

## INTERCALAÇÃO DE SULFADIAZINA DE PRATA EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR POR RECONSTRUÇÃO ESTRUTURAL

Davi R. Munhoz<sup>1\*</sup>, Marcela P. Bernardo<sup>1</sup>, Francys K.V. Moreira<sup>2</sup>, Luiz H. C. Mattoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil, \*davimunhoz.ufscar@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

**Classificação:** Processos de imobilização de biomoléculas e funcionalização em nanopartículas.

### Resumo

Este trabalho avaliou a intercalação do antimicrobiano sulfadiazina de prata em hidróxido duplo lamelar hidrotalcítico (HDL-MgAl). A sulfadiazina de prata foi intercalada no HDL-MgAl através do método reconstrução estrutural. Os resultados de DRX indicaram o fenômeno de intercalação no qual as moléculas do antimicrobiano preencheram os espaços interlamelares do HDL, sugerindo que esses dois componentes interagiram em nível molecular. O composto de intercalação formado apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (gram-negativas). A intercalação de sulfadiazina de prata em HDL hidrotalcítico não restringiu sua atividade biocida.

**Palavras-chave:** Biohíbridos; Multifuncionalidade; Intercalação; Liberação Controlada.

### INTERCALATION OF SILVER SULFADIAZINE IN LAYERED DOUBLE HYDROXIDE BY STRUCTURAL RECONSTRUCTION

#### Abstract

This work was aimed at intercalating the antimicrobial silver sulfadiazine in hydrotalcite-like layered double hydroxide (LDH-MgAl). Silver sulfadiazine was intercalated in LDH-MgAl through the structural reconstruction method. XRD results indicated the intercalation phenomenon in which the antimicrobial molecules filled the interlamellar spaces of LDH-MgAl, suggesting that these two components interacted at the molecular level. The intercalation compound showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (gram-positive) *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (gram-negatives). Intercalation of silver sulfadiazine in hydrotalcite-like LDH did not restrict its biocidal activity.

**Keywords:** Biohybrids; Multifunctionality; Intercalation; Controlled Release.

## 1 INTRODUÇÃO

Hidróxidos duplo lamelares (HDL) são uma classe de sólidos lamelares que apresentam grande potencial em nanotecnologia. Estes são argilas aniônicas com fórmula geral  $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_x(OH)_2][A^{n-}]_{x/n} \cdot mH_2O$ , onde  $M^{2+}$  representa metais bivalentes,  $M^{3+}$  metais trivalentes e  $A^{n-}$  são espécies aniônicas interlamelares (EVANS & SLADE, 2006). Os HDL contendo magnésio e alumínio (HDL MgAl), também conhecidos como HDL hidrotalcíticos, são o exemplo mais bem conhecido dentro da família de HDL. Estas substâncias têm sido estudadas com fins especiais em tecnologias farmacêuticas para carreamento de fármacos, além de apresentarem potencial como reforços em polímeros para aplicações de alto valor agregado na agricultura (EVANS & SLADE, 2006).

Curativos antimicrobianos têm interessado à comunidade científica nas últimas décadas. O desenvolvimento destes começou principalmente pela necessidade de tratamento tópico localizado, pois antibióticos orais não apresentavam a mesma eficiência (DAI et al., 2011; MOGOSANU et al., 2014). A sulfadiazina de prata (SDZ), diferentemente de antibióticos tradicionais normalmente ineficientes em tratar infecções localizadas, apresenta-se como um agente tópico qualificado, de acordo com entidades mundialmente renomadas. Esse agente é extremamente adequado para controlar infecções bacterianas em ferimentos acartretados por queimaduras de segunda grau, pois liga-se a pares

de bases nas duplas hélices do DNA, inibindo assim a transcrição bacteriana e de fagos (RAI et al., 2009).

