo trazer informações mais abrangentes e não vistas pela CIM.

A  $DL_{50}$  foi calculada para o CCP e CCP/ $\beta$ CD nas duas cepas, conforme a Figura 25. A presença de  $\beta$ CD provavelmente esteja aumentando a interação do CCP com a membrana da célula bacteriana melhorando a atividade do antimicrobiano e levando à diminuição da  $DL_{50}$ . A possibilidade de redução da dose é relevante visto que também pode estar associado à menor incidência de efeitos adversos dose-dependentes.

Figura 25 –  $DL_{50}$  do CCP e CCP/ $\beta$ CD em  $\mu\text{g/mL}$  contra *S. aureus*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.2.2 Cinética de morte bacteriana

O teste de cinética de morte bacteriana permite avaliar a diminuição da viabilidade no decorrer do tempo em função da efetividade do antimicrobiano. A eficácia por sua vez é influenciada por diversos fatores, como a quantidade do princípio ativo disponível no local de sua ação e os mecanismos de interação com as células bacterianas, fatores estes que são influenciados pela presença da  $\beta$ CD, que tendo sido complexado previamente com o CCP promove a liberação lenta deste composto, além de alterar os mecanismos de interação com as membranas e paredes celulares bacterianas.

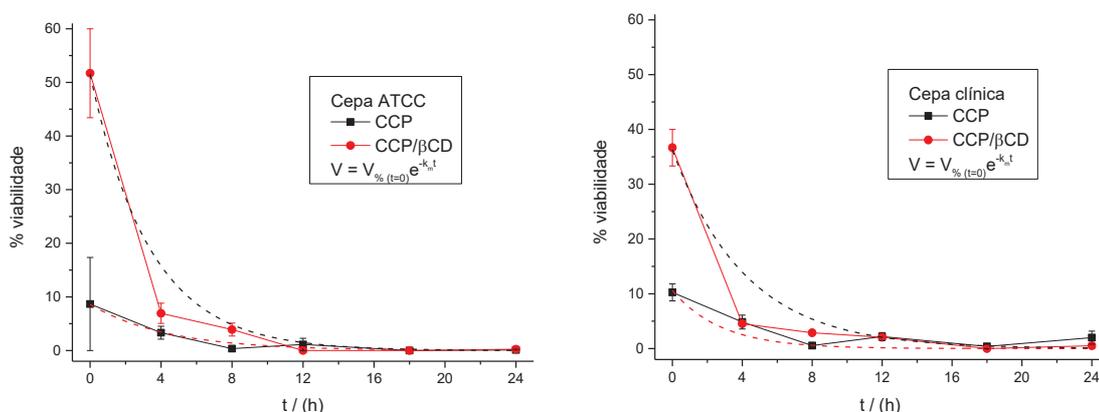
Na Figura 26 é mostrado a variação do percentual de viabilidade celular em função do tempo. Com o objetivo de melhor quantificar o efeito dos compostos na velocidade de morte celular, os dados foram modelados segundo equação exponencial de primeira ordem (Eq. 8, forma diferencial e Eq. 9 forma integrada):

$$\frac{dV_{\%}}{dt} = -k_m V_{\%} \quad \text{Eq. 8}$$

$$V_{\%t} = V_{\%(t=0)} e^{-k_m t} \quad \text{Eq. 9}$$

Nessas equações,  $V_{\%t}$  é o percentual de viabilidade celular em um tempo  $t$  qualquer,  $V_{\%(t=0)}$  é a porcentagem de viabilidade celular no tempo  $t = 0$ , ou seja, com o contato inicial do composto com os microrganismos e  $k_m$  é a constante cinética de morte celular. A quantidade  $dV_{\%}/dt$  é a taxa (velocidade) de redução da viabilidade. Substituindo os valores de  $k_m$  e  $V_{\%(t=0)}$  na equação 8 (obtidos por regressão não linear), temos o produto  $k_m V_{\%(t=0)}$ , que representa a velocidade inicial de redução da viabilidade celular.

Figura 26 – Cinética de morte bacteriana do CCP e do CCP/ $\beta$ CD, ambos na concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$ , contra *S. aureus* cepas ATCC e clínica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os valores de  $k_m$ ,  $V_{\%(t=0)}$  e  $k_m V_{\%(t=0)}$ , obtidos por regressão não linear usando o software Microcal Origin 9.0, estão apresentados na Tabela 7.

Como pode ser observado, para todas as cepas estudadas, tanto o percentual de viabilidade no tempo zero  $V_{\%(t=0)}$  quanto a velocidade inicial de redução da viabilidade  $k_m V_{\%(t=0)}$  foram maiores para o CCP/ $\beta$ CD do que para o CCP puro.

Tabela 7 – Variáveis cinéticas do contato do CCP e CCP/ $\beta$ CD contra *S. aureus* cepas ATCC e clínica

Cepas	Composto	$V_{\%(t=0)}$	$k_m$ ( $s^{-1}$ )	$k_m V_{\%(t=0)}$ ( $s^{-1}$ )
ATCC	CCP	8,6	0,23	1,98
	CCP/ $\beta$ CD	51,5	0,29	14,94
Clínica	CCP	10,6	0,36	3,82
	CCP/ $\beta$ CD	36,2	0,23	8,32

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os maiores valores de  $V_{\%(t=0)}$  para sistemas tratados com compostos de inclusão demonstram que ocorre um atraso na morte dos microrganismos no início do contato. Este fato foi atribuído a uma menor disponibilidade de CCP no meio para ser assimilado e metabolizado, em decorrência do encapsulamento molecular.

