UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

VANESSA ROBERTA RODRIGUES DA CUNHA

Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico immobilizadas em hidróxidos duplos lamelares

São Paulo

Versão corrigida

Data do Depósito na SPG:

12/11/2012

Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico immobilizadas em hidróxidos duplos lamelares

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Química

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Vera Regina Leopoldo Constantino

Versão corrigida

VANESSA ROBERTA RODRIGUES DA CUNHA

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cunha, Vanessa Roberta Rodrigues da
C972m Materiais híbridos orgânico-inorgânico : espécies de
interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos
lamelares / Vanessa Roberta Rodrigues da Cunha. -- São
Paulo, 2012.
134p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Constantino, Vera Regina Leopoldo

1. Composto inorgânico lamelar 2. Química de intercalação
3. Espectroscopia vibracional I. T. II. Constantino, Vera Regina
Leopoldo, orientador.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA. Julgamento da Tese de Doutorado em **Química** de **VANESSA ROBERTA RODRIGUES DA CUNHA**. Ao vigésimo dia do mês de dezembro do ano de dois mil e doze, às catorze horas, na sala 0662 "anfiteatro vermelho" do bloco 06 superior deste Instituto, instalou-se a Comissão Julgadora da Tese de Doutorado intitulada "**Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares**", apresentada por **VANESSA ROBERTA RODRIGUES DA CUNHA**, cujos estudos pós-graduados visando o doutorado iniciaram-se em dezembro de dois mil e sete, neste Instituto de Química. A Comissão Julgadora indicada nos termos do artigo 102 do Regimento Geral da Universidade de São Paulo constituiu dos Professores Doutores: Vera Regina Leopoldo Constantino (Orientadora e Presidente), Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas (Instituto de Química - USP), Breno Pannia Espósito (Instituto de Química - USP), Ivonne Primerano Mascarenhas (Instituto de Física de São Carlos - USP) Marcos Augusto Bizeto (Universidade Federal de São Paulo - Diadema). Verificado o cumprimento das exigências regulamentares, a Comissão Julgadora passou a arguir a candidata na seguinte ordem: Professores Doutores: Marcos Augusto Bizeto, Ivonne Primerano Mascarenhas, Breno Pannia Espósito, Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas e Vera Regina Leopoldo Constantino. Concluídas as arguições, a Comissão Julgadora em sessão secreta, atribuiu os seguintes conceitos: Professores Doutores: Marcos Augusto Bizeto (Aprovada), Ivonne Primerano Mascarenhas (Aprovada), Breno Pannia Espósito (Aprovada), Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas (Aprovada) e Vera Regina Leopoldo Constantino (Aprovada). Em conclusão, a candidata foi considerada **Aprovada**. Em seguida, a Comissão Julgadora elaborou relatório a ser encaminhado à Comissão de Pós-Graduação. Reaberta a sessão, a Senhora Presidente anunciou os resultados e deu por encerrados os trabalhos. E para constar eu, Cibele Rosani Carlos Secretária da Pós-Graduação, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros examinadores. São Paulo, 20 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto

Prof. Dr. Yvonne Primerano Mascarenhas

Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

Prof. Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas

Prof. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino

Eu dedico este trabalho que representa uma parte muito importante da minha vida

Aos meus pais José Roberto e Lourdette pela compreensão e dedicação

Aos meus irmãos Cristiano e Eduardo pelo apoio e amizade

À Profa. Dra. Vera Constantino, minha orientadora,

pela paciência e grande dedicação

AGRADECIMENTO

Aos meus pais e irmãos, por todo o amor, compreensão, paciência e apoio dedicados durante todos esses anos.

À Profa. Vera, pelo grande apoio, carinho, paciência e confiança fornecidos durante esses anos.

À Profa. Marianna (University of Waterloo, Canadá), Chilbert e Marina pela ajuda e colaboração com os experimentos de tamanho de partícula, medidas de potencial Zeta e os testes biológicos realizados no Programa de Doutorado Sanduíche (PDEE) financiados pela CAPES.

Ao Fabrice e Christine (Université Blaise Pascal, França) pelos registros e análises dos espectros de RMN do estado sólido e as simulações dos difratogramas de raios X.

À Profa. Helena e Philippe (IF-USP) pelos cálculos computacionais DFT que auxiliaram na interpretação dos resultados de parte do trabalho.

Ao Prof. José Roberto da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo apoio, dicas e amizade.

Às minhas amigas Daniela e Tamara que estiveram sempre ao meu lado em momentos difíceis me apoiando e incentivando, obrigada.

Às minhas amigas de longos anos Ana Lucia, Angélica, Andrea e Patrícia pelo grande apoio, conselhos, ajuda, e apesar de longe, estarem sempre ao meu lado.

Às minhas amigas Michele e Ana Mangoni pela enorme ajuda, apoio e companhia.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Gustavo, Alfredo, Douglas, Leonardo, João, Iguatinã, Filipe, Philippe, Rafael, Chilbert, Samih, Rania, Constanze, Mahmoud e Marina pelos momentos de descontração, conselhos, ajuda e conhecimento fornecidos para o desenvolvimento do meu projeto.

À Profa. Marcia, Celly e Rômulo (IQ-USP) pelo registro e colaboração na interpretação dos espectros Raman.

À Cida e ao Ricardo pela amizade, apoio técnico e ajuda constante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa e auxílios concedidos no Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE).

À Rede Nanobiomed-CAPES (Avanços, Benefícios e Riscos da Nanobiotecnologia Aplicada à Saúde) pelos auxílios concedidos para participação em Congresso e curso no Exterior.

À Secretária de Pós-Graduação (IQ-USP) em especial a Cibele e ao Milton pela assistência e eficiência na entrega dos documentos requeridos.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

(Cunha, V.R.R.) **Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares.** 2012. 134 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A intercalação de espécies com atividade farmacológica em Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) vem sendo explorada com uma maior frequência não apenas pelo fato da matriz ser biocompatível, mas também por outros efeitos reportados em estudos recentes como: (i) possível liberação sustentada da droga mediada por alterações no pH, (ii) aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água, (iii) aumento da estabilidade química de substâncias frente à luz, ao calor, à umidade, ao oxigênio molecular etc.

O principal objetivo deste trabalho é a intercalação de substâncias de interesse medicinal (em suas formas aniônicas) como a pravastatina, Prav (ação anti-hiperlipidêmica) e os antioxidantes ácidos coumárico, Cou, e lipóico, Lip, em HDLs de magnésio-alumínio e zinco-alumínio através da coprecipitação, utilizando diferentes condições experimentais (pH, tratamento pós-síntese e relação molar ânion/ Al^{3+}). As amostras sólidas foram caracterizadas por análise elementar (CHN e metais), difratometria de raios X, métodos espectroscópicos (vibracional no infravermelho, Raman e ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido), análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta. A ação farmacológica dos HDLs de composição Mg_2Al foi investigada através do teste biológico com o corante Sulforodamina B na linhagem celular de melanoma A-375.

A utilização de diferentes proporções molares Pravastatina/ Al^{3+} (1, 2 e 3) não alterou significativamente a quantidade de substância orgânica presente no material. O HDL de composição lamelar $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ apresentou maior cristalinidade e maior quantidade de orgânico (52 % m/m) que a matriz $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ (32 % m/m). A Pravastatina forma uma bicamada na região interlamelar. Os valores de tamanho médio de partícula e do potencial Zeta encontrado para o material $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ (razão molar Prav/ Al^{3+} = 1) são 126 nm e + 22,9 mV, respectivamente. A Pravastatina e o material de $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ diminuíram o crescimento celular da linhagem A-375 em até 20 % após tratamento.

A composição dos HDLs intercalados com íons coumarato é dependente da razão molar Cou/ Al^{3+} empregada na síntese. Observou-se novamente que o emprego da composição lamelar $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ contribui para a obtenção de material com maior cristalinidade e quantidade de orgânico intercalado (36 % m/m) comparado ao análogo de $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ (32 % m/m). Os ânions orgânicos na forma bivalente, constatados pelos resultados obtidos no espectro Raman, assumem um arranjo de monocamada com inclinação do esqueleto carbônico em relação às lamelas. Dados de análise elementar e análise térmica sugerem que o íon orgânico está enxertado/coordenado às lamelas do HDL. A suspensão aquosa do material $\text{Zn}_2\text{Al3Cou}$ apresenta estabilidade moderada frente à aglomeração (potencial Zeta igual a + 39,6 mV) e tamanho médio de partícula de 226 nm.

No caso dos HDLs-Lip, observou-se que o excesso de íons lipoato na síntese, assim como o tempo de agitação pós-síntese, não alterou a cristalinidade e a quantidade de orgânico (39 % m/m) no material. Os ânions orgânicos devem se organizar na forma de uma bicamada interdigitada na região interlamelar. A suspensão aquosa do material $\text{Mg}_2\text{Al1Lip}$ apresenta estabilidade moderada frente à aglomeração (potencial Zeta igual a + 34,3 mV) e tamanho médio de partícula de 110 nm.

Palavras-chave: hidróxido duplo lamelar, pravastatina, ácido coumárico, ácido lipóico, espectroscopia vibracional e compostos de intercalação.

ABSTRACT

(Cunha, V.R.R.) **Organic-inorganic hybrid materials: species of pharmacological interest immobilized into layered double hydroxide** 2012. 134 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The intercalation of species with pharmacological activity in Layered Double Hydroxide (LDHs) has been explored frequently not only because it is biocompatible, but also by others effects as reported in recent studies: (i) sustained release of the drug by changes in pH, (ii) increasing the solubility of poorly water soluble substances, (iii) increase of the chemical stability of substance against light, heat, moisture, molecular oxygen etc.

The main goal of this work is the intercalation of substances of therapeutic interest (in their anionic forms) as Pravastatin, Prav (antihyperlipidemic), and the antioxidants coumaric acid, Cou, and lipoic acid, Lip, in LDHs of magnesium-aluminum and zinc-aluminum by coprecipitation using different experimental conditions (pH, post-synthesis treatment and molar ratio anion/ Al^{3+}). Solid samples were characterized by elemental analysis (CHN and metals), X-ray diffraction, spectroscopic methods (Vibrational Infrared, Raman and Nuclear Magnetic Resonance of ^{13}C in solid state), thermal analysis, scanning electron microscopy, measurements of particle size and Zeta potential. The pharmacological activity of LDHs of Mg_2Al composition was investigated by the biological assay with the dye Sulforhodamine B in the melanoma cell line A-375.

The usage of different molar ratio Pravastatin/ Al^{3+} (1, 2 and 3) did not significantly alter the amount of organic substance present in the inorganic carrier. The LDH of composition $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ promoted an increase in the crystallinity of the material and in the amount of organic (52 % w/w) compared to the $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ material (32 % w/w). Pravastatin forms a bilayer into the interlayer region. The mean particle size and Zeta potential of the $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ (molar ratio $\text{Prav}^-/\text{Al}^{3+} = 1$) are 126 nm and + 22.9 mV, respectively. The Pravastatin and the material $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ decreased cell growth of strain A-375 melanoma by 20 % after treatment.

The composition of the LDH intercalated with coumarate ions is dependent of the molar ratio anion/ Al^{3+} used in the synthesis. The composition $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ promoted an increase in the crystallinity and amount of the organic (36 % w/w) compared to $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ material (32 % w/w). The organic divalent anions, visualized by the Raman spectra results, assume a monolayer arrangement with the inclination of the carboxylate group related to the layer. Elemental and thermal analysis suggest the grafting/coordination of the organic ions into the layers of LDH. The aqueous suspension of the $\text{Zn}_2\text{Al3Cou}$ shows moderate stability against agglomeration (Zeta potential value + 39.6 mV) and particle size of 226 nm.

In the case of LDHs-Lip, it was observed that excess of lipoate ions from the synthesis, as well as, the stirring time pos-synthesis did not alter the crystallinity and the organic amount (39 % w/w) material. The organic anions are organized in an interdigitated bilayer into the interlayer region. The aqueous suspension of the $\text{Mg}_2\text{Al1Lip}$ material shows moderate stability against the agglomeration (zeta potential value equal to + 34.3 mV) and a particle size of about 110 nm.

Keywords: layered double hydroxide, pravastatin, coumaric acid, lipoic acid, vibrational spectroscopy and intercalation compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos HDLs.....	3
Figura 2. Representação da estrutura molecular da Pravastatina obtida utilizando o <i>software</i> Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).....	19
Figura 3. Representação da estrutura molecular do Ácido Coumárico obtida utilizando o <i>software</i> Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).....	21
Figura 4. Representação da estrutura molecular do Ácido Lipóico obtida utilizando o <i>software</i> Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).....	23
Figura 5. Vidraria utilizada na síntese dos HDLs pelo método da coprecipitação.....	27
Figura 6. Esquema geral do funcionamento dos equipamentos Microfluidizer Processor e NanoDeBEE.....	40
Figura 7. Difratomogramas de raios X da Pravastatina Sódica e dos materiais $Mg_2AlPrav$	43
Figura 8. (a) Visualização estrutural da Pravastatina Sódica obtida por cálculos de DFT descrito no item III.3. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions da Pravastatina na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H), vermelho (O), e roxo (Na).....	44
Figura 9. Espectros ^{13}C RMN no estado sólido da Pravastatina Sódica (linha vermelha), $Mg_2AlPrav$ (linha azul) e deslocamentos químicos calculado para a Pravastatina Sódica (traço vermelho).....	47
Figura 10. Espectros vibracionais calculado e experimental na região do infravermelho dos materiais Mg_2AlCl , $Mg_2AlPrav$ e da Pravastatina Sódica.....	49
Figura 11. (a) Espectros Raman dos materiais $Mg_2AlPrav$ e Mg_2AlCO_3 . (b) Espectros Raman calculado e experimental dos materiais $Mg_2AlPrav$ e Pravastatina Sódica.....	50
Figura 12. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) da Pravastatina Sódica.....	52
Figura 13. Curvas TGA (-) e DSC (--) dos materiais $Mg_2AlxPrav$	53
Figura 14. Curvas DTG (--) e MS (-) dos materiais $Mg_2AlxPrav$	54
Figura 15. Difratomogramas de raios X dos materiais $Mg_2AlPrav$.x.....	55

Figura 16. Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais $Mg_2Al_1Prav.x$	57
Figura 17. Espectros Raman dos materiais $Mg_2Al_1Prav.x$	58
Figura 18. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras (a) Mg_2Al_1Prav , (b) Mg_2Al_2Prav , (c) Mg_2Al_3Prav , (d) $Mg_2Al_1Prav.Micro$, (e) $Mg_2Al_1Prav.Hidro$, (f) $Mg_2Al_1Prav.Refl$ (ampliação: 5000 vezes) e (g) $HDLCO_3$ (ampliação: 10000 vezes).....	59
Figura 19. Difratogramas de raios X dos materiais Mg_2AlCl , Mg_2Al_1Prav e Zn_2Al_1Prav	61
Figure 20. Representação esquemática do arranjo interlamelar da pravastatina no Zn_2Al_1Prav : (a) Densidade eletrônica (1D) projetada ao longo do eixo de empilhamento-c; (b) Mapa de Patterson do plano (x0z) de 0 a 1 ao longo do eixo b.....	62
Figura 21. Representação de quatro células unitárias do sal de tert-octilamônio da Pravastatina; cristal monoclinico, $a= 16,850(3) \text{ \AA}$, $b= 5,801(1) \text{ \AA}$, $c=17,290(3) \text{ \AA}$, $\beta= 108,04(1)^\circ$. Os átomos de hidrogênio foram omitidos (ref. 176).....	63
Figura 22. Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais Mg_2AlCl , Mg_2Al_1Prav , Zn_2Al_1Prav e da Pravastatina Sódica.....	64
Figura 23. Espectros Raman dos materiais Mg_2Al_1Prav , Zn_2Al_1Prav e da Pravastatina Sódica.....	64
Figura 24. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do material $Zn_2AlPrav$	65
Figure 25. Representação esquemática da cointercalação dos íons da Pravastatina e cloreto entre as lamelas dos materiais $M_2Al-HDL$	70
Figura 26. Distribuição de tamanho de partícula do Mg_2AlCl em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).....	71
Figura 27. Distribuição do tamanho de partícula do Mg_2Al_1Prav em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).....	72
Figura 28. Valores de potencial Zeta do material Mg_2AlCl em relação ao meio iônico.....	76
Figura 29. Valores de potencial Zeta do material Mg_2Al_1Prav em relação ao meio iônico.....	77

Figura 30. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-Cl após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.....	80
Figura 31. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de NaPrav após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.....	81
Figura 32. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-Prav após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.....	82
Figura 33. Difrátogramas de raios X do Ácido Coumárico e dos materiais Mg_2AlCou	84
Figura 34. (a) Visualização estrutural do Ácido Coumárico obtida por cálculos de DFT descrito no item III.3. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions coumarato na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H) e vermelho (O).....	85
Figura 35. Espectros Raman do Ácido Coumárico (HCou) e dos sais NaCou e Na_2Cou	87
Figura 36. Espectros Raman dos materiais $Mg_2AlxCou$ e Na_2Cou	88
Figura 37. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do Ácido Coumárico.....	89
Figura 38. Curvas TGA (-) e DTG (--) do Na_2Cou e dos materiais $Mg_2AlxCou$	92
Figura 39. Curvas DTG (--) e MS (-) dos materiais $Mg_2AlxCou$	93
Figura 40. Difrátogramas de raios X dos materiais Mg_2Al_3Cou e Zn_2Al_3Cou	94
Figura 41. Espectros Raman dos materiais Mg_2Al_3Cou e Zn_2Al_3Cou	96
Figura 42. (a) Curvas TGA (-) e DTG (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do material Zn_2Al_3Cou	97
Figura 43. Distribuição do tamanho de partícula do Zn_2Al-Cl em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).....	100
Figura 44. Distribuição do tamanho de partícula do Zn_2Al_3Cou em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).....	101

Figura 45. Difrátogramas de raios X do Ácido Lipóico e dos materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2AlxLip$	103
Figura 46. (a) Visualização estrutural do Ácido Lipóico obtida por cálculos de DFT descrito no item III.3. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions lipoato na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H), vermelho (O), e amarelo (S).....	105
Figura 47. Espectros vibracionais na região do infravermelho do Ácido Lipóico e dos materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2AlxLip$	106
Figura 48. Curvas TGA (-) e DSC (--) do Ácido Lipóico (a) e do $Mg_2Al1Lip.1h$ (b).....	107
Figura 49. Curvas DTG (--) e MS (-) do Ácido Lipóico (a) e do $Mg_2Al1Lip.1h$ (b).....	108
Figura 50. Distribuição do tamanho de partícula do $Mg_2Al1Lip$ em suspensão aquosa 0,1 % (m/v).....	111
Figura 51. Valores de potencial Zeta do material $Mg_2Al1Lip$ em relação ao meio iônico.....	114
Figura 52. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HLip após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua.....	116
Figura 53. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-Lip após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).....	5
Tabela 2: Reagentes empregados nas sínteses dos HDLs e na preparação de tampões.....	25
Tabela 3: Condições experimentais utilizadas para a obtenção dos HDLs-X (onde X= Prav, Cou ou Lip).....	30
Tabela 4: Instrumentação e materiais utilizados no Ensaio com corante SRB.....	35
Tabela 5: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais Mg_2Al_xPrav ($x= 1, 2$ e 3), obtidos dos dados de difratometria de raios X.....	43
Tabela 6: Deslocamento Químico de ^{13}C RMN no estado sólido da Pravastatina Sódica e do $Mg_2Al1Prav$	46
Tabela 7: Número de onda (cm^{-1}) e possíveis atribuições relativos aos espectros vibracionais no IV e Raman da Pravastatina Sódica e dos materiais de HDL-Prav.....	49
Tabela 8: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $Mg_2Al1Prav.x$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.....	56
Tabela 9: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $Mg_2Al1Prav$ e $Zn_2Al1Prav$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.....	60
Tabela 10: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Prav.....	67
Tabela 11: Concentração dos ânions da Pravastatina em 100 g de material.....	68
Tabela 12: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Prav$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).....	74
Tabela 13: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Prav$ em função do meio iônico.....	75
Tabela 14: Resposta celular em função do tempo de incubação do tratamento obtida através do Ensaio com o corante SRB, (1) HDL-Cl, (2) NaPrav e (3) HDL-Prav.....	79
Tabela 15: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $Mg_2AlxCou$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.....	84

Tabela 16: Dados de análise térmica do Sal de sódio (Na_2Cou) e dos materiais Mg_2AlxCou	91
Tabela 17: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.....	95
Tabela 18: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Cou, assim como a concentração dos ânions coumarato em 100 g de material.....	98
Tabela 19: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Zn_2AlCl e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).....	102
Tabela 20: Dados de análise térmica do Ácido Lipóico e dos materiais Mg_2AlLip	107
Tabela 21: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Lip, assim como a concentração dos ânions lipoato em 100 g de material.....	110
Tabela 22: Valores de potencial Zeta dos materiais Mg_2AlCl e $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Lip}$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).....	112
Tabela 23: Valores de potencial Zeta do material $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Lip}$ em relação ao meio iônico.....	113
Tabela 24: Resposta celular em função do tempo de incubação do tratamento obtida através do Ensaio com o corante SRB, (1) HLip e (2) HDL-Lip.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFM/ MFA** – Microscopia de força atômica.
- CHN** - Análise química dos elementos C, H e N.
- CHNS**- Análise química dos elementos C, H, N e S.
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência.
- DLS** – Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering*).
- DRX** - Difratometria de raios X.
- DSC** - Calorimetria exploratória diferencial.
- DTA** – Análise térmica diferencial.
- DTG** - Termogravimetria derivada (curva referente à primeira derivada da curva TGA).
- EDTA** – Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*).
- EDX** – Energia dispersiva de raios X.
- FTIR** - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.
- FT-Raman** - Espectroscopia Raman com transformada de Fourier.
- HDLs-Mg₂Al e Zn₂Al** - Hidróxido Duplo Lamelar de magnésio/alumínio e zinco/alumínio com razão molar M^{2+}/Al^{3+} igual a 2, onde M= Mg ou Zn.
- ICP-AES** - Espectroscopia de Emissão Atômica.
- IV** - Espectroscopia vibracional no infravermelho.
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*).
- Mg₂Al-Cl e Zn₂Al-Cl** - HDL-Mg₂Al e Zn₂Al intercalados com os íons cloreto.
- Mg₂Al-Prav, Mg₂Al-Cou e Mg₂Al-Lip** - HDL-Mg₂Al intercalado com os íons derivados da Pravastatina, Ácido Coumárico e Ácido Lipóico, respectivamente.
- MET** – Microscopia eletrônica de transmissão.
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura.
- MS** - Espectrometria de Massa.
- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear.
- TGA** - Análise termogravimétrica.
- UV-vis** - Espectroscopia eletrônica no ultravioleta e visível.
- VLDL** - Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*).
- XPS** – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (X-ray photoelectron spectroscopy).

Zn₂Al-Prav, Zn₂Al-Cou - HDL-Zn₂Al intercalados com os íons derivados da Pravastatina e Ácido Coumárico, respectivamente.

GLOSSÁRIO

Aglomerado: Conjunto de partículas primárias ligadas por interação física fraca levando à separação pela formação de precipitado maior que o tamanho de coloide, 1 a 1000 nm. Partículas que se aglomeram podem ser dispersas novamente.

Agregado: Conjunto de partículas primárias interconectadas por ligação química. As partículas agregadas (originadas dos aglomerados) não podem ser dispersas novamente.

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais compreendem um grupo variado de fármacos que têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, promover analgesia e de combater a hipertermia (febre).

Anemia Ferropriva: Causada pela deficiência de ferro no organismo.

Anticoagulante: Fármacos usados para prevenir a formação de trombos sanguíneos.

Antihiperlipidêmico: Substâncias bioativas utilizadas para diminuir níveis de lipídios na corrente sanguínea.

Antitumor: Agentes que combatem a proliferação anormal do tecido.

Apoptose: Morte celular programada que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a execução.

ATP: Adenosina Trisfosfato, nucleotídeo (composto rico em energia e que auxilia os processos metabólicos, principalmente a biossíntese, na maioria das células) responsável pelo armazenamento de energia.

Biocompatibilidade: Habilidade de estar em contato com um sistema vivo sem produzir efeitos adversos.

Biodisponibilidade: Medida da porcentagem da dose administrada da substância com atividade terapêutica que alcança o sistema de circulação e está disponível no local de ação.

Células Dendríticas: Células imunes que fazem parte do sistema imunológico dos mamíferos.

Coalescência: Desaparecimento da barreira entre duas partículas em contato, ou entre uma partícula e uma matriz polimérica seguida por alterações de forma que levam a redução da área superficial total.

Cofator: Substâncias orgânicas ou inorgânicas necessárias ao funcionamento das enzimas.

Doença Autoimune: Perda da capacidade de reconhecer corpos estranhos (antígenos) que podem ou não ser danosos ao organismo pelo sistema de defesa, levando à produção de anticorpos contra células, tecidos ou órgãos do próprio corpo.

Fagocitose: Englobamento e digestão de partículas sólidas e microorganismos pelas células.

Fenótipo: Características observáveis ou caracteres de um organismo como, por exemplo, morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento.

Floculação: Processo de contato e adesão em moléculas dispersas ou partículas unidas por interação física fraca o que leva a separação de fase pela formação de precipitados maiores que o tamanho de um colóide.

Hemólise: Rompimento de uma hemácia liberando a hemoglobina no plasma, ou seja, a hemólise é a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue por rompimento da membrana plasmática com liberação da hemoglobina.

Hipercolesterolemia: Presença de quantidades de colesterol acima do normal no sangue.

Hiperfibrinólise: Atividade excessiva do processo responsável pela eliminação de coágulos sanguíneos.

Liberação alvo-específico: Ocorre a liberação da substância ativa no sítio biológico desejado, ou seja, no órgão ou tecido doente (alvo específico).

Liberação atrasada: A liberação da droga é retardada por um tempo finito, depois é liberada.

Liberação controlada: Sistemas que fornecem alguma ação terapêutica temporária ou controle na área da liberação da droga.

Liberação Modificada: Expressão geral usada para a liberação de fármacos no organismo que pode ser de forma atrasada, sustentada, alvo-específico e controlada.

Liberação Sustentada: Inclui qualquer sistema em que o fármaco se torna disponível por um período prolongado após a administração.

Monócitos: Leucócito que faz parte do sistema imunológico do corpo humano.

Nanomaterial: Material natural ou sintético contendo partículas, em um estado desagregado ou agregado ou aglomerado e onde, para 50 % ou mais dessas partículas, uma ou mais dimensões externas está no intervalo de tamanho entre 1 nm – 100 nm.

Nanopartícula: Partícula (de qualquer forma) de tamanho variando entre 1 a 100 nm.

Necrose: Estado de morte de um tecido ou parte dele em um organismo vivo. A necrose é sempre um processo patológico e desordenado de morte celular causado por fatores que levam à lesão celular irreversível e consequente morte celular.

Partículas primárias: Menor partícula identificada no material que pode ser observada por técnicas específicas (MEV e MET).

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Carregadores Inorgânicos para moléculas bioativas.....	1
I.2. Hidróxidos Duplos Lamelares.....	2
I.3. Moléculas Bioativas: Pravastatina, Ácido Coumárico e Ácido Lipóico.....	18
II. OBJETIVOS.....	24
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
III.1. Reagentes e Substâncias.....	25
III.2. Preparação dos Hidróxidos Duplos Lamelares.....	26
III.2.1. Síntese dos materiais Mg_2Al-Cl e Zn_2Al-Cl.....	26
III.2.2. Síntese dos materiais $Mg_2Al-Prav$, $Mg_2Al-Cou$, $Mg_2Al-Lip$.....	28
III.2.3. Síntese dos materiais $Mg_2Al-Prav$ com tratamento pós-síntese.....	29
III.2.4. Síntese dos materiais $Zn_2Al-Prav$ e $Zn_2Al-Cou$.....	29
III.2.5. Testes para verificação de íons carbonato e cloreto nos HDLs.....	31
III.3. Preparação dos sais coumarato de sódio e coumarato de dissódio.....	31
III.4. Preparação de amostras para medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta.....	32
III.4.1. Preparação de amostras para medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados.....	33
III.5. Ensaio biológico com o corante Sulforodamina B.....	34
III.5.1. Protocolo: Ensaio com corante Sulforodamina B.....	34

III.6. Instrumentação.....	37
III.7. Métodos Computacionais.....	40
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
IV.1. Sistemas contendo a Pravastatina nos HDLs.....	42
IV.1.1. Caracterização de HDLs-Mg ₂ Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Prav/Al ³⁺	42
IV.1.2. Caracterização de HDLs-Mg ₂ Al submetidos a tratamento pós-síntese.....	54
IV.1.3. Caracterização de HDLs-Prav: Mg ₂ Al e Zn ₂ Al.....	60
IV.1.4. Medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta para os materiais Mg ₂ Al-Cl e Mg ₂ Al1Prav.....	70
IV.1.4.1. Medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados para os materiais Mg ₂ Al-Cl e Mg ₂ Al1Prav.....	74
IV.1.5. Ensaio biológico “ <i>in vitro</i> ” com o corante Sulforodamina B.....	78
IV.2. Sistemas contendo o Ácido Coumárico nos HDLs.....	83
IV.2.1. Caracterização de HDLs-Mg ₂ Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Cou/Al ³⁺	83
IV.2.2. Caracterização de HDLs-Cou: Mg ₂ Al e Zn ₂ Al.....	93
IV.2.3. Medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta para os materiais Zn ₂ Al-Cl e Zn ₂ Al3Cou.....	99
IV.3. Sistemas contendo o Ácido Lipóico nos HDLs.....	103
IV.3.1. Caracterização de HDLs-Mg ₂ Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Lip/Al ³⁺ e tempo de agitação.....	103

IV.3.2. Medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta para os materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2Al-Lip$	110
IV.3.2.1. Medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados para o material $Mg_2Al-Lip$	112
IV.3.3. Ensaio biológico “ <i>in vitro</i> ” com o corante Sulforodamina B.....	114
V. CONCLUSÕES.....	118
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	120
VII. REFERÊNCIAS.....	121
VIII. APÊNDICE(s).....	132
VIII.1. Protocolo: Ensaio com corante Sulforodamina B.....	132

SÚMULA CURRICULAR

IX. LISTA DE ANEXOS

IX.1. RESUMO DO PROJETO REFERENTE AO PROGRAMA DE DOUTORADO NO PAÍS COM ESTÁGIO NO EXTERIOR (PDEE)

IX.2. Protocolo da linhagem celular A-375

IX.3. ARTIGO DE REVISÃO: Química Nova, 2010. Hidróxidos Duplos Lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico

I. INTRODUÇÃO

I.1. Carregadores Inorgânicos para moléculas bioativas

A utilização de nanopartículas inorgânicas como suporte e veículo de espécies de interesse biológico vem recebendo crescente atenção nos últimos anos. Esse destaque está relacionado ao fato desses sistemas geralmente apresentarem propriedades promissoras como carregadores, tais como biocompatibilidade, biodisponibilidade, baixa toxicidade, superfície que pode ser funcionalizada e promoção da liberação sustentada.¹

Os materiais híbridos orgânico-inorgânico obtidos na imobilização de espécies biologicamente ativas em estruturas inorgânicas apresentam grande interesse devido à potencialização das propriedades desses materiais quando comparados aos sistemas isolados.¹ Logo, os materiais híbridos podem apresentar propriedades diferenciadas em relação às substâncias de partida, como aumento da estabilidade térmica, preservação das propriedades físico-químicas e terapêuticas, em particular de moléculas que são sensíveis à luz, ao calor etc.^{2,3,4} Além disso, a liberação modificada dos agentes bioativos em um alvo específico pode promover uma melhor eficiência quanto à disposição da substância no local desejado.⁵

Apesar da variada aplicabilidade de nanopartículas inorgânicas como ouro, prata, nanotubo de carbono, Fe_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , *Quantum Dots*, entre outros para fins medicinais, ressalta-se a importância da avaliação toxicológica desses materiais através de testes *in vitro* e *in vivo*.^{6,7,8} Por conta disso, ensaios de internalização celular, alteração no DNA e expressão genética, imunogenicidade, estresse oxidativo, proliferação celular, atividade metabólica, hemólise, apoptose e necrose vêm sendo realizados quando em presença de nanopartículas.^{6,9}

Na presente Tese de Doutorado, os estudos focaram uma classe particular de partículas inorgânicas, os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), que serão apresentados a seguir. Ao contrário de carregadores inorgânicos como Au e Fe₂O₃, as espécies a serem transportadas não estão apenas ancoradas na superfície externa, mas também e, principalmente, no interior dos HDLs, constituindo sistemas organizados em escala nanométrica.

I.2. Hidróxidos Duplos Lamelares

Dentre os vários possíveis carregadores inorgânicos de espécies bioativas, encontram-se os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), materiais lamelares que apresentam fórmula geral $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+} [A^{n-}_{x/n}yH_2O]^{x-}$, na qual M^{II} e M^{III} são cátions divalentes e trivalentes, e Aⁿ⁻ é um ânion de carga n. Nesses materiais bidimensionalmente organizados, as lamelas possuem cargas positivas entre as quais podem se alojar ânions de diferentes naturezas e tamanhos, de modo que os poros entre as lamelas podem ser classificados como *flexíveis*.¹⁴ A estrutura dos HDLs é semelhante-brucita Mg(OH)₂.¹¹ Na brucita, as lamelas são neutras e formadas através do compartilhamento das arestas de octaedros constituídos por cátions Mg²⁺ localizados no centro e ânions hidroxila localizados nos vértices. As camadas planas e neutras se empilham por meio de ligações de hidrogênio. A substituição isomórfica, na estrutura da brucita, de cátions divalentes por cátions trivalentes, resulta na formação de camadas positivamente carregadas. A eletroneutralidade do material é mantida com a presença de ânions que, juntamente às moléculas de água, promovem o empilhamento das lamelas formando a estrutura dos HDLs (Figura 1). Esses materiais também são conhecidos como *compostos do tipo hidrotalcita*, devido à similaridade estrutural com o mineral hidrotalcita, de composição química $[Mg_6Al_2(OH)_{16}](CO_3).4H_2O$, cuja estrutura do monocristal foi resolvida por Allmann.¹⁵ A

hidrotalcita sintética é usada comercialmente como um antiácido, patentado pela empresa Bayer AG com o nome Talcid®.^{16,17}

Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos HDLs.

Os HDLs possuem ocorrência natural e podem ser obtidos facilmente em laboratório utilizando uma gama muito variada de composição química através de rotas simples e de baixo custo (sem a necessidade de utilizar pressões e temperaturas elevadas), levando à obtenção de sólidos de alto grau de pureza.⁹⁻¹²

Assim como mencionado anteriormente para os carregadores inorgânicos, além de ser biocompatíveis¹⁸⁻²² e apresentarem baixa toxicidade^{23,24,25}, os HDLs podem servir como uma “capa” protetora contra à degradação das espécies biologicamente ativas confinadas na região interlamelar.^{5,18,19,21} Dentre outros atributos bem difundidos na literatura, encontra-se o caráter antiácido dos HDLs.^{26,27,1,10} Aliados a essas características, a elevada capacidade de troca aniônica desses materiais os torna promissores veículos para a liberação sustentada não somente

de fármacos,²⁸⁻³⁵ mas também de biomoléculas como aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos.³⁶⁻⁴¹ Nota-se, conseqüentemente, a crescente importância conferida aos HDLs para tais finalidades a partir das primeiras publicações em 2001.⁴²⁻⁴⁷

Visando a utilização dos HDLs como hospedeiros e carregadores de fármacos, vale ressaltar o papel biológico que esses materiais podem exercer. Li et al⁴⁸ mostraram o emprego dos HDLs como potencial imunomoduladores na ativação da maturação de células dendríticas (CDs). Primeiramente, foi determinado o efeito da densidade lamelar através da variação da razão molar Mg^{2+}/Al^{3+} (1:1, 2:1 e 3:1, nomeados R1, R2 e R3 respectivamente) contendo íons nitrato na região interlamelar revestidos com as CDs. Após a caracterização físico-química dos materiais através das técnicas de DRX, MET e medidas de Potencial Zeta, foram realizados testes *in vivo*. Dessa forma, foi possível elucidar os efeitos da densidade de carga lamelar em funções celulares cruciais como fagocitose, fenótipo, capacidade de migração, secreção de citocinas e viabilidade dos HDLs contendo as CDs imaturas e maduras. Os resultados indicaram o grande potencial do material R1 como carregador de vacinas e na maturação das CDs, comportamento justificado devido à presença do $Al(OH)_3$, fase presente somente no R1.^{49,50} Assim, o possível desempenho imunobiológico dos HDLs nas CDs foi considerado essencial para o aumento da resposta imune e eventualmente a utilização em vacinas desses materiais na liberação *ex vivo* de monócitos derivados de CDs.

Na **Tabela 1** estão relacionados os artigos reportados de 2001 até outubro de 2012 sobre a intercalação de fármacos e espécies de interesse biológico em hidróxidos duplos lamelares.

Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Ação Farmacológica	Métodos de caracterização	Ref
Diclofenaco, Ibuprofeno, Naproxeno, Ácido 4-bifenilacético, Ácido tolfenâmico, Ácido 2-propilpentanóico, Gemfibrozil	Li/Al ₂	AINEs Anticonvulsivo Antihiperlipidêmico	DRX; CHN; IV; TGA	28
Ibuprofeno	Mg ₂ /Al	AINEs	IV; TGA; CHN	51
Ácido salicílico, Ácido cítrico,	Mg ₃ /Al	AINEs Antioxidante	DRX; TGA-DTA; IV; CHN	52
Indometacina, Cetoprofeno, Ácido tioprofênico	Mg ₃ /Al	AINEs	DRX; CHN; UV/Vis	53
Ácido 1hidroxietilideno-1,1-difosfônico	Mg ₂ /Al e Mg ₃ /Al	Tratamento de osteoporose Reabsorção Óssea	DRX; CLAE; ³¹ P/ ²⁷ Al RMN	54
Ácido cítrico	Mg ₂ /Al	Antioxidante	DRX; IV; MEV	55
Ácido indol 2-Carboxílico	Zn ₂ /Al e Zn ₃ /Al	Anticonvulsivo Relaxante Muscular	DRX; IV	56
Indometacina	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; ¹³ C RMN; TGA-DTA	57
Ácido salicílico, Naproxeno	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; ¹³ C RMN; TGA-DTA	58
Ácido folínico Metotrexato	Mg ₂ /Al	Tratamento de alguns tipos de câncer (cólon)	DRX; TGA-DTA; ICP-AES; CHN	59
Diclofenaco	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; XPS	60
Fenbufeno	Mg ₂ /Al e Li/Al ₂	AINEs	DRX; IV; TGA; ICP-AES	61
Fenbufeno	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; MET; XPS	62
Camptocina	Mg ₂ /Al	Tratamento de alguns tipos de câncer (ovário)	DRX; IV; UV/Vis; MET	63
Naproxeno	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; TGA; ICP-AES; CHN; UV/Vis	64
Ibuprofeno	Mg ₃ /Al	AINEs	IV; Raman; DRX; TGA; EPR	65
Ibuprofeno, Diclofenaco, Indometacina	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; Raman; RMN, Dinâmica Molecular	29
Ácido ferúlico	Mg/Al	Antioxidante	DRX; TGA; MEV	66
Fluorouracila	Mg ₂ /Al	Tratamento de alguns tipos de câncer (colorretal, pâncreas)	DRX; IV; TGA	67
Fenoximetilpenicilina	Mg ₃ /Al	Antibiótico	DRX; IV; CHN; MEV	68

Continuação Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Ação Farmacológica	Métodos de caracterização	Ref
Cordicepina (ou 3-Desoxiadenosina)	Mg/Al	Antitumor	DRX; IV; MET; Eletroforese Capilar	69
Metotrexato	Mg ₂ /Al	Tratamento de alguns tipos de câncer (leucemia)	DRX; MEV	70
Tirosina	Zn ₂ /Al	Prevenção doenças neurológicas (mal de Alzheimer)	DRX; IV; ICP-AES; Área Superficial; TGA-DSC; MET	71
Ácido mefenâmico e Ácido meclofenâmico	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; TGA-DTA; Área Superficial	72
Gramicidina, Anfotericina Ampicilina, Ácido nalidixico	Mg ₂ /Al	Antibiótico	DRX; IV; UV/Vis	73
Succinato de cloramfenicol	Mg ₂ /Al	Antibiótico	DRX; TGA; UV/Vis	30
Ácido indol 3-acético	Zn/Al, Zn(OH) ₃	Antioxidante	DRX; IV; TGA-DTA; MEV	74
Podofilotoxina	Mg ₃ /Al	Tratamento do câncer	DRX; UV/Vis; MET	31
Naproxeno	Zn/Al	AINEs	DRX; CHN; MET; Área Superficial	75
Norfloxacin	Mg/Al	Antibiótico	DRX; IV; UV/Vis; TGA-DTA; ICP-AES	32
Celecoxib	Mg/Al	AINEs	DRX; IV; DSC; Área Superficial	76
Ácido mefenâmico	Mg ₂ /Al, Mg ₃ /Al, Mg ₄ /Al	AINEs	DRX; CHN; IV; Raman; TGA-MS; MEV	33
Curcumina	Mg ₃ /Al	Antioxidante	DRX; IV; ICP-AES; TGA-DTA	32
Diclofenaco	Mg ₃ /Al	AINEs	DRX; UV/Vis; CLAE	34
Heparina	Mg ₂ /Al	Anticoagulante (Tratamento de síndromes coronarianas agudas tais como o infarto)	CHNS; ICP-AES; DRX; IV; MET; MEV	77
Fluorouracila	Mg ₂ /Al	Antitumor	DRX; MEV; CHN	78
Heparina	Mg ₂ /Al	Anticoagulante	DRX; CHN; IV; MEV; MET	79
Ácido mefenâmico e Ácido meclofenâmico	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; CHN; IV; MET; UV/Vis	80

Continuação Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Ação Farmacológica	Métodos de caracterização	Ref
Floxuridina	Mg ₂ /Al	Tratamento do câncer colorretal	DRX; CHN; IV; ICP-AES	81
Gliclazide	Zn/Al/Cr	Tratamento de diabetes	DRX; IV; TGA-DTA; DSC; ICP-AES	82
Ácido traxenâmico	Zn ₂ /Al	Prevenção de hemorragias provocadas por hiperfibrinólise	DRX; TGA-DTA; DSC	83
Captopril	Mg ₂ /Al	Tratamento da hipertensão arterial	DRX; CHNS; IV; ICP-AES; TGA-DTA-MS; Área Superficial	84
Naproxeno	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; CHN; TGA-DTA; MEV; MET; Área Superficial; Tamanho de Partícula (DLS)	85
Ácido Ascórbico	Zn ₂ /Fe e Mg ₂ /Fe	Prevenção de gripe, fraqueza muscular e doenças infecciosas	DRX; IV; TGA-DTA	86
Ácido Acetil Salicílico	Mg _x /Al (x= 4, 3, 2)	AINEs	DRX; IV; TGA-DSC; MET; Área Superficial	87
Ibuprofeno	Mg ₂ /Al	AINEs	CHN; MEV; MET; Potencial Zeta; Área Superficial	88
Prednisona	Mg ₂ /Al	Tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias	DRX; IV; UV-vis	89
Ácido Ascórbico	Mg ₃ /Al	Prevenção de infecção	DRX; CHN; IV; ICP-AES; TGA-DTA; CLAE	90
Diclofenaco, Gemfibrozil, Ibuprofeno, Naproxeno, Ácido 2-propilpentanóico, Ácido 4-bifenilacético, Ácido tolfenâmico	Mg ₂ /Al e Ca ₂ /Al	AINEs	DRX; CHN; IV; ICP-AES; UV-vis	91
Diclofenaco	Mg _{1,5} /Al	AINEs	DRX; IV; MEV	92
Pravastatina e Fluvastatina	Mg ₂ /Al	Tratamento da hipercolesterolemia	DRX; IV; CHN; TGA; MEV; UV-vis; MET; EDX	93
Ácido folínico	Zn ₃ /Al	Antitumor	IV; MEV; AFM	94
Podofilotoxina	Mg ₃ /Al	Antitumor	IV; MET; Potencial Zeta; Tamanho de Partícula (DLS)	95
Cefazolina	Zn ₂ /Al	Antibiótico	DRX; IV; CHNS; TGA-DTA; ICP-AES	96

Continuação Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Ação Farmacológica	Métodos de caracterização	Ref
Heparina	Mg ₂ /Al	Anticoagulante	¹³ C RMN; Dinâmica Molecular	97
Bezafibrato e Ácido Clofibrato	Mg ₂ /Al	Tratamento da hiperlipidemia	DRX; IV; TGA	98
Cetoprofeno	Zn ₂ /Al; Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; CHN	99
Camptocina	Mg ₂ /Al	Antitumor	DRX; MET; IV; UV	100
Heparina	Mg ₂ /Al	Anticoagulante	MET	101
Glicil-L-Tirosina	Mg ₂ /Al	Tratamento de insuficiência renal	DRX; IV; MEV; CHN; ICP-AES; UV-vis; ¹³ C RMN	102
Ácido Acetil Salicílico	Mg/Al/Fe	AINEs	DRX; IV; TGA-DTA; MET; EDX	103
Diclofenaco	Zn ₂ /Al	AINEs	Potencial Zeta; DRX; IV; MET; CHN; ICP-AES; TGA	104
Flurbiprofeno	Mg _{1,5} /Al	AINEs	DRX; DSC; TGA; IV; MEV; UV-vis	105
Ibuprofeno	Mg/Al; Zn/Al; Mg/Fe	AINEs	IV; DRX; MET; TGA; UV-vis	106
Ácido Clorogênico	Mg ₂ /Al	Antioxidante	DRX; IV; TGA; MEV	107
2,4 Dicloro benzoato de sódio	Zn ₂ /Al	Atividade antimicrobiana	DRX; TGA-DTA	108
Para- hidroxibenzoato de sódio				
Alendronato trihidratado de sódio	Mg ₃ /Al	Tratamento da osteoporose	DRX; DSC	109
Metotrexato	Zn ₂ /Al	Antitumor	DRX; IV; MET; MEV; TGA, Tamanho de Partícula (DLS), EDX	110
Ibuprofeno	Zn ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; CHN; ICP-AES	111
Teofilina	Mg/Zn/Al	Tratamento de asma	DRX; IV; TGA-DTA; UV-vis	112
Heparina	Mg ₂ /Al	Anticoagulante	MET	113
Diclofenaco	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; TGA; CHN; MEV; EDX	114
Ibuprofeno	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; ICP-AES; CHN; MEV; MET	115
Paracetamol	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; IV; TGA-DTA; Dinâmica Molecular	116

Continuação Tabela 1: Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares (2001-2012).

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Ação Farmacológica	Métodos de caracterização	Ref
Metotrexato	Mg ₂ /Al	Antitumor	MEV; MET	117
Diclofenaco	Zn ₂ /Al	AINEs	DRX; TGA-DTA; MET; MEV; ICP-AES	118
Furosemida	Mg ₂ Al; Zn ₂ /Al	Tratamento de insuficiência renal	DRX; TGA; DSC; IV; ICP-AES	119
Ácido Fólico	Mg/Zn/Al	Tratamento de algumas anemias (ferropriva), reduz risco do mal de Alzheimer	DRX; IV; TGA-DTA; UV-vis	120
Cetorolaco	Mg ₂ /Al	AINEs	DRX; CHN; ICP-AES; Tamanho de Partícula (DLS); IV; MEV; MET; UV-vis	121
Metotrexato	Mg ₂ /Al	Antitumor	DRX; MET; EDX; TGA-DTA; IV; Tamanho de Partícula (DLS)	122
Diclofenaco; Cetoprofeno; Cloranfenicol	Mg ₂ Al; Zn ₂ /Al	AINEs Antibiótico	DRX; ICP-AES; CHN; IV; TGA-DTA; MEV	123
Pravastatina	Mg ₂ Al; Zn ₂ /Al	Antihiperlipidêmico	DRX; CHN; ICP-AES; IV; Raman; ¹³ C RMN; TGA-DTA; DFT	124

Devido à possível aplicação biológica confiada aos HDLs como carregadores, é imprescindível a caracterização criteriosa e aprofundada dos materiais, quando intercalados com as moléculas biologicamente ativas.¹²⁵

Há um amplo conjunto de técnicas de caracterização estrutural empregados nos estudos de materiais híbridos de HDL, conforme mostra a **Tabela 1**, sendo que as comumente utilizadas são DRX, IV, CHN, ICP-AES e TGA. Porém, nota-se que algumas técnicas vêm ganhando espaço como a Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido para o ¹³C,^{57,58,97,102,124} cálculos de Dinâmica Molecular,^{29,97,116} medidas de Tamanho de Partícula^{85,95,110,121,122} e de Potencial Zeta.^{88,95,104} Vale ressaltar a complementação fornecida por cada técnica quanto à elucidação

estrutural das amostras de HDLs em presença das moléculas bioativas. Del Arco et al.,⁵⁷ mostraram pela primeira vez a utilização da ^{13}C RMN do estado sólido para complementar a caracterização estrutural dos HDLs intercalados com o anti-inflamatório Indometacina (Ind). Os materiais híbridos foram obtidos por dois métodos de síntese: a coprecipitação ($\text{Mg}_2\text{AlIndcop}$) e a reconstituição ($\text{Mg}_2\text{AlIndrec}$), utilizando a mesma composição lamelar Mg_2Al . Os dados de DRX mostraram a intercalação do fármaco em arranjo de bicamada e monocamada para os materiais $\text{Mg}_2\text{AlIndcop}$ e $\text{Mg}_2\text{AlIndrec}$, respectivamente. Os espectros de ^{13}C RMN de ambos os materiais apresentam perfil semelhante ao da indometacina livre, exceto pela presença do pico em 179,85 ppm atribuída ao grupo carboxilato confirmando a presença da forma aniônica da molécula no material. Além disso, foi observado o aparecimento de um pico de baixa intensidade em 170 ppm, que não aparece na indometacina, mas na matriz de HDL contendo ânions carbonato (Mg_2AlCO_3). Porém, não foi possível detectar a presença desses íons pelas técnicas previamente utilizadas na caracterização dos sólidos (DRX, IV e TGA). Os autores atribuíram o pico em 170 ppm à adsorção dos íons na superfície dos cristalitos, como resultado da reação com dióxido de carbono da atmosfera, levando a uma contaminação de ânions carbonato no processo de síntese. Portanto, a técnica de ^{13}C RMN do estado sólido pôde corroborar a presença da indometacina na forma aniônica juntamente ao dado de IV, além de mostrar uma contaminação com ânions carbonato nos HDLs isolados.

Mohanambe et al.²⁹ mostraram a caracterização estrutural dos HDLs de Mg_2Al intercalados com três AINEs (Ibuprofeno, Diclofenaco e Indometacina) através de DRX e das Espectroscopias IV, Raman e ^{13}C RMN comparadas aos resultados de dinâmica molecular (Software packages Cerius ou Materials Studio) para obter um melhor entendimento quanto às possíveis orientações, arranjos e geometria dos AINEs confinados na matriz lamelar. A simulação computacional possibilita a elucidação das propriedades estruturais e dinâmicas em nível molecular e oferece

uma conexão direta entre detalhes da estrutura local e as medidas experimentais. Os dados experimentais, juntamente com aqueles da simulação para o Ibuprofeno, mostraram que a espécie intercalada encontra-se na forma aniônica em um arranjo de bicamada. Apesar do Ibuprofeno se encontrar na forma desprotonada no material, devido ao processo de interação entre as lamelas positivas dos HDLs, a sua geometria foi mantida quando comparada à da molécula livre. Porém, através da simulação foi possível visualizar a significativa diferença entre a geometria das moléculas Diclofenaco e Indometacina quando imobilizadas nos HDLs em relação às estruturas desses fármacos no estado sólido. O processo de intercalação pode proporcionar distintos arranjos e orientações para a molécula convidada devido a vários fatores como, por exemplo, densidade de carga lamelar e grau de hidratação. Porém, o espaço interlamelar é ajustado para acomodar a espécie em um arranjo de mínimo de energia que geralmente corresponde à geometria da molécula livre. Os autores atribuem essa diferença na geometria para o Diclofenaco e Indometacina intercalados à interação eletroestática entre os átomos eletronegativos da molécula dos fármacos com as lamelas. Os resultados de simulação proporcionaram um melhor detalhamento na interpretação dos dados experimentais obtidos para os materiais híbridos de HDL-AINEs quanto à orientação e à geometria das moléculas presentes na matriz hospedeira de HDLs.

Assim como a simulação computacional, as medidas de tamanho de partícula (DLS) vêm complementar os dados de caracterização estrutural dos HDLs contendo moléculas bioativas. Além das técnicas de imagens MEV e MET, que indicam a morfologia dos HDLs e a estimativa (MET) da espessura e largura de algumas partículas primárias no sólido, as medidas de tamanho de partícula fornecem parâmetros de distribuição e homogeneidade de tamanho do material isolado. Parâmetros de síntese podem ser ajustados para obter materiais homogeneamente distribuídos quanto ao tamanho. Carriazo et al,⁸⁵ reportaram pela primeira vez dados de tamanho

de partícula (DLS) do material de HDL Mg_2Al intercalado com o fármaco naproxeno. Os dados de DRX e Espectroscopia mostraram a intercalação da espécie e a integridade estrutural após o processo de síntese, respectivamente. As imagens obtidas por MEV e MET indicaram a obtenção de agregados irregulares de forma hexagonal, como já foi observado previamente para os HDLs,^{20,51,53} devido à interação entre as superfícies das partículas inorgânicas e orgânicas. Além disso, os valores de tamanho de partícula mostraram um perfil de distribuição bimodal em uma faixa entre 3 a 80 μm , concordantes às observações obtidas pela microscopia eletrônica.

A morfologia, tamanho e carga superficial das partículas inorgânicas apresentam extrema importância quanto ao mecanismo de interação desses materiais no meio biológico.¹²⁶ Por isso, além das caracterizações estruturais descritas acima, nota-se a importância de se conhecer o potencial Zeta das partículas, uma vez que a estabilidade das suspensões quanto à agregação pode influenciar na disponibilidade dos materiais no organismo.^{104,126} Nessa direção, Qin et al.,⁹⁵ reportaram a caracterização estrutural do material de HDL Mg_3Al contendo a molécula Podofilotoxina utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer como o linfoma. Os dados de DRX e IV mostraram a obtenção do material lamelar com a intercalação da podofilotoxina na região interlamelar. Além disso, o material obtido apresentou distribuição homogênea de tamanho de partícula na faixa entre 80 - 90 nm e potencial Zeta igual a + 20,3 mV.

Ensaio biológicos *in vitro* e *in vivo* vêm sendo explorados de modo a avaliar o mecanismo de ação dos HDLs-moléculas bioativas quando empregados *via* administração oral (enteral), tópica (local) ou intravenosa (parenteral).^{35,36,127} Na administração oral, os híbridos de HDLs podem liberar as moléculas convidadas de duas maneiras: (1) no suco gástrico ($\text{pH} = 1,8$), pode ocorrer a dissolução da matriz com a liberação dos íons que compõem as lamelas (M^{II} , M^{III}), juntamente com a espécie intercalada e (2) nos fluídos do intestino delgado a troca iônica dos íons imobilizados entre as lamelas (liberação sustentada) pelos íons presentes.⁶ Ressalta-se que a

solubilização do HDL no suco gástrico é dependente do tempo e da espécie intercalada entre as lamelas.⁹² A aplicação tópica ocorre através da troca iônica dos fluidos da transpiração (NaCl, por exemplo) com a espécie confinada entre as lamelas.¹²⁸ Os trabalhos publicados até então sobre a administração parenteral dos HDLs propõe que a internalização ocorre através da endocitose mediada pela proteína clatrina (mecanismo mais comum utilizado na absorção das partículas intracelulares em células eucarióticas).^{6,83}

Testes *in vitro* simulando os fluidos do trato gastrointestinal (administração enteral), ou seja, em pH= 1,8 (estômago) e pH= 7,4 (intestino delgado), mostraram que os HDLs contendo moléculas bioativas (anti-inflamatórios, anticancerígenos, antibióticos e antioxidantes, entre outros) apresentam um perfil de liberação sustentada das drogas quando comparadas às moléculas isoladas.^{9,126} Logo, picos de concentração plasmática nas faixas subterapêutica e tóxica (acima da concentração terapêutica) podem ser evitados com esses nanocarregadores. Assim, tratamentos prolongados como, por exemplo, com anti-inflamatórios podem ser modulados e controlados na liberação, de modo a diminuir a quantidade de droga ingerida e manter a concentração na faixa terapêutica por mais tempo. Outros testes *in vitro* envolvendo cultura celular (geralmente com células cancerígenas como pulmonar A549, cervical HeLa, osteossarcoma HOS, por exemplo) de HDLs contendo anticancerígenos como o metotrexato (MTX) indicaram o potencial dos materiais híbridos quanto à inibição do crescimento celular.¹²⁶

Vale reportar nesse contexto o trabalho apresentado pelo nosso grupo e colaboradores (Cunha et al., 2010)¹²⁹ quanto a ação anti-inflamatória e a citotoxicidade do ácido mefenâmico (anti-inflamatório), e das amostras contendo mefenamato, HDL-Mef (Mg₂Al-Mef), e cloreto, HDL-Cl, intercalados em HDLs. A ação biológica e a citotoxicidade foram analisadas através dos testes *in vivo* de motilidade intestinal em camundongos albinos *Swiss* e ratos *Wistar* adultos, machos (induzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético) e *in vitro* (hemólise). Para o teste de

motilidade intestinal, observou-se que na administração de 50 mg/kg do medicamento e de sua forma intercalada, foram observados 15 contrações quando administrado o ácido mefenâmico contra 8 contrações quando administrado o material HDL-Mef. Nota-se o aumento da ação farmacológica do anti-inflamatório quando intercalado na matriz lamelar. Da mesma forma, para a ocorrência de 20 % de hemólise, foi necessário utilizar 1,8 mg de Mef, 4,3 mg de HDL-Mef e 7,1 mg de HDL-Cl. Portanto, o efeito hemolítico (citotóxico) tanto do HDL-Mef quanto da própria matriz sem nenhum fármaco intercalado (somente íons cloreto) foi diminuído devido a necessidade de uma maior quantidade desses materiais para atingir a mesma porcentagem de hemólise (20 %).

Trabalhos reportando a ação farmacológica dos carregadores inorgânicos de HDLs através de testes *in vitro* (simulando as administrações oral e parenteral, e em cultura celular) e *in vivo* (efeito analgésico, ulceração gástrica)^{99,130} vêm sendo publicados de forma crescente nos últimos anos.^{34,82,83} Porém, mais recentemente, tem-se explorado testes *ex vivo* utilizando Microscopia Confocal para analisar o efeito toxicológico e a biodistribuição dos HDLs (Mg/Al e Zn/Al) contendo os ânions carbonato (CO_3^{2-}) e cloreto (Cl^-), ou seja, o efeito cumulativo dos carregadores inorgânicos no organismo.¹²⁵ Choi et al.¹²⁵ mostraram a distribuição de partículas de HDL- CO_3 recoberto externamente por corante fluorescente vermelho (isotiocianato de rodamina B). O HDL marcado com a sonda fluorescente foi administrado em ratos (fêmea Balb-c) através da injeção intraperitoneal a uma concentração de 500 mg/kg por 5 dias consecutivos. A utilização de repetidas injeções e elevada concentração foram necessárias para a obtenção de imagens bem resolvidas no Microscópio Confocal, além de avaliar o alvo preferencial no possível acúmulo das nanopartículas nos seguintes órgãos: cérebro, coração, rim, fígado, pulmão e baço. Os resultados de imagens apontaram a larga distribuição das nanopartículas no baço, fígado e rim, pouca quantidade no pulmão e nenhum rastro no cérebro e coração. Porém, outro estudo *in vivo*,

também reportado por Choi et al.,¹³¹ mostrou que a aplicação dos HDLs como carregadores de drogas anticancerígenas (MTX) não acarretou qualquer acúmulo significativo em nenhum dos órgãos citados acima quando administrada na forma de injeção intraperitoneal a uma concentração de 100 mg/kg. Dessa forma, pôde-se inferir que uma dose menor da nanopartícula possibilitou a sua decomposição e excreção no meio sistêmico.

O efeito do tamanho de partícula dos HDLs no mecanismo de captação celular vem sendo alvo de estudo, uma vez que o tamanho de partícula é um dos fatores que pode influenciar na adesão celular, assim como na internalização e no comportamento intracelular das nanopartículas. A determinação da faixa ideal de tamanho dos HDLs como carregadores intracelulares é de extrema importância para maximizar a eficiência de internalização. Oh et al.¹³² avaliaram o mecanismo de internalização do material HDL-CO₃ (50, 100, 200 e 350 nm) revestido com o fluoróforo 5'-isotiocianato de fluoresceína (FTIC- fluorescein 5'-isothiocyanate) por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a captação celular é altamente dependente do tamanho. A faixa de partículas entre 50 a 200 nm foi seletivamente internalizada através do mecanismo de endocitose mediado pelo receptor clatrina com uma elevada permeabilidade e retenção. A clatrina é uma proteína fibrosa, localizada em pequenas depressões na membrana plasmática, que capta macromoléculas pela invaginação e consequente formação de vesículas com aproximadamente 120 nm.⁵⁷ Porém, essas vesículas são capazes de adaptar e modificar o seu tamanho de modo a acomodar a macromolécula. Esses resultados sugerem que o controle do tamanho na faixa de 50 a 200 nm torna a internalização das partículas específica pela mediação do receptor clatrina resultando em uma elevada captação celular. Portanto, o controle do tamanho de partícula dos HDLs é fundamental para o reconhecimento, interação e mecanismo de internalização celular.

Parâmetros como composição, morfologia, tamanho (mencionado anteriormente), carga elétrica superficial e área superficial podem modificar os mecanismos de ação assim como a toxicidade dos HDLs no meio biológico.¹²⁶

Estudos comparativos da citotoxicidade dos HDLs (Mg_2Al e Zn_2Al)²⁴ através do teste de hemólise apontaram a menor toxicidade do primeiro em relação ao segundo. Como os tamanhos de partícula, assim como as solubilidades, encontrados para as duas matrizes no meio celular em questão foram praticamente os mesmos, os autores atribuíram a toxicidade aos íons Zn^{2+} , uma vez que os níveis de Al^{3+} liberados foram os mesmos para os dois materiais. Alguns estudos relacionados aos sais básicos de zinco mostraram uma maior toxicidade quando comparados a materiais contendo outros elementos como o titânio e o alumínio.^{133,134} Por outro lado, estudos sobre citotoxicidade em células A549 (carcinoma pulmonar) de duas matrizes de HDLs ($\text{Mg}_2\text{Al-CO}_3$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$)¹³⁵ indicaram que o primeiro é mais tóxico que o segundo. A explicação para esse resultado é a estabilidade termodinâmica do $\text{Mg}_2\text{Al-CO}_3$ comparado ao $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$. A menor dissolução do $\text{Mg}_2\text{Al-CO}_3$ no meio do fluido corporal pH= 7,4, aumenta a retenção celular interferindo no andamento de funções celulares essenciais. Avaliou-se também a toxicidade do $\text{Mg}_2\text{Al-CO}_3$ de diferentes tamanhos de partículas (50, 100, 200 e 350 nm) em células A549.¹³⁶ Os resultados obtidos mostraram que partículas de 50 ($142 \text{ m}^2/\text{g}$) e 350 nm ($20 \text{ m}^2/\text{g}$) são mais tóxicas quando comparadas às partículas de tamanho 100 ($60 \text{ m}^2/\text{g}$) e 200 nm ($35 \text{ m}^2/\text{g}$). Segundo os autores, o aumento da área superficial das partículas de 50 nm leva a uma maior reatividade no meio biológico devido à indução de resposta inflamatória e danos à membrana celular. Já as partículas de 350 nm causam um ligeiro distúrbio no crescimento celular. Portanto, os HDLs preparados na faixa de tamanho de partícula entre 100 nm a 200 nm exibiram baixa toxicidade em termos de proliferação celular, danos na membrana e resposta inflamatória.

As partículas de HDL no meio biológico em relação ao grau de agregação dependem de vários parâmetros, como o pH, a concentração dos sais no sistema biológico, a carga superficial, entre outros, que podem ser avaliados pelo potencial Zeta.¹³⁷

Xu et al.¹³⁸ investigaram o efeito dinâmico de adsorção/troca nos HDLs de cloreto e carbonato na presença dos sais inorgânicos cloreto de sódio (NaCl) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) e de sais orgânicos de sódio (docecil sulfato, folato, citrato e poliacrilato) em diferentes concentrações. A adição de NaCl até a concentração de 3×10^{-3} mol/L na suspensão dos HDLs não alterou significativamente o potencial Zeta, um comportamento atribuído à menor afinidade do HDL pelos ânions cloreto. Já a introdução de concentrações acima de 1×10^{-4} mol/L de Na₂CO₃ reduziu severamente o potencial Zeta até o ponto de passar de potencial positivo para valor negativo com *ca.* 2×10^{-3} mol/L do sal em ambos HDLs. Provavelmente, a mudança no valor do potencial Zeta é resultado da troca e reorientação dos ânions CO₃²⁻ em um arranjo inclinado/vertical na superfície devido à maior afinidade dos ânions CO₃²⁻ em comparação aos ânions Cl⁻.¹³⁹ Os quatro ânions orgânicos afetaram significativamente o valor do potencial Zeta invertendo o sinal de positivo para negativo dos dois HDLs de cloreto e carbonato. A quantidade de dodecil sulfato utilizada para os HDLs atingirem o Ponto de Carga Zero (PZC- Point of Zero Charge) foi menor ($< 2-5 \times 10^{-4}$ mol/L) que a dos demais ânions ($< 1-3 \times 10^{-3}$ mol/L), devido a maior afinidade dos HDLs com o grupo -OSO₃⁻ em relação ao grupo -COO⁻.¹³⁹ Além disso, apesar da afinidade do grupo COO⁻ ser menor que a dos íons Cl⁻ e CO₃²⁻, uma pequena quantidade de troca/adsorção (< 4 %) é suficiente para inverter o potencial Zeta dos HDLs. Provavelmente a densidade de carga dos ânions folato (A⁻²), citrato (A⁻³) e poliacrilato (A⁻ⁿ) auxiliam na adsorção desses íons no HDL. Vale ressaltar que os HDLs começam a sofrer aglomeração a uma concentração salina perto da concentração do Ponto de Carga Zero (onde se aglomeram rapidamente), chamado também de concentração crítica de coagulação.¹³⁹ O estudo

reportado acima investigou as mudanças nas cargas superficiais e aglomeração dos HDLs em suspensões aquosas quando em presença de soluções salinas (íons inorgânico/orgânico) como, por exemplo, o tampão fosfato.

Apesar dos HDLs apresentarem efeito citotóxico, eles induzem uma toxicidade moderada quando comparados a outras nanopartículas inorgânicas.^{140,141} O óxido de ferro (Fe_2O_3), por exemplo, provoca considerável morte celular que provavelmente está relacionada aos danos causados à membrana plasmática. Os nanotubos de carbono, por outro lado, apresentam elevada toxicidade devido à produção das espécies reativas de oxigênio (ROS- Reactive Oxygen Species), além da indução da apoptose celular. As linhagens celulares A549 e L132 se mostraram mais sensíveis às sílicas quando comparadas aos HDLs. Vale destacar que geralmente as doses utilizadas de HDLs nos testes biológicos estão na ordem de 100 $\mu\text{g/mL}$, o que permite considerar os HDLs praticamente não tóxicos nessa faixa de concentração.¹⁴⁰

I.3. Moléculas Bioativas: Pravastatina, Ácido Coumárico e Ácido Lipóico

A **Pravastatina Sódica** (Figura 2), (3R,5R)-3,5-dihidróxi-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-6-hidróxi-2-metil-8-[(S)-2-metil-butiloxi]-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil] heptanoato de sódio ou Pravacol®, como é conhecida comercialmente no Brasil (Bristol-Myers Squibb), possui a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{Na}$ e apresenta função anti-hiperlipidêmica, ou seja, diminui os níveis de colesterol na corrente sanguínea. Esse sal apresenta doze polimorfos (chamados de formas A-L) sendo a forma D encontrada comercialmente com ponto de fusão variando entre 172-174 °C e solubilidade em água igual a 499 mg/mL.¹⁴² Pertencente à classe das estatinas, a pravastatina é uma molécula de origem natural obtida através da cultura dos fungos *Nocardia*

autrophica.¹⁴³ Por ser um medicamento tecido-seletivo, sua ação é inibitória, agindo onde há taxas elevadas de colesterol (fígado e íleo).^{142,144}

Figura 2. Representação da estrutura molecular da Pravastatina obtida utilizando o *software* Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).

A Pravastatina pode agir no organismo reduzindo a produção de lipídios de duas formas: (i) inibe a produção da HMG-CoA (3 hidróxi-3 metil glutamil CoA ou estatinas) responsável pela produção do colesterol ruim LDL; (ii) inibe a produção do LDL, através da inibição de seu precursor VLDL.

Além disso, as estatinas apresentam grande potencial no tratamento do câncer, como os de cólon, pancreático e melanoma.^{145,146} Alguns trabalhos sugerem que um dos mecanismos de ação anticâncer das estatinas está relacionado à redução nos níveis de colesterol. Muitas células cancerígenas, incluindo células de melanoma, usam o colesterol para se proliferar o que não ocorre com as células não cancerígenas. A redução nos níveis de colesterol pode diminuir, parar ou possivelmente prevenir o crescimento do tumor.¹⁴⁵ Outros trabalhos sugerem que o uso de altas doses de estatinas lipofílicas pode estar associado à redução do câncer.¹⁴⁷

De acordo com alguns trabalhos, a pravastatina sódica é sensível ao calor, luz, umidade e sofre parcial degradação em meios ácidos como o do estômago, o que diminui a sua biodisponibilidade.^{148,149} Algumas patentes endossam a utilização de formulações farmacêuticas com propriedades básicas como hidróxidos metálicos para melhorar a estabilidade do fármaco.¹⁴⁸ Após a administração oral, a pravastatina é absorvida (ca. 34 %, baixa absorção) principalmente no intestino e em menor extensão no estômago.¹⁵⁰ Os efeitos colaterais comumente associados ao uso da pravastatina são constipação, flatulência, e dores abdominais.¹⁵⁰ Além disso, a pravastatina atinge máxima concentração plasmática em menos de 1 h, levando ao uso de dosagens altas, o que pode acarretar problemas no fígado. O uso dos HDLs como carregadores pode otimizar o potencial do fármaco de modo a aumentar a estabilidade no estômago e a biodisponibilidade. Nesse contexto, Panda et al.⁹³ intercalaram duas moléculas, pertencentes à classe das estatinas (Fluvastatina e Pravastatina), nos HDLs de magnésio e alumínio (razão molar Mg/Al igual a 2) pelo método da coprecipitação. Porém, os resultados de caracterização para a pravastatina mostraram a intercalação da molécula em um arranjo de monocamada, com espaço interlamelar igual a 10,1 Å, diferente do encontrado na presente Tese, como será discutido adiante. Os autores avaliaram a liberação *in vitro* do HDL-Prav nas condições fisiológicas com o tempo e usaram o modelo cinético de dissolução-difusão para descrever a liberação da pravastatina intercalada. Ambos os materiais mostraram perfil de liberação sustentada, o que é um resultado promissor quanto à administração oral das estatinas.

O Ácido Coumárico, ácido (E) 3-(4-hidróxi fenil)-2-propenóico, de fórmula molecular $C_9H_8O_3$, é um antioxidante derivado do ácido cinâmico.¹⁵¹ Presente nos tecidos de alguns vegetais, o ácido coumárico pode ser encontrado em muitos alimentos como, por exemplo, amendoim, tomate, cenoura e alho.¹⁵¹ Esse ácido carboxílico apresenta ponto de fusão entre 210-

213 °C e $pK_{a1} = 4,34$ e $pK_{a2} = 8,83$ (a 298 K) referentes aos grupamentos carboxílico e fenólico da molécula, respectivamente (Figura 3).^{152,153,154} Em pH igual a 3,73 e temperatura de 298 K, sua solubilidade em água é baixa ($0,3 \pm 0,0$ g/L).¹⁵²

Figura 3. Representação da estrutura molecular do Ácido Coumárico obtida utilizando o *software* Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).

Estudos recentes desse composto fenólico mostraram resultados promissores na ação anti-inflamatória, cardioprotetora e no combate de alguns tipos de câncer como o tumor de mama hormônio-dependente e o melanoma.^{152,155,156} Além disso, o ácido *p*-coumárico pode prevenir doenças neurodegenerativas tais como o Mal de Parkinson, Alzheimer e diminuir níveis de colesterol na corrente sanguínea.^{157,158}

O ácido *p*-coumárico pode ter o seu potencial farmacológico reduzido devido a fatores biológicos tais como baixa absorção no intestino, rápida metabolização e rápida eliminação. Adicionalmente, os metabólitos encontrados na corrente sanguínea que são levados para os órgãos resultantes da digestão podem ser diferentes das substâncias isoladas em termos da atividade biológica.^{159,160} Portanto, o carregador à base de HDL pode proteger a espécie bioativa da degradação através do confinamento da molécula entre as lamelas e proporcionar uma liberação gradativa, mantendo a sua concentração em níveis terapêuticos. Biswick et al.¹⁶¹ imobilizaram o ácido coumárico em outra matriz lamelar, o sal básico lamelar de zinco (Layered

Zinc Basic Salt – ZBS) que exibe estrutura similar aos HDLs, sendo também um trocador aniônico e biocompatível. Através dos resultados de caracterização foi possível visualizar a intercalação do ânion da molécula em um arranjo de bicamada e a manutenção da integridade estrutural da espécie imobilizada. Os autores avaliaram a liberação *in vitro* do material ZBS-Cou em uma solução salina isotônica (teste de 31 h), e visualizaram duas etapas: (i) a primeira etapa de liberação foi abrupta, com 43 % dos íons liberados nas primeiras 4 h devido, provavelmente, a espécies adsorvidas na matriz (ii) a etapa seguinte compreendeu a liberação lenta e sustentada ao longo do experimento. Além disso, através do teste com o radical DPPH (2,2-difenil-2-picrihidrazil), foi possível avaliar a ação antioxidante do ácido coumárico intercalado na matriz lamelar. A reação do DPPH com um antioxidante (doador de um átomo de hidrogênio) reduz o radical levando à mudança na coloração de púrpura para amarelo. Essa transformação é proporcional ao número de elétrons capturados, mostrando a ação antioxidante da espécie. Da mesma forma que na liberação, a ação do material ZBS-Cou com o DPPH foi lenta e sustentada devido a difusão da molécula antioxidante da matriz lamelar. Portanto, é esperado que a matriz lamelar não apenas protegerá a espécie intercalada da degradação como também irá liberá-la de forma sustentada, permitindo a ação prolongada do antioxidante ácido coumárico.

O Ácido Lipóico (Figura 4), ou ácido (R)-5-(1,2-ditiolan-3-il) pentanóico, de fórmula molecular $C_8H_{14}O_2S_2$, é um antioxidante que apresenta ponto de fusão variando entre 58 a 61 °C, e pouco solúvel em água e sensível à luz e ao calor.¹⁶²⁻¹⁶⁶ De ocorrência natural, o ácido lipóico pode ser obtido através da cultura dos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e sintetizado em menor quantidade por plantas e animais (incluindo os seres humanos) sendo encontrado em vários alimentos.¹⁶⁷ Vegetais como brócolis, espinafre, couve, ervilha, tomate e carne vermelha como coração, fígado e rim são fontes do ácido lipóico.¹⁶⁸ A substância endógena funciona como

cofator em inúmeros complexos multienzimáticos responsáveis pela conversão do alimento em energia (ATP).¹⁶⁹

Figura 4. Representação da estrutura molecular do Ácido Lipóico obtida utilizando o *software* Chemdraw-ultra 7.0 (Cambridge).

O ácido lipóico apresenta uma variada aplicação farmacológica; há estudos de uso desse composto contra diabetes do tipo 2, aterosclerose, inflamação na pele e no tratamento da doença de Parkinson.^{164,170} Além disso, inúmeros trabalhos reportam sua ação no tratamento de alguns tipos de câncer através da indução da apoptose, como as células cancerígenas do fígado, mama, leucemia e melanoma.^{163,164,171,172,173} Ainda que sintetizado pelo organismo e encontrado em vários alimentos, a sua biodisponibilidade é baixa (20-30 %), sendo um dos motivos atribuído à sua baixa solubilidade.^{163,164} Logo, o uso de um carregador pode ser uma estratégia inovadora para contornar esses problemas e potencializar a sua atividade terapêutica. Considerando que os carregadores de HDLs são trocadores aniônicos e biocompatíveis, o confinamento do ácido lipóico entre as lamelas pode aumentar sua estabilidade e assegurar sua eficácia quanto a sua biodisponibilidade no organismo.

II. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho é a preparação e a caracterização físico-química de materiais híbridos orgânico-inorgânicos de Hidróxidos Duplos Lamelares contendo espécies bioativas.

Os objetivos específicos desta Tese são os seguintes: (i) intercalação das espécies de interesse farmacológico, em suas formas aniônicas, pravastatina (ação antihiperlipidêmica), ácidos coumárico e lipóico (atividade antioxidante) nos HDLs através do método da coprecipitação, variando as condições experimentais (por exemplo, a relação molar ânion/ Al^{3+} , o tempo de agitação, o tratamento pós-síntese, entre outros); (ii) caracterização dos materiais híbridos por análise elementar (CHN e metais), difratometria de raios X, espectroscopia vibracional no infravermelho, espectroscopia Raman, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta; (iii) avaliação do comportamento e do potencial farmacológico dos materiais contendo os ânions da pravastatina e ácido lipóico através de testes biológicos *in vitro* empregando células de melanoma humano.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reagentes e Substâncias

A **Tabela 2** apresenta os reagentes utilizados, bem como a fórmula, procedência e grau de pureza das substâncias. Todas as substâncias foram utilizadas sem purificação prévia. Os reagentes higroscópicos como os cloretos dos cátions magnésio e alumínio foram adequadamente secos à pressão reduzida em dessecador na presença de sílica gel ativada.

Tabela 2: Reagentes empregados nas sínteses dos HDLs e na preparação de tampões.

Reagentes	Fórmula	Procedência	Pureza (%)
Cloreto de Magnésio Hexahidratado (203,30 g/mol)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Synth	>99
Cloreto de Alumínio Hexahidratado (241,43 g/mol)	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Aldrich	>99
Cloreto de Zinco (136,29 g/mol)	ZnCl_2	Aldrich	>99
Hidróxido de Sódio (40,00 g/mol)	NaOH	Merck	>99
Pravastatina Sódica (446,51 g/mol)	$\text{NaC}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_7$	Henrifarma	99,1
Ácido Coumárico (164,16 g/mol)	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	Sigma	≥ 99
Ácido Lipóico (206,33 g/mol)	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$	Sigma-Aldrich	≥ 99
Ácido nítrico (63,01 g/mol; 16 mol/L)	HNO_3	Synth	
Nitrato de prata (169,87 g/mol)	AgNO_3	Merck	>99,8
Cloreto de Potássio (74,55 g/mol)	KCl	Sigma-Aldrich	>99
Hidrogenocarbonato de Sódio (84,01 g/mol)	NaHCO_3	Sigma-Aldrich	>99
Dihidrogenofosfato de Sódio (119,98 g/mol)	NaH_2PO_4	Fisher Scientific	>99
Tiocianato de Potássio (97,18 g/mol)	KSCN	Sigma-Aldrich	>99
Ácido Lático (90,08 g/mol; 13 mol/L)	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	Sigma-Aldrich	>99
Ácido Cítrico (192,12 g/mol)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Sigma-Aldrich	>99
Citrato de Sódio Dihidratado (294,03 g/mol)	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	>99
Cloreto de Sódio (58,5 g/mol)	NaCl	Sigma-Aldrich	>99
Ácido Clorídrico (36,5 g/mol; 12 mol/L)	HCl	Spectrum	
Dihidrogenofosfato de Potássio (136,09 g/mol)	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich	>99
Hidrogenofosfato de Sódio Heptahidratado (268,07 g/mol)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	>99

III.2. Preparação dos Hidróxidos Duplos Lamelares

III.2.1. Síntese dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$

A seguir, será descrita a síntese dos HDLs de cloreto para confrontar com os resultados dos HDLs preparados visando a incorporação dos ânions da pravastatina, ácido coumárico e ácido lipóico. Vale ressaltar que os sais metálicos utilizados na síntese dos HDLs estavam na forma de cloreto, de modo que esse ânion pode competir com aqueles que se deseja intercalar. Nos testes biológicos, o HDL cloreto foi utilizado como “branco”, ou seja, a amostra para investigar as propriedades do HDL (carregador), uma vez que não se espera atividade biológica desse material nos testes descritos nesta Tese.