Esse trabalho teve como objetivo intercalar a sulfadiazina de prata em hidróxido duplo lamelar hidrotalcítico (HDL-MgAl) visando a desenvolver um biohíbrido com potencial de aplicação em curativos antimicrobianos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reconstrução Estrutural

A intercalação de SDZ em HDL-MgAl foi realizada através de reconstrução estrutural (DE ROY et al., 2001). As condições experimentais necessárias para formação de produtos HDL cristalinos foram estabelecidas pela reconstrução do HDL em água pura na temperatura de 25°C durante 24 h (BERNARDO et al., 2016). Primeiramente, amostras de HDL comercial foram calcinadas em mufla a 600°C numa taxa de aquecimento padronizada de 30°min<sup>-1</sup>. Então, 500 mg de HDL calcinado foram adicionados a seis soluções distintas contendo água e SDZ (0,008 g L<sup>-1</sup>; 0,024 g L<sup>-1</sup>; 0,01 g L<sup>-1</sup>; 0,125 g L<sup>-1</sup>; 0,25 g L<sup>-1</sup>; 0,5 g L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup>). A temperatura do reator foi ajustada para 75°C. O reator foi então fixado sobre um agitador magnético. As misturas foram constantemente agitadas durante 24 h e então centrifugadas a 11,000 g durante 10 min (BERNARDO et al., 2016). Para remover o excesso de sulfadiazina, as amostras foram lavadas com metanol em filtro com cerâmica sinterizada e filtração a vácuo e secada em estufa a 45°C para caracterizações posteriores.

### 2.2 Técnicas de Caracterização

A difratometria de Raios-X (DRX) foi realizada com um difratômetro XRD 6000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) operando com radiação Cu K<sub>α</sub> ( $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ ) monocromatizada com um filtro de Ni. O ânodo de cobre foi excitado com uma tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. A intensidade do feixe difratado foi coletada à 25°C na faixa de ângulos de Bragg de 3 – 80° utilizando uma velocidade de varredura de 1° min<sup>-1</sup>. A partir do ângulo de difração, o espaçamento interplanar para cada família de planos (*hkl*) foi calculado a partir da Lei de Bragg:  $n\lambda = 2d \sin\theta$ , onde *d* e  $\theta$  são a distância e o ângulo entre dois planos (*hkl*) consecutivos na rede cristalina,  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio-X, e *n* é a ordem de difração. O espaçamento basal  $d_{001}$  para a arquitetura lamelar dos HDL corresponde à soma da altura da galeria (espaçamento interlamelar) mais a espessura da lamela do HDL,  $w = 4,77 \text{ \AA}$  (BERNARDO et al., 2016). A intercalação de SDZ resulta no aumento do espaçamento interlamelar. Este espaçamento para os biohíbridos HDL-Mg/Al-SDZ foi calculado a partir de  $d_{001}$ .

A atividade antimicrobiana foi avaliada por testes de difusão em meio ágar frente a culturas de *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella enterica* (NCTC 6017). Estes microrganismos foram fornecidos pelo laboratório de ensaios microbiológicos da Embrapa Instrumentação. As culturas dos três microrganismos foram previamente cultivadas em placa de petri contendo Mueller Hintor solidificado (Becton, Dickinson e Co., Sparks, MD). Os microrganismos foram inoculados em tubos contendo seus meios não solidificados (sem adição de ágar) para desenvolvimento e crescimento de novo inóculo. A concentração celular destes microrganismos foi padronizada com a escala McFarland 0.5 para as concentrações finais de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. Para os testes antimicrobianos, 10 mg de amostra foram adicionadas no centro das placas de petri, as quais foram incubadas por 24 h em temperatura ótima de crescimento para cada microrganismo. A formação de halo de inibição ou inibição por contato foi avaliada para cada teste.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Intercalação da sulfadiazina em HDL-MgAl

A série de HDL-MgAl incorporado com SZD nas concentrações entre 0,008 e 1 g L<sup>-1</sup> por reconstrução estrutural foram caracterizados por difratometria de raios-X (DRX). Os difratogramas foram agrupados em faixas de baixa (0,008 – 0,1 g L<sup>-1</sup>) e alta concentração (0,125 – 1 g L<sup>-1</sup>), Figura 1.