Todavia, os valores de velocidade inicial de morte celular,  $k_m V_{\%(t=0)}$ , são bem maiores na presença de  $\beta$ CD. Isso sugere a existência de um mecanismo alternativo de interação do CCP com as membranas celulares na presença de  $\beta$ CD. Após intervalo de aproximadamente 12 h, os valores de percentual de viabilidade para os microrganismos tratados com CCP puro ou complexado com  $\beta$ CD se igualam.

#### 4.2.3 Estudos de interação fármaco-membrana

Considerando que os estudos cinéticos de morte celular sugeriram um mecanismo diferente de interação do composto de inclusão CCP/ $\beta$ CD com os microrganismos, bem como dados da literatura que indicam que, na presença de  $\beta$ CD, fármacos interagem de maneira diferente com bactérias (SUÁREZ et al., 2014), foram realizados estudos visando a identificação dos efeitos coloidais do CCP puro e CCP/ $\beta$ CD nas células de *S. aureus*, bem como determinação dos parâmetros termodinâmicos de interação fármaco-microrganismo.

A técnica de DLS é uma ferramenta que permite a determinação do tamanho médio de nanoestruturas em meio líquido. Este método baseia-se na dispersão do feixe de laser monocromático quando a partícula é iluminada pelo mesmo, levando

em consideração o movimento browniano das partículas e o fato que pequenas partículas se deslocam mais rapidamente do que partículas maiores. Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, a flutuação da intensidade de luz espalhada é maior, pois como se movimentam mais rapidamente, essas partículas cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo. Com partículas grandes, o efeito é o oposto. As flutuações de intensidade resultantes são utilizadas para calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas utilizando a equação de Stokes-Einstein (Eq. 10) (KANTER et al., 2016).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Eq. 10}$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão translacional ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $K_B$  = constante de Boltzmann ( $1,38064852 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (K),  $\eta$  = viscosidade dinâmica (Pa.s) e  $R_h$  o raio hidrodinâmico da partícula ou agregado molecular.

O PZ relaciona-se com o potencial eletrostático nas superfícies das partículas, sendo dependente da micelização e adsorção de íons, estando intimamente ligado à estabilidade da dispersão. Quando o PZ é baixo tem-se dispersões mais instáveis, já valores elevados de PZ podem indicar maior estabilidade, visto que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as forças de Van Der Waals, as quais são sempre de natureza atrativa e promovem à agregação. Do ponto de vista prático, tem sido observado que suspensões com valores de PZ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto que aquelas cujo valor se situa entre -30 mV e +30 mV são instáveis e podem flocular. A análise das propriedades  $D_h$  e  $PZ$  nos permite sugerir o comportamento coloidal e a estabilidade de sistemas nanoestruturados em solução ou suspensão (ALVES et al., 2014; BIJARBOONEH et al., 2013; MONTEIRO et al., 2011).

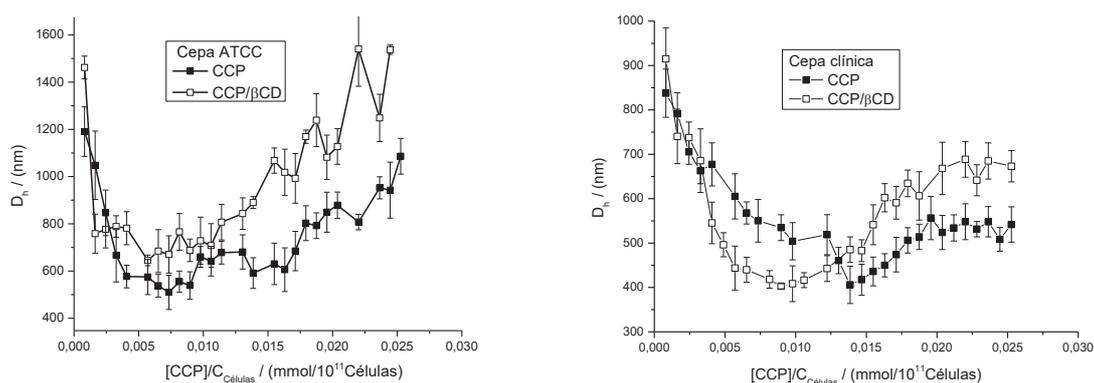
A concentração molar do CCP e do CCP/ $\beta$ CD que foram adicionadas às suspensões bacterianas foram calculadas de forma que na metade das injeções, ou seja, após a adição de 150,0  $\mu\text{L}$ , a concentração do CCP na cubeta fosse de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , correspondente à CIM encontrada para as bactérias em estudo.