Na síntese da matriz de HDL $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, empregou-se 14,0 mmols de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 7,0 mmols de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Em um béquer de 500 mL, adicionaram-se 100 mL de água desionizada e colocaram-se dois funis de adição: um contendo a solução aquosa dos sais metálicos (0,1 mol/L) e outro contendo a solução aquosa de NaOH (0,2 mol/L) como pode ser observado na Figura 5. O sistema foi mantido sob atmosfera inerte através da imersão de uma agulha conectada ao cilindro de N_2 com o monitoramento do pH.

Figura 5. Vidraria utilizada na síntese dos HDLs pelo método da coprecipitação.

Primeiramente, ajustou-se o pH da água desionizada contida no béquer com solução de NaOH 0,2 mol/L para aproximadamente 9,5. Em seguida, iniciou-se a adição da solução dos sais metálicos a uma velocidade de 1 mL/min, com agitação constante e à temperatura ambiente, mantendo-se sempre o sistema sob atmosfera dinâmica de N_2 . O pH da mistura foi mantido no valor igual a 9,5 pela adição da solução de NaOH 0,2 mol/L, até o fim da adição dos sais metálicos. Terminada essa etapa, os funis de adição e o eletrodo foram retirados. O béquer contendo o precipitado branco em suspensão foi mantido à temperatura ambiente e sob agitação em atmosfera de N_2 por 1 h para evitar a contaminação com os ânions carbonato.

A suspensão foi filtrada à pressão reduzida e o sólido isolado foi seco à pressão reduzida em dessecador na presença de sílica gel por 48 h. Após esse período, o material foi triturado em almofariz, transferido para um frasco de vidro e guardado no armário do laboratório.

Os processos de preparação, lavagem, secagem e armazenamento da matriz de HDL $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ foram os mesmos descritos para o $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$. Porém, o pH da solução para a precipitação do HDL de Zn e Al foi ajustado para aproximadamente 7,5 com a solução de NaOH 0,2 mol/L.

Os precursores contendo os íons M^{2+} (M= Mg ou Zn) e Al^{3+} na proporção molar 2:1 e os íons cloreto intercalados (nomeados $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$) foram caracterizados por difratometria de raios X, análise térmica e espectroscopia vibracional no infravermelho.

III.2.2. Síntese dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al-Prav}$, $\text{Mg}_2\text{Al-Cou}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Lip}$

A preparação dos materiais contendo a pravastatina, o ácido coumárico e ácido lipóico nas suas formas aniônicas (abreviadas como Prav, Cou e Lip, respectivamente) será descrita a seguir.

Em um balão de 500 mL de três bocas, adicionou-se 100 mL de uma solução aquosa 0,1 mol/L do ânion de interesse (Prav, Cou e Lip). Ao balão, adaptaram-se dois funis de adição (com braços laterais para passagem de N_2 no interior da vidraria, mantendo sempre o sistema sob atmosfera dinâmica de N_2): um funil contendo a solução aquosa dos sais metálicos (0,1 mol/L) e outro contendo uma solução de NaOH 0,2 mol/L. O eletrodo utilizado para monitorar o pH foi colocado na terceira boca do balão.

Primeiramente, ajustou-se o pH da solução contida no balão com solução aquosa de NaOH 0,2 mol/L para aproximadamente 9,5 (vide justificativa no item III.2.1). Em seguida, iniciou-se a adição da solução dos sais metálicos a uma velocidade de 1 mL/min, com agitação constante e à temperatura ambiente, para a precipitação do HDL sob atmosfera de N_2 . O pH da mistura foi controlado pela adição da solução de NaOH 0,2 mol/L, até o fim da adição dos sais metálicos. Terminada essa etapa, os funis de adição e o eletrodo foram retirados. Uma boca do

balão contendo o precipitado branco em suspensão foi vedada com uma tampa esmerilhada e as outras duas bocas, com válvulas para a entrada e a saída de gás N_2 . A suspensão foi mantida à temperatura ambiente sob agitação por 1 h. Os sólidos foram isolados utilizando o mesmo procedimento descrito para o HDL Mg_2Al-Cl (item III.2.1).

III.2.3. Síntese dos materiais $Mg_2Al-Prav$ com tratamento pós-síntese

Os processos de preparação dos materiais contendo o ânion derivado da pravastatina foram os mesmos descritos no item III.2.2. Porém, após terminada a adição dos cátions, a suspensão foi dividida em três alíquotas e cada uma tratada da seguinte maneira: alíquota 1- aquecimento em sistema de Refluxo (abreviação Refl), alíquota 2- aquecimento em Reator de Micro-ondas (abreviação Micro) e alíquota 3- aquecimento em Reator Hidrotérmico (abreviação Hidro). As amostras foram submetidas aos tratamentos pós-síntese por 1 h a 50 °C sob atmosfera de N_2 .

O aparato utilizado para o material submetido ao sistema de refluxo foi um condensador de bolas. Assim, após a síntese, foi introduzido o condensador no balão de três bocas, mantendo-se o fluxo contínuo de N_2 .

III.2.4. Síntese dos materiais $Zn_2Al-Prav$ e $Zn_2Al-Cou$

Os processos de preparação, lavagem, secagem e armazenamento dos materiais contendo o ânion derivado da pravastatina e do ácido coumárico nos HDLs- Zn_2Al foram os mesmos descritos no item III.2.2. Porém, da mesma forma que para a obtenção do Zn_2Al-Cl , o pH da síntese foi ajustado para aproximadamente 7,5.

As condições experimentais utilizadas para a obtenção dos materiais de HDLs-X (onde X= Prav, Cou ou Lip) descritos nos itens III.2.2, III.2.3 e III.2.4 são mostradas na **Tabela 3**. Todos os materiais foram preparados pelo método da coprecipitação com tempo de adição dasolução dos cátions M^{2+} (M= Mg e Zn) e Al^{3+} igual a 2 h e tempo de agitação da suspensão após adição dos metais igual a 1 h.

Os nomes dos materiais são indicados com a seguinte abreviação: $M_2Al_y(\hat{\text{Anion}}).x$ onde:

$M = Mg^{2+}$ ou Zn^{2+}

y = razão molar entre ânion/ Al^{3+} ;

$\hat{\text{Anion}}$ = espécie desejada na região interlamelar (Prav, Cou ou Lip);

x = tempo de agitação ou de tratamento térmico do material após o término da adição dos metais.

Tabela 3: Condições experimentais utilizadas para a obtenção dos HDLs-X (onde X= Prav, Cou ou Lip).

Abreviações	Razão molar ânion/ Al^{3+}	pH de reação	Tratamento pós-síntese
$Mg_2Al1Prav$	1	9-10	-
$Mg_2Al2Prav$		9-10	
$Mg_2Al3Prav$	3	9-10	-
$Mg_2Al1Prav.Refl$	1	9-10	Refluxo, 50 °C
$Mg_2Al1Prav.Hidro$	1	9-10	Hidrotérmico, 50 °C
$Mg_2Al1Prav.Micro$	1	9-10	Micro-ondas, 50 °C
$Zn_2Al1Prav$	1	7-8	-
$Mg_2Al1Cou$	1	9-10	-
$Mg_2Al3Cou$	3	9-10	-
$Mg_2Al5Cou$	5	9-10	-
$Zn_2Al3Cou$	3	7-8	-
$Mg_2Al1Lip.1h$	1	9-10	-
$Mg_2Al1Lip.24h$	1	9-10	-
$Mg_2Al3Lip.1h$	3	9-10	-
$Mg_2Al3Lip.24h$	3	9-10	-

III.2.5. Testes para verificação de íons carbonato e cloreto nos HDLs

O procedimento utilizado para o teste de verificação da possível presença de íons carbonato e cloreto nos materiais obtidos na intercalação das espécies orgânicas (Prav, Cou ou Lip) está descrito a seguir.

Em um tubo de ensaio contendo cerca de 3 mL de solução 0,1 mol/L de HNO_3 , adicionou-se aproximadamente 3 mg de HDL-X (X= Prav, Cou ou Lip). A presença de íons carbonato é constatada quando há liberação de gás. Após a solubilização do material foi acrescentado *ca.* de 1 mg do sólido AgNO_3 para visualizar a formação ou não de um precipitado branco proveniente da presença de íons cloreto.

III.3. Preparação dos sais coumarato de sódio e coumarato de dissódio

Os sais coumarato de sódio (NaCou) e coumarato de dissódio (Na_2Cou) descritos em artigo publicado por nós recentemente, foram obtidos através da reação ácido-base entre o Ácido Coumárico e o Hidróxido de Sódio.¹⁷⁴ Em um balão de três bocas adaptados com dois funis de adição contendo o Ácido Coumárico foi adicionado concomitantemente água e uma solução de NaOH na razão molar Ácido Coumárico/ NaOH igual a 1:1 e 1:2 para a formação dos sais NaCou e Na_2Cou , respectivamente. A total solubilização do Ácido Coumárico ocorre em pH igual a 7. Após a adição da solução alcalina o pH era igual a 7 para o NaCou e igual a 10 para o Na_2Cou . As soluções foram mantidas sob agitação por aproximadamente 30 min. Em seguida, a água foi quase totalmente evaporada à pressão reduzida a 38 °C no rotoevaporador. Os precipitados foram lavados com água desionizada e secados à pressão reduzida em dessecador na presença de sílica gel por 48 h.

III.4. Preparação de amostras para medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta

Os procedimentos de preparação das suspensões de HDLs (Mg_2Al-Cl , Zn_2Al-Cl , Mg_2Al_1Prav , Zn_2Al_3Cou e Mg_2Al_1Lip) para as medidas de tamanho de partícula e potencial Zeta serão descritos a seguir. Todas as medidas foram feitas em quintuplicata a 25 °C (exceto o material Zn_2Al_3Cou , cujas medidas foram realizadas em quatruplicata).

Para as medidas de **tamanho de partículas**, foram preparadas primeiramente duas suspensões aquosas estoque de concentrações iguais a 0,1 % e 0,05 % (m/v) dos HDLs e dispersadas por cinco minutos no agitador Vortex. Em seguida, essas suspensões foram divididas em alíquotas e submetidas a diferentes etapas de homogeneização. Os equipamentos *Microfluidizer Processor* e *NanoDeBEE* foram utilizados para desagregar partículas através da interação com uma câmara à alta pressão. Portanto, as alíquotas foram processadas utilizando: (i) 1 h de agitação no sonicador; (ii) 1 h de agitação no sonicador seguida de tratamento no *Microfluidizer* a pressão igual a 10, 20 ou 30 x 10³ psi com diferentes passagens (1, 2, 3, 5 e 6) (iii) 1 h de agitação no sonicador seguida de tratamento no *NanoDeBEE* a pressão igual a 10, 20 ou 30 x 10³ psi com diferentes passagens (1, 2, 3, 5 e 6).

Para as medidas de **potencial Zeta**, preparou-se inicialmente uma suspensão aquosa de concentração igual a 0,4 % (m/v) dos HDLs seguida por 1 h de agitação no sonicador. Então, as suspensões foram processadas três vezes consecutivas (três passagens) no *NanoDeBEE* a uma pressão igual a 20 x 10³ psi.

III.4.1. Preparação de amostras para medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados

De modo a avaliar a estabilidade quanto à aglomeração das suspensões aquosas dos HDLs ($\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e $\text{Mg}_2\text{Al1Lip}$) frente ao meio biológico, foram realizadas medidas de potencial Zeta em alguns meios simulando as condições fisiológicas a partir de uma administração oral, ou seja, a saliva ($\text{pH}=6,9$), o estômago ($\text{pH}=1,8$), o intestino ($\text{pH}=7,4$) e o lisossomo ($\text{pH}=5,5$). Partindo-se das suspensões aquosas de concentração 0,4 % (m/v) preparadas conforme descrição do item III.4, foram adicionadas alíquotas dos tampões para avaliar o comportamento do potencial Zeta dos materiais através do aumento dos íons no meio. Os valores de potencial Zeta reportados são a média de cinco medidas.

Para preparar 1 L dos tampões biológicos, foram adicionados em um balão volumétrico os seguintes reagentes:

- (i) Tampão $\text{pH}= 6,9$ (Saliva)¹⁷⁵: 1,5 g de KCl , 1,5 g de NaHCO_3 , 0,5 g de NaH_2PO_4 , 0,5 g de KSCN e 0,9 g de ácido láctico;
- (ii) solução $\text{pH}= 1,8$ (Estômago)¹⁷⁶: 2,0 g de NaCl e solução 0,2 mol/L de HCl para ajustar o pH igual a 1,8;
- (iii) Tampão Fosfato $\text{pH}= 7,7$ (Intestino)¹⁷⁷: 0,2 g de KH_2PO_4 , 1,5 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,0 g de NaCl e 0,2 g de KCl ;
- (iv) Tampão $\text{pH}= 5,5$ (Lisossomo)¹⁷⁸: 2,3 g de ácido cítrico e 11,2 g de cítrato de sódio dihidratado.

III.5. Ensaio biológico com o corante Sulforodamina B

O ensaio biológico foi desenvolvido no *Delivery and Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory* (item IX.1.), na University of Waterloo, em Ontário, Canadá, sob supervisão da Profa. Dra. Marianna Foldvari. De modo a investigar o potencial farmacológico dos sistemas dos HDLs contendo os ânions da pravastatina e do ácido lipóico foi realizado o teste biológico com o corante Sulforodamina B para avaliar o crescimento celular e citotoxicidade da linhagem celular de melanoma A-375 (item IX.2.).^{179,180}

III.5.1. Protocolo: Ensaio com corante Sulforodamina B^{181,182}

A seguir será descrito o Protocolo para o Ensaio com o Corante Sulforodamina B (SRB) na linhagem celular A-375,¹⁸³ em presença da Pravastatina Sódica (NaPrav), Ácido Lipóico (HLip) e dos HDLs contendo os ânions Cloreto (Cl^-), Pravastatina (Prav^-) e Lipoato (Lip^-). A infraestrutura assim como o material utilizado para a execução do Ensaio com o corante SRB está descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4: Instrumentação e materiais utilizados no Ensaio com corante SRB.

Instrumentação	Materiais
Fluxo laminar Labconco: classe 2, Tipo A2	Célula de Melanoma Humano (A-375)
Incubadora mantida a 37 °C e 5 % de CO ₂	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)
Bomba a vácuo para aspirar meio de cultura	Solução de Tripsina-EDTA, Frascos de Cultura Celular
Banho-maria, IsoTemp 220, Fisher Scientific	Pipetas Pasteur (previamente higienizadas por Autoclave), Parafilm
Countess, Automated Cell Counter, Invitrogen	Azul de Tripiano (<i>Trypan Blue</i>), TRIS base pH= 10,5 (tampão Tris[hidroximetil]aminometano
SpectraMax 190 Absorbance Microplate Reader para teste biológico (Leitor para Microplacas)	Pravastatina Sódica, Ácido Lipóico, HDL-X (X= Cl ⁻ , Prav ⁻ ou Lip ⁻)

Procedimento

Cultivo da linhagem celular A-375 em placa de 96 poços

As células A-375 (item IX.2.) foram cultivadas de modo a obter em cada poço uma suspensão de 150 µL contendo 50.000 células (calculadas em contador automático Invitrogen). As placas foram mantidas na incubadora por 24 h antes de serem realizados os tratamentos com as amostras NaPrav, HLip, HDL-Cl, HDL-Prav e HDL-Lip. Os detalhes referentes ao Tratamento Celular e Tempo de incubação encontram-se no item IX.1 (Apêndice).

Resposta induzida pelo corante SRB (Sulforodamina B)

As células foram fixadas adicionando primeiramente 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) gelado 50 % (m/v) e mantida a 4 °C por 1 h. Em seguida, as células foram lavadas por

cinco vezes com água destilada para remover o sobrenadante. Após secagem, foi adicionado em cada poço 100 µL de solução de SRB 0,2 % (m/v) em 1 % ácido acético mantendo a placa por 10 min à temperatura ambiente. O SRB não ligado foi removido lavando cinco vezes os poços com solução 1 % de ácido acético. Após secagem, foi adicionado 100 µL de tampão (Tris base pH = 10,5) em cada poço para posterior leitura da absorbância de SRB em 550 nm.

Método de Análise do Ensaio com o corante SRB

A densidade óptica (*optical density* - OD), que é diretamente proporcional ao número de células viáveis, foi registrada em um espectrofômetro automatizado para leitura de microplacas em 550 nm. Os dados foram expressos em termos de % OD das células tratadas para cada tempo (24 h, 48 h, 72 h e 96 h) como uma medida de células sobreviventes. Primeiramente, foi encontrada a % OD das células não tratadas (controle) para cada tempo, por exemplo, para a placa 24 h: $(\text{OD das células não tratadas 24 h} / \text{OD das células 0 h}) \times 100$, sendo a OD_{0h} referente ao tempo que o tratamento é iniciado. Em seguida, com os dados da % OD das células não tratadas foram encontradas as referentes às células tratadas. Portanto, para a placa de 24 h, por exemplo, a $\% \text{OD}_{24\text{h}} = (\text{OD das células tratadas 24 h} / \text{OD das células não tratados 24 h}) \times 100$. Com isso, os valores de células sobreviventes foram plotados em relação às concentrações utilizadas do tratamento.

Para a análise dos dados experimentais obtidos do teste SRB, foi realizado teste estatístico de comparação por análise de variância de uma via (One-way ANOVA) através do Teste de Tukey. O programa utilizado foi o Origin 8.0 (MicrocalTM Software, Inc., USA).

III.6. Instrumentação

Os **difratogramas de raios X** no pó (DRX) das amostras foram obtidos no difratômetro Rigaku, modelo Miniflex, utilizando raios X gerados por um ânodo de Cu (K_{α}), operando em 30 kV de tensão e 15 mA de corrente, e filtro de Ni. Utilizou-se uma faixa de varredura (2θ) de 1,5 a 70° , a um passo de $0,03^{\circ}$ a cada segundo.

Os dados de **análise térmica** foram obtidos em aparelho TGA-DSC modelo 490 PC Luxx, da Netzsch, acoplado a um espectrômetro de massa QMS 403C Aeolos, utilizando cadinho de Al_2O_3 . As condições utilizadas para as medidas foram as seguintes: ar sintético (marca Oxigás, 99,5 % pureza) como gás de purga a uma vazão de 50 mL min^{-1} ; velocidade de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a partir da temperatura ambiente até $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$; N_2 (marca Oxigás, 99,5 % pureza) como gás de proteção para a balança TGA-DSC a uma vazão de 20 mL min^{-1} .

Os **espectros vibracionais na região do infravermelho** (IV) foram registrados em um aparelho FTIR-Bomem, modelo-MB série 102. Os espectros foram obtidos na região entre $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 4 cm^{-1} , empregando-se os sólidos dispersos em KBr no acessório de reflectância difusa.

Os **espectros Raman** foram registrados em um espectrômetro FT-Raman Bruker modelo FRS100/S, do Laboratório de Espectroscopia Molecular (IQ-USP), utilizando a linha em 1064 nm de um laser Nd:YAG (Coherent COMPASS 1064-500N) com divisor de feixe de quartzo e detector de Ge refrigerado com nitrogênio líquido.

As **análises elementares (CHN)** foram realizadas em equipamento Perkin-Elmer modelo 2400 da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As análises de metais determinadas por **Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-AES)** foram efetuadas em um equipamento Spectro Ciros CCD da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As **micrografias eletrônicas de varredura** (MEV) para análise da morfologia de partículas foram realizadas na Central Analítica do IQ-USP, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FE-SEM) JEOL modelo JSM-7000F. As amostras foram preparadas depositando o pó em uma fita de cobre dupla face aderida ao porta amostra de alumínio.

Os espectros de **Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido** RMN ^{13}C ($I = 1/2$) foram obtidos no espectrômetro Bruker 300 (75,47 MHz) pelo Dr. Fabrice Leroux do Laboratório de Materiais Inorgânicos na Universidade Blaise Pascal, em Clermont-Ferrand, França, utilizando-se da Rotação no Ângulo Mágico (MAS- Magic Angle Spinning) a 10 kHz em um rotor de zircônia com 4 mm de diâmetro. O espectro de ^{13}C obtido através do método da ^1H Polarização Cruzada (CP, *proton enhanced Cross-Polarization Method*, tempo de contato de 1 ms, tempo de reciclagem de 5 s) está relacionado à carbonila da glicina calibrada a 176,03 ppm. Para a obtenção de sinal apropriado para a Pravastatina Sódica e os HDL-Prav foram necessárias 2.000 e 10.000 acumulações, respectivamente.

Para pesagem de reagentes e amostras, utilizou-se a balança Analítica Digital Shimadzu AY-220. As medidas de pH foram feitas empregando-se o pHmetro Digimed- DM 20. A água desionizada utilizada nas sínteses foi obtida em um desionizador Elga Purelab Máxima.

Os equipamentos utilizados no tratamento pós-síntese retratados no item **III.2.3** foram o (i) Reator de Micro-ondas marca CEM (modelo Discover) com 50 W de potência e (ii) o Reator Hidrotérmico marca Parr (modelo 4560).

Os equipamentos que possibilitaram o desenvolvimento do projeto no *Delivery and Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory* estão listados a seguir:

1. Equipamentos utilizados na preparação das amostras para medidas de tamanho de partícula e potencial Zeta: (i) Balança Analítica, Model XL 60 da Fisher Scientific; (ii) Digital Vortex Mixer da Fisher Scientific; (iii) Sonicador, Model 08895-16, 40 kHz, da Cole-Parmer; (iv) ZetaSizer NanoZs com um autotitulado acoplado MPT-2 da Malvern Instruments, Worcestershire, UK, para medir distribuição de tamanho e carga superficial das partículas; (v) Homogeneizador, Model LV1 Series, Microfluidizer Processor da Microfluidics e (vi) Homogeneizador NanoDeBEE 45 da BEE International.

2. Equipamentos utilizados para os ensaios biológicos: (i) Fluxo laminar: classe 2, Tipo A2 da Labconco; (ii) Incubator da Symphony UWR; (iii) Bath, IsoTemp 220 da Fisher Scientific; (iv) Countess, Automated Cell Counter da Invitrogen; (v) Absorbance Microplate Reader 190 da SpectraMax para teste biológico.

Os equipamentos Microfluidizer Processor e NanoDeBEE são utilizados para desagregar partículas através do uso de uma câmara a alta pressão. Ambos apresentam o mesmo mecanismo de processamento, diferenciando-se na quantidade de amostra e na faixa de pressão de operação. O Microfluidizer Processor utiliza pequenas quantidades de amostra, variando de 1 a 6 mL, a uma pressão entre 2 a 40×10^3 psi, enquanto o NanoDeBEE utiliza amostras a partir de 20 mL a uma pressão variando entre 2 a 45×10^3 . A amostra é introduzida no sistema através do reservatório de entrada e é direcionado por uma bomba de alta pressão para a câmara de interação, que apresenta orifícios (esse processo pode ser feito mais de uma vez, chamado passagem) de modo a permitir a coleta de partículas uniformes e de tamanho reduzido de acordo com o esquema representado na Figura 6.

Figura 6. Esquema geral do funcionamento dos equipamentos Microfluidizer Processor e NanoDeBEE.

III.7. Métodos Computacionais

O mapa de densidade eletrônica do HDL-Prav foi calculado pela Dra. Christine Taviot-Gueho da Universidade Blaise Pascal, Clermont-Ferrant, França, de acordo com a literatura¹⁸⁴.

Os cálculos computacionais de estrutura eletrônica, geometria, espectros vibracionais (IV e Raman) e ^{13}C RMN do estado sólido da Pravastatina Sódica, assim como a geometria dos Ácidos Coumárico e Lipóico foram feitos no grupo da Profa. Helena M. Petrilli (Departamento de Física de Materiais e Mecânica, IF-USP) pelo doutorando Ms. Philippe Petersen. A Teoria do Funcional da Densidade (DFT- *Density functional Theory*) foi utilizada com o funcional de troca e correlação B3LYP, conforme implementado no programa Gaussian03.^{185,186} No caso da Pravastatina Sódica foi utilizada a base 6-31G**, enquanto para os Ácidos Coumárico e Lipóico, a base 6311++G(d,p).

A geometria otimizada da Pravastatina foi calculada considerando os dados de difração de raios X de monocristal do sal de tert-octilamônio da pravastatina reportado por Sato e Furukawa.¹⁸⁷ Os valores isotrópicos (¹³C RMN) do deslocamento químico da Pravastatina Sódica no vácuo foram obtidos usando como referência o tetrametilsilano (TMS- *TetraMethylSilane*). O valor de 0,9614 foi utilizado como um fator de escala para frequências vibracionais harmônicas para comparação dos resultados teóricos de espectroscopia Raman obtidos com a base 6-31G**.¹⁸⁸⁻¹⁹¹

A energia mínima dos Ácidos Coumárico e Lipóico foi obtida com a otimização da estrutura no programa Gaussian03 e o volume das estruturas otimizadas foi calculado no programa Discovery Studio 2.0.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. Sistemas contendo a Pravastatina nos HDLs

IV.1.1. Caracterização de HDLs-Mg₂Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Prav/Al³⁺

O difratograma de raios X do sal de sódio da pravastatina mostra os picos em $2\theta = 3,60$ (24,5 Å), 6,42 (13,7 Å), 9,78 (9,03 Å) e 17,1 (5,18 Å) característicos do polimorfo D.¹⁹² Os padrões de difração de raios X para os materiais Mg₂Al_xPrav (x= 1, 2 e 3), exibidos na Figura 7, apresentam perfis semelhantes ao encontrado para a matriz Mg₂Al-Cl na região acima de $2\theta = 30^\circ$, ou seja, visualiza-se a presença das reflexões referentes aos planos (012), (110) e (113) típicas da formação de HDL.^{10,11} Na região de baixo ângulo, nota-se um maior deslocamento dos picos para menores ângulos em relação ao Mg₂Al-Cl, significando aumento de espaçamento basal, ou seja, a intercalação do fármaco.

O perfil do difratograma da amostra Mg₂Al₁Prav sugere uma estrutura mais organizada em relação ao empilhamento das lamelas se comparado aos outros materiais (Mg₂Al₂Prav e Mg₂Al₃Prav), visto a presença bem definida dos picos harmônicos (003, 006, 009, 0012 e 0015) referentes ao empilhamento das lamelas na direção do eixo cristalográfico c (picos 00ℓ) com ordens de difração $n = 3, 6, 9, 12$ e 15.

As análises químicas dos materiais mostram que a utilização de diferentes razões molares íons pravastatina/Al³⁺ nas sínteses dos HDLs/Pravastatina não favoreceram o aumento no conteúdo de espécie orgânica no material. As quantidades em gramas de íons pravastatina/100 g de material são: Mg₂Al₁Prav (32,4 g), Mg₂Al₂Prav (31,4 g) e Mg₂Al₃Prav (32,3 g).

Figura 7. Difratomogramas de raios X da Pravastatina Sódica e dos materiais Mg₂AlPrav.

Os índices de Miller (hkl) e as respectivas distâncias interplanares (d_{hkl}) relativos aos espaçamentos basais se encontram na **Tabela 5**.

Tabela 5: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54$ Å) dos materiais Mg₂Al_xPrav (x= 1, 2 e 3), obtidos dos dados de difratometria de raios X.

Mg ₂ Al ₁ Prav		Mg ₂ Al ₂ Prav		Mg ₂ Al ₃ Prav		hkl
2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	
2,82	31,3	2,76	31,9	2,88	30,6	(003)
5,61	15,7	5,58	15,8	5,64	15,7	(006)
8,40	10,5	8,52	10,4	8,70	10,2	(009)
11,3	7,82	11,4	7,75	11,5	7,67	(0012)
14,0	6,30	-	-	-	-	(0015)

O espaçamento basal igual a aproximadamente 31 Å (003) obtido para os materiais HDL-Prav é maior do que o observado por Panda et al.⁹³ para a amostra Mg₂AlPrav (15,5 Å).

Considerando as distâncias interlamelares e que a Pravastatina possui aproximadamente as dimensões 10,0 x 10,0 x 7,0 Å (segundo cálculos de DFT, item III.7.), Figura 8a, pode-se propor um arranjo de bicamada do íon derivado da molécula orgânica no espaço interlamelar, onde os grupos carboxilato e hidroxila encontram-se próximos às camadas positivas (Figura 8b), ao invés da monocamada proposta anteriormente por Panda et al.

Figura 8. (a) Visualização estrutural da Pravastatina Sódica obtida por cálculos de DFT descrito no item III.3. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions da Pravastatina na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H), vermelho (O) e roxo (Na).

A fim de investigar as interações existentes entre os íons orgânicos na região interlamelar com a matriz foi feita uma análise aprofundada dos valores dos deslocamentos químicos atribuídos para a Pravastatina Sódica experimental e calculado (DFT) e do material Mg₂Al1Prav

através dos espectros de ^{13}C RMN no estado sólido (**Tabela 6** e Figura 9). Nota-se uma boa concordância entre os valores experimentais e calculados para o sal NaPrav. O espectro de ^{13}C RMN da amostra $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_2(\text{Prav})_2$ mostrou similaridade à Pravastatina Sódica, o que indica que o ânion não sofreu nenhum tipo de fragmentação estrutural na obtenção dos materiais lamelares. Observa-se, por exemplo, que a pravastatina possui uma ligação éster que poderia ser hidrolisada na presença de base. Então, foram visualizados os picos referente ao grupo CH_3 - (**1a**, **5n**, **4a**) de 10 a 20 ppm, ao grupo metileno CH_2 - (**7c**, **2a**, **6c**, **11n**, **2c**, **4c**) de 20 a 50 ppm, sendo que os carbonos **2c** e **4c** sofreram deslocamento devido à presença do grupo carboxilato e hidroxila, respectivamente, que estão interagindo com as lamelas positivas do material híbrido.

Os grupos CH - do anel hexahidronaftil (**2n**, **3n**, **4n**) e **3a** estão mais blindados (31-40 ppm) que os CH - ligados diretamente ao grupo hidroxila (**10n**, **3c**, **5c**) ou ao éster **1n**, 60 a 80 ppm. Além disso, nota-se que os CH - do grupo vinil (**6n**, **7n**, **8n**, **9n**) são deslocados para campo baixo (picos à esquerda).

As modificações ocorridas nas regiões de 60–70 ppm e 130–140 ppm estão relacionados ao empacotamento ou arranjo dos íons da pravastatina na região interlamelar. Por isso, foi possível observar que as interações ocorrem principalmente entre os carbonos **10n** através de ligações de hidrogênio com a vizinhança (interação intermolecular estabelecida entre as espécies orgânicas), assim como entre os carbonos **1c** e **3c**, voltados para as lamelas em virtude da interação eletroestática e íon-dipolo, respectivamente, formando um arranjo do tipo cabeça-cauda.

Tabela 6: Deslocamento Químico de ^{13}C RMN no estado sólido da Pravastatina Sódica e do $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6$.

Átomo Carbono ^{a)}	Pravastatina Sódica Calculado ^{b)}	Pravastatina Sódica Experimental ^{c)}	$\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6$ Experimental	Ref. [193] ^{d)}
1 ^a	9,70	12,5 (sh)	12,5 (sh)	11,70
2 ^a	30,6	25,8 / 27,0	26,4	26,62
3 ^a	41,40	41 (sh)	40,9	41,61
4 ^a	16,32	19,0	19,3	16,74
5 ^a	168,73	176,9 / 179	177,4	176,39
1n	71,94	69,46	69,48	69,20
2n	40,36	37,5	37,8	37,69
3n	38,81	36,5 (sh), 37,5	37,8	36,67
4n	35,73	31,4	31,6	31,00
5n	15,03	13,6	13,7	13,56
6n	132,13	134,4	135	135,74
7n	124,89	128,2	128	127,43
8n	132,86	134,4	137,1	135,24
9n	124,49	128,2	128	126,18
10n	66,49	63,8	64,6	64,99
11n	38,80	36,5 (sh), 37,5	37,8	36,71
1c	178,88	180,3 / 182,8	180,2	e)
2c	43,42	46,5	44,9	e)
3c	72,28	71,6 (sh)	71	62,63
4c	44,50	46,5	44,9	e)
5c	73,38	73,6		76,05
6c	37,00	34	34,5	32,79
7c	27,20	23,6 (sh)	24 (sh)	23,77

^{a)} Ver a legenda para os carbonos na Figura 8; ^{b)} Valores em ppm obtidos com o funcional/base B3LYP/631G**;

^{c)} Polimorfo D; ^{d)} Espectro em solução de clorofórmio deuterado (CDCl_3) da pravastatina na forma de lactona; ^{e)} lactona.

Figura 9. Espectros ^{13}C RMN no estado sólido da Pravastatina Sódica (linha vermelha), $\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Prav}$ (linha azul) e deslocamentos químicos calculado para a Pravastatina Sódica (traço vermelho).

O espectro vibracional no IV do $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ (Figura 10) apresenta as bandas largas na região de 3550 cm^{-1} , comum a todos os HDLs, referentes ao estiramento O-H das moléculas de água extrínseca (adsorvidas na lamela), intrínseca (interlamelares) e também dos grupos hidroxila das lamelas. A banda de absorção na região de 1631 cm^{-1} é atribuída à deformação angular das moléculas de água. A banda larga na região de 652 e em $430\text{-}465\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à deformação metal-oxigênio das lamelas do HDL.^{10,194,195,212}

De modo a facilitar a discussão dos espectros vibracionais dos materiais híbridos de HDL-Prav, na **Tabela 7** estão representadas algumas bandas típicas da estrutura da Pravastatina Sódica (os carbonos estão nomeados de acordo a Figura 9), que foram sensíveis ao processo de intercalação. Além disso, pôde-se observar que a imobilização da molécula na região interlamelar não afetou a estrutura da pravastatina.

Os espectros vibracionais no IV e Raman da NaPrav e dos HDL-Prav estão representados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Nota-se uma boa concordância entre os valores experimentais e calculados por DFT para a Pravastatina Sódica.

Tabela 7: Número de onda (cm^{-1}) e possíveis atribuições relativos aos espectros vibracionais no IV e Raman da Pravastatina Sódica e dos materiais de HDL-Prav.^{124,196,197}

Pravastatina Sódica (cm ⁻¹)			HDL-Prav (cm ⁻¹)		
Calculado ^{a)}	Experimental ^{b)}		Experimental		
	IV	Raman	IV	Raman	Atribuições ^{c)}
3047, 3042, 3025		3027		3023	^{d)} v _{s,as} CH (olefina)
3024-2957	2964		2959		v _{as} CH (alcano)
1730	1726 (vs)		1730		v C=O (ester)
1563	1574 (vs)		1560-1554 (vs)		v _{as} COO ⁻ , δ COH (1c,3c)
1391	1400 (vs)	1399	1400	1399	v _s COO ⁻ , δ =CH (6n,7n)
1200		1210		1206	δ CH (10n), δ =CH (olefina), δ COH (10n)
960		965		975, 963	δ CH ₂ (heptanoato), δoop =CH (6n,7n)

^{a)} Valores em cm^{-1} obtido pelo funcional/base BLYP/6-31G*; ^{b)} Polimorfo D; ^{c)} Grupos principais envolvidos na vibração; ^{d)} ν_s = symmetric stretching, ν_{as} = antisymmetric stretching, δ = bending, oop = out-of-plane, vs = very strong.

Figura 10. Espectros vibracionais calculado e experimental na região do infravermelho dos materiais Mg_2AlCl , Mg_2AlPrav e da Pravastatina Sódica.

Figura 11. (a) Espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e Mg_2AlCO_3 . (b) Espectros Raman calculado e experimental dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e Pravastatina Sódica.

Comparando os espectros vibracionais na região do IV (Figura 10) da NaPrav e dos HDLs-Prav, pode-se observar o deslocamento da banda referente aos modos ν_{as} COO⁻ e δ COH (**1c**, **3c**), de 1574 para 1560 cm⁻¹ ($\Delta \approx 14$ cm⁻¹), respectivamente, **Tabela 7**. Esse deslocamento sugere que a interação entre as lamelas e a pravastatina ocorre através do grupo carboxilato e também da hidroxila (**3c**). O enfraquecimento da ligação COO⁻ da espécie intercalada indica que a interação eletroestática do ânion da pravastatina com as lamelas positivas do HDL é mais forte que com o cátion Na⁺. Da mesma forma, o deslocamento das bandas atribuídas aos modos δ CH (**10n**), δ =CH (olefina) e δ COH (**10n**) na pravastatina intercalada, sugere que as interações de van der Waals, assim como a ligação de hidrogênio, são maximizadas entre as espécies orgânicas na região interlamelar. Além disso, outra banda que sofreu deslocamento após o processo de intercalação da pravastatina está relacionada aos modos δ CH₂ (heptanoato) e δ_{oop} =CH (**6n**, **7n**) em 965 cm⁻¹, que foi desdobrada em duas bandas (975 e 963 cm⁻¹) nos materiais híbridos.

A banda em 1399 cm⁻¹ visualizada nos espectros Raman (Figura 11) dos materiais Mg₂AlxPrav está relacionada ao ν_s COO⁻ da pravastatina e não ao íon CO₃²⁻, uma vez que a intensidade da banda referente ao estiramento ν_3 do ânion carbonato é extremamente baixa no espectro Raman.⁶⁵ Para facilitar o entendimento desse argumento, foi feita uma comparação entre um dos materiais (Mg₂Al1Prav) e a matriz de carbonato Mg₂AlCO₃ (Figura 11a). O modo referente ao estiramento simétrico do carbonato é permitido no espectro Raman e a banda ocorre em 1061 cm⁻¹. Como não é possível visualizar uma banda com intensidade apreciável para as amostras mostradas na Figura 11, pode-se concluir que, se há ânions carbonato no material, a quantidade deve ser muito pequena. Porém, é visualizada a banda em 540-560 cm⁻¹ nos espectros Raman dos HDLs-Prav que apresenta contribuição dos modos vibracionais referentes à deformação metal-oxigênio nas lamelas e δ CH e δ CH₂ (heptanoato).¹⁹⁵

As curvas TGA e DSC registradas para o sal da Pravastatina Sódica (Figura 12a) apresentam cinco eventos térmicos. O evento 1 ocorre entre 25 e 110 °C e está relacionado à desidratação com perda de 1,5 % (m/m) de água. O evento 2 está relacionado à fusão do sal (processo endotérmico, Figura 12a) e ocorre em aproximadamente 173 °C, valor concordante ao reportado na literatura para o polimorfo D.¹⁴² As etapas seguintes estão relacionadas à perda de massa, e as faixas de temperatura (Figura 12b) pertinentes a cada evento são: 175 a 290 °C (evento 3), 300 a 517 °C (evento 4) e 517 a 629 °C (evento 5).¹⁴²

As curvas DTG-MS para a Pravastatina Sódica (Figura 12b) corroboram que, nos intervalos de temperatura dos eventos 3, 4 e 5 relatados acima, a amostra perde água e gás carbônico e correspondem a 32, 43 e 11 % de perda de massa, respectivamente.

Figura 12. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) da Pravastatina Sódica.

Os resultados de análise térmica dos materiais Mg_2Al_xPrav representados nas Figuras 13 e 14 revelam que a estabilidade térmica da espécie convidada é igual ou um pouco maior que a do orgânico não intercalado. Primeiramente, os materiais sofrem desidratação (*ca.* 8 %) na faixa de temperatura entre 25 a 160 °C. Em seguida, ocorrem duas etapas de perda de massa acima de 175 °C. Na faixa entre 177 e 460 °C ocorre simultaneamente a parcial decomposição das lamelas dos HDLs e da espécie orgânica e corresponde a *ca.* 44 % para o Mg_2Al_1Prav , *ca.* 47 % para o Mg_2Al_2Prav e *ca.* 51 % para o Mg_2Al_3Prav . A perda de massa entre 460 e 650 °C envolve a completa combustão e a desidroxilação das lamelas do hospedeiro e corresponde a *ca.* 20 % para o Mg_2Al_1Prav , *ca.* 15 % para o Mg_2Al_2Prav e *ca.* 13 % para o Mg_2Al_3Prav . O resíduo obtido a 1000 °C corresponde a 27 % da massa inicial para todos os materiais. Dessa forma, pode-se inferir com os dados das curvas TGA que as amostras apresentam perfis térmicos semelhantes.