O perfil de difração do HDL-MgAl reconstruído em água pura, Figura 1a, corrobora com outros perfis documentados na literatura (BERNARDO et al., 2016). Todos os picos foram indexados à série de linhas de reflexões basais (00l) e difrações (110) e (113) características da simetria romboédrica ( $R\bar{3}m$ ) (JCPDF 54-1030) que é típica de HDL (BERNARDO et al., 2016). O resultado encontrado confirma que a fase cristalina HDL foi obtida com sucesso após o processo de reconstrução estrutural.

Na presença de SDZ nas concentrações entre 0,008 e 0,1 g L<sup>-1</sup> todas as reflexões referentes à fase HDL foram mantidas, Figura 1a. Entretanto, observa-se o surgimento de novas reflexões em 8,98° e 10,19° de 2θ para a concentração de 0,1 g L<sup>-1</sup>. A reflexão em 10,19° corresponde à reflexão da SDZ pura, a qual é conhecida por ser um antimicrobiano de estrutura cristalina (VENKATARAMAN, 2013). Todavia, a reflexão em 8,98° é inédita, sugerindo que o HDL-MgAl sofreu intercalação parcial pela SDZ. O espaçamento interlamelar desta nova reflexão equivale a 0,507 nm, o qual é quase duas vezes maior do que espaçamento interlamelar do HDL-MgAl sem SDZ, 0,269 nm.

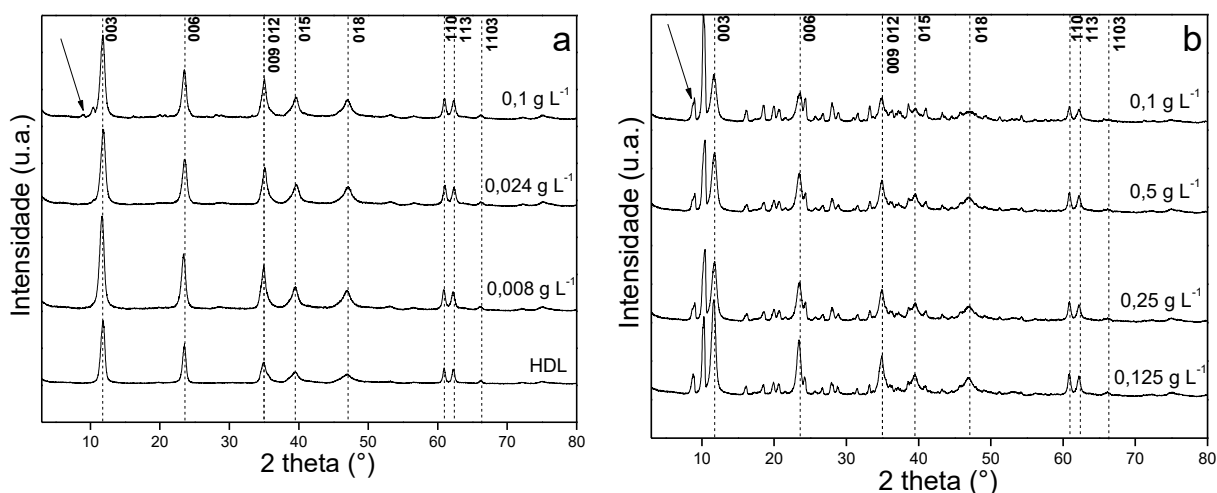


Figura 1: Perfis de DRX (Cu Kα,  $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ ) registrados a 25 °C para os HDL incorporados com sulfadiazina de prata por reconstrução estrutural. (a) 0,008 – 0,1 g L<sup>-1</sup> (b) 0,125 – 1 g L<sup>-1</sup>.

Para a faixa de alta concentração de SDZ (entre 0,125 e 1 g L<sup>-1</sup>), Figura 1b, observa-se, além das reflexões típicas de HDL e do pico referente à intercalação, um aumento na intensidade da reflexão em 10,19° referente à SDZ pura e surgimento de novas reflexões. A intensidade do pico em 10,19° aumenta proporcionalmente à concentração inicial de SDZ. Tal comportamento indica um excesso de SDZ livre no biohíbridos para concentrações a partir de 0,125 g L<sup>-1</sup>. Neste caso, foi preciso submeter os biohíbridos HDL-MgAl/SDZ a um procedimento de lavagem com metanol para remoção da SDZ livre.