Pode-se observar na Figura 27 que a adição de CCP à suspensão de *S. aureus* leva a uma inicial diminuição do  $D_h$ , tendo o ponto mínimo deste coincidindo com a concentração aproximada da CIM, sugerindo uma saturação das membranas

bacterianas. A partir do mínimo, ocorre um aumento de tamanho das células, sugerindo uma desestruturação das membranas. Para as duas cepas, as células tratadas com CCP/ $\beta$ CD apresentam maiores valores de  $D_h$ , sugerindo que o entumescimento foi maior na presença de  $\beta$ CD.

*S. aureus* tem uma parede celular de polissacarídeo que confere uma forte resistência a diferentes ambientes, possuindo a camada mais externa com carga elétrica negativa e demonstrou possuir interações medianas com drogas catiônicas (STROMINGER; PARK; THOMPSON, 1959; SUÁREZ et al., 2014).

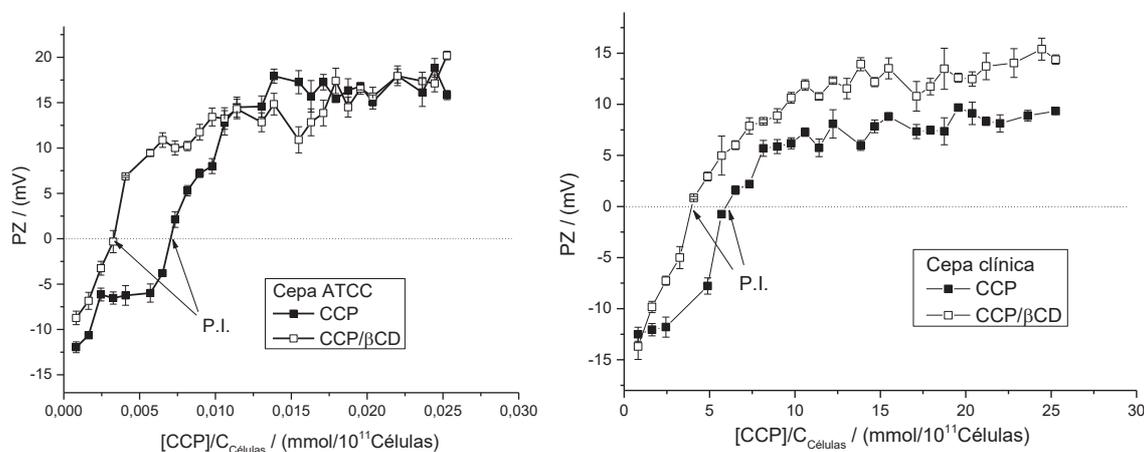
Figura 27 – Diâmetro hidrodinâmico de células de *S. aureus* ATCC e clínica em função da concentração do CCP e CCP/ $\beta$ CD



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Medidas de PZ foram utilizadas para se determinar o efeito do CCP na superfície dos microrganismos. Conforme demonstrado na Figura 28, tem-se valores de PZ inicialmente negativos, atribuído à presença de fosfolipídios negativamente carregados na membrana celular. Durante a titulação, os valores de PZ tornam-se menos negativos tanto para o CCP puro quanto para o CCP/ $\beta$ CD, devido à neutralização das macromoléculas pelo surfactante. Quando o PZ se iguala a zero, tem-se a neutralização da superfície bacteriana, sendo este o ponto isoelétrico (P.I.) do microrganismo, ocorrendo inversão de carga devido à saturação da superfície das células pelo CCP.

Figura 28 – Potencial zeta de células de *S. aureus* ATCC e clínica em função da concentração do CCP e CCP/ $\beta$ CD.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

No caso do CCP/ $\beta$ CD, observa-se uma melhoria na capacidade de neutralização dos microrganismos pelo CCP, embora o fenômeno tenha sido mais pronunciado para a cepa ATCC. Essa melhoria foi atribuída a um possível aumento na intensidade das interações entre o complexo CCP/ $\beta$ CD e as membranas bacterianas, através da formação de ligações de hidrogênio através das hidroxilas da  $\beta$ CD, além das interações iônicas já esperadas (SANDT et al., 2007; SUÁREZ et al., 2014). As diferenças observadas nos resultados para os dois microrganismos pode ter ocorrido devido a diferenças estruturais na constituição de suas membranas.

Por essas razões, aprofundamos os estudos de interação fármaco-microrganismo, via experimentos de ITC, conforme demonstrado adiante.