Figura 13. Curvas TGA (-) e DSC (--) dos materiais Mg_2Al_xPrav .

Figura 14. Curvas DTG (--) e MS (-) dos materiais Mg_2Al_xPrav .

IV.1.2. Caracterização de HDLs- Mg_2Al submetidos a tratamento pós-síntese

A seguir, será analisado o efeito do tratamento pós-síntese nos HDLs-Prav quanto à cristalinidade do material obtido.^{198,199} As legendas das figuras abreviadas por $Mg_2Al1Prav.x$, correspondem respectivamente a x = Refluxo (Refl), Reator de Micro-ondas (Micro) ou Reator Hidrotérmico (Hidro).

Os difratogramas de raios X mostrados na Figura 15 indicam a presença de material lamelar juntamente com picos deslocados para regiões de baixos valores de 2θ , significando aumento de espaçamento basal em relação ao empilhamento das lamelas. Assim como para o $Mg_2Al1Prav$ retratado no item IV.2.1., essas amostras apresentam os picos harmônicos (003, 006, 009, 0012 e 0015) referente ao empilhamento das lamelas no eixo cristalográfico c (picos 00ℓ) com ordens de difração $n = 3, 6, 9, 12$ e 15 .

Figura 15. Difratogramas de raios X dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$.

Através da avaliação do valor médio da largura dos picos basais 003 e 006 na meia altura ($h/2$), pode-se inferir que a cristalinidade das amostras sofre variação da seguinte maneira:

$$\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Refl} (8,43 \text{ \AA}) < \text{Mg}_2\text{Al1Prav} (6,79 \text{ \AA}) < \text{Mg}_2\text{Al1Prav.Hidro} (5,57 \text{ \AA}) \sim \text{Mg}_2\text{Al1Prav.Micro} (5,39 \text{ \AA}).$$

Nota-se que os materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Hidro}$ e $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Micro}$ apresentam grau de organização próximo quanto ao empilhamento das lamelas. O comportamento observado no tratamento com os Reatores de Micro-ondas e Hidrotérmico podem estar relacionados à maior eficiência no mecanismo de dissolução/ recristalização (Amadurecimento de Ostwald) dos HDLs. No Reator de Micro-ondas, o solvente (água) receptivo às frequências das micro-ondas pode

influenciar de modo a facilitar a dissolução dos sólidos, comparado a processos de aquecimento térmicos convencionais.²⁰⁰

As análises químicas dos materiais que foram obtidos pela utilização de diferentes tratamentos pós-síntese nos $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.X}$ com razão molar pravastatina/ $\text{Al}^{3+} = 1$ praticamente não afetaram na quantidade de espécie orgânica presente nos HDLs. As quantidades em gramas de íons pravastatina por 100 g de material são: $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ (32,4 g), $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Refl}$ (31,9 g), $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Hidro}$ (32,6 g) e $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Micro}$ (31,4 g).

Os índices de Miller (hkl) e as respectivas distâncias interplanares (d_{hkl}) relativos ao espaçamento basal das amostras $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.X}$ se encontram na **Tabela 8**.

Tabela 8: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.

$\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Micro}$		$\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Hidro}$		$\text{Mg}_2\text{Al1Prav.Refl}$		
2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	hkl
2,70	32,7	2,79	31,6	2,73	32,3	(003)
5,61	15,7	5,67	15,6	5,58	15,8	(006)
8,58	10,3	8,61	10,3	8,58	10,3	(009)
11,5	7,82	11,3	7,86	11,3	7,86	(0012)
14,4	6,14	14,3	6,17	14,1	6,26	(0015)

Os valores das distâncias interplanares (d_{hkl}) dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$ (**Tabela 8**) comprovam a semelhança estrutural se comparados à amostra $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ que não sofreu nenhum tratamento térmico após a síntese (**Tabela 3**).

Os espectros vibracionais na região do infravermelho e Raman dos materiais híbridos $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$ estão representados nas Figuras 16 e 17. As amostras submetidas a tratamento pós-síntese apresentam o mesmo perfil vibracional que o $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$. Dessa maneira, a atribuição das bandas é a mesma já mencionada para as amostras que não sofreram tratamento térmico pós-síntese (**Tabela 7**).

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que os tratamentos pós-síntese não conduziram a um aumento significativo da cristalinidade das amostras ou no grau de intercalação. Por outro lado, o tratamento térmico não provocou a degradação da pravastatina intercalada.

Figura 16. Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais Mg₂Al1Prav.x.

Figura 17. Espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras contendo os ânions da pravastatina inseridos nos HDLs (preparadas com diferentes razões molares do ânion/ Al^{3+} e submetidas ao tratamento térmico pós-síntese) estão ilustradas na Figura 18. A morfologia desses materiais revela a presença de placas relacionadas à formação da estrutura lamelar (Figura 18g). Nota-se que mesmo em diferentes condições de síntese, as imagens são razoavelmente semelhantes, ou seja, a utilização de diferentes proporções molares ânion/ Al^{3+} , assim como os tratamentos térmicos, não modificam a morfologia dos materiais.

Figura 18. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras (a) Mg_2Al_1Prav , (b) Mg_2Al_2Prav , (c) Mg_2Al_3Prav , (d) $Mg_2Al_1Prav.Micro$, (e) $Mg_2Al_1Prav.Hidro$ e (f) $Mg_2Al_1Prav.Refl$ (ampliação: 5000 vezes) e (g) $HDLCO_3$ (ampliação: 10000 vezes).

Os resultados de análise térmica dos materiais $Mg_2Al_1Prav.x$ apresentam um comportamento de decomposição frente ao aquecimento similar ao material Mg_2Al_1Prav (item IV.3.1., Figuras 13 e 14). Observou-se que a utilização dos diferentes tratamentos pós-síntese não interferiu no perfil térmico dos materiais de HDL-Prav, uma vez que as faixas de decomposição

assim como as variações nas massas mantiveram os mesmos valores quando comparados ao material sem tratamento ($\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$).

IV.1.3. Caracterização de HDLs-Prav: Mg_2Al e Zn_2Al

Os dados reportados abaixo mostram os resultados de caracterização dos materiais de HDL-Prav (Mg_2Al e Zn_2Al) obtidos através da utilização de diferente composição lamelar: Mg/Al e Zn/Al . Os difratogramas de raios X do $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$ representados na Figura 19 indicam a formação de material lamelar uma vez que a região acima de $2\theta = 30^\circ$ apresenta um perfil similar ao da matriz Mg_2AlCl . Nota-se a presença das reflexões (012) e (110) típicas da estrutura lamelar do mineral brucita.²⁶ Além disso, ambos HDL-Prav apresentam os picos harmônicos (00 ℓ), listados na **Tabela 9**, na região de baixo ângulo (2θ), relacionados à intercalação da espécie convidada (pravastatina) nos HDLs.

Tabela 9: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.

$\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$		$\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$		
2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	hkl
2,82	31,3	2,88	30,6	(003)
5,61	15,7	5,64	15,7	(006)
8,40	10,5	8,46	10,4	(009)
11,3	7,82	11,2	7,90	(0012)
14,0	6,30	14,2	6,22	(0015)

Figura 19. Difratomogramas de raios X dos materiais Mg_2AlCl , $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$.

A relativa cristalinidade do material $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$ (Figura 19) possibilitou o refinamento dos dados de DRX através da utilização do software FULLPROF SUITE-2000. As intensidades das reflexões de Bragg obtidas através do difratograma de raios X da amostra foram utilizadas no cálculo da densidade eletrônica em 1D projetada ao longo do eixo de empilhamento lamelar c , como pode ser visualizado na Figura 20. A utilização do mapeamento 1D vem sendo explorado como uma ferramenta auxiliar para propor um arranjo estrutural para a espécie intercalada na região interlamelar.^{201,202,203}

Figure 20. Representação esquemática do arranjo interlamelar da pravastatina no $\text{Zn}_2\text{Al}_1\text{Prav}$: (a) Densidade eletrônica (1D) projetada ao longo do eixo de empilhamento- c ; (b) Mapa de Patterson do plano (x_0z) de 0 a 1 ao longo do eixo b .

Os dados de análises químicas do material $\text{Zn}_2\text{Al}_1\text{Prav}$ mostra um aumento significativo na quantidade de orgânico intercalado quando comparado ao material $\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Prav}$. A diferença na densidade de carga lamelar entre os materiais $\text{Zn}/\text{Al} = 1,98$ e $\text{Mg}/\text{Al} = 2,0$ favoreceu a imobilização da pravastatina nos HDLs. As quantidades em gramas de íons pravastatina/100 g de material são: $\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Prav}$ (32,4 g) e $\text{Zn}_2\text{Al}_1\text{Prav}$ (52,7 g).

A disposição dos ânions da pravastatina na região interlamelar deduzida no mapeamento 1D é similar ao sal tert-octilamônio da pravastatina determinado através da difração de raios X de monocristal (Figura 21).¹⁸⁷ Portanto, as moléculas mantêm-se unidas maximizando as interações

intermoleculares através das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila (**10n**) na pravastatina. As cadeias de hidrocarboneto que contém os grupos carboxilato e dois grupos hidroxila (grupo heptanoato) interagem entre si por ligação de hidrogênio e o grupo butirato interage com a vizinhança através das forças de van der Waals.

Figura 21. Representação de quatro células unitárias do sal de tert-octilamônio da Pravastatina; cristal monoclínico, $a = 16,850(3) \text{ \AA}$, $b = 5,801(1) \text{ \AA}$, $c = 17,290(3) \text{ \AA}$, $\beta = 108,04(1)^\circ$. Os átomos de hidrogênio foram omitidos (ref. 186, Sato et al).

As Figuras 22 e 23 mostram os espectros no IV e Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$, respectivamente, assim como da Pravastatina Sódica. Nota-se uma elevada similaridade dos espectros vibracionais dos dois materiais de HDL-Prav (Mg/Al e Zn/Al). A utilização de diferente composição lamelar nas matrizes de HDLs não comprometeu a integridade estrutural da espécie orgânica sendo visualizadas as bandas características da molécula como reportadas anteriormente no item IV.1.1 (**Tabela 8**).

Figura 22. Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais Mg_2AlCl , $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$, $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$ e da Pravastatina Sódica.

Figura 23. Espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$, $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$ e da Pravastatina Sódica.

Os resultados das análises térmicas dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ (item IV.1.1.) e $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$, Figura 24, revelam que a estabilidade térmica da espécie convidada é um pouco favorecida ou igual a da Pravastatina Sódica. Seguindo a discussão do item IV.3.1., o primeiro evento relacionado à desidratação (Figura 24b) na faixa de temperatura entre 25 a 160 °C corresponde a 8 % para o $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e 7 % para o $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$. Os dois eventos seguintes de perda de massa que ocorrem entre 177 - 460 °C e 460 - 650 °C correspondem a 44 % (ambos os materiais) e 16 % para o $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$, respectivamente. Os resíduos coletados a 1000 °C são 27 % e 32 % para o $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ e o $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$ da massa inicial dos materiais. Portanto, a análise térmica possibilitou inferir que a utilização de uma diferente composição lamelar ($\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$) não interferiu no comportamento térmico de decomposição da pravastatina intercalada.

Figura 24. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do material $\text{Zn}_2\text{Al1Prav}$.

A seguir, na **Tabela 10**, serão mostradas as fórmulas propostas para os materiais HDL-Prav, considerando-se os dados obtidos de análise elementar de CHN e de metais e a porcentagem de H_2O (obtida das curvas TGA). Para todas as amostras, considerou-se que a quantidade de carga das lamelas não balanceada pelos íons derivados da pravastatina é neutralizada pelos íons cloreto, uma vez que a banda de carbonato nos espectros Raman é praticamente inexistente.

Além disso, foi realizado um teste para visualizar a presença dos íons carbonato e cloreto nos HDLs-Prav. Para tanto, cerca de 3 mg de material foi dissolvido em HNO_3 0,1 mol/L. A constatação da presença de íons carbonato se deve à liberação dos gases visualizados após poucos segundos de agitação, devido à formação do ácido carbônico (H_2CO_3) que em meio ácido se decompõe em $\text{H}_2\text{O}(\text{l})$ e $\text{CO}_2(\text{g})$. Porém, para certificar-se da presença de íons cloreto, após dissolução do HDL adiciona-se à solução o sólido nitrato de prata; para a formação do precipitado branco de AgCl (cloreto de prata). Através dos resultados, pode-se concluir que o material contém apenas íons cloreto (provavelmente cointercalados na região interlamelar).

Tabela 10: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Prav.

Amostra	Fórmula Proposta	M ^{II} /Al ^{a)}	%C	%H ₂ O
Mg ₂ Al1Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·2,1H ₂ O	2,00 (1,99) ^{b)}	34,6 (34,8)	7,8 (8,0)
Mg ₂ Al2Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·2,0H ₂ O	2,00 (2,05)	34,4 (34,4)	7,5 (7,5)
Mg ₂ Al3Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·1,9H ₂ O	2,00 (2,24)	34,6 (34,7)	7,1 (7,0)
Mg ₂ Al1Prav.Micro	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·2,4H ₂ O	2,00 (2,02)	33,9 (34,1)	8,8 (9,0)
Mg ₂ Al1Prav.Hidro	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·1,9H ₂ O	2,00 (2,02)	34,9 (34,9)	7,1 (7,0)
Mg ₂ Al1Prav.Refl	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·2,5H ₂ O	2,00 (2,00)	34,1 (34,1)	9,1 (9,0)
Zn ₂ Al1Prav	[Zn _{1,98} Al _{1,03} (OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,78} Cl _{0,25} ·1,6H ₂ O	1,92 (1,90)	34,4 (34,4)	4,6 (4,7)

a) razão em mol

b) valor experimental

A **Tabela 11** mostra a quantidade do ânion derivado da pravastatina presente em 100 g de amostra isolada, calculada através dos dados das análises elementares, utilizando a fórmula proposta para cada material.

Tabela 11: Concentração dos ânions da Pravastatina em 100 g de material.

Abreviação	Fórmula Proposta	g ânion /100 g de material
Mg ₂ Al1Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·2,1H ₂ O	32,4
Mg ₂ Al2Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·2,0H ₂ O	31,7
Mg ₂ Al3Prav	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·1,9H ₂ O	31,9
Mg ₂ Al1Prav.Micro	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,60} Cl _{0,40} ·2,4H ₂ O	31,4
Mg ₂ Al1Prav.Hidro	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·1,9H ₂ O	32,6
Mg ₂ Al1Prav.Refl	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,61} Cl _{0,39} ·2,5H ₂ O	31,9
Zn ₂ Al1Prav	[Zn _{1,98} Al _{1,03} (OH) ₆](C ₂₃ H ₃₅ O ₇) _{0,78} Cl _{0,25} ·1,6H ₂ O	52,7

Os resultados relatados na **Tabela 11** demonstram que tanto a utilização de excesso do ânion da Pravastatina em relação à quantidade de íons Al³⁺ quanto o tratamento térmico pós-síntese não auxiliaram no aumento da quantidade da espécie convidada no material. Esse comportamento pode ser atribuído ao impedimento estérico resultante da saturação na região interlamelar pelos ânions da pravastatina. Porém, para o Zn₂Al1Prav foi notado um aumento significativo da quantidade da espécie convidada no material.

Considerando a fórmula proposta para o Zn₂Al1Prav, observa-se um aumento na densidade lamelar, devido provavelmente a menor incorporação de íons Zn²⁺ no material sólido levando à razão molar Zn/Al igual a 1,98, diferentemente dos materiais de Mg/Al, onde todos apresentam a razão molar igual ou maior que 2. A diferença na carga da lamela devido a uma maior presença de Al³⁺ no Zn₂AlPrav promoveu a atração dos ânions da pravastatina aumentando a sua quantidade no material.

Através das composições propostas para os materiais de HDL-Prav, nota-se a necessidade da presença de íons cloreto provenientes da síntese (item III. 2.2.) para balancear as cargas das lamelas em relação aos ânions interlamelares (**Tabela 10**). Além disso, observou-se que devido

às dimensões do ânion da pravastatina, sua geometria e a posição dos grupos funcionais não foi possível ocupar o espaço de uma unidade de carga das lamelas. De fato, a área por unidade de carga dos HDL-M₂Al (M = Mg²⁺ or Zn²⁺) é de aproximadamente 25 Å², enquanto a molécula da pravastatina representando um paralelepípedo retangular com as dimensões 10,0 x 10,0 x 7,0 Å apresenta uma área de 100 Å² para a base e 70 Å² para a área lateral.^{204,205} Nessas condições, os ânions da pravastatina são muito grandes e não carregados negativamente o suficiente para neutralizar a área ocupada por carga positiva das lamelas, indicando que há um impedimento estérico responsável pela incompleta intercalação da pravastatina no M₂Al-HDL.

Os íons da pravastatina apresentam estruturas flexíveis e diferentes conformações, como já é bem conhecido na literatura pelo fato de apresentar vários polimorfos, que podem promover um arranjo denso dos íons orgânicos entre as lamelas. Considerando a orientação da molécula deduzida através do mapeamento 1D com uma área por unidade de carga de 70 Å², pode-se propor um arranjo lamelar como mostrado na Figura 25, com a presença de íons cloreto provenientes da síntese (item III.2.2). Nessa representação esquemática, dez cargas positivas dos HDLs levam a uma área de aproximadamente 250 Å². A neutralização dessas dez cargas pode ser alcançada com seis íons pravastatina em uma bicamada cercados por quatro íons cloreto (**Tabela 10**). Dessa forma, nota-se que o conteúdo estimado dos ânions nos HDL-Prav de “0,6 Prav, 0,4 Cl” está consideravelmente de acordo com a análise química.

Figure 25. Representação esquemática da cointercalação dos íons da Pravastatina e cloreto entre as lamelas dos materiais Mg_2Al -HDL.

Os dados de caracterização dos materiais de HDL-Prav apresentados do item IV.3.1 até o item IV.3.3 possibilitaram a organização e consequente publicação de um artigo na revista Chemistry of Materials: Structural, Spectroscopic (NMR, IR, and Raman), and DFT Investigation of the Self-Assembled Nanostructure of Pravastatin-LDH (Layered Double Hydroxides) Systems, 24 (8), pp 1415–1425, 2012.¹²⁴

IV.1.4. Medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta para os materiais Mg_2Al -Cl e Mg_2Al Prav

De modo a atingir o tamanho de partícula na faixa entre 50 e 200 nm (ver a justificativa, no item I.1.) foram empregados diferentes procedimentos para desaglomerar os HDLs de Mg_2Al -Cl e Mg_2Al Prav. Como descrito no item III.4, foram utilizados dois tipos de equipamentos (Microfluidizer e NanoDeBEE) para desaglomerar os HDLs em suspensão aquosa através da aplicação da pressão. Logo, foram feitas várias passagens das amostras pelo equipamento a uma

determinada pressão 10, 20, 30 ($\times 10^3$ psi) para a otimização das condições ideais de processamento. Dentre as amostras preparadas foi possível medir o tamanho de partícula em quintuplicata mantendo o desvio padrão abaixo de 5 (para certificar a confiabilidade do resultado). Assim, a suspensão estoque de concentração 0,05 % (m/v) foi submetida a três passagens a uma pressão igual a 20×10^3 psi no equipamento NanoDeBEE. As Figuras 26 e 27 mostram os resultados de cinco medidas de tamanho para os materiais $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{AlIPrav}$, respectivamente. Os respectivos tamanhos máximos e os Índices de Polidispersibilidade (PdI: Polydispersibility Index) para o $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{AlIPrav}$ são respectivamente: 85,3 nm (PdI: 0,366) e 126,2 nm (PdI: 0,246). Nota-se que a utilização do mesmo procedimento para desaglomeração, o tamanho das partículas de HDLs intercaladas com a molécula orgânica é maior quando comparadas à matriz de cloreto. Essa diferença pode estar relacionada ao aumento no espaçamento entre as lamelas devido à presença da pravastatina levando a formação de partículas maiores.¹⁰⁴ Nota-se que ambos os HDLs apresentam uma restrita distribuição no tamanho, indicando que o método de homogeneização das amostras processadas no equipamento NanoDeBEE foi eficaz para a obtenção de um sistema monomodal.

Figura 26. Distribuição de tamanho de partícula do Mg_2AlCl , em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).

Figura 27. Distribuição do tamanho de partícula do $Mg_2Al1Prav$, em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).

Os valores de potencial Zeta em meio aquoso das suspensões 0,4 % (m/v) de Mg_2Al-Cl e $Mg_2Al1Prav$ acompanhados pelo tempo estão descritos na **Tabela 12**.

Os valores de potencial Zeta da matriz de HDL cloreto encontram-se na faixa esperada entre + 20 mV - + 40 mV.²⁰⁶ O valor positivo do potencial Zeta dos HDLs em meio aquoso em princípio está relacionado à carga positiva da estrutura lamelar assim como à dupla camada elétrica (DL- *Double Layer*) presente ao redor da superfície dos HDLs. Apesar da estrutura interna dos hidróxidos lamelares estarem contrabalanceadas com os ânions presentes na região interlamelar, a carga superficial não está totalmente balanceada pelos ânions adsorvidos devido à existência da dupla camada elétrica, que é composta pelas camadas Stern e difusa.²⁰⁶ A camada Stern é uma camada rígida de carga oposta à superfície da partícula e a difusa é uma camada transitória não tão fortemente associada à partícula, onde encontram-se em equilíbrio dinâmico íons atraídos pela superfície da partícula e íons sofrendo repulsão à camada Stern. Por isso, as partículas de HDL associadas à camada Stern são positivamente carregadas. Uma vez que a superfície das lamelas adsorve temporariamente ânions que podem sair da camada Stern, sempre existirá a presença de ânions na camada difusa. O valor do potencial Zeta para os HDLs está

relacionado com a afinidade e a concentração dos ânions e a superfície das lamelas. Portanto, ânions que apresentam uma maior afinidade com a superfície das lamelas serão retidos pela camada Stern, diminuindo a sua concentração na camada difusa e, conseqüentemente, apresentando um menor valor de potencial Zeta.

Os valores dos potenciais Zeta ao longo do tempo para a matriz de HDL cloreto mostraram ligeira variação, mantendo-se na faixa correspondente a dispersões com estabilidade moderada, (+/-) 30 até (+/-) 40 mV.^{138,207} Porém, o material Mg₂Al₂Prav apresentou valor de potencial Zeta no 1º dia igual a + 22,9 mV, que corresponde a dispersões instáveis. Observou-se um decréscimo do potencial Zeta ao longo do período de dezessete dias de medida, atingindo + 7,9 mV no 17º dia de monitoramento. O potencial Zeta é um parâmetro que permite avaliar a estabilidade de carga de um sistema disperso de modo a não formar aglomerados e consequente sedimentação ao longo do tempo através do valor do potencial eletrocinético da partícula.²⁰⁷ O potencial eletrocinético é a medida do potencial da interface entre a dupla camada elétrica (formada ao redor da partícula) com o meio da suspensão, fornecendo então a mobilidade da partícula no sistema quando aplicado um campo elétrico. Observa-se que a matriz de HDL cloreto mostrou-se mais estável em suspensão aquosa ao longo do tempo quando comparada ao material Mg₂Al₂Prav. Além disso, pode-se inferir que a afinidade dos ânions pravastatina com a superfície dos HDLs é maior que os ânions cloreto. Por isso, uma menor quantidade de ânions pravastatina está presente na camada difusa diminuindo o valor do potencial Zeta.

Tabela 12: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Prav$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).

Tempo (dias)	1º	2º	3º	6º	9º	13º	17º
Mg_2Al-Cl (mV)	+ 41,7	+ 33,4	+ 31,9	+ 40,4	+ 22,8	+ 33,2	
$Mg_2Al1Prav$ (mV)	+ 22,9	+ 16,9	+ 25,8	+ 21,4	+ 14,9	+ 12,1	+ 7,9

IV.1.4.1. Medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados para os materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2Al1Prav$

A **Tabela 13** e as Figuras 28 e 29 mostram os valores do potencial Zeta dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Prav$ em função do aumento na concentração dos íons nos meios que simulam os fluídos saliva (pH= 6,9), estômago (pH= 1,8), intestino (pH= 7,4) e lisossomo (pH= 5,5).²⁰⁸ Visualiza-se a variação no valor do potencial Zeta dos HDLs (+ 20 - + 40 mV, ver justificativa no item IV.1.4) atingindo o PCZ (Ponto de Carga Zero) e consequente reversão com o aumento da concentração de íons na solução. A reversão no valor do potencial Zeta dos HDLs está relacionada à afinidade e à concentração dos ânions com a superfície das lamelas, uma vez que a retenção dos ânions na camada Stern diminui a concentração desses ânions na camada difusa e, como consequência, ocorre a diminuição no potencial Zeta. A força iônica é um fator importante em soluções aquosas contendo íons, pois a presença dos eletrólitos afeta a dissociação e a solubilidade dos sais. Vale ressaltar que quando o valor do potencial Zeta dos HDLs está próximo a zero, as partículas agregam-se rapidamente. De maneira geral, os HDLs começam a agregar em uma concentração salina próxima da concentração do Ponto de Carga Zero, que é chamada concentração de coagulação crítica.^{138,139} Através do aumento da força iônica dos meios, foi possível avaliar o comportamento dos HDLs frente ao meio biológico simulado. As modificações nos valores dos potenciais Zeta foram proporcionais à força iônica dos meios, ou seja, quanto

maior a concentração ou valência dos contra íons, mais contraída ficará a Dupla Camada, o que aumentará o gradiente do potencial elétrico.²⁰⁸ Porém, o PCZ nos HDLs em todos os fluidos é observado em faixas de concentração onde o meio tamponado estava diluído, ou seja, com concentração menor que a encontrada no meio biológico, representada como Meio Iônico 1 na **Tabela 13**. Portanto, apesar da reversão no valor do potencial Zeta devido ao aumento da força iônica, pode-se sugerir a dispersão dos HDLs nas condições biológicas simulando algumas regiões na administração oral (saliva, estômago, intestino e lisossoma).

Tabela 13: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Prav$ em função do meio iônico.

Meio Iônico	Potencial Zeta (mV) pH= 6,9 Saliva		Potencial Zeta (mV) pH= 1,8 Estômago		Potencial Zeta (mV) pH= 7,4 Intestino		Potencial Zeta (mV) pH= 5,5 Lisossoma	
	Mg_2Al-Cl	$Mg_2Al1Prav$	Mg_2Al-Cl	$Mg_2Al1Prav$	Mg_2Al-Cl	$Mg_2Al1Prav$	Mg_2Al-Cl	$Mg_2Al1Prav$
0	+ 41,7	+ 22,9	+ 41,7	+ 22,9	+ 41,7	+ 22,9	+ 41,7	+ 22,9
0,001	+ 54,8	+ 23,1		+ 7,5	+ 23,5	+ 9,6	- 14,4	- 9,6
0,002	a)				+ 10,9		- 30,8	
0,003					+ 14,1		- 29,2	
0,004					+ 2,7		- 37,4	
0,005	+ 35,9	+ 15,5	+46,0	+ 16,8	- 3,7	+ 7,0	- 30,7	- 19 5
0,009	+ 21,4	+ 16,9	+42,6	+ 18,5	- 6,5		- 35,3	
0,01	+ 20,4	+ 14,2	+47,7	+ 22,2	- 10,6	+ 6,3	- 38,6	- 23,1
0,02	- 4,4	+ 3,6						
0,03	- 8,3	- 2,0						
0,04	- 11,9	- 4,1						
0,05	- 12,0	- 4,0	+45,3	+ 16,5	- 26,0	- 13,5	- 48,1	- 40,9
0,1	- 11,4	- 9,5	+41,3	+ 22,9	- 27,0	- 14,1	- 40,1	- 41,1
0,2					- 19,7			
0,5	- 29,6	- 25,3	+20,6	+ 7,7	- 21,3	- 19,2	- 36,1	- 28,4
0,9	- 38,9	- 28,1	+9,9	+ 27,8	- 24,5		- 29,4	
1			+34,5	+ 14,8				

2			+31,4	+ 13,8				
5			+32,5	+ 16,6				
7			+22,8	+ 5,0				
9			+24,5	+ 9,1				

^{a)} não foi possível fazer a medida (limitação do aparelho).

Figura 28. Valores de potencial Zeta do material Mg_2AlCl em relação ao meio iônico.

Figura 29. Valores de potencial Zeta do material Mg_2Al_1Prav em relação ao meio iônico.

IV.1.5. Ensaio biológico “*in vitro*” com o corante Sulforodamina B

De modo a avaliar o potencial farmacológico dos HDLs, foi realizado o ensaio biológico com o corante SRB na linhagem celular de melanoma A-375 (item XI.2) na presença da Pravastatina Sódica (NaPrav) e dos materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2Al-Prav$. Através do ensaio de quatro dias de incubação, utilizando seis concentrações de tratamento com as amostras acima citadas, foi possível determinar a porcentagem de células sobreviventes em função do tempo (**Tabela 14**). Como descrito no item III.5.1, a % O.D (Optical Density, Densidade Óptica) controle para cada tempo é igual a 125,3 % (24 h), 128,2 % (48 h), 120,5 % (72 h) e 125,9 % (96 h). As Figuras 30, 31 e 32 mostram as curvas de dose-resposta para o Mg_2Al-Cl , NaPrav e $Mg_2Al-Prav$ ($p \leq 0,05$). A pravastatina sódica é um fármaco utilizado no tratamento de hipercolesterolemia e, adicionalmente, alguns estudos mostram o seu potencial frente a alguns tipos de câncer, como o melanoma (ver item I.3.).^{145,146} Os resultados descritos na **Tabela 14** mostram o efeito da pravastatina nas células da linhagem celular A-375.

Neste trabalho, foi avaliado o potencial dos carregadores de HDL sem e com a pravastatina intercalada frente às células cancerígenas A-375. A combinação das propriedades da pravastatina, juntamente às dos HDLs (que podem promover a liberação sustentada e aumentar a biodisponibilidade do fármaco) pode potencializar a ação dessa droga nas células de melanoma. De acordo com os dados mostrados na **Tabela 14**, para todos os tempos e concentrações (5 a 100 $\mu g/mL$) os tratamentos com as três amostras diminuiram o crescimento das células de melanoma em aproximadamente 20 %. Porém, através da análise estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), observou-se que a utilização de diferentes tempos e doses de tratamento não é estatisticamente diferentes quanto à inibição das células da linhagem A-375. Logo, a utilização de 5 $\mu g/mL$ e 1 dia de tratamento mostrou o mesmo efeito contra o crescimento das células de melanoma que, por

exemplo, a utilização de 100 µg/mL e 4 dias em todos os sistemas (NaPrav, HDLCl e HDLPrav) para o Ensaio biológico com o corante SRB.

Tabela 14: Resposta celular em função do tempo de incubação do tratamento obtida através do Ensaio com o corante SRB, (1) HDL-Cl, (2) NaPrav e (3) HDL-Prav.

(1) HDL-Cl: % células sobreviventes

$\mu\text{g/mL}$ tempo	5	10	20	50	80	100
	HDL-Cl					
24 h	79,5	79,0	80,0	79,8	79,6	80,1
48 h	80,1	71,5	77,3	71,4	73,6	79,8
72h	84,4	81,2	81,1	86,3	84,2	84,4
96 h	80,9	81,6	79,8	79,9	79,1	80,0

(2) NaPrav: % células sobreviventes

$\mu\text{g/mL}$ tempo	5	10	20	50	80	100
	NaPrav					
24 h	82,3	80,7	79,8	80,0	81,3	78,6
48 h	70,5	76,3	80,7	75,7	76,8	76,9
72h	83,7	84,9	84,8	82,1	78,5	85,7
96 h	81,4	82,3	80,5	80,7	75,3	78,2

(3) HDL-Prav: % células sobreviventes

$\mu\text{g/mL}$ tempo	5	10	20	50	80	100
	HDL-Prav					
24 h	78,6	83,6	80,8	80,8	79,0	82,3
48 h	79,0	74,6	75,4	76,2	78,6	68,8
72h	83,2	82,6	83,0	83,9	83,7	77,1
96 h	81,0	81,7	80,5	79,4	80,3	74,3

Figura 30. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-CI após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.

Figura 31. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de NaPrav após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.

Figura 32. Dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-Prav após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.

IV.2. Sistemas contendo o Ácido Coumárico nos HDLs

IV.2.1. Caracterização de HDLs-Mg₂Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Cou/Al³⁺

A Figura 33 mostra os difratogramas de raios X das amostras Mg₂Al_xCou (onde x= 1, 3 e 5). Nota-se a formação de material lamelar devido à presença das reflexões (012), (110) e (113) típicas de HDL. Os picos localizados nas regiões de baixos valores de 2θ indicam aumento de espaçamento basal em relação ao Mg₂Al-Cl, ou seja, a inserção de íons coumarato na região interlamelar. Esse deslocamento é mais evidente nos difratogramas das amostras Mg₂Al₃Cou e Mg₂Al₅Cou, para os quais o pico basal (003) é mais intenso e bem definido se comparado ao Mg₂Al₁Cou. Além disso, observa-se a presença dos picos harmônicos (003, 006, 009, 0012 e 0015) referente ao empilhamento das lamelas no eixo cristalográfico c (picos 00ℓ) com ordens de difração n = 3, 6, 9, 12 e 15, indicando um material mais ordenado no eixo de empilhamento em relação a matriz de Mg₂Al-Cl.

Figura 33. Difratomogramas de raios X do Ácido Coumárico e dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$.

Os índices de Miller (hkl) e as respectivas distâncias interplanares (d_{hkl}) relativos ao espaçamento basal se encontram na **Tabela 15**.

Tabela 15: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) para os materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.

$\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Cou}$		$\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$		$\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$		hkl
2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	
5,13	17,2	5,04	17,5	5,04	17,5	(003)
10,9	8,14	10,3	8,61	10,3	8,61	(006)
-	-	15,4	5,76	15,1	5,88	(009)
-	-	20,6	4,30	20,5	4,32	(0012)
		25,8	3,45	25,1	3,54	(0015)

Diferentemente dos HDLs/Pravastatina discutidos no item IV.1, o excesso utilizado dos íons coumarato em relação à quantidade de íons Al^{3+} na síntese, influenciam diretamente não somente na cristalinidade, como também nas quantidades presentes do orgânico no material (valores obtidos das análises elementares de CHN). De forma crescente, as quantidades em gramas de íons coumarato por 100 g de material são: $\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Cou}$ (20,1 g), $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ (31,4 g) e $\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$ (32,3 g), ou seja, o excesso acarreta um aumento na quantidade desse ânion nos materiais isolados.

O ácido coumárico possui aproximadamente as dimensões $5,4 \times 13,7 \times 1,5 \text{ \AA}$ (Figura 34a). A área ocupada pelos ânions coumarato inclinados na região interlamelar é de aproximadamente $27 \text{ \AA}^2$ considerando a distância interlamelar d_{003} dos HDL-Cou de $12,7 \text{ \AA}$. A área por unidade de carga dos HDL- Mg_2Al é de aproximadamente $25 \text{ \AA}^2$. Com base nestes valores, pode-se propor um arranjo de monocamada dos íons coumarato no espaço interlamelar, com os grupos carboxilato próximos às camadas positivas (Figura 34b).

Figura 34. (a) Visualização estrutural do Ácido Coumárico obtida por cálculos de DFT descrito no item III.3. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions coumarato na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H) e vermelho (O).

O ácido coumárico (HCou) é uma molécula bifuncional apresentando os grupos carboxílico e fenólico, com constantes ácidas pK_a 4,34 e 8,83, respectivamente. Portanto, a discussão referente aos resultados de espectroscopia Raman para os sistemas de HDLs contendo o ácido coumárico descrito a seguir foi baseada no trabalho publicado recentemente por nós e colaboradores que mostra pela primeira vez a caracterização espectroscópica do ácido coumárico e de suas formas sódicas coumarato de sódio (NaCou) e coumarato de dissódio (Na₂Cou).¹⁷⁴ Dessa forma, foi possível elucidar a natureza da espécie aniônica presente no material através de uma análise criteriosa dos espectros Raman. Os HDLs de composição lamelar Mg/Al foram obtidos em soluções de pH 9-10, que favorecem a formação do ânion Cou²⁻.

Os espectros Raman do HCOu e dos sais de sódio NaCou e Na₂Cou representados na Figura 35 mostram que uma das principais diferenças entre a espécie neutra e ambas formas aniônicas é a banda em 1250 cm⁻¹ referente a $\delta(C-H)$ do estireno com contribuição de modos vibracionais do anel benzênico $\nu C-C$ e $\delta_{in\ plane} C-H$ (*bending in plane*, deformação no plano). Da mesma forma, comparando os espectros do HCOu com o do NaCou, nota-se a drástica mudança nas intensidades relativas das bandas em 1606 e 1635 cm⁻¹ (HCOu) e 1614 e 1642 cm⁻¹ (Cou⁻), atribuídas a modos vibracionais similares onde ambos apresentam contribuições do $\nu(C=C)_{esti}$, $\nu_{as}(COO)$ e $\Phi \nu C-C$. Por outro lado, apesar da similaridade nos espectros Raman em relação às bandas mais intensas dos dois sais de sódio contendo os ânions Cou⁻ e Cou²⁻, nota-se a presença da banda larga em *ca.* 1598 cm⁻¹ que aparece de forma bem definida em 1583 cm⁻¹ no espectro Raman calculado.¹⁷⁴ Essa banda é atribuída ao modo vibracional composto principalmente pelo estiramento assimétrico do grupo carboxilato $\nu_{as}(COO)$ com contribuição do estiramento do estireno $\nu(C=C)_{esti}$. Os dados dos espectros Raman indicam que o aumento da delocalização eletrônica no Cou²⁻ em comparação ao Cou⁻ faz com que a ligação COO⁻ enfraqueça de modo a

aparecer uma banda distinta referente ao $\nu_{as}(\text{COO})$ em uma região de menor energia.¹⁷⁴ Além disso, o sal Na_2Cou apresenta as bandas em 1436 e 1391 cm^{-1} referentes aos modos vibracionais do anel benzênico $\delta_{\text{in plane}} \text{C-H}$ e $\nu \Phi\text{C=O}$, respectivamente.

Figura 35. Espectros Raman do Ácido Coumárico (HCou) e dos sais NaCou e Na_2Cou .

Através da discussão anterior sobre as diferenças nos espectros Raman dos sais de sódio NaCou e Na_2Cou foi possível inferir qual espécie aniônica está presente nos HDLs após o processo de síntese. Os espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$ (Figura 36) mostram claramente as bandas típicas da espécie orgânica na forma divalente (Cou^{2-}). Logo, as bandas em 1607 e 1636 cm^{-1} são referentes à contribuição dos modos vibracionais $\nu(\text{C=C})_{\text{esti}}$, $\nu_{as}(\text{COO})$ e $\Phi \nu\text{C-C}$, enquanto as bandas em 1247 e 1170 cm^{-1} ao $\delta\text{C=C}$ do anel aromático.¹⁵³ Adicionalmente, nota-se a presença das bandas referentes ao estiramento antissimétrico (ν_{as}) e simétrico (ν_s) do grupo carboxilato (COO^-) em 1590 cm^{-1} e 1399-1407 cm^{-1} respectivamente, assim como a banda em 1391 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo fenolato $\nu \Phi\text{C=O}$.¹⁹⁷

Figura 36. Espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$ e Na_2Cou .

De modo a comparar a estabilidade térmica do ácido coumárico livre e a forma intercalada nos HDLs (Cou^{2-}), serão mostradas a seguir as análises térmicas do ácido coumárico e do sal de sódio Na_2Cou .

As curvas TGA e DSC registradas para o Ácido Coumárico (Figura 37a) apresentam duas etapas de perda de massa. As faixas de temperatura (Figura 37b) pertinentes a cada evento são: 169 a 284 °C (evento 1) e 290 a 620 °C (evento 2).

O evento 1 está principalmente relacionado à descarboxilação (processo exotérmico) com 52,6 % de perda de CO_2 . As curvas DTG-MS para o ácido orgânico (Figura 37b) corroboram que, no intervalo de temperatura do evento 2 retratado acima, a amostra perde água e CO_2 e corresponde a 46 % de perda de massa respectivamente.²⁰⁹

Figura 37. (a) Curvas TGA (-) e DSC (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do Ácido Coumárico.