### 3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do biohíbrido SDZ/HDL-MgAl

O biohíbrido SDZ/HDL-MgAl, formado após reconstrução estrutural apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (gram-positiva) *E.coli* e *S. enterica* (gram-negativas) como demonstrado na Figura 2.

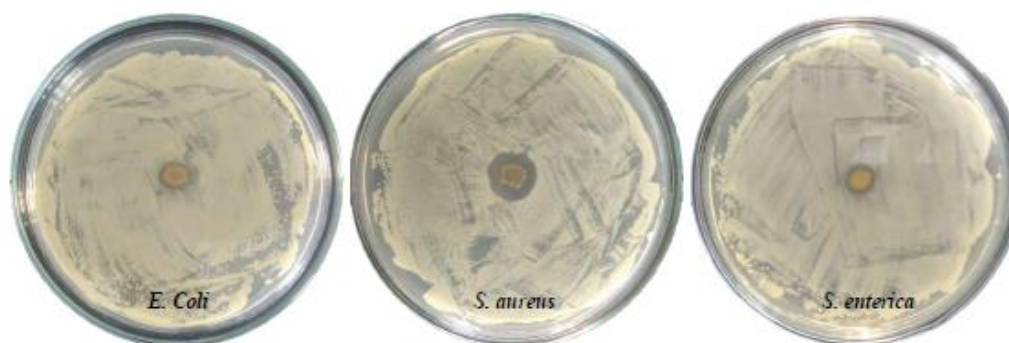


Figura 2: Atividade antimicrobiana do biohíbrido SDZ/HDL-MgAl em cultivos de *S.aureus*; *E. coli* e *S.enterica*.

Observa-se que SDZ/HDL-MgAl apresentou atividade antimicrobiana devido à formação de halos para as três culturas. No cultivo da *S. aureus* o tamanho do halo foi de 1,45 cm, de acordo com as três réplicas preparadas; enquanto no cultivo de *E. coli* apresentou 0,85 cm de halo em média; e o halo de inibição formado para *S. enterica* foi em média de 0,83 cm. Esses resultados representam um potencial de ação antimicrobiano da SDZ tanto para bactérias gram-negativas como gram-positivas encontradas em regiões entéricas e também em ferimentos locais tanto em humanos como em mamíferos no geral. A próxima etapa será avaliar o perfil de liberação da SDZ quando intercalada no HDL hidrotalcítico.

#### 4 CONCLUSÃO

Foi possível intercalar SDZ em HDL-MgAl utilizando o método de reconstrução estrutural; além disso, notou-se que esse biohíbrido apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, e *S. enterica*, enfatizando assim um potencial antimicrobiano desse biohíbrido. A intercalação de SDZ em HDL hidrotalcítico não restringiu sua atividade biocida.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA Instrumentação, SISNano/MCTI e CNPQ-PIBIC (Processo CNPQ nº 145851/2016-8) pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

BERNARDO, M. et al. Physico-chemical assessment of [Mg-Al-PO<sub>4</sub>]-LDH obtained by structural reconstruction in high concentration of phosphate. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* v.497, p 53-62, 2016.

DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. In: *Expert review of anti-infective therapy* v. 9 n.7 p. 857-879, 2011.

EVANS, D. G.; SLADE, R. C. T. Structural Aspects of Layered Double Hydroxides. Em: Duan, X.; Evans, D. G. In: *Layered Double Hydroxides, Structure and Bonding Series*, Springer Berlin Heidelberg New York. p. 1-88, 2006.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. In: *International journal of pharmaceutics* v.463 n. 2 p.127-136, 2014

RAI, M. et al. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. In: *Biotechnology Advances* v.27, n.1, p. 76-83, 2009.

VENKATARAMAN, M.; NAGARSENKER, M. Silver sulfadiazine nanosystems for burn therapy. In: *AAPS PharmSciTech* v.14, n.1, p. 254-264, 2013.