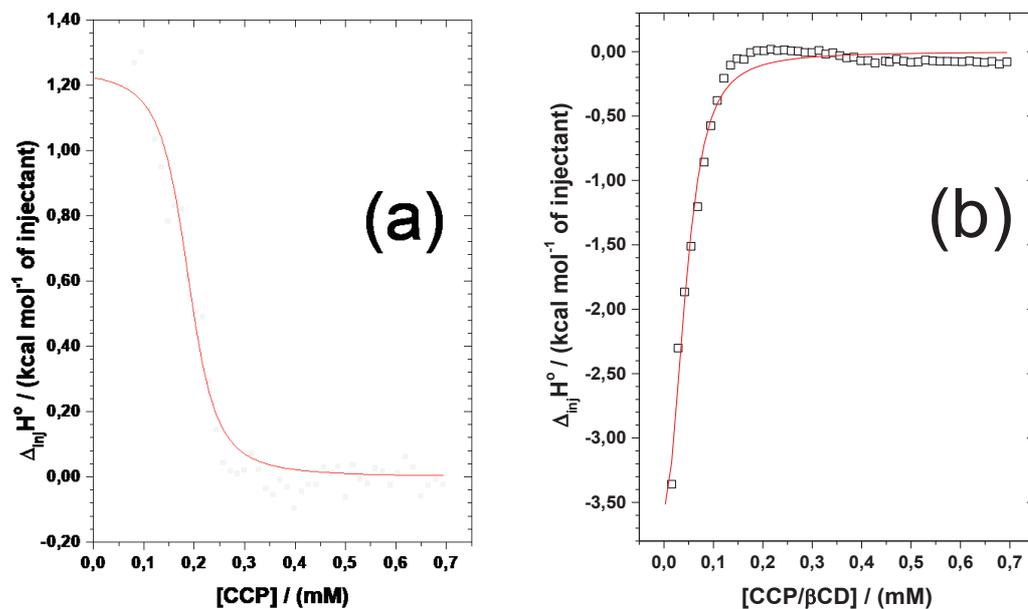
#### 4.2.4 Estudo termodinâmico de interação fármaco-membrana

Para melhor caracterizar as interações entre o CCP ou o CCP/ $\beta$ CD com as cepas de *S. aureus*, foram realizados experimentos de ITC, titulando-se diretamente os compostos em suspensões contendo os microrganismos, conforme demonstrado

nas Figuras 29 e 30. Os resultados são expressos após a subtração dos respectivos brancos (curvas de diluição dos compostos em salina) (SUÁREZ et al., 2014).

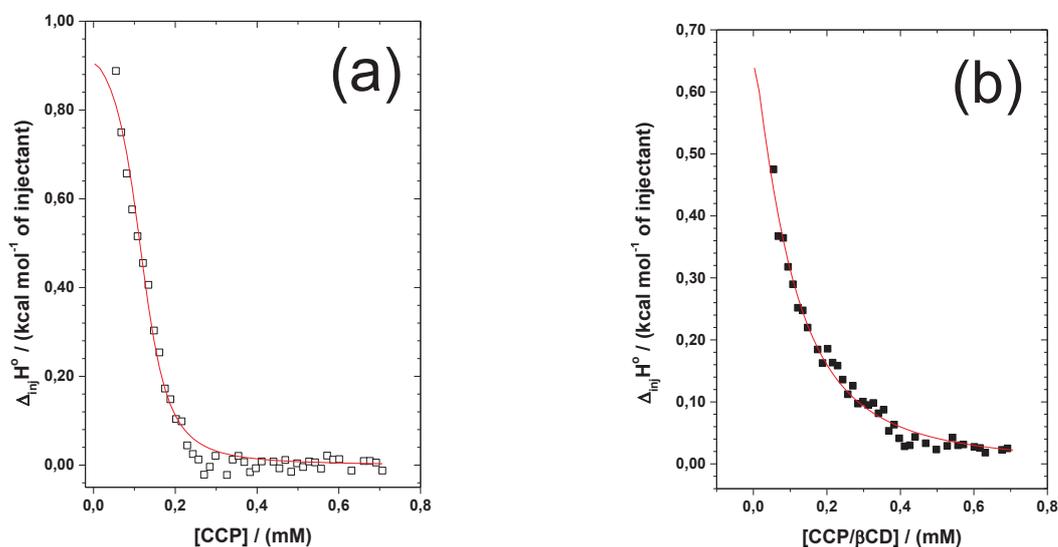
Nas Figuras 29 (a) e 30 (a) e (b) percebe-se curvas com característica endotérmica, fenômeno que pode ser devido à quebra de solvatação em torno das superfícies celulares negativamente carregadas, em consequência da interação eletrostática com o cátion CCP.

Figura 29 – Titulação do CCP (a) e CCP/ $\beta$ CD (b) a 122,87  $\mu$ M em suspensão de *S. aureus* cepa ATCC.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 30 – Titulação do CCP (a) e CCP/ $\beta$ CD (b) a 122,87  $\mu$ M em suspensão de *S. aureus* cepa clínica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Já na Figura 29 (b), a adição do CCP na presença de  $\beta$ CD teve um comportamento diferente, apresentando uma curva de característica exotérmica, sugerindo que a interação CCP/*S.aureus* foi modificada pela  $\beta$ CD. Como oligossacarídeo cíclico, a  $\beta$ CD é rica em grupos hidroxilas que podem formar espontaneamente ligações de hidrogênio com vários componentes da membrana celular e gerar uma reação exotérmica. Situação similar já foi descrita na literatura por Suárez et al. (2014).

Em maiores concentrações de CCP não há mais sítios de ligação às membranas bacterianas e a energia envolvida nas titulações tendem a um valor constante nos quatro experimentos, comportamento já observado em outros trabalhos (MONTEIRO et al., 2011).

Na Tabela 8 estão apresentadas as variáveis termodinâmicas das interações do CCP com as membranas de *S. aureus* cepas ATCC e clínica na ausência e na presença de  $\beta$ CD. Na presença de  $\beta$ CD houve considerável redução do coeficiente estequiométrico (N) em ambas as cepas, sugerindo que a mudança do perfil de

interação com a membrana proporcionada pelo oligossacarídeo permitiu que uma menor concentração de CCP seja capaz de saturar a célula bacteriana, o que é compatível com a redução dos valores de  $DL_{50}$  observados na presença de  $\beta$ CD.