Os dados de análise térmica do sal Na_2Cou (**Tabela 16** e Figura 38) mostram que o primeiro evento de perda de massa (8 %) está relacionado à liberação de moléculas de água superficiais. Considerando a fórmula empírica $\text{Na}_2\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a quantidade de água eliminada na primeira etapa é próximo ao valor esperado de 7,9 %. No evento subsequente ocorre a decomposição do sal com a obtenção do resíduo a 1000 °C, correspondente a 45 % da massa do coumarato de dissódio.¹⁷⁴

Assumindo que o resíduo obtido na decomposição do sal Na_2Cou é carbonato de sódio (Na_2CO_3), a reação global de decomposição do sal pode ser representada pela equação química a seguir:

Reação de decomposição do sal coumarato de dissódio:

As análises térmicas dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$ (**Tabela 16**) apresentam duas etapas principais de perda de massa, representadas nas Figuras 38 e 39. O primeiro evento ocorre da temperatura ambiente até 110 °C e corresponde a *ca.* 6 % ($\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Cou}$) e 7 % ($\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$) e está relacionado à liberação das águas superficiais. A segunda etapa ocorre na faixa de temperatura entre 110 a 600 °C e corresponde a *ca.* 46 % para o $\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Cou}$ e *ca.* 52 % para o $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e o $\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$. Essa etapa corresponde à decomposição do orgânico e concomitante desidroxilação das camadas dos HDLs. Além disso, os materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$ sofrem uma extensão à etapa 2 com a perda de *ca.* 3 % de massa acima de 600 °C. Através dos dados de análise térmica dos materiais híbridos, pode-se inferir que o confinamento dos íons coumarato nos HDLs não promoveu um aumento na estabilidade térmica do orgânico quando comparado ao ácido coumárico e o sal de dissódio uma vez que a temperatura de decomposição da molécula livre e do sal ocorre a partir de 169 °C e 300 °C, respectivamente.

Tabela 16: Dados de análise térmica do Sal de sódio (Na_2Cou) e dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$.

	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Resíduo m %
Na_2Cou	25-130 °C $\Delta m = 8 \%$	300-380 °C $\Delta m = 17 \%$	600-800 °C $\Delta m = 30 \%$	45
$\text{Mg}_2\text{Al}_1\text{Cou}$	25-110 °C $\Delta m = 6 \%$ m/z= 18	110-600 °C $\Delta m = 46 \%$ m/z= 18 e 44	--	48
$\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$	25-110 °C $\Delta m = 7 \%$ m/z= 18	110-600 °C $\Delta m = 52 \%$ m/z= 18 e 44	700-820 °C $\Delta m = 2 \%$ m/z= 18 e 44	39
$\text{Mg}_2\text{Al}_5\text{Cou}$	25-110 °C $\Delta m = 7 \%$ m/z= 18	110-600 °C $\Delta m = 52 \%$ m/z= 18 e 44	650-800 °C $\Delta m = 3 \%$ m/z= 18 e 44	38

Figura 38. Curvas TGA (-) e DTG (--) do Na_2Cou e dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$.

Figura 39. Curvas DTG (--) e MS (-) dos materiais Mg_2Al_xCou .

IV.2.2. Caracterização de HDLs-Cou: Mg_2Al e Zn_2Al

A seguir serão confrontados os dados de caracterização dos materiais Mg_2Al_3Cou (discutidos no item IV.2.1.) e Zn_2Al_3Cou , de modo a analisar as possíveis diferenças estruturais entre os materiais quanto à composição lamelar (item III.2.2. e III.2.4).

Os difratogramas de raios X de ambos os materiais (Figura 40) indicam a obtenção de fase lamelar devido à presença das reflexões típicas da formação da estrutura de HDL com a imobilização dos íons coumarato. Dessa forma, é visualizado o deslocamento do pico (003) para baixo ângulo em relação à matriz contendo íons cloreto indicando à variação no espaçamento basal (**Tabela 17**). Além disso, da mesma forma observada para os sistemas de HDL-Prav (item IV.1.3.), o difratograma do material Zn_2Al_3Cou apresenta uma maior organização no

empacotamento lamelar quando comparado ao $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$. Portanto, nota-se a presença bem definida dos harmônicos (003, 006, 009, 0012 e 0015) referentes ao empilhamento das lamelas no eixo cristalográfico c (picos 00 ℓ) com ordens de difração $n = 3, 6, 9, 12$ e 15 .

Figura 40. Difratomogramas de raios X dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$.

Tabela 17: Distância interplanar (d_{hkl}) e 2θ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$, obtidos dos dados de difratometria de raios X.

$\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$		$\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$		hkl
2θ	$d \text{ (\AA)}$	2θ	$d \text{ (\AA)}$	
5,04	17,5	5,13	17,2	(003)
10,3	8,61	10,2	8,66	(006)
15,4	5,76	15,3	5,77	(009)
20,6	4,30	20,6	4,32	(0012)
25,8	3,45	25,8	3,45	(0015)

O processo de coprecipitação aquosa dos hidróxidos dos cátions divalente e trivalente para a formação das lamelas nos Hidróxidos Duplos Lamelares é pH-dependente, uma vez que ocorre a competição entre a formação dos complexos solúveis dos cátions e a precipitação dos hidróxidos.^{10,26} A formação das lamelas contendo os hidróxidos de Mg/Al ocorre em pH 9-10 enquanto Zn/Al pH 7-8, ou seja, o valor de pH no qual a precipitação das lamelas ocorre simultaneamente para ambos os cátions.²⁶ Através do espectro Raman do $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ foi possível analisar qual forma aniônica foi intercalada no material (item III.2.4). Como mostrado no item IV.2.1, foi possível constatar a presença da forma divalente (Cou^{2-}) nos HDLs de MgAl, fato já esperado devido ao pH necessário para formação dessa composição lamelar (pH 9-10). Os espectros Raman do material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ (Figura 41) são semelhantes, mostrando as bandas típicas do orgânico (item IV.2.1). Porém, da mesma forma que o HDL de MgAl, é visualizada a banda distinta em 1589 cm^{-1} no espectro do $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$, ou seja, a banda atribuída ao $\nu_{\text{as}}\text{COO}$, assim como a banda em $1391(82) \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento do grupo fenolato $\nu \Phi\text{C}=\text{O}$, características da presença do ânion divalente Cou^{2-} . A síntese do HDL ZnAl foi realizada em pH menor que o segundo pKa do HCou. O processo de intercalação dos ânions nas lamelas positivas dos HDLs é favorecido com o aumento da densidade de carga da espécie

convidada. Logo, possivelmente os HDLs influenciaram no deslocamento do equilíbrio entre as duas espécies Cou^- e Cou^{2-} , favorecendo a forma mais carregada (Cou^{2-}).^{14,26,27,212}

Figura 41. Espectros Raman dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$.

A análise térmica do material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ (Figura 42) apresenta três etapas de perda de massa. O primeiro e segundo eventos ocorrem da temperatura ambiente até 110 °C (*ca.* 7 %) e de 140 a 250 °C (*ca.* 10 %), e podem ser atribuídos à desidratação e desidroxilação do material ($m/z=18$, Figura 42b), respectivamente. A terceira etapa que ocorre na faixa de temperatura entre 340 a 500 °C, e corresponde a *ca.* 36 % de perda de massa. Essa etapa está relacionada à decomposição do orgânico com a obtenção de 47 % de resíduo a 1000 °C. Diferentemente dos HDLs $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Cou}$ mostrados no item IV.2.1, a imobilização dos íons coumarato foi bastante

favorecida na matriz de HDL de ZnAl quando comparada ao ácido coumárico e ao sal coumarato de dissódio (decomposição a partir de 300 °C). A obtenção do material mais organizado na matriz de ZnAl (dados de difração de raios X) quando comparado ao HDL de MgAl promoveu uma maior interação entre as lamelas adjacentes dos HDLs dificultando a decomposição da estrutura lamelar frente ao aquecimento.

Figura 42. (a) Curvas TGA (-) e DTG (--) e (b) curvas DTG (--) e MS (-) do material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$.

Na **Tabela 18** são mostradas as fórmulas propostas assim como as quantidades de orgânico em 100 g de material para os sistemas de HDL-Cou, com os dados obtidos de análise elementar (CHN) e de metais e a porcentagem de H_2O (obtida das curvas TGA). Para todas as amostras, considerou-se que a quantidade de carga das lamelas não balanceada pelos íons

derivados do ácido coumárico é neutralizada pelos íons cloreto, uma vez que a banda de carbonato nos espectros Raman é praticamente inexistente.

O teste para visualizar a presença dos íons carbonato e cloreto nos HDLs-Cou (como descrito no item IV.1.3) mostrou que somente o material $\text{Mg}_2\text{Al1Cou}$ contém íons cloreto (provavelmente cointercalados na região interlamelar), o que corrobora com as fórmulas propostas para os HDL-Cou.

Os resultados da **Tabela 18** demonstram que a utilização de excesso do ânion Coumarato em relação à quantidade de íons Al^{3+} auxiliou no aumento da quantidade da espécie convidada até a saturação no material com razão molar Cou/Al igual a 3. Da mesma forma que o sistema de HDL-Prav foi visualizado um pequeno aumento na quantidade de orgânico no $\text{Zn}_2\text{Al3Cou}$ quando comparado ao $\text{Mg}_2\text{Al3Cou}$.

Tabela 18: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Cou, assim como a concentração dos ânions coumarato em 100 g de material.

Amostra	Fórmula Proposta	$\text{M}^{\text{II}}/\text{Al}^{\text{a)}$	%C	% H_2O	g ânion/ 100 g de material
$\text{Mg}_2\text{Al1Cou}$	$[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6](\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3)_{0,32}\text{Cl}_{0,36}\cdot 1,0\text{H}_2\text{O}$	2,00	13,3	6,9	20,2
		(2,39) ^{b)}	(13,4)	(6,0)	
$\text{Mg}_2\text{Al3Cou}$	$[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6](\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3)_{0,50}\cdot 1,0\text{H}_2\text{O}$	2,00	20,0	6,5	31,4
		(2,18)	(20,9)	(7,0)	
$\text{Mg}_2\text{Al5Cou}$	$[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6](\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3)_{0,50}\cdot 1,0\text{H}_2\text{O}$	2,00	20,0	6,5	32,3
		(1,93)	(21,5)	(7,0)	
$\text{Zn}_2\text{Al3Cou}$	$[\text{Zn}_{2,15}\text{Al}(\text{OH})_{5,30}]\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3\cdot 2,0\text{H}_2\text{O}$	2,15	23,7	7,9	35,6
		(2,15)	(23,6)	(7,0)	

a) razão em mol

b) valor experimental

Com base nos dados de análise elementar e análise térmica dos HDLs-Cou, pode-se propor duas interações distintas dos íons coumarato na região interlamelar com as lamelas dos HDLs, dependendo da composição lamelar. No caso do HDL de ZnAl, os íons coumarato podem estar enxertados nas lamelas, ou seja, um grupo hidroxila é substituído por um átomo de oxigênio do coumarato de modo a ser possível propor a fórmula química do material isolado. A enxertia dos íons coumarato nas lamelas pode explicar o diferente perfil térmico apresentado pela matriz de HDL-ZnAl. A estabilidade térmica da molécula orgânica é favorecida quando confinada na matriz de HDL-ZnAl quando comparada aos HDLs-MgAl, nos quais os íons coumarato estão interagindo com as lamelas por interação eletrostática e ligação de hidrogênio.

IV.2.3. Medidas de tamanho de partícula e potencial Zeta para os materiais Zn_2AlCl e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$

Diferentes procedimentos de preparação dos HDLs de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ foram empregados com o objetivo de obter suspensões com o tamanho de partícula entre 50 e 200 nm. Como descrito no item III.4., dois tipos de equipamentos (Microfluidizer e NanoDeBEE) foram utilizados para homogeneizar as suspensões dos HDLs. Assim como para as amostras $\text{Mg}_2\text{Al-Prav}$, os HDLs de ZnAl contendo o ânion coumarato atingiram a faixa mencionada acima, partindo-se da solução estoque 0,05 % (m/v) submetida a três passagens pela membrana do equipamento a uma pressão igual a 20×10^3 psi. As Figuras 43 e 44 mostram os resultados referente ao tamanho de partículas realizadas em cinco ($\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$) e quatro ($\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$) medidas, mantendo o desvio padrão abaixo de 5, o que certifica a obtenção de um resultado confiável. Portanto, os respectivos tamanhos máximos e os Índices de Polidispersibilidade (PdI- Polydispersibility Index) para o $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ são respectivamente 104,2 nm (PdI: 0,151) e 226,0 nm (PdI: 0,419). Vale ressaltar, seguindo a discussão e os valores de tamanho

descritos no item IV.1.4., que as matrizes de HDL com diferentes composições lamelares (ZnAl e MgAl) apresentam tamanhos diferentes: 85,3 nm para o $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e 104,2 nm para o $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de o raio iônico do Zn^{2+} (0,125 nm) ser maior do que o Mg^{2+} (0,072 nm).¹⁰⁴ Da mesma forma que foi abordado no item IV.1.4, visualiza-se a obtenção de partículas maiores no $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ em relação ao $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$. Portanto, a presença de espécies convidadas maiores na região interlamelar, se comparadas aos íons cloreto, influenciam no tamanho dos aglomerados formados dos HDLs.¹⁰⁴ Nota-se pelo perfil do gráfico que ambas as amostras apresentam uma ligeira variação no tamanho das partículas, ou seja, o método de processamento das amostras pôde proporcionar a obtenção de sistemas monomodais com população de partículas de tamanhos semelhantes.

Figura 43. Distribuição do tamanho de partícula do $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).

Figura 44. Distribuição do tamanho de partícula do $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ em suspensão aquosa 0,05 % (m/v).

A **Tabela 19** mostra os valores do potencial Zeta em meio aquoso das suspensões $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ acompanhados pelo tempo. O potencial Zeta da matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}$ sofreu uma variação mínima (± 1) + 46 mV ao longo do período do experimento, sendo o valor correspondente a dispersões com estabilidade elevada. Dessa maneira, as partículas dos HDLs de ZnAl sofrem repulsão entre si de modo a não apresentarem tendência à agregação e consequente sedimentação. O material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ apresentou valor de potencial Zeta no 1º dia igual a aproximadamente + 39 mV, correspondente a dispersões com estabilidade moderada. Observou-se, após seis dias de experimento, um decréscimo do potencial Zeta, atingindo valor de aproximadamente + 13 mV. Portanto, pode-se observar que a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}$ é mais estável em suspensão aquosa ao longo do tempo quando comparada ao material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$.

Tabela 19: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Zn_2AlCl e $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).

Tempo (dias)	1º	2º	6º
$\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ (mV)	+ 47,6	+ 46,6	+ 48,9
$\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ (mV)	+ 39,6	+ 38,1	+ 13,8

IV.3. Sistemas contendo o Ácido Lipóico nos HDLs

IV.3.1. Caracterização de HDLs-Mg₂Al sintetizados a partir de diferentes razões molares Lip/Al³⁺ e tempo de agitação

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos na tentativa de intercalar os ânions derivados do ácido lipóico em HDL Mg₂Al. Para tanto, serão comparados os materiais sintetizados através do método da coprecipitação utilizando diferentes razões molares (x) Lip/Al³⁺ (x= 1 e 3) e tempo de agitação (y= 1 h e 24 h) após a síntese. Os parâmetros de síntese utilizados foram previamente relatados no item III.2.2.

Os difratogramas de raios X no pó do ácido lipóico, Mg₂Al-Cl e os materiais Mg₂Al_xLip são apresentados na Figura 45.

Figura 45. Difratogramas de raios X do Ácido Lipóico e dos materiais Mg₂Al-Cl e Mg₂Al_xLip.

Os padrões de difração de raios X para os materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Lip}$ apresentam perfis análogos ao encontrado para a matriz $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ na região acima de $2\theta=30^\circ$, ou seja, visualiza-se a presença das reflexões (012), (110) e (113) típicas da formação de HDL.^{10,11} Os picos localizados nas regiões de baixos valores de 2θ mostram aumento de espaçamento basal em relação ao empilhamento das lamelas, ou seja, a inserção de íons lipoato entre as lamelas (d_{003} igual a 22,6 Å para o $\text{Mg}_2\text{Al1Lip.1h}$, 22,5 Å para o $\text{Mg}_2\text{Al1Lip.24h}$ e $\text{Mg}_2\text{Al3Lip.1h}$ e 21,3 Å para o $\text{Mg}_2\text{Al3Lip.24h}$). Porém, observa-se que o aumento da relação molar $\text{Lip}^-/\text{Al}^{3+}$ na síntese, assim como o tempo de agitação de 1 h para 24 h, não modificou o perfil referente ao empilhamento das lamelas no eixo cristalográfico c (picos 00ℓ), indicando um material menos ordenado em relação ao empacotamento lamelar quando comparado a matriz de Mg_2AlCl .

Os dados das análises químicas dos materiais obtidos utilizando diferentes parâmetros de síntese não favoreceram o aumento no conteúdo de espécie orgânica no material. As quantidades em gramas de íons lipoato/ 100 g de material são: $\text{Mg}_2\text{Al1Lip.1h}$ e $\text{Mg}_2\text{Al3Lip.1h}$ (39,7 g/ 100 g), $\text{Mg}_2\text{Al1Lip.24h}$ (39,3 g/ 100 g) e $\text{Mg}_2\text{Al3Lip.24h}$ (38,4 g/ 100 g).

Através das dimensões aproximadas do ácido lipóico (item III.3.) de 4,4 x 12,1 x 3,6 Å, (Figura 46a) combinadas aos dados de DRX (aumento nas distâncias interlamelares d_{003}) reportados acima, pode-se sugerir um arranjo de uma bicamada do ânion orgânico no espaço interlamelar, com os grupos carboxilato próximos às camadas positivas. A área de um íon lipoato é igual a 15,8 Å² (4,4 Å x 3,6 Å) enquanto os HDLs-MgAl apresentam 25 Å² de área ocupada por carga positiva. De acordo com a distância interlamelar dos HDLs-Lip igual a 17,7 Å (22,5 – 4,8 Å), nota-se a necessidade de um arranjo de uma bicamada dos íons lipoato com a interação dos grupos ditiolano entre as moléculas, uma vez que o ácido lipóico apresenta 12,1 Å de altura.

Figura 46. (a) Visualização estrutural do Ácido Lipóico obtida por cálculos de DFT descrito no item III. (b) Representação esquemática simplificada do arranjo proposto para os ânions lipoato na região interlamelar do HDL. Código de cores: cinza escuro (C), cinza claro (H), vermelho (O), e amarelo (S).

Os espectros vibracionais no IV do ácido lipóico, da matriz $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, dos materiais $\text{Mg}_2\text{Al}_x\text{Lip}$ estão representados na Figura 47.

Figura 47. Espectros vibracionais na região do infravermelho do Ácido Lipóico e dos materiais Mg_2Al-Cl e $Mg_2AlxLip$.

Os espectros vibracionais no infravermelho dos materiais híbridos formados apresentam bandas características do ânion derivado do composto orgânico: ν_{CH_2} ($\sim 2928\text{ cm}^{-1}$), $\nu_{as}COO^-$ (1545 cm^{-1}), ν_sCOO^- (1408 cm^{-1}), ν_{S-C} (681 cm^{-1}) e ν_{S-S} (523 cm^{-1}) assim como as bandas típicas da deformação metal-oxigênio das lamelas dos HDLs ($430\text{-}465$ e 652 cm^{-1}).^{10,210,212}

Os eventos térmicos associados aos materiais Mg_2AlLip obtidos utilizando diferentes parâmetros de síntese (descritos no item III.2.2.) são parecidos e estão resumidos na **Tabela 20**. Portanto, adiante será mostrado a análise térmica somente da amostra $Mg_2Al1Lip.1h$ e do ácido lipóico (Figuras 48 e 49).

Tabela 20: Dados de análise térmica do Ácido Lipóico e dos materiais Mg_2AlLip .

	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Resíduo m %
HLip	61 °C $\Delta m = 0$	180-330 °C $\Delta m = 92 \%$ m/z= 18 e 44	400-650 °C $\Delta m = 7,5 \%$ m/z= 44	0,5
$\text{Mg}_2\text{Al1Lip.1h}$	25-200 °C $\Delta m = 12 \%$ m/z= 18	210-600 °C $\Delta m = 39 \%$ m/z= 18 e 44	600-800 °C $\Delta m = 10 \%$ m/z= 18 e 44	37
$\text{Mg}_2\text{Al1Lip.24h}$	25-200 °C $\Delta m = 12 \%$ m/z= 18	200-600 °C $\Delta m = 39 \%$ m/z= 18 e 44	600-800 °C $\Delta m = 9 \%$ m/z= 18 e 44	36
$\text{Mg}_2\text{Al3Lip.1h}$	25-200 °C $\Delta m = 10 \%$ m/z= 18	210-600 °C $\Delta m = 38 \%$ m/z= 18 e 44	600-800 °C $\Delta m = 11 \%$ m/z= 18 e 44	38
$\text{Mg}_2\text{Al3Lip.24h}$	25-200 °C $\Delta m = 10 \%$ m/z= 18	200-600 °C $\Delta m = 37 \%$ m/z= 18 e 44	600-800 °C $\Delta m = 9 \%$ m/z= 18 e 44	40

Figura 48. Curvas TGA (-) e DSC (--) do Ácido Lipóico (a) e do $\text{Mg}_2\text{Al1Lip.1h}$ (b).

Figura 49. Curvas DTG (--) e MS (-) do Ácido Lipóico (a) e do Mg₂Al₁Lip.1h (b).

Através dos dados de análise térmica do Ácido Lipóico (Figura 48a), nota-se a presença de três eventos térmicos. O evento 1 em 61 °C está relacionado à fusão da molécula, pico endotérmico, uma vez que não foi observada perda de massa, e esse valor está de acordo com o encontrado na literatura.^{162,163} O evento 2 corresponde à decomposição do composto com perda concomitante de fragmentos com massas iguais a 18 u e 44 u (curvas DTG-MS, Figura 49) a partir de 180 °C (**Tabela 20**). Supondo que essa faixa de temperatura está relacionada à decomposição do material orgânico, atribui-se as massas a H₂O e CO₂, respectivamente (processo exotérmico, Figura 48). O evento 3 corresponde à continuação da decomposição do composto na faixa de temperatura entre 400 e 650 °C. Os valores de temperatura inicial e final de cada etapa do processo de decomposição térmica foram determinados através das curvas DTG (Figura 49).

As curvas TGA e DSC registradas para o Mg₂Al₁Lip.1h (Figura 48) apresenta três eventos térmicos (**Tabela 20**). O evento 1 está relacionado à desidratação do material. No evento

2, ocorre simultaneamente parcial decomposição das lamelas dos HDLs e da espécie orgânica a partir de 210 °C.^{211,212,213,214,215} O evento 3 envolve a completa combustão e a desidroxilação das lamelas do hospedeiro.^{216,217} O resíduo obtido a 1000 °C corresponde a aproximadamente 37 % da massa inicial (vide **Tabela 20**) para todos os materiais.²¹⁸ Dessa forma, pode-se inferir a partir dos dados das curvas TGA que as amostras apresentam perfis térmicos semelhantes.

Os resultados reportados acima indicam que tanto a estrutura quanto a composição, mesmo utilizando diferentes parâmetros de síntese, são similares. Além disso, a estabilidade térmica da espécie imobilizada na região interlamelar foi bastante favorecida (**Tabela 20**), considerando-se que a decomposição térmica do ácido lipóico inicia-se em 180 °C enquanto nos materiais HDLs-Lip ocorre a partir de 210 °C.

Os dados obtidos de análise elementar de CHNS e de metais e a porcentagem de H₂O (obtida das curvas TGA) para todos os materiais HDLs-Lip foram semelhantes. Para todas as amostras, considerou-se que a quantidade de carga das lamelas não balanceada pelos íons derivados do ácido lipóico é neutralizada pelos íons cloreto. Dessa forma, foi possível propor a fórmula química dos materiais (**Tabela 21**).

O teste para visualizar a presença de íons carbonato e cloreto nos HDLs-Lip (como descrito no item IV.1.3) mostrou que todos os materiais Mg₂Al-Lip contêm íons cloreto (provavelmente co-intercalados na região interlamelar), o que corrobora com as fórmulas propostas para os HDL-Lip.

Tabela 21: Fórmulas químicas propostas para os materiais HDL-Lip, assim como a concentração dos ânions lipoato em 100 g de material.

Amostra	Fórmula Proposta	Mg/Al ^{a)}	%C	%S	%H ₂ O	g ânion/ 100 g de material
Mg ₂ Al1Lip.1h	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₈ H ₁₃ O ₂ S ₂) _{0,7} Cl _{0,3} ·2,0H ₂ O	2,00 (2,00) ^{b)}	18,3 (18,6)	12,3 (10,1)	10,0 (12,0)	39,0
Mg ₂ Al1Lip.24h	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₈ H ₁₃ O ₂ S ₂) _{0,7} Cl _{0,3} ·2,0H ₂ O	2,00 (1,97)	18,3 (18,4)	12,3 (10,4)	10,0 (12,0)	39,0
Mg ₂ Al3Lip.1h	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₈ H ₁₃ O ₂ S ₂) _{0,7} Cl _{0,3} ·2,0H ₂ O	2,00 (2,36)	18,3 (18,6)	12,3 (10,2)	10,0 (10,0)	39,0
Mg ₂ Al3Lip.24h	[Mg ₂ Al(OH) ₆](C ₈ H ₁₃ O ₂ S ₂) _{0,7} Cl _{0,3} ·2,0H ₂ O	2,00 (2,08)	18,3 (18,0)	12,3 (10,7)	10,0 (10,0)	39,0

a) razão em mol

b) valor experimental

Os resultados relatados anteriormente demonstram que tanto a utilização de excesso do ânion Lip em relação aos íons Al³⁺ quanto diferentes tempos de agitação após a síntese não auxiliaram no aumento da quantidade da espécie intercalada no material.

IV.3.2. Medidas de tamanho de partícula e potencial Zeta para os materiais Mg₂Al-Cl e Mg₂Al1Lip

Da mesma forma que foi descrito para o sistema de HDL-Prav (item IV.1.4.), diferentes procedimentos de preparação foram empregados para desagregar o Mg₂Al1Lip, de modo a atingir partículas de tamanho na ordem de 50 a 200 nm. A medida do tamanho de partícula foi feita em quintuplicata, mantendo o desvio padrão abaixo de 5, para o procedimento que partiu da solução estoque de concentração 0,1 % (m/v) e foi processada no equipamento Microfluidizer com duas passagens consecutivas pela membrana usando de pressão 10 x 10³ psi, seguida de 20 x 10³ psi. O tamanho máximo de partículas e o Índice de Polidispersibilidade (PdI- Polydispersibility

Index) para o material Mg_2AlH são 110,4 nm e PDI: 0,220. Através do gráfico (Figura 50) da distribuição de tamanho do Mg_2AlH , nota-se que foi possível preparar uma suspensão homogênea e monomodal com uma população de partículas de tamanho médio igual a aproximadamente 110 nm.

Figura 50. Distribuição do tamanho de partícula do Mg_2AlH em suspensão aquosa 0,1 % (m/v).

Os valores de potencial Zeta em meio aquoso das suspensões $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e Mg_2AlH acompanhados pelo tempo, encontra-se na **Tabela 22**. De acordo com o item IV.1.4. a matriz $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ apresenta um valor de potencial Zeta na ordem esperada para esse material, sem sofrer grandes variações ao longo do tempo do experimento. Por outro lado, apesar de o material Mg_2AlH apresentar um potencial Zeta igual a + 34 mV no primeiro dia, não foi observada a manutenção do valor do potencial ao longo do tempo. Com base no valor do potencial Zeta de partida, pode-se classificar a dispersão como de estabilidade moderada. Portanto, a matriz de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ mostrou-se mais estável em solução aquosa ao longo do tempo quando comparada ao material Mg_2AlH .

Tabela 22: Valores de potencial Zeta (mV) dos materiais Mg_2AlCl e $Mg_2Al1Lip$ ao longo do tempo, empregando suspensão aquosa 0,4 % (m/v).

Tempo (dias)	1º	2º	3º	6º	9º	13º	17º
Mg_2Al-Cl (mV)	+ 41,7	+ 33,4	+ 31,9	+ 40,4	+ 22,8	+ 33,2	
$Mg_2Al1Lip$ (mV)	+ 34,3		+ 31,5	+ 29,8	+ 26,0	+ 18,3	+ 13,0

IV.3.2.1. Medidas de potencial Zeta nos meios biológicos simulados para o material $Mg_2Al1Lip$

Os valores do potencial Zeta do material $Mg_2Al1Lip$ em função do aumento na concentração dos íons dos meios simulando a saliva (pH= 6,9), o estômago (pH= 1,8), o intestino (pH= 7,4) e o lisossoma (pH= 5,5) encontram-se na **Tabela 23** e Figura 51. Da mesma forma que discutido no item IV.1.4.1, o aumento da força iônica na solução permite a presença de uma maior quantidade de ânions na camada Stern resultando no PCZ dos HDLs e consequente reversão do potencial Zeta.^{138,139} Porém, o PCZ (ponto de aglomeração dos HDLs) do $Mg_2Al1Lip$ disperso em todos os fluidos ocorreu em faixas de meio iônico menores da encontrada no meio biológico (Meio Iônico igual a 1, **Tabela 23**). Pode-se sugerir que o material $Mg_2Al1Lip$, na presença dos fluidos biológicos, encontra-se disperso. Portanto, os HDLs podem ser utilizados como veiculadores de moléculas com atividade biológica no meio fisiológico sem a formação de aglomerados e possível acumulação dos materiais no organismo, fato esse já bem difundido na literatura.^{36,37,37,54}

Tabela 23: Valores de potencial Zeta do material Mg_2AlLi em relação ao meio iônico.

Meio Iônico	Potential Zeta (mV) pH = 6,5 Saliva	Potential Zeta (mV) pH = 1,8 Estômago	Potential Zeta (mV) pH = 7,4 PBS	Potential Zeta (mV) pH = 5,5 Lisossoma
0	+ 34,3	+ 34,3	+ 34,3	+ 34,3
0,001	+ 33,1	+ 39,7	+ 4,3	- 16,3
0,005	+ 26,4	+ 45,5	- 8,0	- 23,7
0,009	+ 18,7	+ 48,7		
0,01	+ 13,5	+ 45,6	- 14,2	- 37,2
0,05	+ 18,9	+ 47,2	- 18,0	- 40,7
0,1	+ 16,1	+ 46,6	- 32,8	- 34,6
0,2	- 2,6	a)		
0,3	- 7,0			
0,4	- 10,7			
0,5	- 10,9	+ 6,1	- 21,8	- 44,1
0,9	- 25,7	- 16,0		

a) não foi possível fazer a medida, limitação do aparelho.

Figura 51. Valores de Potencial Zeta do material Mg_2Al_1Lip em relação ao meio iônico.

IV.3.3. Ensaio biológico com o corante Sulforodamina B

A seguir, será mostrado o efeito do Ácido Lipóico (HLip) e do material Mg_2Al_1Lip em presença da linhagem celular de melanoma A-375 (item IX.2) através do ensaio biológico com o corante SRB. A **Tabela 24** mostra a porcentagem de células sobreviventes em quatro tempos (24 h, 48 h, 72 h e 96 h) de incubação, utilizando seis concentrações diferentes das amostras usadas no tratamento. Dessa forma, como descrito no item III.5.1, a % O.D controle para cada tempo é igual a 125,3 % (24 h), 128,2 % (48 h), 120,5 % (72 h) e 125,9 % (96 h). As Figuras 52 e 53 mostram as curvas de dose-resposta para o HLip e HDL-Lip. O ácido lipóico é uma substância antioxidante amplamente citada no tratamento de vários tipos de câncer através da indução de

apoptose.^{171,172} De acordo com os dados descritos na **Tabela 24**, para todos os tempos e concentrações, o tratamento com as duas amostras diminuiu o crescimento das células de melanoma em aproximadamente 20 %.

A análise estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) não mostrou diferença estatística quanto a aplicação de diferentes doses e tempos de tratamento para o HLip e HDLLip. Por isso, a ação quanto a inibição das células da linhagem A-375 utilizando o ácido lipóico livre e intercalado na menor concentração (5 µg/mL) após 1 dia de tratamento foi o mesmo encontrado para a concentração de 100 µg/mL após 4 dias para o Ensaio biológico com o corante SRB.

Tabela 24: Resposta celular em função do tempo de incubação do tratamento obtida através do Ensaio com o corante SRB, (1) HLip e (2) HDL-Lip.

(1) HLip: % células sobreviventes

$\mu\text{g/mL}$ tempo	5	10	20	50	80	100
	HLip					
24 h	79,8	78,2	78,7	80,1	79,3	67,0
48 h	82,1	65,4	74,5	74,9	77,5	71,9
72h	84,5	83,2	82,4	77,2	83,9	82,5
96 h	81,5	80,6	81,5	74,4	76,6	75,9

(2) LDHLip: % células sobreviventes

$\mu\text{g/mL}$ tempo	5	10	20	50	80	100
	LDHLip					
24 h	84,3	80,8	79,5	78,9	80,3	79,5
48 h	65,3	78,2	79,0	77,5	78,0	78,3
72h	81,2	87,0	83,1	85,0	76,8	82,8
96 h	83,6	78,4	80,4	79,5	74,8	77,4

Figura 52. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HLip após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua.

Figura 53. Curva de dose-resposta para a linha celular A-375 incubada com seis concentrações de HDL-Lip após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, exposição contínua. Análise estatística através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Índices iguais não apresentam valores estatisticamente diferentes.

V. CONCLUSÕES

O estudo sistemático relacionado aos parâmetros de síntese empregados na intercalação dos íons da pravastatina permitiu inferir que a utilização de diferentes proporções molares Pravastatina/ Al^{3+} não alteraram significativamente na quantidade de orgânico presente no material. Porém, o $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ (sintetizado na proporção 1:1) mostrou ser o material mais ordenado quanto ao empilhamento das lamelas. Os materiais $\text{Mg}_2\text{Al1Prav.x}$ submetidos a tratamento pós-síntese (x = Refluxo, Reator de Micro-ondas e Reator Hidrotérmico) não sofreram variação quanto à quantidade de orgânico presente no material, quando comparados com a amostra não tratada ($\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$). O tratamento *via* Reator de Micro-ondas favoreceu o aumento da cristalinidade do material. A utilização da composição lamelar $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ promoveu uma maior cristalinidade do material e aumento na quantidade de orgânico em relação ao material Mg_2AlCl . Todas as amostras apresentaram uma melhora relativamente pequena na estabilidade térmica da Pravastatina se comparadas à molécula livre. As medidas de potencial Zeta do material $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ nos meios biológicos simulados são revertidas, porém a sua biodisponibilidade no organismo pode não ser afetada uma vez que as partículas não sofreram aglomeração. O material $\text{Mg}_2\text{Al1Prav}$ diminuiu o crescimento celular da linhagem de melanoma A-375 em até 20 %. A utilização da menor concentração de tratamento 5 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h foi suficiente para resultar no mesmo efeito encontrado após 96 h de tratamento a concentrações elevadas (100 $\mu\text{g/mL}$).

Os experimentos relacionados à intercalação dos íons coumarato mostraram que o excesso utilizado na síntese influenciou na cristalinidade e na quantidade de orgânico no material isolado ocorrendo a saturação no $\text{Mg}_2\text{Al3Cou}$. Dessa forma, o material mais organizado foi o $\text{Mg}_2\text{Al5Cou}$. O emprego de diferente composição lamelar $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ promoveu um aumento na

cristalinidade do material e aumento na quantidade de orgânico. A estabilidade térmica dos íons confinados nas camadas dos HDLs foi favorecida apenas para o material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ quando comparado aos HDLs-MgAl devido provavelmente à enxertia dos íons coumarato no HDL-ZnAl. A proposta de enxertia é sustentada pelos resultados de análise elementar e análise térmica. A suspensão aquosa do material $\text{Zn}_2\text{Al}_3\text{Cou}$ apresenta estabilidade moderada frente à aglomeração considerando-se o valor de potencial Zeta + 39,6 mV.

No caso dos sistemas de HDL-Lip, foram observados que o excesso de íons lipoato utilizado na síntese, assim como o tempo de agitação pós-síntese (1 h e 24 h), conduziram a resultados semelhantes em relação à cristalinidade e quantidade de orgânico no material isolado. A inserção dos íons lipoato nas camadas dos HDLs promoveu uma maior estabilidade térmica quando comparada a da espécie livre. A suspensão aquosa do material $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Lip}$ apresenta estabilidade moderada frente à aglomeração considerando-se o valor de potencial Zeta igual a + 34,3 mV. O íon lipoato confinado no material $\text{Mg}_2\text{Al}_3\text{Lip}$ resultou na mesma ação anticancerígena na utilização da menor concentração de tratamento 5 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h quanto após 96 h de tratamento a concentrações elevadas (100 $\mu\text{g/mL}$).

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

O projeto de Doutorado desenvolvido deu continuidade ao estudo referente à intercalação de moléculas com atividade biológica nas matrizes biocompatíveis de Hidróxidos Duplos Lamelares iniciado no Mestrado. A partir dos resultados obtidos é possível a proposição de vários outros estudos, ainda dentro do tema de preparação dos materiais híbridos de HDLs, nos quais parâmetros como composição lamelar, tratamento pós-síntese e tamanho de partículas podem ser manipulados de acordo a aplicação desejada. Além disso, explorar a estabilidade em suspensões aquosas e sistemas biológicos dos HDLs com diferentes composições e tamanhos.

VII. REFERÊNCIAS

1. Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q., Yu, A. B., Chem. Eng. Sci., 61:1027-1040, 2006.
2. Sun, B., Ranganathan, B., Feng, S. S., Biomater., 29: 475-486, 2008.
3. Chatterjee, D. K., Zhang, Y., Sci. Technol. Adv. Mater., 8: 131-133, 2007.
4. Jain, K. K., Trends Biotechnol., 24: 143-145, 2006.
5. Choy, J. H., Jung, J. S., Oh, J. M., Park, M., Jeong, J., Kang, Y. K., Han, O., J., Biomater., 25: 3059-3064, 2004.
6. Love, S. A., Jones, M. A. M., Thompson, J. W., Lin, Y. S., Haynes, C. L., Rev. Adv., 5: 181 205, 2012.
7. Yildirimer, L., Thanh., N. T. K., Loizidou, M., Seifalian, A. M., Nano Today, 6: 585-607, 2011.
8. Richards, D., Ivanisevic, A., Chem. Soc. Rev., 41: 2052-2060, 2012.
9. Sanvicens, N., Marco, M. P., Trends Biotechnol., 26: 425-433, 2008.
10. Cavani, F., Trifiro, F., Vaccari, A., Catal. Today, 11: 173-301, 1991.
11. Vaccari, A., Catal. Today, 41: 53-71, 1998.
12. Vaccari, A., Appl. Clay Sci., 10: 1-3, 1995.
13. Crepaldi, E. L., Valim, J. B., Quím. Nova, 21: 300-311, 1998.
14. Pinnavaia, T. J., Mater. Chem., 245: 283-300, 1995.
15. Allmann, R., Acta Cryst., 24: 972-977, 1968.
16. Serna, C. J., White, J. L., Hem, S. L., J. Pharm. Sci-US. 67: 324-327, 1978.
17. Peterson, C. L., Perry, D. L., Masood, H., Lin, H., White, J. L., Hem, S. L., Fritsch, C., Haeusler, F., Pharm. Res., 10: 998-1004, 1993.
18. Cosnier, S., Mousty, C., Gondran, C., Lepellec, A., Mater. Sc. & Eng. C-Biomimetic and Supramolecular Syst., 26: 442-447, 2006.
19. Oh, J. M., Park, M., Kim, S. T., Jung, J. Y., Kang, Y. G., Choy, J. H., J. Phys. Chem. Solids, 67: 1024-1027, 2006.
20. Zhang, H., Zou, K., Guo, S. H., Duan, X., J. Solid State Chem., 179: 1792-1801, 2006.
21. Choy, J. H., Sc. Tech. Hybrid Mater. Solid State Phenom., 111, 2006.
22. Li, B. X., He, J, Evans, D. G., Duan, X., Appl. Clay Sci., 27: 199-207, 2004.

23. Xu, Z. P., Walker, T. L., Liu, K. L., Cooper, H. M., Lu, G. Q. M., Bartlett, P. F., *Inter. J. Nanomed.*, 2: 163–174, 2007.
24. Choi, S. J., Oh, J. M., Park, T., Choy, J. H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7: 4017-4020, 2007.
25. Choi, S. J., Oh, J. M., Choy, J. H., *J. Mater. Chem.*, 18: 615-620, 2008.
26. Trifirò, F., Vaccari, A., Hydrotalcite-like Anionic Clays (Layered Double Hydroxides). In: G. Alberti e T. Bein (eds). "Solid State Supramolecular Chemistry: Two and Three-Dimensional Inorganic Networks", Cap. 8: 251-291, 1996.
27. Braterman, P. S., Xu, Z. P., Yarberry, F., Layered Double Hydroxides (LDHs). In: S. M. Auerbach, K. A. Carrado e P. K. Dutta (eds). "Handbook of Layered Materials", New York, Marcle Dekker, Inc., Cap. 8: 373-474, 2004.
28. Khan, A. I.; Lei, L. X.; Norquist, A. J.; O'Hare, D.; *Chem. Comm.*, 22: 2342-2343, 2001.
29. Mohanambe, L.; Vasudevan, S.; *J. Phys. Chem. B.* 109: 15651-15658, 2005.
30. Tamaro, L.; Costantino, U.; Bolognese, A.; Sammartino, G.; Marenzi, G.; Calignano, A.; Tete, S.; Mastrangelo, F.; Califano, L.; Vittoria, V.; *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 29: 417-423, 2007.
31. Xue, Y. H.; Zhang, R.; Sun, X. Y.; Wang, S. L.; *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19: 1197-1202, 2008.
32. Ni, Z. M.; Xia, S. J.; Wang, L. G.; Xing, F. F.; Pan, G. X.; Hu, J.; *Chem. J. Chinese U.*, 28: 1214-1219, 2007.
33. Cunha, V. R. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
34. Bonina, F. P.; Giannossi, M. L.; Medici, L.; Puglia, C.; Summa, V.; Tateo, F.; *Appl. Clay Sci.*, 41: 165-171, 2008.
35. Cunha, V. R. R., Tronto, J., Ferreira, A. M. C., Valim, J. B., Constantino, V. R. L., *Quím. Nova*, 33: 159-171, 2010.
36. Xu, Z. P., Niebert, M., Porazik, K., Walker, T. L., Cooper, H. M., Middelberg, A. P., Gray, P. P., Bartlett, P. F., Lu, G. Q., *J. Control. Release*, 130: 86-94, 2008.
37. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; Portier, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 1399-1400, 1999.
38. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; *J. Mater. Chem.*, 11: 1671-1674, 2001.
39. Oh, J. M.; Kwak, S. Y.; Choy, J. H.; *J. Phys. Chem. Solids*, 67: 1028-1031, 2006.
40. Tyner, K. M.; Roberson, M. S.; Berghorn, K. A.; Li, L.; Gilmour, Jr, R. F.; Batt, C. A.; Giannelis, E. P.; *J. Control. Release*, 100: 399-409, 2004.

41. Thyveetil, M. A.; Coveney, P. V.; Greenwell, H. C.; Suter, J. L.; J. Am. Chem. Soc., 130: 4742-4756, 2008.
42. O'Hare, D. M., Drug delivery system comprising a drug intercalated between a Layered Double Hydroxide, WO 0247729, 2002.
43. O'Hare, D. M., Drug Delivery System, US pat. 20040052849, 2004.
44. Park, T., Choy, J. H., Oh, J. M., Jung, J. S., Injectable drug carrier comprising Layered Double Hydroxide, WO 2006/129893, 2006.
45. Marenzi, G., Bolognese, A., Califano, L., Calignano, A., Costantino, U., Sammartino, G., Vittoria, V., Controlled-delivery system of pharmacologically active substances, preparation process and medical use thereof, WO 2007/010584, 2007.
46. Stockel; R. F., Bisphosphonates inorganic carriers, US pat. 20060013893, 2006.
47. Slaghek, T. M., Batenburg, L. F., Fischer, H. R., Preparation for treatment of mineral deficiency, WO 2007/067043, 2007.
48. Li, A., Qin, L., Zhu, D., Zhu, R., Sun, J.; Wang, S., Biomater., 31: 748-756, 2010.
49. Xu, Z. P., Zeng, H. C., J. Phys. Chem. B, 105: 1743-1749, 2001.
50. Arezoo, C., Ellen, Y. Y., Mindy, T., Brain Res., 933: 60-65, 2002.
51. Ambroggi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L.; Int. J. Pharm., 220: 23-32, 2001.
52. Tronto, J.; Crepaldi, E. L.; Pavan, P. C.; Paula, C. C.; Valim, J. B.; Mol. Cryst. Liq. Cryst., 356: 227-238, 2001.
53. Ambroggi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Nocchetti, M.; Perioli, L.; J. Pharm. Sci., 92: 1407-1418, 2003.
54. Nakayama, H.; Takeshita, K.; Tsuhako M.; J. Pharm. Sci., 92: 2419-2426, 2003.
55. Tronto, J.; Reis, M. J.; Silvério, F.; Balbo, V. R.; Marchetti, J. M.; Valim, J. B.; J. Phys. Chem. Solids, 65: 475-480, 2004.
56. Bin Hussein, M. Z.; Long, C. W.; Mater. Chem. Phys., 85: 427-431, 2004.
57. Del Arco, M.; Cebadera, E.; Gutierrez, S.; Martín, C.; Montero, M. J.; Rives, V.; Rocha, J.; Sevilla, M. A.; J. Pharm. Sci., 93: 1649-1658, 2004.
58. Del Arco, M.; Gutiérrez, S.; Martín, C.; Rives, V.; Rocha, J.; J. Solid State Chem., 177: 3954-3962, 2004.
59. Choy, J. H.; Jung, J. S.; Oh, J. M.; Park, M.; Jeong, J.; Kang, Y. K.; Han, O. J.; Biomater., 25: 3059-3064, 2004.

60. Dupin, G. C.; Martinez, H.; Guimon, C.; Dumitriu, E.; Fechete, I.; *Appl. Clay Sci.*, 27: 95-106, 2004.
61. Li, B. X.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X.; *Appl. Clay Sci.*, 27: 199-207, 2004.
62. Li, B.; He, J.; Evans, D. V.; Duan, X.; *Int. J. Pharm.*, 287: 89-95, 2004.
63. Tyner, K. M.; Schiffman, S. R.; Giannelis, E. P.; *J. Controlled Release*, 95: 501-514, 2004.
64. Wei, M.; Shi, S. X.; Wang, J.; Li, Y.; Duan, X.; *J. Solid State Chem.*, 177: 2534-2541, 2004.
65. Gordijo, C. R.; Barbosa, C. A. S.; Ferreira, A. M. C.; Constantino, V. R. L.; Silva, D. O.; *J. Pharm. Sci.*, 94: 1135-1148, 2005.
66. Schoubben, A.; Blasi, P.; Giovagnoli, S.; Nocchetti, M.; Ricci, M.; Perioli, L.; Rossi, C.; *Pharm. Res.*, 23: 604-613, 2005.
67. Wang, Z.; Wang, B.; Gao, L.; Xu, L.; *J. Solid State Chem.*, 178: 736-741, 2005.
68. Li, W. Z.; Lu, J.; Chen, J. S.; Li, G. D.; Jiang, Y. S.; Li, L. S.; Huang, B. Q.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81: 89-93, 2006.
69. Yang, Q. Z.; Yang, J.; Zhang, C. K.; *Int. J. Pharm.*, 326: 148-152, 2006.
70. Oh, J. M.; Choi, S. J.; Kim, S. T.; Choy, J. H.; *Bioconjugate Chem.*, 17: 1411-1417, 2006.
71. Li, S. P.; *Colloid Surf. A.*, 290: 56-61, 2006.
72. Del Arco, M.; Fernandez, A.; Martin, C.; Rives, V.; *Appl. Clay Sci.*, 36: 133-140, 2007.
73. Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D. F.; *Int. J. Pharm.*, 332: 176-184, 2007.
74. Yang, J. H.; Han, Y. S.; Park, M.; Park, T.; Hwang, S. J.; Choy, J. H.; *Chem. Mater.*, 19: 2679-2685, 2007.
75. Hou, W. G.; Jin, Z. L.; *Colloid Polym. Sci.*, 285: 1449-1454, 2007.
76. Ambroggi, V.; Perioli, L.; Marmottini, F.; Rossi, C.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66: 253-259, 2007.
77. Gu, Z.; Thomas, A. C.; Xu, Z. P.; Campbell, L. H.; Lu, G. Q. M.; *Chem. Mater.*, 20: 3715-3722, 2008.
78. Choi, S. J.; Oh, J. M.; Choy, J. H.; *J. Phys. Chem. Solids*, 69: 1528-1532, 2008.
79. Gu, Z.; Thomas, A. C.; Xu, Z. P.; Campbell, J. H.; Lu, G. Q.; *Chem. Mater.*, 20: 3715-3722, 2008.
80. Del Arco, M.; Fernandez, A.; Martin, C.; Sayalero, M. L.; Rives, V.; *Clay Miner.*, 43: 255-265, 2008.

81. Yang-Hong, L., Jie, X., Shao-Jie, Z., Dong-Xiang, L., Bin, Z., Wan-Duo, H., *Chin. J. Inorg. Chem.*, 25: 1-5, 2009.
82. Ambroggi, V., Perioli, L., Ciarnelli, V., Nocchetti, M., Rossi, C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 73: 285-291, 2009.
83. Tammaro, L., Costantino, U., Nocchetti, M., Vitoria, V., *Appl. Clay Sci.*, 43: 350-356, 2009.
84. Zhang, H., Shao-Huan, G., Zou, K., Duan, X., *Mater. Res. Bull.*, 44: 1062-1069, 2009.
85. Carriazo, D., del Arco, M., Martín, C., Ramos, C., Rives, V., *Micropor. Mesopor. Mater.*, 130: 229-238, 2010.
86. Gasser, M. S., *Colloid Surface B.*, 73: 103-109, 2009.
87. Guoling, G., Hongping, X., Jianping, L., *Acta Chim. Sinica*, 67: 65-82, 2009.
88. Gunavam, P., Xu, R., *Chem. Mater.*, 21: 781-783, 2009.
89. Li, F., Jin, L., Han, J., Wei, M., Li, C., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48: 5590-5597, 2009.
90. Kameshima, Y., Sasaki, H., Isobe, T., Nakajima, A., Okada, K., *Int. J. Pharmaceut.*, 381: 34-39, 2009.
91. Khan, A. I., Ragavan, A., Fong, B., Markland, C., O'Brien, M., Dunbar, T. G., Williams, G. R., O'Hare, D., 48: 10196-10205, 2009.
92. Zhang, J. P., Wang, Q., Xie, X. L., Xun, L., Wang, A. Q., *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 92B: 205-214, 2010.
93. Panda, H. S., Srivastava, R., Bahadur, D., *J. Phys. Chem. B.*, 113: 15090-15100, 2010.
94. Li, Y., Liu, D., Ai, H., Chang, Q., Liu, D., Xia, Y., Liu, S., Peng, N., Xi, Z., Yang, X., *Nanotechnol.*, 21: 1-13, 2010.
95. Qin, L., Xue, M., Wang, W., Zhu, R., Wang, S., Sun, J., Zhang, R., Sun, X., *Int. J. Pharmaceut.*, 388: 223-230, 2010.
96. Ryu, S. J., Jung, H., Oh, J. M., Lee, J. K., Choy, J. H., *J. Phys. Chem. Solids*, 71: 685-688, 2010.
97. Zhang, H., Xu, Z. P., Lu, G. Q., Smith, S. C., *J. Phys. Chem. C.*, 114: 12618-12629, 2010.
98. Berber, M. R., Hafez, I. H., Minagawa, K., Mori, T., Tanaka, M., *Pharm. Res.*, 27: 2394-2401, 2010.
99. Sillion, M., Hritcu, D., Jaba, I. M., Tamba, B., Ionescu, D., Mungiu, O. C., Popa, I. M., *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 21: 3009-3018, 2010.
100. Dong, L., Li, Y., Hou, W.G., Liu, S.J., *J. Sol. State Chem.*, 183: 1811-1816, 2010.

101. Gu, Z., Rolfe, B. E., Xu, Z. P., Thomas, A. C., Campbell, J. H., Lu, G. Q. M., *Biomater.*, 31: 5455-5462, 2010.
102. Kong, X., Shi, S., Han, J., Zhu, F., Wei, M., Duan, X., *Chem. Eng. J.*, 157: 598-604, 2010.
103. Ay, A.N., Konuk, D., Karan, B.Z., *Mater. Sci. Eng.*, 31:851–857, 2011.
104. Cao, F., Wang, Y., Ping, Q., Liao, Z., *Int. J. Pharm.*, 404: 250-256, 2011.
105. Perioli, L., Ambroggi, V., di Nauta, L., Nocchetti, M., Rossi, C., *Appl. Clay Sci.*, 51: 407-413, 2011.
106. Ding, P., Tang, S., Li, Z., *Adv. Mater. Res.*, 152-153: 556-559, 2011.
107. Wei, Y., Gao, Y., Xie, Q., Zhang, G., Fu, W., *Chromat.*, 73: 97-102, 2011.
108. Bugatti, V., Gorrasi, G., Montanari, F., Nocchetti, M., Tammaro, L., Vittoria, V., *Appl. Clay Sci.*, 52: 34-40, 2011.
109. Chakraborti, M., Jackson, J. K., Plackett, D., Brunette, D. M., Burt, H. M., *Int. J. Pharm.*, 416: 305-313, 2011.
110. Chakraborty, M., Dasgupta, S., Soundrapandian, C., Chakraborty, J., Ghosh, S., Mitra, M. K., Basu, D., *J. Solid State Chem.*, 184: 2439-2445, 2011.
111. DeLeon, V. H., Nguyen, T. D., Nar, M., D'Souza, N. A., Golden, T. D., *Mater. Chem. Phys.*, 132: 409-415, 2011.
112. Du, B., Luo, W., Wang, R., *Adv. Mater. Res.*, 189-193: 2448-2455, 2011.
113. Gu, Z., Rolfe, B. E., Thomas, A. C., Campbell, J.H., Lu, G. Q. M., Xu, Z. P., *Biomater.*, 32: 7234-7240, 2011.
114. Ha, J. K., Xanthos, M., *Int. J. Pharm.*, 414: 321-331, 2011.
115. Huang, W., Zhang, H., Pan, D., *Bioengineering, Food, and Natural Products*, 57: 1936-1946, 2011.
116. Kovanda, F., Maryšková, Z., Kovář, P., *J. Solid State Chem.*, 184: 3329-3335, 2011.
117. Oh, J. M., Park, C. B., Choy, J. H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 11: 1632-1635, 2011.
118. Perioli, L., Posati, T., Nocchetti, M., Bellezza, F., Costantino, U., Cipiciani, A., *Appl. Clay Sci.*, 53: 374-378, 2011.
119. Perioli, L., Ambroggi, V., Nocchetti, M., Sisani, M., Pagano, C., *Appl. Clay Sci.*, 53: 696-703, 2011.
120. Xiao, R., Wang, W., Pan, L., Zhu, R., Yu, Y., Li, H., Liu, H., Wang, S. L., *J. Mater. Sci.*, 46: 2635-2643, 2011.

121. Xu, Z. P., Gu, Z., Cheng, X., Rasoul, F., Whittaker, A. K., Lu, G. Q. M., *J. Nanopart. Res.*, 13: 1253-1264, 2011.
122. Chakraborty, M., Dasgupta, S., Sengupta, S., Chakraborty, J., Ghosh, S., Ghosh, J., Mitra, M. K., Mishra, A., Mandal, T. K., Basu, D., *Ceram. Int.*, 38: 941-949, 2012.
123. Román, M. S. S., Holgado, M. J., Salinas, B., Rives, V., *Appl. Clay Sci.*, 55: 158-163, 2012.
124. Cunha, V. R. R., Petersen, P. A. D., Gonçalves, M. B., Petrilli, H. M., Taviot-Gueho, C., Leroux, F., Temperini, M. L. A., Constantino, V. R. L., *Chem. Mater.*, 24: 1415-1425, 2012.
125. Choi, S. J., Oh, J. M., Choy, J. H., *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 117: 543-549, 2009.
126. Choi, S. J., Choy, J. H., *Nanomed.*, 6: 803-814, 2011.
127. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, J. Wiley: New York, 1990.
128. Choy, J. H., Choi, S. J., Oh, J. M., Park, T., *Appl. Clay Sci.*, 36: 122-132, 2007.
129. Cunha, V. R. R., Guilherme, V. A., de Paula, E., de Araujo, D. R., Constantino, V. R. L., (P-103) XVIII International Conference on Bioencapsulation – Porto – Portugal, October 1-2, 2010.
130. Del Arco, M., Cebadera, E., Gutiérrez, S., Martín, C., Montero, M. J., Rives, V., Rocha, J., Sevilla, M. A., *J. Pharm. Sci.*, 93: 1649-1658, 2004.
131. Choi, S. J., Oh, J. M., Choy, J. H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 10: 2913-2916, 2010.
132. Oh, J. M., Choi, S. J., Lee, G. E., Kim, J. E., Choy, J. H., *Chem. Asian J.*, 4: 67-73, 2009.
133. Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y., *J. Environm. Sci. Health Part A*, 43: 278-284, 2008.
134. Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Marechal, E. M., Boczkowski, J., Lacroix, G., Hoet, P., *Particle Fibre Toxicol.*, 6: 1-12, 2009.
135. Baek, M., Kim, I. S., Yu, J., Chung, H. E., Choy, J. H., Choi, S. J., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 11: 1803-1806, 2011.
136. Choi, S. J., Oh, J. M., Choy, J. H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8: 5297-5301, 2008.
137. Bremmell, K. E., Jameson, G. J., Biggs, S., *Colloid Surfaces*, 146, 75-87, 1999.
138. Xu, Z. P., Jin, Y., Liu, S., Hao, Z. P., Lu, G. Q. M., *J. Colloid Interface Sci.*, 326, 522-529, 2008.
139. Lagaly, G., Mecking, O., Penner, D., *Colloid Polym. Sci.*, 279: 1090-1096, 2001.
140. Choi, S. J., Oh, J. M., Choy, J. H., *J. Inorg. Biochem.*, 103: 463-471, 2009.
141. Huang, H. C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K., Rege, K., *J. Control. Release*, 15: 344-357, 2011.

142. Martín-Islán, A. P., Cruzado, M. C., Asensio, R., Sainz-Díaz, C. I., *J. Phys. Chem. B*, 110: 26148-26159, 2006.
143. Manzoni, M., Rollini, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58: 555-564, 2002.
144. Campo, V. L., Carvalho, I., *Quím. Nova*, 30: 425-430, 2007.
145. Sleijfer, S., van der Gaast, A., Planting, A. S. T., Stoter, G., Verweij, J., *Eur. J. Cancer*, 41: 516-522, 2005.
146. Freeman, S. R., Drake, A. L., Heilig, L. F., Graber, M., McNealy, K., Schilling, L. M., Dellavalle, R. P., *J. Natl. Cancer I.*, 98: 1538-1546, 2006.
147. Minichsdorfer, C., Hohenegger, M., *Br. J. Pharmacol.*, 157: 1278-1290, 2009.
- 148 (a) Triscari, J., O'Donnell, D., Zinny, M., Pan, H. Y. J., *Clin. Pharmacol.*, 35, 142-144, 1995. (b) Jacobsen, W., Kirchner, G., Hallensleben, K., Mancinelli, L., Deters, M., Hackbarth, I., Benet, L. Z., Sewing, K. F., Christians, U., *Drug Metab. Dispos.*, 27, 173-179, 1999. (c) Hatanaka, T., *Clin. Pharmacokinet.*, 39, 397-412, 2000.
149. (a) Kumar, M., Talwar, N., Raghuvanshi, R. S., Rampal, A. K., *Controlled Release Drug Delivery System of Pravastatin*, U.S. Patent 2005/0089572 A1. (b) Habib, Y. S., Ullah, I., Jain, N. B., *Enteric Coated Pravastatin Bead Formulation*. WO 00/33821.
150. Moghadasian, M. H., *Life Sci.*, 65, 1329-1337, 1999.
151. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., *Trends Plant Sci.*, 2: 1360-1385, 1997.
152. Queimada, A. J., Mota, F. L., Pinho, S. P., Macedo, E. A., *J. Phys. Chem. B*, 113: 3469-3476, 2009.
153. Biswick, T., Park, D. H., Shul, Y. G., Choy, J. H., *J. Phys. Chem. Solids*, 4: 647-649, 2010.
154. Ozkorucuklu, S. P., Beltran, J. L., Fonrodona, G., Barron, D., Alsancak, G., Barbosa, J., *J. Chem. Eng. Data* 54, 807-815, 2009.
155. Fergunson, L. R., Zhu, S. T., Harris, P. J., *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 585-693, 2005.
156. An, S. M., Koh, J. S., Boo, Y. C., *Phytotherapy Research*, 24: 1175-1180, 2010.
157. Shin, K. Y., Lee, G. H., Park, C. H., Kim, H. J., Park, S. H., Kim, S., Kim, H. S., Lee, K. S., Wom, B. Y., Lee, H. G., Choi, J. H., Suh, Y. H., *J Neurosci. Research*, 85: 2500-2511, 2007.
158. Zang, L. Y., Cosma, G., Gardner, H., Shi, X., Castranova, V., Vallyathan, V., *A. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279: C954-C960, 2000.
159. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 727-747, 2004.

160. Scalbert, A., Williamson, G., *J. Nutr.*, 130: 2073S-2085S, 2000.
161. Biswick, T., Park, D. H., Shul, Y. G., Choy, J. H., *J. Phys. Chem. Solids*, 71: 647-649, 2010.
162. Moyano, M. A., Broussalis, A. M., Segall, A. I., *J. Therm. Anal. Calorim.*, 99: 631-637, 2010.
163. Carlson, D. A., Smith, A. R., Fischer, S. J., Young, K. L., Packer, L., *Alternative Med. Rev.*, 12: 343-351, 2007.
164. Carlson, D. A., Young, K. L., Fischer, S. J., Ulrich, H., Packer & Patel, cap. 10: 235-270, 2008.
- 165 Maeda, H., Onodera, T., Nakayama, H., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 68: 201-206, 2010.
166. Guibu, S., Lauzier, B., Delemasure, S., Amoureux, S., Sicard, P., Vergely, C., Muresan, A., Mogosan, C., Rochette, L., *Mol. Cell Biochem.*, 320: 141-148, 2009.
167. Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Kursu, V. A. S., Hiltunen, J. K., Dieckmann, C. L., *J. Bio. Chem.*, 284: 23234-23242, 2009.
168. Durrani, A. I., Schwartz, H., Nagi, M., Sontag, G., *Food Chem.*, 120: 1143-1148, 2010.
169. Cronan, J. E., Fearnley, I. M., Walker, J. E., *Federation Euro. Biochem. Soc.*, 579: 4892-4896, 2005.
170. Zhang, S. J., Ge, F., Guo, D. W., Hu, W. X., Liu, H. Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20: 3078-3083, 2010.
171. Kim, J. H., Sim, G. S., Bae, J. T., Oh, J. Y., Lee, G. S., Lee, D. H., Lee, B. C., Pyo, H. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, 60: 863-870, 2008.
172. Lu, C., Kim, B. M., Chai, K. Y., *Euro. J. Med. Chem.*, 46: 5184-5188, 2011.
173. Dozio, E., Ruscica, M., Passafaro, L., Dogliotti, G., Steffani, L., Pagani, A., Demartini, G., Esposti, D., Fraschini, F., Magni, P., *Euro. J. Pharm.*, 641: 29-34, 2010.
174. Cunha, V. R. R., Constantino, V. R. L., Ando, R. A., *Vibrat. Spectr. (Print)*, 58: 139-145, 2012.
175. Brett, C. M. A., Muresan, I., *Engin. Mater.*, 230-232: 459-462, 2002.
176. Ghazal, H. S., Dyas, A. M., Ford, J. L., Hutcheon, G. A., *Int. J. Pharm.*, 366: 117-123, 2009.
177. Stopforth, J. D., Skandamis, P. N., Ashton, L. V., Geornaras, I., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., Sofos, J. N., *Appl. Environm. Microbiol.*, 72: 672-679, 2006.

178. Nkansah, M. K., Thakral, D., Shapiro, E. M., *Magnetic Resonance Med.*, 65: 1776-1785, 2011.
179. Jaafari, M. R., Foldvari, M., *J. Pharm. Sci.*, 91: 396-404, 2002.
180. Foldvari, M., Badea, I., Wettig, S., Baboolal, D., Kumar, P., Creagh, A.L., Haynes, C.A, *Mol. Pharm.*, 7: 751-762, 2010.
181. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., *J. Natio Cancer Inst.*, 83: 757-766, 1991.
182. Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., Lee, C. C., *Methods*, 42: 377-387, 2007.
183. www.atcc.org, acessado em outubro de 2012.
184. Whittingham, M.; Jacobson, A. *Intercalation Chemistry*; Academic press: New-York, 1982.
185. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B*, 37: 785-789, 1988; (b) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 104: 1040-1046, 1996.
186. Frisch M. J.; et al. *Gaussian 03, Revision A.1*, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2003.
187. Sato, S.; Furukawa, Y. *J. Antibiot.*, 41: 1265-1267, 1988.
188. Casabianca, L. B.; de Dios, A. C. *J. Chem. Phys.*, 128: 052201-10, 2008.
189. (a) Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.*, 112: 8251-8260, 1990; (b) Cheeseman, J. R.; Trucks, G. W.; Keith, T. A.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.*, 104: 5497-5509, 1996.
190. Halls, M. D; Schlegel, H. B. *J. Chem. Phys.*, 111:8819- 8824, 1999.
191. Andersson, M. P; Uvdal, P., *J. Phys. Chem. A*, 109: 2937-2941, 2005.
192. Keri, V.; Arvai, E. N.; Czovek, Z.; Kovacsne-Mezei, A.; Katai, I. V.; Racz, C. N., *Methods of making Pravastatin sodium*, Patent U.S. 2006 194984A1.
193. Bacher, M.; Baumann, K.; Knapp, H.; Steck, A.; Teibl, S. *Magn. Reson. Chem.*, 47:71–83, 2009.
194. López, T., Bosch. P., Asomoza, M., Gómez, R., Ramos, E., *Mater. Lett.*, 31: 311-316, 1997.
195. Klopogge, J. T.; Hickey, L.; Frost, R. L.; *J. Raman Spectrosc.*, 35: 967-974, 2004.
196. Dollish, F. R.; Fateley, W. G.; Bentley, F. F. *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds* ; John Wiley & Sons: New York, 1974.

197. Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry ; John Wiley & Sons: New York, 1997.
198. Berber, M. R., Adv. Mater. Develop. Perform., 6: 133-137, 2012.
199. Wang, L., Li, B., Yang, M., Chen, C., Liu, Y., J. Colloid Interface Sci., 356: 519-525, 2011.
200. Benito, P., Labajos, F. M., Rives, V., Pure Appl. Chem., 81: 1459-1471, 2009.
201. Bauer, J., Behrens, P., Speckbacher, M., Langhals, H., Adv. Funct. Mater., 13: 241-248, 2003.
202. Pisson, J., Morel-Desrosiers, N., Morel, J. P., de Roy, A., Leroux, F., Taviot-Gueho, C., Malfreyt, P., Chem. Mater., 23: 1482-1490, 2011.
203. Silva, L. F. S., Demets, G. J. F., Taviot-Guého, C., Leroux, F., Valim, J. B., Chem. Mater., 23: 1350-1352, 2011.
204. Costantino, U., Coletti, N., Nocchetti, M., Langmuir, 15: 4454-4460, 1999.
205. Li, C., Wang, G., Evans, D. G., Duan, X., J. Solid State Chem., 177: 4569-4575, 2004.
206. Xu, Z.P., Stevenson, G., Lu, C.Q., Lu, G.Q.M., J. Phys. Chem. B., 110: 16923-16929, 2006.
207. Delgado, A. V., Caballero, F. G., Hunter, R. J., Koopal, L. K., Lyklema, J., Pure Appl. Chem., 77: 1753-1805, 2005.
208. Berg, J. C., An Introduction to interfaces & colloids: The bridge to nanoscience, World Scientific, cap. VI.
209. Sun, R., Fang, J., Rowlands, P., Polymer J., 30: 289-294, 1998.
210. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 3.ed., editora: Guanabara Koogan S.A., Cap.3: 65-74, 1987.
211. Rey, F., Fornés, V., Rojo, J. M., J. Chem. Soc. Faraday Trans., 88: 2233-2238, 1992.
212. Constantino, V. R. L., Pinnavaia, T. J., Inorg. Chem., 4: 883-892, 1995.
213. Reichle, W. T., Chemetech, 16: 58-63, 1986.
214. Yun, S. K., Pinnavaia, Y. J., Chem. Mater., 7: 352-359, 1986.
215. Miyata, S., Clays Clay Miner., 28: 50-55, 1980.
216. Tsuji, M., Mao, G., Yoshida, T., Tamaura, Y., J. Mater. Res., 8: 1137-1142, 1993.
217. Belloto, M., Rebours, B., Clause, O., Lynch, J., Bazin, D., Elkaim, E., J. Phys. Chem., 100: 8535-8542, 1996.
218. Wypych, F., Satyanarayana, K. G., Clays Surfaces, 15: 425-458, 2004.

VIII. APÊNDICE (s)

VIII.1. Protocolo: Ensaio com corante Sulforodamina B

Tratamento celular

Após 24 h de incubação, as células foram tratadas adicionando-se 20 µL das soluções ou suspensões de (i) NaPrav, HLip, HDL-Cl, HDL-Prav e HDL-Lip (42,5, 85, 170, 425, 680 e 850 µg/mL) até atingir o volume final de 170 µL em seis concentrações diferentes de fármaco (5, 10, 20, 50, 80 e 100 µg/mL). O HDL-Cl é a amostra controle (não carrega nenhum fármaco). Portanto, a concentração mencionada anteriormente está relacionada ao material de HDL contendo o cloreto. Todas as diluições foram feitas partindo-se de uma solução estoque (ii) 0,4 % (m/v) de cada sistema. Portanto, foram preparadas seis soluções (1,5 mL) de concentração de fármaco igual a 42,5, 85, 170, 425, 680 e 850 µg/mL. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

(1)- Exemplo: Obtenção de uma suspensão de 170 µL a 10 µg/mL, partindo-se de 20 µL de solução de pravastatina sódica:

$$C \times V = C_f \times V_f$$

$$C \times 20 \mu\text{L} = 10 \mu\text{g/mL} \times 170 \mu\text{L}$$

$$C = 85 \mu\text{g/mL}$$

(2)- Exemplo:

i. Partindo-se da solução estoque 0,4 % (m/v) ou 4000 µg/mL (NaPrav, HLip e HDL-Cl), preparou-se 1,5 mL das seis soluções mencionadas acima:

$$C_{\text{estoque}} \times V_{\text{estoque}} = C_f \times V_f$$

$$4000 \mu\text{g/mL} \times V_{\text{estoque}} = 85 \mu\text{g/mL} \times 1,5 \text{ mL}$$

$$V_{\text{estoque}} = 32 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)}$$

$$V_{\text{total}} = 32 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)} + 1468 \mu\text{L (Água Desionizada)} = 1500 \mu\text{L}$$

ii. Partindo-se da solução estoque 0,4 % (m/v) ou 4000 µg/mL (HDL-Prav e HDL-Lip), preparou-se 1,5 mL das seis soluções mencionadas acima. A quantidade de fármaco para cada material é igual a 53,5 g/ 100 g para o HDL-Prav e 39,7 g/ 100 g para o HDL-Lip. Portanto, a concentração de fármaco na suspensão estoque é 0,214 e 0,159 % (m/v) ou 2140 e 1590 µg/mL para o HDL-Prav e HDL-Lip, respectivamente. Dessa forma, as soluções foram preparadas como mencionadas anteriormente para os sistemas NaPrav, HLip e HDL-Cl:

Exemplo:

1. HDL-Prav

$$C_{\text{estoque}} \times V_{\text{estoque}} = C_f \times V_f$$

$$2140 \mu\text{g/mL} \times V_{\text{estoque}} = 85 \mu\text{g/mL} \times 1,5 \text{ mL}$$

$$V_{\text{estoque}} = 60 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)}$$

$$V_{\text{total}} = 60 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)} + 1440 \mu\text{L (Água Desionizada)} = 1500 \mu\text{L}$$

2. HDL-Lip

$$C_{\text{estoque}} \times V_{\text{estoque}} = C_f \times V_f$$

$$1590 \mu\text{g/mL} \times V_{\text{estoque}} = 85 \mu\text{g/mL} \times 1,5 \text{ mL}$$

$$V_{\text{estoque}} = 80 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)}$$

$$V_{\text{total}} = 80 \mu\text{L}, 0,4 \% \text{ (m/v)} + 1420 \mu\text{L (Água Desionizada)} = 1500 \mu\text{L}$$

Tempo de Incubação

As placas de cultura foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 h. Em cada tempo (**Tabela 5**) foram adicionados 5 sistemas com 6 concentrações medidas em triplicata (o controle contém somente as células A-375).

Código utilizado para os diferentes tratamentos distribuídos em cada placa para o Ensaio com o Corante SRB.

5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	50 µg/mL	80 µg/mL	100 µg/mL
NaPrav: A1, A2 e A3 HLip: A4, A5 e A6 HDL-Cl: A7, A8 e A9 HDL-Prav: A10, A11 e A12 HDL-Lip: B1, B2 e B3	NaPrav: B4, B5 e B6 HLip: B7, B8 e B9 HDL-Cl: B10, B11 e B12 HDL-Prav: C1, C2 e C3 HDL-Lip: C4, C5 e C6	NaPrav: C7, C8 e C9 HLip: C10, C11 e C12 HDL-Cl: D1, D2 e D3 HDL-Prav: D4, D5 e D6 HDL-Lip: D7, D8 e D9	NaPrav: D10, D11 e D12 HLip: E1, E2 e E3 HDL-Cl: E4, E5 e E6 HDL-Prav: E7, E8 e E9 HDL-Lip: E10, E11 e E12	NaPrav: F1, F2 e F3 HLip: F4, F5 e F6 HDL-Cl: F7, F8 e F9 HDL-Prav: F10, F11 e F12 HDL-Lip: G1, G2 e G3	NaPrav: G4, G5 e G6 HLip: G7, G8 e G9 HDL-Cl: G10, G11 e G12 HDL-Prav: H1, H2 e H3 HDL-Lip: , H5 e H6
Controle H7-H9					

Exemplo para a 1ª placa: 24 h

A1 NaPrav 5	A2 NaPrav 5	A3 NaPrav 5	A4 HLip 5	A5 HLip 5	A6 HLip 5	A7 HDL-Cl 5	A8 HDL-Cl 5	A9 HDL-Cl 5	A10 HDL-Prav 5	A11 HDL-Prav 5	A12 HDL-Prav 5
B1 HDL-Lip 5	B2 HDL-Lip 5	B3 HDL-Lip 5	B4 NaPrav 10	B5 NaPrav 10	B6 NaPrav 10	B7 HLip 10	B8 HLip 10	B9 HLip 10	B10 HDL-Cl 10	B11 HDL-Cl 10	B12 HDL-Cl 10
C1 HDL-Prav 10	C2 HDL-Prav 10	C3 HDL-Prav 10	C4 HDL-Lip 10	C5 HDL-Lip 10	C6 HDL-Lip 10	C7 NaPrav 20	C8 NaPrav 20	C9 NaPrav 20	C10 HLip 20	C11 HLip 20	C12 HLip 20
D1 HDL-Cl 20	D2 HDL-Cl 20	D3 HDL-Cl 20	D4 HDL-Prav 20	D5 HDL-Prav 20	D6 HDL-Prav 20	D7 HDL-Lip 20	D8 HDL-Lip 20	D9 HDL-Lip 20	D10 NaPrav 50	D11 NaPrav 50	D12 NaPrav 50
E1 HLip 50	E2 HLip 50	E3 HLip 50	E4 HDL-Cl 50	E5 HDL-Cl 50	E6 HDL-Cl 50	E7 HDL-Prav 50	E8 HDL-Prav 50	E9 HDL-Prav 50	E10 HDL-Lip 50	E11 HDL-Lip 50	E12 HDL-Lip 50
F1 NaPrav 80	F2 NaPrav 80	F3 NaPrav 80	F4 HLip 80	F5 HLip 80	F6 HLip 80	F7 HDL-Cl 80	F8 HDL-Cl 80	F9 HDL-Cl 80	F10 HDL-Prav 80	F11 HDL-Prav 80	F12 HDL-Prav 80
G1 HDL-Lip 80	G2 HDL-Lip 80	G3 HDL-Lip 80	G4 NaPrav 100	G5 NaPrav 100	G6 NaPrav 100	G7 HLip 100	G8 HLip 100	G9 HLip 100	G10 HDL-Cl 100	G11 HDL-Cl 100	G12 HDL-Cl 100
H1 HDL-Prav 100	H2 HDL-Prav 100	H3 HDL-Prav 100	H4 HDL-Lip 100	H5 HDL-Lip 100	H6 HDL-Lip 100	H7	H8	H9	H10	H11	H12

As outras placas (48 h, 72 h e 96 h) foram organizadas com correspondente distribuição de códigos descrita para a 1^o placa incubada por 24 h.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Vanessa Roberta Rodrigues da Cunha

Endereço: Rua Antônio Camardo, nº06, Vila Gomes Cardim- São Paulo, SP- Brasil

Telefones: (11) 2092-2586/ (11) 98678-9557

Educação

Colégio Positivo

Praia Grande, SP, 1998

EESG Paulo Novaes de Carvalho

São Paulo, SP, 1999-2000

Universidade de Guarulhos

Bacharelado e Licenciatura em Química

Guarulhos, SP, fevereiro de 2002 a julho de 2005

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Mestrado em Química- 2007

Título da Dissertação: Intercalação de fármacos com atividade antiinflamatória (ácido mefenâmico e piroxicam) em Hidróxido Duplo Lamelar

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Regina Leopoldo Constantino

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Doutorado em Química- início: 2008

Título do Projeto: Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Regina Leopoldo Constantino

Bolsas recebidas

CAPES - PROGRAMA DE DOUTORADO NO PAÍS COM ESTÁGIO NO EXTERIOR (PDEE)

Projeto: Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares

Abrangência: junho a setembro de 2011

Local: University of Waterloo, Ontário (Canadá)

PAE – PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO

Estagiária (Monitoria) na disciplina “Química Geral e Inorgânica Básica” (QFL-1100), no período de 04/03/09 a 27/06/09

Local: Instituto de Química da USP

PAE – PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO

Estagiária (Monitoria) na disciplina “Química Geral” (QFL-137), no período de março/08 a junho/08

Local: Instituto de Química da USP

CNPq - Doutorado

Projeto: Materiais híbridos orgânico-inorgânico: substâncias de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares

Abrangência: janeiro de 2008 a janeiro de 2012

Local: Instituto de Química da USP

PAE – PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO

Estagiária (Monitoria) na disciplina “Fundamentos da Química - Transformações” (QFL-2142), no período 08/03/06 a 29/06/06

Local: Instituto de Química da USP

Fapesp - Mestrado

Projeto: Intercalação de fármacos com atividade antiinflamatória (ácido mefenâmico e piroxicam) em Hidróxido Duplo Lamelar

Local: Instituto de Química da USP

Abrangência: abril de 2006 a julho de 2007

CNPq - Mestrado

Projeto: Intercalação de fármacos com atividade antiinflamatória (ácido mefenâmico e piroxicam) em Hidróxido Duplo Lamelar

Local: Instituto de Química da USP

Abrangência: agosto de 2005 a março de 2006

Fapesp - Iniciação Científica

Projeto: Intercalação de fármaco com atividade anti-hiperlipidêmica (pravastatina) em Hidróxido Duplo Lamelar

Local: Instituto de Química da USP

Abrangência: fevereiro a julho de 2005

Trabalhos apresentados em eventos científicos

CUNHA, V. R. R.; PETERSEN, P. A. D.; GONÇALVES, M. B.; PETRILLI, H. M.; TAVIOT-GUEHO, C.; LEROUX, F.; TEMPERINI, M. L. A.; CONSTANTINO, V. R. L.; Structural, spectroscopic (NMR, IR and Raman) and DFT investigation of the self assembled nanostructure of Pravastatin-LDH (layered double hydroxides) systems. II Workshop da Rede Nanobiomed, junho de 2012, Parnaíba, Piauí.