Houve, no entanto, significativa redução na constante de equilíbrio (K) na presença de  $\beta$ CD, demonstrando diminuição da força de interação entre o CCP e as membranas bacterianas. Na ausência de  $\beta$ CD, a natureza da interação é majoritariamente eletrostática e portanto mais fortes, envolvendo o cátion CCP e as membranas de características aniônicas. Já na presença de  $\beta$ CD novas interações acontecem, como ligações de hidrogênio e força de Van der Waals (ion-dipolo, dipolo induzido, dipolo-dipolo) entre o CCP/ $\beta$ CD e as membranas bacterianas, as quais tem menor força.

Tabela 8 – Parâmetros termodinâmicos da interação de CCP e CCP/ $\beta$ CD a 122,87  $\mu$ M em suspensões de *S. aureus* cepas ATCC e clínica.

Cepas	Parâmetros termodinâmicos	Substância testata	
		CCP	CCP/ $\beta$ CD
ATCC	N	0,185 $\pm$ 0,004	0,040 $\pm$ 0,004
	K (M <sup>-1</sup> )	226000 $\pm$ 62400	63000 $\pm$ 11800
	$\Delta_{inj}H^{\circ}$ (cal/mol)	1250,0 $\pm$ 55,3	-4983,0 $\pm$ 520,1
	T $\Delta_{inj}S^{\circ}$ (cal/mol/deg)	8556,9	1580,2
	$\Delta_{inj}G^{\circ}$ (cal mol <sup>-1</sup> )	-7307	-6548
Clínica	N	0,119 $\pm$ 0,0038	0,07 $\pm$ 0,02
	K (M <sup>-1</sup> )	98800 $\pm$ 17000	9050 $\pm$ 1600
	$\Delta_{int}H^{\circ}$ (cal/mol)	982,6 $\pm$ 50,35	1557 $\pm$ 580,4
	T $\Delta_{int}S^{\circ}$ (cal/mol/deg)	7781,7	6947
	$\Delta_{int}G^{\circ}$ (cal mol <sup>-1</sup> )	-6799	-5390

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Além disso, pode-se observar que todos os processos foram conduzidos por entropia. Isto pode ser explicado pela extensa dessolvatação resultante de forte

interação eletrostática entre o CCP e fosfolipídios aniônicos, grupos carboxila no peptideoglicano e ácido teicóicos das membranas bacterianas. O caráter endotérmico das titulações foi atribuído como a quebra da ligação de hidrogênio da água durante a dessolvatação (LI et al., 2019; THOMAS; RICE, 2014).

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante a caracterização confirmaram a formação do complexo de inclusão devido ao estabelecimento de novas interações, tanto em solução quanto no estado sólido.

Os espectros de absorção na região do infravermelho demonstraram diferenças significativas dos padrões de bandas no CCP/ $\beta$ CD quando comparados às substâncias puras. O aumento da estabilidade térmica do CCP no CCP/ $\beta$ CD foi percebido nas análises de TGA e DTA.

A técnica de RMN de  $^1\text{H}$  possibilitou visualizar alteração nos sinais dos hidrogênios como reflexo de um novo ambiente químico devido às interações entre o CCP e a  $\beta$ CD. Já o ROESY do complexo de inclusão CCP/ $\beta$ CD demonstrou correlações dipolares entre os hidrogênios aromáticos do CCP com os hidrogênios da cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD.

No estudo de micelização por ITC observou-se que a presença da  $\beta$ CD aumenta a cmc do CCP, levando à crescente elevação da cmc sempre que se aumentava a concentração da  $\beta$ CD, sugerindo que interação do CCP com a  $\beta$ CD é preferencial em relação à formação de micelas.

Nos estudos de complexação por ITC, foi observado que a interação entre CCP/ $\beta$ CD se deu com estequiometria preferencial de 1:1, podendo ocorrer também a formação de complexos do tipo 1:2. Esse dado foi confirmado pela modelagem molecular, que identificou que a interação entre esses compostos, na ausência de solvente (estado gasoso) ora se formam com relação estequiométrica de 1:1, ora 1:2, com aproximadamente 50% de probabilidade para cada tipo. Dentre as variáveis termodinâmicas obtidas, o valor da constante de equilíbrio é considerado alto e está relacionado com a força de interação, interação esta espontânea devida principalmente à contribuição entrópica na formação do CCP/ $\beta$ CD.

Na realização dos testes de atividade antimicrobiana, os resultados de  $\text{DL}_{50}$  obtidos com o CCP na presença da  $\beta$ CD foram melhores, ou seja, a concentração necessária para reduzir a viabilidade de cepas ATCC e clínica de *S. aureus* em 50% foi menor para o CI quando comparado ao CCP puro.