GUILHERME, V. A., CUNHA, V. R. R., CONSTANTINO, V. R. L., de PAULA, E., de ARAUJO, D. R. In vitro release and pharmaceutical evaluation of coumaric acid in layered Double hydroxide. South-American Symposium on microencapsulation, 30 de abril a 2 de Maio, 2012, Limeira, São Paulo.

GUILHERME, V. A., CUNHA, V. R. R., CONSTANTINO, V. R. L., de PAULA, E., de ARAUJO, D. R. Evaluation of cytotoxicity and anti-inflammatory activity of morin, coumaric acid, lipoic acid and mefenamic acid complexed with layered double hydroxides inorganic nanoparticles. 1º Workshop do programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular (BFM), 30 de junho a 1 de julho, 2011, Campinas, São Paulo.

CUNHA, V. R. R.; GUILHERME, V. A.; de PAULA, E.; de ARAUJO, D. R., CONSTANTINO, V. R. L.; Layered Double Hydroxide as a carrier of an anti-inflammatory drug. XVIII International Conference on Bioencapsulation, 2010, Porto, Portugal.

CUNHA, V. R. R.; ANDO, R. A.; CONSTANTINO, V. R. L.; Derivatives of cinnamic acid molecule inserted in Mg-Al hidrotalcite-like compounds. XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2010, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

CUNHA, V. R. R.; CONSTANTINO, V. R. L.; Bioactive Molecule (Pravastatin) incorporated in Layered Double Hydroxide Nanomaterials. 11th International Conference on Advanced Materials (VIII Encontro da SBPMat), 2009, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CUNHA, V. R. R.; CONSTANTINO, V. R. L.; Intercalação de substância com atividade antiinflamatória em material lamelar biocompatível. 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia, São Paulo.

CUNHA, V. R. R.; CONSTANTINO, V. R. L.; Mg-Al hidrotalcite-like compounds containing intercalated mefenamate anion. XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu, Paraná.

CUNHA, V. R. R.; CONSTANTINO, V. R. L.; Hybrid Organic-Inorganic Materials: Mefenamic Acid and Layered Double Hydroxides. VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - SBPMat, 2008, Guarujá, São Paulo.

PEROTTI, G. F.; CUNHA, V. R. R.; TRONTO, J.; CONSTANTINO, V. R. L.; Intercalação de Corantes do Extrato de Urucum em Hidróxido Duplo Lamelar. 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, São Paulo.

CUNHA, V. R. R.; CONSTANTINO, V. R. L.; Layered Double Hydroxide Intercalated by the Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug Mefenamic Acid. V Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2006, Florianópolis, Santa Catarina.

BIZETO, M.A.; SHIGUIHARA, A.L.; CUNHA, V.R.R.; CONSTANTINO, V.R.L.; Materiais Porosos para uso em Nanotecnologia, Tecniq - Seminário sobre Tecnologia na Indústria Química, 2006, São Paulo, São Paulo.

Participação em cursos e eventos científicos

II Workshop da Rede Nanobiomed. 2012, Parnaíba, Piauí.

2 Escuela de Nanomedicinas and 1 Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas. 2010, La Plata, Argentina.

XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry and II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry. 2010, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

XVIII Internacional Conference on Bioencapsulation. 2010, Porto, Portugal.

I Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP. 2009, São Paulo, São Paulo.

11th International Conference on Advanced Materials (VIII Encontro da SBPMat). 2009, Guarujá, São Paulo.

VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. 2008, Guarujá, São Paulo.

XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry. 2008, Foz do Iguaçu, Paraná.

31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2008, Águas de Lindóia, São Paulo.

V Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. 2006, Florianópolis, Santa Catarina.

Publicações

CUNHA, V. R. R., PETERSEN, P. A. D., GONÇALVES, M. B., PETRILLI, H. M., TAVIOT-GUEHO, C., LEROUX, F., TEMPERINI, M. L. A., CONSTANTINO, V. R. L., Structural, spectroscopic (NMR, IR and Raman) and DFT investigation of the self assembled nanostructure of Pravastatin-LDH (layered double hydroxides) systems, *Chemistry of Materials*, 24, **2012**, 1415–1425.

CUNHA, V. R. R., CONSTANTINO, V. R. L., ANDO, R. A., Raman spectroscopy and DFT calculations of *para*-coumaric acid and its deprotonated species, *Vibrational Spectroscopy (Print)*, 58, **2012**, 139-145.

CUNHA, V. R. R., TRONTO, J., FERREIRA, A. M. C., VALIM, J. B., CONSTANTINO, V. R. L., Hidróxidos Duplos Lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico, *Química Nova*, 33, **2010**, 159-171.

IX. LISTA DE ANEXOS

XI.1. RESUMO DO PROJETO REFERENTE AO PROGRAMA DE DOUTORADO NO PAÍS COM ESTÁGIO NO EXTERIOR (PDEE), Nº DO PROCESSO: BEX 0323/11 - 0

Considerando o potencial dos sistemas de HDLs intercalados com espécies de interesse biológico na área farmacêutica, buscamos a colaboração de especialistas na área de sistemas carregadores de drogas. Assim, as atividades que foram desenvolvidas no *Delivery and Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory* sob supervisão da Profa. Dra. Marianna Foldvari (no período de 01 de junho a 31 de outubro de 2011), na University of Waterloo, em Ontário, Canadá, teve como objetivo caracterizar por métodos físico-químicos e biológicos dois materiais de HDLs-Mg,Al: um contendo a Pravastatina (Prav) e outro o Ácido Lipóico (Lip). Esses materiais foram sintetizados, isolados e caracterizados pelas técnicas de análise elementar e de metais, difratometria de raios X, espectroscopia vibracional, análise térmica TGA-DTG-MS e RMN de ^{13}C no estado sólido. Dessa forma, a colaboração da Profa. Marianna Foldvari possibilitou a avaliação do potencial farmacológico através do teste com corante Sulforodamina B (facilidades disponíveis no laboratório da Profa. Foldvari) para avaliação do crescimento celular e citotoxicidade da linha celular de melanoma A-375 desses dois materiais. Tanto a Pravastatina quanto o Ácido Lipóico têm sido avaliados em estudos de tratamento do câncer de pele e processos de apoptose. Além de infraestrutura para a caracterização físico-química de nanocarregadores de drogas, o grupo da Profa. Foldvari tem realizado estudos com células de melanomas e outros tipos de câncer.

XI.2. Protocolo da linhagem celular A-375

A seguir, será descrito o Protocolo para o cultivo celular da linhagem celular A-375 da ATCC (*American Type Culture Collection*).

Número ATCC® (ATCC® Number): CRL-1619™

Nível de Biossegurança: 1

Organismo: *Homo sapiens* (humano)

Órgão: pele

Doença: Melanoma maligno

Meio de cultura celular ATCC: O meio de cultura utilizado para esse tipo celular é o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) formulado pela ATCC (cat# 30-2002). Ao meio completo foi adicionado 10% de soro fetal bovino.

Temperatura: 37,0 °C

Protocolo para Subcultura ou Tripsinização e Repique

Remover e descartar o meio

1. Lavar rapidamente a camada de células com uma solução 0,53 mmol/L de EDTA com 0,25 % (m/v) de tripsina para remover todos os traços de soro que contém inibidores da tripsina;
2. Adicionar de 2,0 a 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA na placa. As células deveram ser descoladas da placa (observar no Microscópio Óptico) entre 5 a 15 min;

Nota: Para evitar agregação enquanto as células desagregam, não é recomendado a utilização de agitação automática ou aquecimento. Células que são difíceis de separar devem ser mantidas a 37 °C para facilitar a dispersão;

3. Adicionar de 6,0 a 8,0 mL do meio completo e aspirar a suspensão gentilmente com a pipeta;
4. Adicionar alíquotas apropriadas da suspensão de células em um frasco novo para iniciar uma nova cultura celular;
5. Incubar as culturas celulares a 37 °C.

Troca do Meio: De 2 a 3 dias.

XI.3. ARTIGO DE REVISÃO: Química Nova, 2010. Hidróxidos Duplos Lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico

HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES: NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS PARA ARMAZENAMENTO E LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES DE INTERESSE BIOLÓGICO E TERAPÊUTICO

Vanessa R. R. Cunha, Ana Maria da C. Ferreira e Vera R. L. Constantino*

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo – SP, Brasil

Jairo Tronto

Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, CP 22, 38810-000 Rio Paranaíba – MG, Brasil

João B. Valim

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 11/12/08; aceito em 1/7/09; publicado na web em 27/11/09

LAYERED DOUBLE HYDROXIDES: INORGANIC NANOPARTICLES FOR STORAGE AND RELEASE OF SPECIES OF BIOLOGICAL AND THERAPEUTIC INTEREST. Studies about the inorganic nanoparticles applying for non-viral release of biological and therapeutic species have been intensified nowadays. This work reviews the preparation strategies and application of layered double hydroxides (LDH) as carriers for storing, carrying and control delivery of intercalated species as drugs and DNA for gene therapy. LDH show low toxicity, biocompatibility, high anion exchange capacity, surface sites for functionalization, and a suitable equilibrium between chemical stability and biodegradability. LDH can increase the intercalated species stability and promote its sub-cellular uptake for biomedical purposes. Concerning the healthy field, LDH have been evaluated for clinical diagnosis as a biosensor component.

Keywords: layered double hydroxides; inorganic carriers; drug release.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais híbridos é um campo de pesquisa que vem apresentando um desenvolvimento considerável nos últimos anos, devido principalmente ao fato de combinar o conhecimento tradicional com as novas abordagens e as modernas tecnologias. Esse desenvolvimento tem como objetivo atender à crescente demanda por novos materiais multifuncionais, com variadas aplicações em Física, Química, Biologia, Agricultura e Medicina. Particularmente, merece destaque o número de trabalhos que tratam da utilização de nanopartículas como cápsulas de armazenamento ou carregadores de espécies de interesse biológico e terapêutico.¹⁻³

Diversos sistemas para liberação controlada de drogas têm sido engendrados e descritos, com suas vantagens e desvantagens comparadas, podendo ser classificados em quatro grupos principais: carregadores virais, compostos catiônicos orgânicos, proteínas recombinantes e nanopartículas inorgânicas. Exemplos recentes incluem: pontos quânticos (*quantum dots*) ou nanocompósitos magnético-fluorescentes;^{4,5} géis poliméricos;^{6,7} nanotubos de carbono ou sílica funcionalizados;⁸ cápsulas multilamelares de polieletrólitos;⁹ nanopartículas de ouro^{10,11} e hidróxidos duplos lamelares (HDL).¹² A Figura 1 mostra alguns exemplos de espécies nanoparticuladas de interesse na área médica.

Particularmente, a busca por terapias antitumorais novas e racionais, aliadas às técnicas de diagnóstico mais seguras, envolve o planejamento e a obtenção de drogas ou fármacos alvo-específicos, isto é, que tenham alta especificidade para determinada biomolécula ou componente celular, podendo então serem transportados e liberados apenas em sítios escolhidos ou apropriados, aumentando sua eficácia terapêutica e diminuindo seus efeitos colaterais. Uma estratégia criativa é utilizar nanopartículas multifuncionais, capazes de carregar o

Figura 1. Alguns tipos de nanopartículas empregadas em estudos de transporte de espécies de interesse na área médica: (A) lipossomas; (B) nanopartículas de ouro ou sílica funcionalizadas; (C) partículas lamelares passíveis de sofrer intercalação e (D) nanotubos de carbono funcionalizados

fármaco e que, adicionalmente, contenham um composto (proteína, anticorpo ou ligante) reconhecido apenas por proteínas ou receptores associados a células tumorais (biomarcadores). Dessa forma, com engenhosidade e combinando conhecimento de diferentes áreas, consegue-se aprimorar a estratégia de drogas alvo-específicas.¹³⁻¹⁶

Os carregadores virais têm sido reportados como os mais eficientes, mas apresentam muitos efeitos colaterais, tais como respostas imunes e mutação dos genes. Os carregadores catiônicos (lipídios e polímeros) podem evitar tais problemas, porém usualmente são muito

*e-mail: vrlconst@iq.usp.br

Tabela 1. Comparação das propriedades de várias nanopartículas inorgânicas¹

Tipo	Tamanho (nm)	Forma	Citotoxicidade (mg/mL)	Biodegradação	Eliminação ^(a)
Au	1-100	esférica/bastão	> 0,05	Não	A, C ou M
C _n (nanotubos)	1-10	tubular	> 0,05	Não	A, C ou M
C _{60,70,80}	~1	esférica	~500 ^(b)	Não	A, C ou M
HDL	30-200	lamelar	~1	Sim	Dissolução
SiO ₂	5-100	esférica	~1	Não	A, C ou M
Fe ₃ O ₄	1-50	esférica	0,5-2,0	Não	A, C ou M

(a) A = acumulação; C = circulação; M = metabolização; (b) em unidades de mg/kg de camundongos.

tóxicos para a célula. Em contraste, os materiais inorgânicos geralmente apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carregadores, tais como boa biodisponibilidade,¹⁷ baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, alta capacidade de inserção de espécies iônicas, possibilidade de funcionalização da superfície, aumento da estabilidade das espécies inseridas e promoção de sua liberação sustentada. Mais recentemente, também foi descrita a possibilidade de controle do alvo celular através da morfologia e tamanho das partículas inorgânicas. Isso explica o crescente interesse na pesquisa e desenvolvimento desses materiais para serem utilizados como novos carregadores não-virais de drogas. Alguns sistemas nanoestruturados orgânicos já se encontram aprovados para uso terapêutico (por exemplo, sistemas à base de lipossomas, albumina e proteínas ligadas ao PEG, (polietilenoglicol) ou em estágio de testes clínicos (micelas poliméricas e compósitos de polímeros biodegradáveis). Entretanto, a utilização de nanopartículas inorgânicas se encontra em fase de testes clínicos (nanoestruturas à base de ouro) e de testes pré-clínicos (por exemplo, nanotubos de carbono e partículas de sílica).¹⁸

NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS

A Tabela 1 mostra algumas propriedades de partículas inorgânicas de interesse na área médica.¹ Convém ressaltar que os dados reportados sobre toxicidade de um material em particular nem sempre concordam entre si, uma vez que esse parâmetro pode variar com a morfologia da partícula, com as substâncias que recobrem a nanopartícula etc.^{2,3}

Apesar das vantagens apresentadas pelos carregadores inorgânicos, a estabilidade química das nanopartículas inorgânicas (exceto HDL), inicialmente uma propriedade excelente para manter a integridade do material durante o processo de liberação do fármaco, faz com que sua biodegradação no plasma e citoplasma do corpo humano seja comprometida.^{1,3} Como resultado, essas partículas ou serão acumuladas nas células, ou circularão pelo plasma, ou serão metabolizadas. Isso ocorre devido à dificuldade que essas partículas encontram para sofrer exocitose. O HDL é a única exceção devido à sua alcalinidade e capacidade de lenta degradação em meio ácido, como o do citoplasma (pH = 4-6), resultando em íons como Mg²⁺, Al³⁺, CO₃²⁻, Cl⁻, que podem deixar a célula através dos canais iônicos competentes ou disponíveis. Assim, o HDL parece apresentar um equilíbrio favorável entre estabilidade química e biodegradabilidade e, por isso, ser altamente promissor para promover a liberação sustentada de ânions orgânicos na célula.

HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

Os hidróxidos duplos lamelares, também conhecidos como *compostos do tipo hidrotalcita* ou como *argilas aniônicas*, apresentam estruturas bidimensionalmente organizadas e poros flexíveis como os argilominerais. Esses materiais são capazes de incorporar espécies

negativas na região interlamelar de modo a neutralizar as cargas positivas das lamelas.¹⁹⁻²⁴ Deste modo, espécies inseridas nos espaços interlamelares podem adquirir estabilidade extra através de interações eletrostáticas. Os HDL possuem ocorrência natural e também podem ser sintetizados em laboratório por rotas simples e de baixo custo, que permitem o isolamento de sólidos de alta pureza.

Os HDL apresentam fórmula geral $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2](A^{n-})_{x/n} \cdot zH_2O$ (M = íon metálico e Aⁿ⁻ = ânion interlamelar) e uma estrutura derivada da brucita, um mineral de fórmula mínima Mg(OH)₂, no qual os cátions magnésio estão localizados no centro de octaedros, que possuem ânions hidroxila em seus vértices. Esses octaedros compartilham suas arestas formando camadas planas e neutras, que são mantidas juntas por ligações de hidrogênio. Quando, na estrutura do tipo da brucita, cátions bivalentes são isomorficamente substituídos por cátions trivalentes, a lamela passa a apresentar uma carga residual positiva. Para que o sistema adquira a eletroneutralidade, é necessária a presença de ânions entre as lamelas, que juntamente com moléculas de água promovem o empilhamento das camadas do hidróxido duplo com um domínio interlamelar pouco ordenado. Nesse caso, as lamelas são mantidas juntas não apenas por ligações de hidrogênio, como no caso da brucita, mas pela atração eletrostática entre as lamelas positivamente carregadas e os ânions interlamelares. A representação esquemática da estrutura dos HDL é apresentada na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos HDL (se Aⁿ⁻ é o íon carbonato e M²⁺/M³⁺ é Mg e Al (3:1), o HDL é a hidrotalcita)

As camadas inorgânicas dos HDL podem ser empilhadas de acordo com duas simetrias diferentes, resultando em células unitárias romboédrica ou hexagonal. A maioria dos HDL sintéticos apresenta célula unitária romboédrica e, com muito menor frequência, célula hexagonal; apenas os HDL com proporção M(II)/M(III) igual a 1 apresentam célula unitária ortorrômbica. Maiores detalhes sobre a estrutura dos HDL e, também, sobre os métodos de preparação

desses materiais são encontrados em artigos de revisão^{20,21,23,25} e em capítulos de livros.²⁶⁻²⁸

A intercalação de espécies orgânicas em HDL tem recebido atenção expressiva devido às diversas aplicações possíveis para esses materiais híbridos orgânico-inorgânicos. As propriedades dos HDL permitem empregá-los como trocadores de ânions, catalisadores, precursores ou suporte para catalisadores, adsorventes, na síntese de materiais cerâmicos avançados, na preparação de eletrodos modificados e também em aplicações medicinais, como antiácidos.^{20,22,23,26-40}

A biocompatibilidade do HDL com a composição da hidrotalcita o torna um interessante aliado nas áreas medicinal e farmacológica, nas quais suas propriedades como antiácido são estudadas já há algum tempo.⁴¹⁻⁴⁴ O HDL de magnésio-alumínio e carbonato é encontrado comercialmente com o nome Talcid®, um antiácido patenteado pela empresa Bayer AG.^{45,46} Os antiácidos são administrados quando identificados problemas de azia, refluxo gastroesofágico e dispepsia funcional. Um bom antiácido deve ser caracterizado pelas seguintes propriedades: rápido efeito de neutralização e ação de longa duração; alta capacidade tamponante na faixa de pH 3-5, evitando assim que o pH do suco gástrico se torne muito alcalino; atividade estável mesmo na presença de outros componentes do suco gástrico.^{20,47} A Figura 3 mostra o desempenho *in vitro* da hidrotalcita (abreviada como Mg₃AlCO₃-HDL) e de outros compostos utilizados como antiácidos. Pelo gráfico, pode-se notar que a hidrotalcita é o composto que melhor se adapta às características de um bom antiácido. Outros testes mostram também que, entre vários antiácidos comerciais, a hidrotalcita é a que apresenta a maior capacidade de ligação com o ácido taurodesoxicólico, um ácido biliar tóxico para a célula e a mucosa gástrica.⁴⁷

Figura 3. Curvas de medida de pH em função do tempo para vários antiácidos. Adaptado da ref. 47. Copyright 2003, com permissão da Blackwell Publishing Ltd.

Além do uso como antiácido, no qual o HDL é o princípio ativo, esses compostos também vêm sendo empregados há algum tempo como excipientes farmacêuticos. Nos últimos anos, observa-se um número crescente de artigos científicos e de patentes que focam a intercalação de produtos biologicamente ativos em HDL, como uma estratégia para aumentar a estabilidade das substâncias, para aplicação em terapias modernas e, ainda, para uso em diagnóstico clínico (Figura 4). Conforme será visto adiante, o confinamento de substâncias em estruturas lamelares pode aumentar o seu “tempo de prateleira”, de modo a manter as especificações físicas, químicas, terapêuticas e toxicológicas do princípio ativo durante o período de armazenamento. Além de promover a estabilidade da substância, os sistemas híbridos podem direcioná-la para alvos específicos (tecidos) e/ou regular a sua liberação no organismo.

Neste artigo, além de fármacos ou drogas, também serão tratados como produtos medicinais aquelas substâncias capazes de tratar ou prevenir uma doença (como os antioxidantes) ou modificar uma função fisiológica. Em 2007, dois artigos de revisão foram publicados

Por que intercalar espécies de interesse medicinal em HDL ?

Figura 4. Principais motivações dos trabalhos realizados sobre intercalação em HDL de espécies orgânicas de interesse medicinal

sobre materiais híbridos constituídos por HDL e moléculas orgânicas de interesse para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos.^{48,49} Na Tabela 2 estão relacionados os artigos reportados até 2008 sobre a intercalação de fármacos e espécies de interesse biológico em hidróxidos duplos lamelares.

Na Tabela 2, não foram considerados trabalhos envolvendo biomoléculas como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, mono- ou dissacarídeos que não apresentam dados relacionados com o tema deste trabalho de revisão como, por exemplo, ensaios de liberação ou desintercalação em soluções de pH de relevância no meio biológico; estudos de viabilidade celular etc.

Por outro lado, na Tabela 3 foi dado destaque aos artigos que tratam de sistemas híbridos de HDL com potencial aplicação na área de terapia gênica. Os estudos mostram, além de resultados de caracterização estrutural e textural dos sistemas híbridos, os ensaios de viabilidade celular. O encapsulamento de biomoléculas funcionais, pela interação de lamelas catiônicas do HDL e cargas aniônicas na biomolécula, tem permitido sua proteção à degradação, tendo até mesmo aumentado significativamente a eficiência de sua transferência para dentro de células ou órgãos em mamíferos.¹⁰⁴ Essa neutralização de cargas pela intercalação, por exemplo, entre HDL e DNA parece facilitar a penetração da biomolécula na célula através da endocitose, já que as interações repulsivas entre a membrana celular carregada negativamente e o DNA aniônico seriam minimizadas. Outras moléculas de interesse farmacêutico como os biopolímeros aniônicos alginato, pectina, goma xantana, carragenana, poli(a,b-aspartato) foram intercalados com sucesso em HDL,^{95,96} mas não serão tratadas neste artigo de revisão, embora a associação entre um carregador inorgânico e um polímero orgânico possa gerar produtos muito interessantes para a área médica.

Desde as primeiras publicações sobre a intercalação de espécies de interesse farmacológico em HDL, observa-se não apenas o aumento no número de trabalhos, como também o depósito de patentes pelos grupos de O'Hare,^{97,98} Choy⁹⁹ e Costantino,¹⁰⁰ que trabalham na síntese e caracterização de HDL há muitos anos. Outras patentes recentes foram encontradas relatando o uso de HDL para liberação sustentada de bisfosfonatos (tratamento de osteoporose)¹⁰¹ e HDL contendo íons Fe(III) nas lamelas para tratamento de deficiência de ferro no organismo.¹⁰²

As propriedades dos HDL (como o caráter antiácido) podem ser combinadas com as propriedades do composto intercalado, resultando em um híbrido no qual as estabilidades química, térmica

Tabela 2. Trabalhos publicados sobre espécies de interesse medicinal intercaladas em hidróxidos duplos lamelares

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Métodos de caracterização	Ref.
Diclofenaco, Gemfibrozil, Ibuprofeno, Naproxeno, Ácido 2-propilpentanóico, Ácido 4-bifenilacético, Ácido tolfenâmico	Li/Al ₂	DRX; CHN; IV; TG	50
Ibuprofeno	Mg ₂ /Al	IV; TG; CHN	51
Ácido salicílico, Ácido cítrico, Ácido glutâmico, Ácido aspártico	Mg ₃ /Al	DRX; TG-DTA; IV; CHN	52
Indometacina, Cetoprofeno, Ácido tiopropênico	Mg ₃ /Al	DRX; CHN; UV/Vis	53
Ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico	Mg ₂ /Al e Mg ₃ /Al	DRX; CLAE; RMN	54
Ácido cítrico	Mg ₂ /Al	DRX; IV; MEV	55
2-Carboxilato-Indol	Zn ₂ /Al e Zn ₃ /Al	DRX; IV	56
Ácido salicílico, Naproxeno	Mg ₂ /Al	DRX; IV; RMN; TG-DTA	57
Indometacina	Mg ₂ /Al	DRX; IV; RMN; TG-DTA	58
Ácido folínico	Mg ₂ /Al	DRX; TG-DTA; ICP-AES; CHN;	59
Diclofenaco	Mg ₂ /Al	DRX; XPS	60
Fenbufeno	Mg ₂ /Al e Li/Al ₂	DRX; IV; TG; ICP-AES	61
Fenbufeno	Mg ₂ /Al	DRX; MET; XPS	62
Captotecina	Mg ₂ /Al	DRX; IV; UV/Vis; MET	63
Naproxeno	Mg ₂ /Al	DRX; IV; TG; ICP-AES; CHN; UV/Vis	64
Ibuprofeno	Mg ₃ /Al	IV; FT-Raman; DRX; TG; EPR	65
Ibuprofeno, Diclofenaco, Indometacina	Mg ₂ /Al	DRX; IV; Raman; RMN	66
Ácido ferúlico	Mg/Al	DRX; TG; MEV	67
5-Fluorouracil	Mg ₂ /Al	DRX; IV; TG	68
Fenoximetilpenicilina	Mg ₃ /Al	DRX; IV; CHN; MEV	69
Cordicepina (ou 3-Desoxiadenosina)	Mg/Al	DRX; IV; MET; Eletroforese Capilar	70
Metotrexato	Mg ₂ /Al	DRX; MEV	71
Tirosina	Zn ₂ /Al	DRX; IV; ICP-AES; Área Superficial; TG-DSC; MET	72
Ácido mefenâmico e Ácido meclofenâmico	Mg ₂ /Al	DRX; IV; TG-DTA; Área Superficial	73
Protoporfirina IX e Ácido perfluoroheptanóico	Mg ₂ /Al e Mg ₃ /Al	DRX; IV; UV/Vis; TG	74
Gramicidina, Anfotericina	Mg ₂ /Al	DRX; IV; UV/Vis	75
Ampicilina, Ácido nalidixico			
Succinato de cloramfenicol	Mg ₂ /Al	DRX; TG; UV/Vis	76
Ácido indol-3-acético	Zn/Al, Zn(OH) ₃	DRX; IV; TG-DTA; MEV	77
Podofilotoxina	Mg ₃ /Al	DRX; UV/Vis; MET	78
Naproxeno	Zn/Al	DRX; CHN; MET; Área Superficial	79
Norfloxacina	Mg/Al	DRX; IV; UV/Vis; TG-DTA; ICP-AES	80
Celecoxib	Mg/Al	DRX; IV; DSC; área superficial	81
Ácido mefenâmico	Mg ₂ /Al, Mg ₃ /Al, Mg ₄ /Al	DRX; CHN; IV; Raman; TG-MS; MEV	82
Curcumina	Mg ₃ /Al	DRX; IV; ICP-AES; TG-DTA	83
Diclofenaco	Mg ₃ /Al	DRX; UV/Vis; CLAE; Absorção tópica	84
Colágeno	Zn ₂ /Al	CHNS; ICP-AES; DRX; IV; MET	85
5-Fluorouracil (5-Fu)	Mg ₂ /Al	DRX; MEV; CHN	86
Heparina	Mg ₂ /Al	DRX; CHN; IV; MEV; MET	87
Ácido mefenâmico e Ácido meclofenâmico	Mg ₂ /Al	DRX; CHN; IV; MET; UV/Vis	88
Colágeno	Zn ₂ /Al	DRX; Raman; TG; MET	89
Ácido mefenâmico, Ácido meclofenâmico e Naproxeno	Mg/Al Fe	CHN; DRX; IV; TG-DTA	90
Ibuprofeno	Mg ₂ /Al	CHN; DRX; IV; UV/Vis; TG; TEM	91
5-Fluorocitosina (5-FC)	Zn ₂ /Al	CHN; DRX; IV; MET	92
L-DOPA	Mg ₂ /Al	CHN; ICP-AES; DRX; IV; UV/Vis; TG-DTA; TG-MS; RMN	93
Enalapril, Lisinopril, Captopril e Ramipril	Zn ₂ /Al	CHN; ICP-AES; DRX; IV; DTA; TG-MS	94

Tabela 3. Trabalhos publicados sobre híbridos de HDL com oligonucleotídeos e ácidos nucleicos de interesse em terapia gênica

Substância Intercalada	Composição do HDL M^{2+}/M^{3+}	Métodos de caracterização	Ref.
Adenosina-5-monofosfato (AMP), Guanosina-5-monofosfato (GMP), Citidina-5-monofosfato (CMP) e Ácido desoxirribonucleico (DNA)	Mg_2/Al	CHN; TG; ICP-AES; DRX; IV; DC; UV/Vis	103
DNA, ATP, Fluoresceína 5-isotiocianato (FITC)	Mg_2/Al	DRX; LSCM	104
CMP, AMP, GMP, Adenosina-5-trifosfato (ATP)	Mg_2/Al	DRX; IV	105
DNA	Mg_2/Al	CHN; ICP-AES; DRX	106
DNA	Mg_2/Al	TG-DTA; MEV; MET; Eletroforese	107
DNA	Mg_2/Al , Mg_2/Fe e Mg_2/Ga	DRX; TG; Eletroforese	108
DNA	Mg_2/Al	DRX; IV; MEV; DC; eletroforese	109
DNA	Mg_2/Al	DRX; LAMMPS	110
DNA	Mg_2/Al	DRX; LAMMPS	111
DNA	Mg_2/Al	DRX; MET; CellTiter-Glo	112

e/ou fotoquímica, entre outras, são sensivelmente aumentadas em relação à do fármaco livre. Além disso, o material intercalado poderá sofrer um processo de liberação sustentada, decorrente da dissolução da matriz lamelar em função do ataque ácido ou de uma reação de troca aniônica.^{48,49} Essas propriedades permitem que o HDL seja um dos materiais inorgânicos apontado como promissor para uso como suporte para o armazenamento e a liberação sustentada da substância intercalada, que pode ser um fármaco como os anti-inflamatórios não-esteroidais,^{50,51,53,65} drogas anti-cancerígenas,^{59,63} um regulador de crescimento vegetal,¹¹³ porfirinas para uso em terapia fotodinâmica,⁷⁴ aminoácidos,¹¹⁴ herbicidas,¹¹⁵ ou mesmo a molécula de DNA em procedimentos de terapia gênica.^{106,107} A aplicação do HDL como, por exemplo, excipiente no tratamento de úlcera e em terapia de distúrbios digestivos já é descrita há mais tempo.

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E ABSORÇÃO DE HDL

A assimilação dos materiais híbridos contendo produtos medicinais intercalados em HDL tem sido investigada *via* administração enteral (pelo trato digestivo), tópica (efeito local) ou parenteral. A liberação da substância intercalada pode ocorrer através de dois mecanismos: solubilização das lamelas do HDL estimulada pelo abaixamento do pH e/ou pela reação de troca aniônica com espécies presentes no organismo. Quando administrado oralmente, o material híbrido pode se dissolver no suco gástrico do estômago ou participar de reação de troca iônica (liberação sustentada) no intestino delgado, se recoberto com um revestimento protetor (entérico) adequado (por exemplo, com polímeros que não se dissolvem em meio ácido). No estômago, o HDL pode proteger a mucosa gástrica e a desintercalação controlada de um fármaco pode evitar a sua alta concentração local, diminuindo possíveis efeitos colaterais. Para uso tópico (absorção cutânea), área de interesse também das indústrias de cosméticos, a substância intercalada, aplicada na forma de cremes, adesivos etc., pode ser liberada por troca iônica com espécies do fluido da transpiração (NaCl, por exemplo). Outra possibilidade consiste na associação do material híbrido aos sistemas endodérmicos ou transdérmicos, ou seja, a substância de interesse (um anti-inflamatório ou um hormônio, por exemplo), atravessaria a epiderme, atingindo a derme ou mesmo a corrente sanguínea.

Quando a administração é intravenosa, a partícula do híbrido é levada para o interior da célula por endocitose, um processo celular que ocorre na resposta imunológica do organismo, executado por macrófagos para degradar agentes patogênicos (moléculas, bactérias, vírus) ou partículas pequenas, e que consiste em engolfar e eliminar o intruso.¹¹⁶ Dentro da célula, nos endossomos que confinam o híbrido

de HDL, pode ocorrer a dissolução parcial ou a troca aniônica no HDL em razão da presença de íons H^+ e Cl^- .^{71,117} O HDL ainda intacto pode escapar do endossoma, alojando-se no citoplasma, conforme ilustra a Figura 5. Outra possibilidade é a fusão dos endossomas com os lisossomos, promovendo a lenta dissolução em função da acidez do meio (pH aproximadamente 4-5).³ Parte do material híbrido não dissolvido pode sofrer reações de troca iônica entre a espécie intercalada e aquelas espécies aniônicas presentes no citosol (pH aproximadamente 7,4). Esse método é importante para o transporte de drogas anticancerígenas, ácidos nucleicos e oligonucleotídeos para as células.

Figura 5. Possíveis etapas da incorporação e absorção de HDL pela célula

Se o DNA é incorporado ao núcleo da célula, ele pode induzir a produção de uma determinada proteína ou, ainda, se compostos (RNA ou oligonucleotídeos) anti-sentido alcançam o núcleo, pode-se regular artificialmente a expressão de genes para inibir a produção de proteínas causadoras de doenças. Porém, os ácidos nucleicos não conseguem penetrar na membrana celular em virtude da elevada carga proveniente dos grupos fosfato, sendo necessária a intermediação de carregadores; uma vez no citosol, quando não protegidos, os ácidos nucleicos são degradados pelas enzimas nucleases. Posteriormente, o DNA ou RNA associados aos carregadores são transportados para o núcleo da célula, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Observa-se que a eficiência dos carregadores inorgânicos na *transfecção* (transporte de ácido nucleico externo para células eucarióticas) não é eficiente, se comparados aos nanocarregadores orgânicos, mas os primeiros possuem as vantagens de não sofrerem ataques de micro-organismos, de apresentarem menor toxicidade e de estabilizarem a macrobiomolécula.^{1,3}

A administração de partículas na forma parenteral requer o controle de seus diâmetros para evitar problemas de obstrução de

capilares, cujos diâmetros médios são da ordem de 10 μm .¹¹⁸ Para injeção intravenosa, Choy *et al.*¹¹⁸ realizaram um estudo em que, através de métodos convencionais, obtiveram partículas de HDL de tamanho nanométrico e realizaram testes em cobaias. A injeção intravenosa de suspensão salina de $\text{Mg}_2\text{AlCl-HDL}$ (diâmetro de *ca.* 100 nm) em camundongos adultos, seguida de exames de sangue e de tecidos, mostraram que doses iguais ou menores que 200 mg/kg não causam efeitos sistêmicos (generalizados). Porém, observou-se irritação no local da aplicação e na injeção intraperitoneal, de modo que a administração não intravenosa deve ser evitada. Choy *et al.*¹¹⁹ estenderam os estudos e reportaram em uma patente que partículas com diâmetro entre 100 e 300 nm não são tóxicas mesmo na concentração de 400 mg/kg quando aplicadas no peritônio de ratos. Partículas contendo metotrexato (MTX), uma droga anticancerígena, também foram testadas *in vivo* através de injeção intraperitoneal.

Em outro trabalho do mesmo grupo,⁸⁶ o agente anticancerígeno 5-fluorouracil intercalado em HDL foi testado *in vitro* frente a três linhagens diferentes de células humanas doentes: adenocarcinoma (A549), osteosarcoma (HOS) e hepatoma (Hep 1). Os resultados mostraram que o HDL sem o fármaco não inibe o crescimento das células quando presente em uma concentração inferior a 500 mg/mL, indicando que o carregador inorgânico não pode ser considerado tóxico. Já outro estudo, empregando outro tipo de célula cancerosa (MNNG/HOS, osteosarcoma humano), revelou que o HDL contendo carbonato não afeta o ciclo celular, quando em concentrações entre 1,5 e 384 $\mu\text{g/mL}$.⁷¹ Choy *et al.*¹²⁰ avaliaram a toxicidade celular de $\text{Mg}_2\text{AlCO}_3\text{-HDL}$ e $\text{Zn}_2\text{AlCO}_3\text{-HDL}$, as composições mais utilizadas em estudos de transporte de drogas ou biomoléculas através de HDL. Para tanto, foram empregadas células normais de pulmão humano (L-132), células de hepatoblastoma (HepG2) e células de adenocarcinoma de mama (MCF-7). O meio celular continha nanopartículas de HDL (de formato hexagonal e tamanho médio de 200 nm) nas concentrações entre 3,9 e 500 $\mu\text{g/mL}$ (até essa concentração, não foram observadas alterações na proliferação celular). Os testes de danos à membrana plasmática também confirmaram a baixa toxicidade dos HDL; a composição com magnésio mostrou ser menos danosa que aquela com zinco e os autores inferiram essa diferença à menor toxicidade do Mg^{2+} em relação ao Zn^{2+} . Considerando uma possível administração parenteral dos materiais híbridos, também foram realizados testes de hemólise através da incubação das nanopartículas de HDL com células vermelhas do sangue. Nas concentrações empregadas no estudo, tanto as partículas de $\text{Mg}_2\text{AlCO}_3\text{-HDL}$ quanto de $\text{Zn}_2\text{AlCO}_3\text{-HDL}$ não causaram a ruptura das células vermelhas em intervalo de tempo adequado.

HDL como carregadores de produtos medicinais

A intercalação de moléculas biologicamente ativas na estrutura de HDL é de interesse não apenas pelo fato da matriz ser biocompatível, mas também por outros efeitos reportados.

Possível liberação sustentada da droga mediada por alterações no pH

Tronto *et al.*¹²¹ realizaram estudos sobre a liberação *in vitro* de aminoácidos intercalados em HDL de magnésio e alumínio. A partir dos valores de concentração dos aminoácidos e dos valores de pH determinados para cada tempo, foi possível construir gráficos de concentração do aminoácido e pH da solução em função do tempo. Analisando a Figura 6, nota-se que inicialmente o valor de pH da solução é de 1,88. Essa solução, que tem como objetivo simular o pH estomacal, apresenta $[\text{HCl}] = 0,0132 \text{ mol L}^{-1}$. Nesse valor de pH da solução (Região I do gráfico), o aminoácido está na forma protonada, o que leva a uma repulsão entre as cargas da lamela e do aminoácido, o qual se desloca para a solução.

Figura 6. Valores de pH e quantidades de aminoácido em solução em função do tempo nos estudos de liberação *in vitro* para o HDL intercalado com aspartato

Com o aumento do pH da solução em função da dissolução do HDL, o material estará em contato com uma solução na faixa de pH entre 2-3, próximo do ponto isoeletrico do aminoácido (Região II). A velocidade máxima de liberação do aspartato intercalado para a solução ocorre em um período de 3 h, quando o pH da solução atinge o valor de aproximadamente 4,0 (Região III), próximo do valor de pK_x do aminoácido (referente ao segundo grupo carboxílico) que é de 3,65. Após esse tempo, a concentração de íons aspartato na solução permanece praticamente constante e em torno de $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir de 3 h, quando o valor de pH é superior a 4,0, observa-se uma velocidade de liberação menor. Isso ocorre porque a partir desse valor de pH praticamente não ocorre dissolução do hidróxido duplo lamelar. Concomitante ao processo de liberação dos ânions orgânicos intercalados por dissolução do HDL, ocorre a troca dos íons aspartato intercalados no HDL por íons cloreto da solução que simula o pH estomacal. A presença de íons cloreto intercalados no HDL resultante após a liberação foi confirmada através da difratometria de raios X no pó e análise qualitativa. A troca de íons aspartato intercalados por íons cloreto pode ser explicada pela maior estabilização da estrutura lamelar pelos ânions cloreto do que pelos ânions aspartato.

Tronto *et al.*⁵⁵ realizaram também testes de liberação *in vitro* para HDL de magnésio e alumínio intercalado com ânions citrato. A partir dos valores de concentração de ânions citrato em solução e dos valores de pH determinados para cada tempo, foi construído um gráfico de concentração e pH em função do tempo (Figura 7).