Após a realização da cinética de morte bacteriana, foi possível perceber que na presença do  $\beta$ CD ocorre um atraso na morte dos microrganismos no início do contato

quando comparado ao CCP puro. Este fato foi atribuído a uma menor disponibilidade de CCP no meio para ser assimilado e metabolizado, em decorrência do encapsulamento molecular. Todavia, a velocidade de diminuição de viabilidade bacteriana na presença de  $\beta$ CD é maior, sugerindo a existência de um mecanismo alternativo de interação do CCP com as membranas celulares na presença de  $\beta$ CD, de modo que após intervalo de aproximadamente 12 h, os valores de percentual de viabilidade para os microrganismos tratados com CCP puro ou complexado com  $\beta$ CD se igualam.

O estudo de interação com a membrana mostrou significativa redução dos valores da estequiometria de ligação CCP/membrana, sinalizando que uma menor concentração de CCP é suficiente para saturar as membranas celulares dos *S. aureus*. Os valores de K (constante de equilíbrio) também foram reduzidos em consequência de novos mecanismos de interação na presença de  $\beta$ CD.

Para melhor entendimento da interação dos compostos com as membranas celulares bacterianas, o PZ foi realizado e a presença da  $\beta$ CD melhorou a capacidade de neutralização do CCP, possivelmente por permitir melhor interação com a membrana bacteriana através de ligações de hidrogênio, agindo sinergicamente com as interações iônicas que pode se formar entre um fármaco catiônico e uma superfície celular aniônica.

A estratégia de reavaliar compostos já utilizados no combate a microrganismos aliada ao encapsulamento molecular resultou em uma melhora na sua potência sugerindo ser uma ferramenta promissora. Isso pode contribuir para melhorar a eficiência do arsenal de antimicrobianos utilizados no combate das infecções, visto que são grandes as dificuldades para descoberta por instituições de pesquisa e liberação pelas agências regulatórias de novos princípios ativos.

## BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, Kátia Maria de Oliveira. **Caracterização reológica e coloidal de xantana biossintetizada a partir de glicose e uso como sistema de liberação controlada de doxiciclina.** 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Juiz de Fora Campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2018.

ALVES, D. et al. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, Porto, v. 53, n. 3, p.181-189, 2012.

ALVES, Júlia. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos.** 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

ALVES, M. R. A. et al. Study of the interaction between glucosamine hydrochloride and sodium dodecylsulphate micelles using conductometric, isothermal calorimetry, zeta-potential titrations, and NMR NOESY. **Turkish Journal Of Chemistry**, Itabira, v. 38, p.248-259, mar. 2014.

ASANUMA, H. et al. Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests. **Analytica Chimica Acta**, Tokyo, v. 435, p.25-33, 2001.

BERTSCHE, U. et al. Correlation of Daptomycin Resistance in a Clinical *Staphylococcus aureus* Strain with Increased Cell Wall Teichoic Acid Production and d-Alanylation. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Tübingen, v. 55, n. 8, p.3922-3928, 23 maio 2011.

BHATTARAI, A. et al. Influence of methanol and dimethyl sulfoxide and temperature on the micellization of cetylpyridinium chloride. **Journal Of Molecular Liquids**, Biratnagar, v. 242, p.831-837, set. 2017.

BIJARBOONEH, F. H. et al. Aqueous Colloidal Stability Evaluated by Zeta Potential Measurement and Resultant TiO<sub>2</sub> for Superior Photovoltaic Performance. **Journal Of The American Ceramic Society**, Wollongong, v. 96, n. 8, p.2636-2643, 6 maio 2013.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The Physicochemical Characteristics of Freeze-Dried Scutellarin-Cyclodextrin Tetracomponent Complexes. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, Nanjing, v. 31, n. 8, p.747-756, jan. 2005.

CASTIGLIONE, F. et al. Selective Interaction of 2,6-Di-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin and Pluronic F127 Micelles Leading to Micellar Rupture: A Nuclear Magnetic Resonance Study. **The Journal Of Physical Chemistry B**, Salamanca, v. 115, n. 29, p.9005-9013, 28 jul. 2011.

CATHUM, S. et al. Detoxification of mercury in the environment. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, Ottawa, v. 381, n. 8, p.1491-1498, abr. 2005.

CHOWDARY, K. P. R.; SHANKAR, K. R.; TANNIRU, A. Recent research on cyclodextrin complexation in formulation development- a review. **Journal Of Global Trends In Pharmaceutical Sciences**, Rajahmundry, v. 5, n. 2, p.1576-1583, 2014.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, Salamanca, v. 39, n. 9, p.1033-1046, maio 2004.

DENADAI, Â. M. I. et al. Chlorhexidine/losartan ionic pair binding and its nanoprecipitation: physico-chemical characterisation and antimicrobial activity. **Supramolecular Chemistry**, Timóteo, v. 24, n. 3, p.204-212, 14 dez. 2011.

EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. **The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet**. 2. ed. New York: Wiley-vch, 1999. 672 p.

Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, Revision D. 01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

GALVÃO, J.G. et al.  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control Aedes aegypti larvae. **Thermochimica Acta**, São Cristóvão, v. 608, p.14-19, maio 2015.

GONTIJO FILHO, P. P. et al. Spread of Multidrug-resistant microorganisms: a global threat and critical healthcare problem. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, p.1-2, 15 ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i3.7062>>. Acesso em: 15 set. 2018.

GRIMME, S.; EHRLICH, S.; GOERIGK, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. **Journal Of Computational Chemistry**, Münster, n. 32, p.1456-1465, 2011.

HIBBITTS, A.; O'LEARY, C. Emerging Nanomedicine Therapies to Counter the Rise of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Materials**, Dublin, v. 11, n. 2, p.1-33, 23 fev. 2018.

HUANG, H. et al. Comparisons of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Hospital-Associated MSRA Infections in Sacramento, California. **Journal Of Clinical Microbiology**, Davis, v. 44, n. 7, p.2423-2427, 1 jul. 2006.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, Toky, v. 6, n. 1, p.41-52, fev. 2003.

JOHNSON, A. P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the European landscape. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 4, p.43-48, 26 abr. 2011

JONES, T. et al. Failures in Clinical Treatment of Staphylococcus aureus Infection with Daptomycin Are Associated with Alterations in Surface Charge, Membrane Phospholipid Asymmetry, and Drug Binding. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Torrance, v. 52, n. 1, p.269-278, 22 out. 2007.

KANTER, M. et al. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. **Measurement**, Aachen, v. 80, p.92-98, fev. 2016.

KARAYIL, J. et al. Micellar Growth in Cetylpyridinium Chloride/Alcohol System: Role of Long Chain Alcohol, Electrolyte and Surfactant Head Group. **Journal Of Surfactants And Detergents**, Calicut, v. 19, n. 4, p.849-860, maio 2016.

KIM, H. et al. Synthesis, Characterization, and Retinol Stabilization of Fatty Amide- $\beta$ -cyclodextrin Conjugates. **Molecules**, Seoul, v. 21, n. 7, p.1-13, 22 jul. 2016

LANGDON, A.; CROOK, N.; DANTAS, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome Medicine**, St. Louis, v. 8, n. 1, p.1-16, 13 abr. 2016.

LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, Jerusalem, v. 355, n. 6327, p.826-830, 9 fev. 2017.

LI, H.; HOU, W.; LI, X. Interaction between xanthan gum and cationic cellulose JR400 in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, Jinan, v. 89, n. 1, p.24-30, jun. 2012.

LI, J. et al. Insights on the ultra high antibacterial activity of positionally substituted 2'-O-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan: A joint interaction of -NH<sub>2</sub> and -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> with bacterial cell wall. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, Shenzhen, v. 173, p.429-436, 2019.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. **Chemical Reviews**, Montreal, v. 92, p.1457-1470, 1992.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Reykjavik, v. 85, n. 10, p.1017-1025, out. 1996.

LULA, I. et al. Interaction between bradykinin potentiating nonapeptide (BPP9a) and β-cyclodextrin: A structural and thermodynamic study. **Materials Science And Engineering: C**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p.244-253, mar. 2012.

MAAMAR, S. B; HU, J; HARTMANN, E. M. Implications of indoor microbial ecology and evolution on antibiotic resistance. **Journal Of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, Evanston, v. 30, n. 1, p.1-15, 7 out. 2019.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, St. Louis, v. 12, n. 1, p.147-179, jan. 1999.

MEOUCHE, I. E.; DUNLOP, M. J. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. **Science**, Boston, v. 362, n. 6415, p.686-690, 8 nov. 2018.

MONNIER, A. A. et al. Ensuring Antibiotic Development, Equitable Availability, and Responsible Use of Effective Antibiotics: Recommendations for Multisectoral Action. **Clinical Infectious Diseases**, Nijmegen, v. 68, n. 11, p.1952-1959, 26 set. 2018.

MONTEIRO, A. S. et al. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, Belo Horizonte, v. 84, n. 2, p.467-476, jun. 2011.

MOREIRA, Ana Maria dos Santos. **Composições nanoestruturadas de avermectinas com  $\beta$ -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti***. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de São João Del-rei, Universidade Federal de SÃO João Del-rei, São João Del-rei, 2016.

MISHRA, N. N.; BAYER, A. S.. Correlation of Cell Membrane Lipid Profiles with Daptomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Torrance, v. 57, n. 2, p.1082-1085, 17 dez. 2012.

MISHRA, N. N. et al. Analysis of Cell Membrane Characteristics of In Vitro-Selected Daptomycin-Resistant Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Torrance, v. 53, n. 6, p.2312-2318, 30 mar. 2009.

NAGARAJ, K.; ARUNACHALAM, S. Synthesis and electron transfer kinetics of a surfactant-cobalt(III) complex: effects of micelles,  $\beta$ -cyclodextrin, and ionic liquids. **Transition Metal Chemistry**, Tiruchirapalli, v. 38, n. 6, p.649-657, 5 jun. 2013.

NEACȘU, A. D. et al. Solid state study of the inclusion compounds of alpha-, beta-cyclodextrin with d-, l-tryptophan isomers. **Revue Roumaine de Chimie**, Bucharest, v. 58, n. 11-12, p.863-870, 2013.

NIU, G. et al. Engineering nucleoside antibiotics toward the development of novel antimicrobial agents. **The Journal Of Antibiotics**, Chongqing, v. 72, n. 12, p.906-912, 9 set. 2019.

OHTA, A. et al. Effect of the side chain of N-acyl amino acid surfactants on micelle formation: An isothermal titration calorimetry study. **Colloids And Surfaces A:**

Physicochemical and Engineering Aspects, Kanazawa, v. 317, n. 1-3, p.316-322, mar. 2008.

PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. **International Journal Of Dental Hygiene**, Amsterdam, v. 3, p.162-178, 2005.

PAULA, W. X. et al. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl- $\beta$ -CD: ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and anti-hypertensive studies. **International Journal Of Pharmaceutics**, Belo Horizonte, v. 404, n. 1-2, p.116-123, fev. 2011.

PINCUS, N. B. et al. Strain Specific Phage Treatment for Staphylococcus aureus Infection Is Influenced by Host Immunity and Site of Infection. **Plos One**, v. 10, n. 4, p.1-16, 24 abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124280>>. Acesso em: 15 set. 2018.

RASIC, A. et al. Efficacy and Safety of Lysozyme, Cetylpyridinium and Lidocaine Fixed Combination for Treatment of Chemotherapy- and Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: a Pilot Study. **Materia Socio Medica**, Sarajevo, v. 31, n. 3, p.166-171, 2019.

REDING, N. S.; SHIFLETT, M. B. Characterization of Thermal Stability and Heat Absorption for Suppressant Agent/Combustible Dust Mixtures via Thermogravimetric Analysis/Differential Scanning Calorimetry. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Lawrence, v. 58, n. 11, p.4674-4687, 19 fev. 2019.

RIZZI, V. et al. Interactions between 4-thiotymidine and water-soluble cyclodextrins: Evidence for supramolecular structures in aqueous solutions. **Beilstein Journal Of Organic Chemistry**, Bari, v. 12, p.549-563, 21 mar. 2016.

RODRÍGUEZ, F. J. et al. Characterization of cetylpyridinium bromide-modified montmorillonite incorporated cellulose acetate nanocomposite films. **Journal Of Materials Science**, Santiago, v. 50, n. 10, p.3772-3780, 10 mar. 2015.

SALTON, M. R. J. Lytic Agents, Cell Permeability, and Monolayer Penetrability. **The Journal Of General Physiology**, New York, p.227-252, 1968.

SANDT, C. et al. Role of the ammonium group in the diffusion of quaternary ammonium compounds in *Streptococcus mutans* biofilms. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Montreal, v. 60, n. 6, p.1281-1287, 3 out. 2007.

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

SOUSA, F. B. et al. Structural and physical-chemical evaluation of Bradykinin Potentiating Peptide and its high soluble supramolecular complex. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3-4, p.407-422, 9 jan. 2010.

STROMINGER, J. L.; PARK, J. T.; THOMPSON, R. E. Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*: its relation to the mechanism of action of penicillin. **The Journal Of Biological Chemistry**, Saint Louis, v. 234, n. 12, p.3263-3268, dez. 1959.

SUÁREZ, D. F. et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ $\beta$ -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, Belo Horizonte, v. 118, p.194-201, jun. 2014.

SUN, D. et al. Isothermal titration calorimetry and  $^1\text{H}$  NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with  $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal Of Pharmaceutics**, Liaocheng, v. 316, n. 1-2, p.7-13, jun. 2006.

SWITZERLAND. WORLD HEALTH ORGANIZATION. . **ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance**. 2014. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf;jsessionid=D1D8ED036A2D](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=D1D8ED036A2D)>. Acesso em: 15 set. 2018.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, Budapest, v. 98, p.1743-1753, 1998.

TEIXEIRA, K. I. R. et al. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. **Drug Delivery**, Belo Horizonte, v. 22, n. 3, p.444-453, 4 fev. 2014.

THOMAS, K. J.; RICE, C. V. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. **Biomaterials**, Norman, v. 27, n. 6, p.1361-1370, 2014.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - Enabling Excipients: Their Present and Future Use in Pharmaceuticals. **Critical Reviews™ In Therapeutic Drug Carrier Systems**, Overland Park, v. 14, n. 1, p.1-104, 1997.

TOKIHIRO, K.; IRIE, T.; UEKAMA, K. Varying Effects of Cyclodextrin Derivatives on Aggregation and Thermal Behavior of Insulin in Aqueous Solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Kumamoto, v. 45, n. 3, p.525-531, 1997.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, Darwin, v. 28, n. 3, p.603-661, 27 maio 2015.

TREVAN, J. W. The Error of Determination of Toxicity. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 101, n. 712, p.483-514, 1 jul. 1927.

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

VALADARES, M. C. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA: ESTRATÉGIAS APÓS A “ERA DO TESTE DL<sub>50</sub>”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p.93-98, 2006. Disponível em: <<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Alternativa.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2018.

VIGLIANTI, C. et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: Experimental study. **Environmental Pollution**, Villeurbanne, v. 140, n. 3, p.427-435, abr. 2006.

VYAS, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, Raipur, v. 62, p.23-42, 23 maio 2008.

WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, Amherst, v. 179, n. 1, p.131-137, maio 1989.

YAO, Q. et al. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: A combined spectroscopy, TG/DSC and DFT

study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Wuhan, v. 117, p.576-586, jan. 2014.