Figura 7. Valores de pH e quantidades de ânions citrato em solução em função do tempo nos estudos de liberação *in vitro* para o HDL de Mg e Al intercalado com ânions citrato

A curva de liberação do ânion orgânico tem o perfil característico de uma liberação sustentada. O pH durante os testes de liberação foi sempre crescente em função do tempo. Tal resultado pode estar relacionado ao alto efeito tamponante do sistema, que impede que o pH se eleve bruscamente. Padrões de difração de raios X no pó, para as amostras sólidas após 42 h de testes de liberação, apresentam picos basais referentes à intercalação de íons citrato ($d_{003} = 1,2$ nm). Diferentemente dos resultados obtidos para HDL intercalados com aminoácidos, para o HDL de Mg e Al intercalado com ânions citrato, o valor de espaçamento basal encontrado após os testes de liberação *in vitro* não variou em relação ao do composto intercalado, indicando que não ocorreu a reação de troca dos ânions citrato intercalados por ânions cloreto da solução. Assim, é possível afirmar que após 42 h de contato com a solução ácida, os ânions citrato intercalados não foram totalmente liberados para a solução. A amostra MgAl-citrato-HDL apresentou uma alta organização estrutural, o que poderia dificultar a troca com os ânions cloreto da solução durante os testes de liberação *in vitro*. Além disso, os ânions citrato proporcionaram um efeito tamponante na solução, o que não favorece nem o processo de dissolução do HDL e nem a troca aniônica. O efeito tamponante dos HDL foi demonstrado por meio de curvas de titulação com um ácido forte. A Figura 8 apresenta as curvas de pH em função do volume de HCl adicionado, para os HDL de magnésio e alumínio intercalados com ânions aspartato e citrato.

Figura 8. Curvas de pH em função do volume de HCl 1,0 mol L⁻¹ adicionado para HDL de Mg e Al intercalados com (a) ânions aspartato; (b) ânions citrato

O efeito tampão para o HDL intercalado com ânions aspartato, Figura 8a, ocorreu com a adição de 2,0 e 4,0 mL de solução de ácido clorídrico, com uma variação no valor de pH entre 4,3 a 3,5. Para esse material, a capacidade tamponante foi de 7,0 meq g⁻¹. Para o HDL intercalado com ânions citrato, Figura 8b, o efeito tamponante ocorreu com a adição de um volume de ácido clorídrico entre 1,0 e 3,0 mL, em que o valor de pH variou entre 2,8 a 3,1. Esse HDL apresentou capacidade tamponante de 7,60 meq g⁻¹. Esses materiais híbridos apresentaram curvas de titulação com um perfil típico de uma base fraca sendo titulada por um ácido forte.

Ambrogi *et al.*⁵¹ realizaram um estudo de liberação *in vitro* do anti-inflamatório ibuprofeno em HDL de magnésio e alumínio, simulando as condições de pH do intestino delgado (pH=7,5). A liberação foi realizada comparando os comportamentos do HDL-IBUt.i. (ibuprofeno intercalado no HDL através do método da troca iônica), HDL-IBU (mistura física do sal de sódio do ibuprofeno com o HDL-Cl) e do Neo-Mindol® (forma comercial do ibuprofeno na forma de sal de sódio) em pH 7,5. O perfil de liberação do HDL-IBUt.i. foi diferente do observado para o Neo-Mindol®. A forma comercial e a mistura física HDL-IBU apresentaram uma liberação imediata do fármaco. O ensaio com a amostra HDL-IBUt.i. mostrou que 60% da droga foi liberada após 20 min, e que os 40% restantes foram liberados após 100 min. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas com o mecanismo de liberação do fármaco intercalado,

pois a liberação ocorre através da troca iônica entre os íons derivados do ibuprofeno e os íons fosfato presentes na solução tampão. O difratograma de raios X do sólido, remanescente após a liberação, confirma esse mecanismo devido ao desaparecimento do pico basal em $d_{003} = 2,17$ nm referente ao HDL-IBUt.i., e o aparecimento do pico em 1,09 nm referente aos íons fosfato intercalados. A liberação *in vitro* do HDL-IBUt.i. utilizando aproximadamente as condições do meio gástrico não foi estudada. Essas condições não favoreceram uma liberação sustentada devido à rápida dissolução do HDL em baixos valores de pH, sendo necessário o recobrimento entérico do material.

Aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água

Ambrogi *et al.*⁵³ também desenvolveram um trabalho sobre o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis como a indometacina, cetoprofeno e o ácido tiopropênico em HDL de magnésio e alumínio. A solubilidade é uma propriedade muito importante dos fármacos, pois tem um papel crucial na liberação e absorção dessas moléculas no plasma sanguíneo, ou seja, na sua biodisponibilidade. As medidas de solubilidade do fármaco livre, do mesmo intercalado e do material formado pela mistura física do fármaco-HDL foram determinadas em um ensaio a 37 °C, no qual o material em pó foi colocado em um meio contendo suco gástrico (pH = 1,2) sem pepsina. Os três fármacos, quando intercalados em HDL, apresentaram um aumento na solubilidade enquanto a molécula livre e a mistura física não mostraram modificações. Para a indometacina, por exemplo, a concentração obtida no ensaio após 3 h, com o fármaco livre e com a mistura física, foi aproximadamente seis vezes menor do que a concentração do fármaco previamente intercalado. Segundo os autores, o aumento na solubilidade pode estar relacionado à ausência de cristalinidade do material intercalado, ocorrendo a liberação direta da forma iônica pela rápida dissolução do HDL em meio ácido.

Aumento da estabilidade química de substâncias frente à luz, calor, umidade, oxigênio molecular etc

Estudo sobre a decomposição térmica do anti-inflamatório naproxeno em HDL de magnésio e alumínio utilizando as técnicas de difratometria de raios X e absorção no infravermelho *in situ* foi realizado por Wei *et al.*⁶⁴ As mudanças observadas durante o processo de decomposição usando tais técnicas estão de acordo com os dados de análise térmica. A espectroscopia no infravermelho e a difratometria de raios X mostram que a decomposição do naproxeno intercalado ocorre em aproximadamente 250 °C, temperatura na qual se observa o desaparecimento de bandas características da molécula e a desidroxilação do HDL. Esse estudo possibilita concluir o notável aumento da estabilidade do naproxeno quando intercalado em HDL, visto que para a molécula livre a temperatura de decomposição é de 170 °C.

Em um estudo recente, a intercalação de heparina, droga frequentemente usada como anticoagulante, em hidróxido duplo lamelar do tipo MgAl-Cl-HDL removeu algumas de suas limitações para uso farmacológico, aumentando sua meia-vida e prolongando sua ação.⁸⁷

Liberação sustentada pode manter a concentração plasmática do fármaco em níveis desejados por um período maior de tempo

Li *et al.*⁶¹ realizaram um estudo sobre o potencial de liberação do anti-inflamatório fenbufeno intercalado na matriz de HDL de magnésio/alumínio e lítio/alumínio. O teste de desintercalação foi realizado a temperatura constante de 37 °C em uma solução de tampão fosfato pH=7,8. A curva de liberação do fenbufeno na matriz LiAl₂-HDL mostra que nos primeiros 10 min ocorre uma alta liberação e atinge um nível constante em 20 min. A liberação máxima, utilizando essa matriz, foi de 40%. O perfil encontrado para a matriz Mg₂Al-HDL mostra uma rápida liberação nos primeiros 15 min, porém menor do que a visualizada para a matriz LiAl₂-HDL. A quantidade de

fenbufeno liberada aumenta linearmente ao longo do ensaio de 120 min e atinge o valor de 59%. Segundo os autores, a explicação para o diferente comportamento da liberação do fenbufeno nas matrizes Mg_2Al -HDL e $LiAl_2$ -HDL pode ser devida a maior interação do ânion orgânico com o $LiAl_2$ -HDL, uma vez que essa matriz possui maior densidade de carga que a Mg_2Al -HDL.

Superfície da matriz de HDL pode ser modificada para evitar liberação de espécies no estômago e promover liberação sustentada no intestino

Li et al.⁶² estudaram a liberação, em condições semelhantes às encontradas no trato gastrointestinal, do anti-inflamatório fenbufeno intercalado na matriz de HDL de magnésio e alumínio recoberto pelo polímero Eudragit S 100. Esse estudo foi desenvolvido devido ao comportamento básico da matriz de HDL, impossibilitando sua passagem sem decomposição de suas lamelas no meio ácido do estômago, expondo assim precocemente o fármaco. Os resultados obtidos mostraram o comportamento desejado do híbrido recoberto, ocorrendo a passagem do fármaco-HDL pelo estômago e possibilitando a liberação sustentada do fármaco nas condições do intestino delgado.

Aumento da estabilidade de fármaco frente à decomposição no transporte até a célula

Choy et al.⁵⁹ reportaram um estudo sobre o aumento da permeabilidade de fármacos nas células, quando intercalados em HDL de Mg e Al. Os autores escolheram para estudo o ácido folínico e o metotrexato (MTX), utilizados no tratamento de câncer. O MTX apresenta uma baixa meia-vida no plasma, por isso são necessárias altas dosagens desse fármaco aumentando, assim, a probabilidade de interação com células não cancerígenas. Os resultados obtidos indicam que o MTX intercalado teve sua eficácia aumentada na supressão do desenvolvimento das células cancerígenas, mesmo quando administrado em doses menores e menor tempo de incubação. A intercalação do MTX em HDL provavelmente diminuiu a decomposição dessa molécula durante o transporte.

Diminuição de efeitos colaterais de anti-inflamatórios (lesões gastrointestinais)

Del Arco et al.⁵⁸ realizaram um estudo *in vivo* do material obtido pela intercalação do anti-inflamatório indometacina em HDL de magnésio e alumínio (indometacina-HDL) comparando-o com a indometacina livre e a mistura física do HDL-carbonato com a indometacina. O fármaco indometacina, assim como todos os anti-inflamatórios não esteroidais não seletivos a COX-2 (enzima responsável pela resposta inflamatória no organismo), causam muitos problemas gastrointestinais. A intercalação desses compostos em HDL pode ser de grande ajuda para contornar os seus efeitos colaterais. Os autores realizaram um experimento *in vivo* utilizando camundongos Swiss dos dois sexos.

Após a administração oral das três amostras contendo indometacina, o estômago dos ratos foi retirado e analisado através da utilização de microscópio óptico para visualizar o grau e a área de ulceração. Os resultados mostraram danos hemorrágicos ao estômago em 88% dos ratos causados pela administração da indometacina livre enquanto que apenas 70% sofreram esses danos quando tratados com a droga intercalada em HDL. Os pontos de ulceração encontrados na superfície do estômago foram cerca de $0,401 \pm 0,100\%$ para a indometacina livre, enquanto apenas $\frac{1}{4}$ dos ratos tratados com indometacina-HDL apresentaram cerca de $0,106 \pm 0,033\%$, indicando o desempenho superior dos materiais intercalados. Para checar se esses resultados foram favoráveis devido à habilidade de proteção dada pelo HDL, foi comparado o material intercalado com a mistura física (HDL-carbonato + indometacina). Os resultados mostraram o decaimento

nos pontos de ulceração para $0,22 \pm 0,037\%$, um valor intermediário entre os encontrados para a indometacina livre e a intercalada. Esses resultados podem estar relacionados com a presença do HDL-carbonato na mistura física, que tem propriedades antiácidas.

Controle da distribuição intracelular (ou do compartimento sub-celular alvo) através da morfologia

Estudo recente desenvolvido por Xu et al.¹¹⁷ sobre o comportamento de captação de nanopartículas de HDL por diferentes células de mamíferos, através do uso de indicador isocianato de fluoresceína e de microscopia confocal, demonstrou que as nanopartículas aderem rapidamente à superfície celular, devido a interações entre as partículas com potencial Zeta positivo e a membrana negativamente carregada, sendo então imediatamente inseridas na célula. Além disso, esse trabalho mostrou que dependendo do tamanho e da morfologia de partículas de HDL de mesma composição, alvos sub-celulares distintos são atingidos: enquanto nanopartículas na forma de placas hexagonais (*hexagonal sheets*) ficam retidas no citoplasma, aquelas que apresentam formas de barra (*rods*) são transferidas para o núcleo (Figura 9). O mesmo resultado foi obtido empregando-se diferentes células de mamíferos.

Figura 9. Imagens de microscopia confocal do núcleo de células embrionárias de camundongos (NIH 3T3) após a adição de nanopartículas em forma de barras de HDL com corante fluorescente: A - 15 min; B - 45 min; C - 90 min e D - 180 min. Reproduzido da ref.117 Copyright 2008, com permissão da Elsevier

A viabilidade celular não foi afetada pela presença dessas nanopartículas de HDL. Embora ainda pouco elucidado, o mecanismo desse processo de internalização celular deve envolver transporte ativo das nanopartículas através de endossomos e, subsequentemente, para o complexo Golgi ou para lisossomos.⁷¹ Além disso, através do uso de mutantes e inibidores apropriados, como clorpromazina, que bloqueiam etapas específicas no processo de endocitose celular, os estudos de Xu et al. confirmaram resultados anteriores de que a internalização das nanopartículas de HDL ocorre prioritariamente por esse processo, mediado por clatrina.

O fato da viabilidade celular para diferentes células não ter sido alterada em presença das nanopartículas de HDL e a inserção bem sucedida de compostos fluorescentes também indicam um novo emprego de materiais baseados em HDL, para obtenção de imagens como auxiliares de diagnósticos clínicos.

Alguns trabalhos recentes merecem breves comentários por apresentarem inovações em relação aos anteriores. Trikeriotis e

Ghanotakis⁷⁵ relataram a síntese e a caracterização de antibióticos intercalados em HDL. A inovação mostrada nesse artigo está na intercalação de uma espécie orgânica neutra (artigos anteriores tratavam da intercalação de fármacos aniônicos). O antibiótico gramicidina não possui carga. Logo, para realizar a intercalação desse material em HDL foi realizada primeiramente a incorporação dessa espécie hidrofóbica em micelas de colato de sódio para, em seguida, efetuar a intercalação por troca iônica usando o HDL-nitrato. A caracterização através da espectroscopia eletrônica UV-vis provou a presença da gramicidina no HDL. Outro artigo aponta a possibilidade de usar partículas de HDL-carbonato encapsuladas em vesículas (de diâmetro aproximado de 80 a 150 nm) para carregar drogas associadas ao HDL, uma vez que esse material inorgânico induz a formação de vesículas.¹²² Recentemente, Nakayama *et al.*¹²³ intercalaram uma ciclodextrina aniônica em HDL também com o objetivo de promover a liberação sustentada de droga não aniônica. Nesse sentido, o medicamento prazosin, utilizado para o controle da hipertensão, foi confinado no interior das cavidades da ciclodextrina aniônica.

Choy *et al.*⁷⁷ mostraram os resultados obtidos na comparação entre duas matrizes inorgânicas, ZnAl-HDL e sal básico lamelar de zinco,¹²⁴ na intercalação e desintercalação do ácido indol-3-acético (IAA) utilizado em cosméticos e ingredientes dermatológicos. De acordo com os dados de difratometria de raios X e espectroscopia vibracional no IV, o ânion IAA apresenta maior interação com o sal básico lamelar de zinco do que com o ZnAl-HDL devido à coordenação do ânion ao metal divalente nas lamelas da matriz. Essa interação resultou em uma quantidade maior de fármaco imobilizado e na liberação lenta do ânion orgânico. Esses resultados possibilitam o desenvolvimento de uma nova matriz para o suporte e liberação de fármacos. O *Nanohybrid Research Center* (Coréia do Sul), fundado em 2001 pelo Dr. Jin-Ho Choy, trabalha no desenvolvimento de sistemas híbridos constituídos de HDL (ou sal básico lamelar) e espécies orgânicas de interesse para uso como drogas ou em cosméticos.¹²⁵ Dois produtos patenteados estão disponibilizados para comercialização: Vitabrid-C para liberação de vitamina C e IAA-Brid para liberação de IAA.

Recentemente, Ambrogi *et al.*⁸¹ propuseram a imobilização do anti-inflamatório celecoxib (uma molécula neutra) em HDL-carbonato calcinado como um meio de evitar a cristalização do fármaco amorfo quando armazenado para uso posterior. Quando não cristalino, a solubilidade da substância é maior, logo, uma das estratégias para aumentar a solubilidade de fármacos muito pouco solúveis é promover a amorfização do sólido. No estudo em questão, o HDL calcinado foi suspenso em solução etanólica contendo o fármaco solubilizado e posteriormente a mistura foi seca a vácuo. Os testes de solubilização das moléculas orgânicas foram realizados em meio de fluido gástrico. Os resultados mostraram que em determinadas concentrações do fármaco no HDL, a cristalização é suprimida e a solubilidade é aumentada nas condições avaliadas.

Tammaro *et al.*⁷⁶ publicaram um trabalho sobre possíveis aplicações do antibiótico succinato de cloranfenicol intercalado em HDL na liberação sustentada transdérmica, quando incorporado em um polímero (policaprolactona) biocompatível e biodegradável. Segundo os autores, o efeito local da droga evita a administração de altas doses ao paciente, diminuindo efeitos colaterais do fármaco. O híbrido incorporado ao polímero pode ser empregado em artigos cirúrgicos como suturas, membranas, placas para reconstituição óssea, auxiliando na reparação e regeneração do tecido. A síntese do nano-híbrido foi realizada através da troca iônica de ânions nitrato intercalado em Mg₂Al-NO₃-HDL pelos ânions succinato de cloranfenicol. Após a incorporação do nano-híbrido ao polímero, foram obtidos filmes de 0,15 mm de espessura. O processo de liberação em solução salina fisiológica mostrou resultados interessantes, pois foi visualizada a presença de dois estágios. No estágio inicial, acontece uma rápida

liberação, na qual uma pequena fração da droga é liberada; o segundo estágio, mais lento, estende-se por um longo período. Esse comportamento é muito diferente e mais lento se comparado com as amostras nas quais o antibiótico está incorporado diretamente na matriz polimérica. Para as aplicações sugeridas pelos autores, é desejável que a liberação se prolongue por 24 h ou mesmo por dias.

A absorção percutânea *in vitro* do anti-inflamatório diclofenaco adsorvido (não intercalado) em hidrotalcita comercial foi investigada por Bonina *et al.*,⁸⁴ empregando membranas de epiderme humana. A amostra que mostrou o melhor resultado de permeabilidade foi utilizada em testes *in vivo* na inibição de eritemas induzidos por radiação UV. Os resultados mostraram que a formulação com hidrotalcita apresenta melhor desempenho que aquela empregada para comparação (gel hidroalcoólico contendo diclofenaco).

HDL como suporte para aplicação em diagnóstico clínico

Ainda na área relacionada à medicina, outra possibilidade de aplicação dos hidróxidos duplos lamelares consiste na utilização dos mesmos como suportes para reagentes utilizados em diagnósticos clínicos, e como biossensores.

Barhoumi *et al.*¹²⁶ publicaram um trabalho que relata o uso do material híbrido contendo urease associada à matriz de HDL de zinco e alumínio como biossensor. A imobilização da enzima foi realizada através do método da troca iônica, partindo-se da matriz Zn₃Al-dodecilsulfato. Os dados de difração de raios X e espectroscopia no infravermelho indicam a obtenção da enzima imobilizada no Zn₃Al-HDL. O material resultante foi depositado pelo método *spin coating* sobre o detector Si/SiO₂/Si₃N₄. A resposta do biossensor foi obtida através de medidas de impedância e capacitância, sendo observado um aumento no valor do limite máximo de intervalo dinâmico da impedância (110 mM) em relação à capacitância (5,6 mM). O valor da constante de Michaelis-Menten, calculada pelas medidas de capacitância de acordo com Lineweaver-Burk para a enzima intercalada no HDL, é da mesma ordem de grandeza da constante da urease livre.

Estudos para avaliar a possível aplicação do sistema HDL-urease como biossensor também foram realizados por Vial *et al.*^{127,128} Na etapa de síntese, os autores exploraram a utilização de diferentes quantidades da biomolécula intercalada na matriz Zn₃Al pelo método da coprecipitação. Os difratogramas de raios X das amostras mostraram que o aumento da razão ZnAl-urease diminui a intensidade do pico basal (001) devido à perda da organização no empilhamento das lamelas. Além disso, segundo os autores, esse aumento intensifica as bandas, por exemplo, νC=O 1652 cm⁻¹ (amida I) e νN-H 1543 cm⁻¹ (amida II), referentes à enzima, confirmando maior quantidade da enzima imobilizada na região interlamelar. Através das imagens de MEV foi possível visualizar que os cristais de Zn₃Al-Cl são formados por placas hexagonais, organizadas na forma de uma rosa, onde as placas são identificadas individualmente. Já para o material híbrido, notou-se uma grande tendência para a formação de filmes espessos com uma orientação preferencial. Observou-se que o aumento da razão Zn₃Al-urease aumenta a densidade do filme, o que demonstra uma maior associação entre a enzima e as lamelas de [Zn₃Al]. Por último, a permeabilidade dos híbridos foi investigada utilizando um método voltamétrico. Os resultados obtidos demonstram uma maior permeabilidade do híbrido (1,6 - 0,7 x 10⁻² cm s⁻¹) se comparada à matriz Zn₃Al/Cl (2,2 - 2,5 x 10⁻² cm s⁻¹) e a eletrodos modificados com a argila catiônica laponita sem (2 x 10⁻³ cm s⁻¹) ou na presença da urease (3 x 10⁻³ cm s⁻¹).

Recentemente, Forano *et al.*¹²⁹ reportaram a imobilização da enzima fosfatase alcalina em HDL de magnésio e alumínio por coprecipitação. O material híbrido isolado apresenta uma estrutura esponjosa interessante, constituída de macroporos que favorecem

a difusão de moléculas em direção ao centro ativo da enzima. Os testes de permeabilidade dos filmes híbridos e da atividade enzimática foram avaliados positivamente em ensaios eletroquímicos com hidroquinona difosfato.

A enzima glicose oxidase também foi imobilizada em HDL para avaliação como biossensor para detecção e quantificação de glicose.¹³⁰ O material híbrido foi preparado a partir de uma dispersão de MgAl-lactato-HDL esfoliado em água. Uma mistura contendo o HDL esfoliado e a enzima foi depositada sobre eletrodo de carbono por *casting*. Os autores comparam os dados de voltametria cíclica da enzima imobilizada em HDL a partir do material esfoliado com aquele obtido sem a prévia esfoliação e destacam o melhor desempenho do primeiro. Apenas a enzima depositada no eletrodo de carbono vítreo não mostra resposta nas condições empregadas no estudo.

Nanocompósitos constituídos de biopolímeros intercalados em HDL de zinco e alumínio foram avaliados como sensores de íons cálcio.⁹⁵ Os dispositivos potenciométricos constituídos dos nanocompósitos de alginato e carragenana incorporados em pasta de carbono ou PVC mostraram as melhores respostas. Os íons cálcio interagem com as cadeias dos biopolímeros mesmo quando intercalados na matriz inorgânica.

Os trabalhos reportados até o momento sugerem que não há a intercalação da enzima no HDL, mas a sua adsorção, uma vez que o tamanho e a conformação desses biopolímeros não permitem a intercalação da maneira usual (troca dos contra íons do sal de partida). O processo de adsorção está principalmente baseado na interação entre partículas de diferentes cargas elétricas.^{127,130} Nos artigos acima reportados, os autores comparam o desempenho das enzimas associadas a HDL com biossensores construídos com outros materiais inorgânicos (nanotubos de carbono e nanopartículas de Au ou Fe₃O₄, por exemplo) e orgânicos (polipirrol). Os estudos mostram que o papel da matriz inorgânica não se restringe à preservação ou proteção da enzima, mas adiciona novas funcionalidades à contraparte bio-orgânica.

HDL como carregadores de substâncias de interesse na agricultura e na área de alimentos

Recentemente, Cornejo *et al.*¹³¹ publicaram um trabalho de revisão que trata da interação de pesticidas com argilas catiônicas e hidróxidos duplos lamelares. A grande maioria dos trabalhos sobre esse assunto enfoca a alta afinidade dos HDL com os pesticidas iônicos com vistas à remoção dessas espécies da água e do solo contaminados, bem como a modificação da superfície dessa matriz com o íon orgânico apropriado pode aumentar o seu desempenho na remoção de pesticidas neutros. Alguns trabalhos começam a tratar da possibilidade de uso dos HDL como reservatórios para a liberação controlada de pesticidas com o objetivo de diminuir o impacto ambiental, diminuindo a ocorrência de processos indesejáveis como volatilização, transporte e lixiviação.

Lakraimi *et al.*¹³² reportam trabalho sobre a intercalação do pesticida 2,4-diclorofenóxiacetato (2,4-D) em Zn₂Al-Cl-HDL através do método da troca iônica. Os autores investigaram parâmetros de síntese como a concentração molar do ânion em solução (2,4-D/Zn₂Al-Cl), tempo de agitação e temperatura para avaliarem a eficácia da troca iônica dos íons cloreto pelo 2,4-D. A intercalação do 2,4-D foi evidenciada pelo aumento no espaçamento basal do material que passou de 0,78 nm (íons cloreto) para 1,91 nm (íons 2,4-D). A estabilidade térmica do orgânico imobilizado na matriz inorgânica (temperatura de decomposição ocorre acima de 300 °C) foi favorecida em relação à espécie livre.

Valim *et al.*¹¹⁵ reportaram um estudo em que três diferentes herbicidas, 2,4-D, ácido 4-cloro-2-metil fenóxi acético (MCPA) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico (picloran),

foram intercalados em hidróxidos duplos lamelares de magnésio e alumínio por três diferentes métodos: coprecipitação, troca iônica e por regeneração de Mg₂Al-CO₃-HDL calcinado. Os produtos obtidos foram caracterizados e ensaios de liberação foram realizados pelos métodos de batelada e por lixiviação em colunas de solos. Todos os herbicidas intercalados apresentaram liberação em água mais lenta do que a dos mesmos livres e foram quase que totalmente liberados pelo método de batelada. Comparados com os herbicidas livres, os materiais intercalados aplicados em colunas de solos resultaram em redução da concentração máxima de herbicida nos lixiviados e levaram à retardação da lixiviação do herbicida. Também foram realizados ensaios da atividade dos herbicidas em plantas, que indicaram que os materiais intercalados apresentaram a mesma eficácia que os herbicidas livres e, portanto, uma potencial aplicabilidade desses materiais como suporte em formulações para liberação sustentada de herbicidas.

Com respeito à utilização de HDL na agricultura, outros híbridos, além daqueles com pesticidas, foram reportados. Bin Hussein *et al.*¹¹³ publicaram um trabalho sobre a imobilização de ácido α -naftalenoacético (NAA), um agente regulador de crescimento vegetal, em HDL de Zn e Al através do método da troca iônica. A intercalação do regulador foi confirmada através dos dados da distância interlamelar do material que foi aumentada de 0,88 nm (íons nitrato) para 2,05 nm (ânion α -naftalenoacetato). O estudo da liberação em água do agente regulador intercalado na matriz inorgânica foi realizado em soluções de vários pHs e mostrou que a taxa de liberação do ânion é dependente do pH. A maior porcentagem de NAA liberado foi encontrada em meios que são altamente ácido ou altamente básico. Em uma solução com pH=1, a liberação do ânion da lamela foi seguida pela formação de uma nova fase, do ZnO. Porém, em pH neutro ou altamente alcalino, a liberação não destruiu a estrutura lamelar pelo menos até 7 dias. Além disso, foi observado que a liberação do NAA apresenta cinética de primeira ordem do início da reação até 8 h, com uma liberação em solução aquosa de 23, 16 e 22% de NAA para pH inicial igual a 1, 7 e 14, respectivamente.

HDL contendo íons nitrato são comumente preparados como intermediários de síntese, uma vez que sofrem reação de troca iônica com certa facilidade quando comparados com outros ânions simples intercalados. Olanrewaju *et al.*¹³³ propõem o uso desses materiais contendo nitrato como fertilizantes de liberação lenta. O estudo praticamente simples compreendeu a síntese de MgAl-NO₃-HDL de diferentes densidades de cargas lamelares (Mg:Al = 2:1; 2,5:1 e 3:1), sob diferentes temperaturas e na presença da solução de amônia. Também foi realizada a síntese, mantendo-se todos os parâmetros constantes, trocando-se a base amônia por hidróxido de sódio.

Com o objetivo de aumentar a estabilidade de espécies de consumo humano em matrizes biocompatíveis, Choy *et al.*¹³⁴ publicaram um trabalho sobre a síntese e caracterização de corantes comestíveis, tais como Allura® Red AC (AR) C₁₈H₁₄N₂O₈S₂²⁻, Sunset Yellow FCF (SY) C₁₆H₁₀N₂O₇S₂²⁻ e Brilliant Blue FCF (BB) C₃₇H₃₄N₂O₉S₃²⁻ imobilizados em Zn₃Al-HDL. Os valores dos espaçamentos basais do AR, SY e BB (2,40; 2,03 e 2,43 nm, respectivamente) confirmam a intercalação dos íons orgânicos. Os dados de análise térmica mostram que a temperatura de decomposição das espécies orgânicas nos novos materiais ocorre a partir de 400 °C, indicando o aumento da estabilidade térmica se comparados aos sais dos corantes. Esses novos sistemas obtidos baseados na inserção de orgânicos em hidróxidos duplos lamelares podem ser úteis para várias aplicações na indústria alimentícia.

Estudos de modelagem molecular

A aplicação de técnicas de simulação computacional ao estudo de argilas catiônicas e aniônicas tornou-se um aliado importante para as técnicas instrumentais comumente usadas na caracterização

desses materiais.¹³⁵ A quantidade de informação que pode ser obtida por simulação continua crescendo e os estudos de mecânica quântica prometem revelar novos e inesperados fenômenos. Na área de HDL intercalados com espécies de interesse medicinal, apenas um trabalho foi reportado até o momento empregando a modelagem computacional para auxiliar no entendimento da interação entre as contrapartes orgânica e inorgânica e seus arranjos espaciais.

Mohanambe e Vasudevan⁶⁶ reportaram a intercalação de três anti-inflamatórios não-esteroidais, ibuprofeno, diclofenaco e indometacina, em MgAl-HDL. As técnicas de DRX, IV, Raman e RMN foram utilizadas para caracterizar esses materiais, enquanto que a simulação computacional foi utilizada para obter informações sobre o arranjo espacial das espécies confinadas entre as camadas positivas do HDL. Segundo dados de DRX, todas as amostras intercaladas com os fármacos apresentam um arranjo de bicamada na região interlamelar. Os resultados computacionais indicam que a estrutura do ibuprofeno intercalado se manteve a mesma da molécula livre, mas a imobilização do diclofenaco e indometacina provoca modificações em suas estruturas quando na região interlamelar. Segundo os autores, essas diferenças se devem à interação eletrostática entre o átomo de cloro presente nas espécies orgânicas e as cargas positivas das lamelas.

PERSPECTIVAS E DESAFIOS

A possibilidade de se controlar a morfologia das nanopartículas de HDL por meio de modificações nos procedimentos de síntese, vislumbrada recentemente, representa mais uma vantagem para seu uso como carregador de fármacos e de outros compostos de interesse medicinal, uma vez que dessa forma se pode controlar sua distribuição dentro da célula priorizando sua entrada no núcleo ou sua permanência no citoplasma e, portanto, como veículo para atingir alvos específicos. Com isto, têm-se estratégias farmacológicas mais eficientes, com menor efeito colateral, abrindo-se novas perspectivas para o uso desses nanomateriais em biomedicina celular. Sabe-se que a principal desvantagem das partículas inorgânicas em relação aos carregadores virais é o fato das primeiras sofrerem degradação no endossoma, não permitindo alta eficiência na transfecção. Adicionalmente, evidências obtidas sobre o mecanismo de veiculação intracelular dessas nanopartículas, que parece ocorrer prioritariamente por um processo de endocitose mediada por clatrina, devem permitir um melhor planejamento para obtenção de HDL com propriedades apropriadas e ajustadas a cada uso.

Alguns estudos sobre a utilização de nanopartículas inorgânicas para o transporte de DNA para o interior das células empregam sistemas contendo mais de um tipo de material inorgânico como, por exemplo, partículas de Fe₂O₃ recobertas com sílica funcionalizada ou mesmo sistemas ternários com Fe₂O₃, sílica e uma camada externa de ouro. Exemplos desse tipo com HDL ainda são raros, mas poderiam ser mais explorados, de modo a aumentar o desempenho das partículas inorgânicas tanto para a área de liberação sustentada quanto à de diagnóstico clínico.

O emprego de HDL por via oral é praticamente bem documentado, mas para uso intravenoso, são ainda necessários estudos *in vitro* e *in vivo* mais aprofundados para conhecer sua citotoxicidade e rotas de movimentação, sua biodistribuição e seus mecanismos de eliminação no organismo. Com relação a outras partículas inorgânicas que vêm sendo avaliadas para uso clínico, os HDL mostram vantagens que devem ser consideradas com atenção em trabalhos futuros.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD – Dicroísmo Circular
 CellTiter-Glo – Ensaio de viabilidade celular que quantifica os níveis de ATP celular, como medida da viabilidade celular, usando a produção de luz catalisada por luciferina-luciferase
 CHN - Análise química dos elementos C, H e N
 CHNS - Análise química dos elementos C, H, N e S
 CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
 DRX - Difractometria de raios X
 DSC - Calorimetria exploratória diferencial
 DTA – Análise térmica diferencial
 DTG - Termogravimetria derivada (curva referente à primeira derivada da curva TG)
 EDX – Energia dispersiva de raios X
 FT-Raman - Espectroscopia Raman com transformada de Fourier
 ICP-AES - Espectroscopia de Emissão Atômica
 IV - Espectroscopia vibracional no infravermelho
 LAMMPS (*Large-Scale Atomistic/Molecular Massively Parallel Simulator*) - programa de simulação de dinâmica molecular
 LSCM (*Laser Scanning Confocal Microscopy*) - Microscopia confocal de varredura a laser
 MET – Microscopia eletrônica de transmissão
 MS - Espectrometria de Massa
 RMN – Ressonância Magnética Nuclear
 TG - Termogravimetria
 TG-DSC-MS - Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial acopladas à espectrometria de massas
 UV/Vis - Espectroscopia eletrônica na região ultravioleta e visível
 XPS – Espectroscopia de fotoemissão de raios X

REFERÊNCIAS E NOTAS

- Xu, Z. P.; Zeng, Q. H.; Lu, G. Q.; Yu, A. B.; *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1027.
- Sanvicens, N.; Marco, M. P.; *Trends. Biotechnol.* **2008**, *26*, 425.
- Sokolova, V.; Epple, M.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1382.
- Corr, S. A.; Rakovich, Y. P.; Gun'ko, Y. K.; *Nanoscale. Res. Lett.* **2008**, *3*, 87.
- Hild, W. A.; Breunig, M.; Goepferich, A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 153.
- Malmsten, M.; *Soft Matter* **2006**, *2*, 760.
- Drotleff, S.; Lungwitz, U.; Breunig, M.; Dennis, A.; Blunk, T.; Tessmar, J.; Göpferich, A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 385.
- Son, S. J.; Bai, X.; Lee, S. B.; *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 650.
- Tong, W.; Gao, C.; Möhwal, H.; *Macromolecules* **2006**, *39*, 335.
- Skrabalak, S. E.; Chen, J.; Au, L.; Lu, X.; Li, X.; Xia, Y.; *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3177.
- Daniel, M. C.; Astruc, D.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- Gu, Z.; Thomas, A. C.; Xu, Z. P.; Campbell, J. H.; Lu, G. Q.; *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 3715.
- Sun, B.; Ranganathan, B.; Feng, S. S.; *Biomaterials* **2008**, *29*, 475.
- Chatterjee, D. K.; Zhang, Y.; *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, *8*, 131.
- Jain, K. K.; *Trends. Biotechnol.* **2006**, *24*, 143.
- Fukumori, Y.; Ichikawa, H.; *Adv. Powder Technol.* **2006**, *17*, 1.
- Biodisponibilidade é uma medida da porcentagem da dose administrada da substância com atividade terapêutica que alcança o sistema de circulação e está disponível no local de ação.
- Davis, M. E.; Chen, Z.; Shin, D. M.; *Nature Rev.* **2008**, *7*, 771.
- De Roy, A.; Forano, C.; Besse, J. P.; *Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc.* **1991**, *202*, 127.
- Cavani, F.; Trifiro, F.; Vaccari, A.; *Catal. Today* **1991**, *11*, 173.
- Vaccari, A.; *Catal. Today* **1998**, *41*, 53.

22. Vaccari, A.; *Appl. Clay Sci.* **1995**, *10*, 1.
23. Crepaldi, E. L.; Valim, J. B.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 300.
24. Pinnavaia, T. J.; *Mater. Chem.* **1995**, *245*, 283.
25. Evans, D. G.; Duan, X.; *Chem. Commun.* **2006**, *5*, 485.
26. De Roy, A.; Forano C.; El Maki K.; Besse J. P. *Em Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry*; Ocelli, M.; Robson, H. E., eds.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1992, vol. 2, cap. 7.
27. Trifirò, F.; Vaccari, A. *Em Hydrotalcite-like Anionic Clays (Layered Double Hydroxides)*; Alberti, G.; Bein, T., eds.; Wiley: New York, 1996, cap. 8.
28. Bratterman, P. S.; Xu, Z. P.; Yarberry, F. *Em Handbook of Layered Materials*; Auerbach, S. M.; Carrado, K. A.; Dutta, P. K., eds.; Wiley: New York, 2004, cap. 8.
29. Constantino, V. R. L.; Pinnavaia, T. J.; *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 883.
30. Valim, J. B.; Crepaldi, E. L.; Pavan, P. C.; *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 1337.
31. Sels, B. F.; De Vos, D. E.; Jacobs, P. A.; *Catal. Rev.* **2001**, *43*, 443.
32. Rives, V.; Ulibarri, M. A.; *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *181*, 61.
33. Ballarin, B.; Gazzano, M.; Seeber, R.; Tonelli, D.; Vaccari, A.; *J. Eletroanal. Chem.* **1998**, *445*, 27.
34. Therias, S.; Mousty, C.; *Appl. Clay Sci.* **1995**, *10*, 147.
35. Barbosa, C. A. S.; Ferreira, A. M. C.; Constantino, V. R. L.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *8*, 1577.
36. Bonifácio, L. S.; Gordijo, C. R.; Constantino, V. R. L.; Silva, D. O.; Kiyohara, P. K.; Araki, K.; Toma, H. E.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 274.
37. Marangoni, R.; Taviot-Gueho, C.; Illaïk, A.; Wypych, F.; Leroux, F.; *J. Colloid Interf. Sci.* **2008**, *326*, 366.
38. Wypych, F.; Bail, A.; Halma, M.; Nakagaki, S.; *J. Catal.* **2005**, *234*, 431.
39. Ferreira, O. P.; Moraes, S. G.; Duran, N.; Cornejo, L.; Alves, O. L.; *Chemosphere* **2006**, *62*, 80.
40. Iglesias, A. H.; Ferreira, O. P.; Gouveia, D. X.; Souza-Filho, A. G.; Paiva, J. A. C.; Mendes-Filho, J.; Alves, O. L.; *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 142.
41. Cosnier, S.; Mousty, C.; Gondran, C.; Lepellec, A.; *Mater. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2006**, *26*, 442.
42. Oh, J. M.; Park, M.; Kim, S. T.; Jung, J. Y.; Kang, Y. G.; Choy, J. H.; *J. Phys. Chem. Solids* **2006**, *67*, 1024.
43. Zhang, H.; Zou, K.; Guo, S. H.; Duan, X.; *J. Solid State Chem.* **2006**, *179*, 1792.
44. Choy, J. H.; *Sc. Tech. Hybrid Mat. Solid State Phenom.* **2006**, *111*, 1.
45. Serna, C. J.; White, J. L.; Hem, S. L.; *J. Pharm. Sci-US.* **1978**, *67*, 324.
46. Peterson, C. L.; Perry, D. L.; Masood, H.; Lin, H.; White, J. L.; Hem, S. L.; Fritsch, C.; Haeusler, F.; *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 998.
47. Miederer, S. E.; Wirtz, M.; Fladung, B.; *Chin. J. Digestive Diseases* **2003**, *4*, 140.
48. Del Hoyo, C.; *Appl. Clay Sci.* **2007**, *36*, 103.
49. Choy, J. H.; Choi, S. J.; Oh, J. M.; Park, T.; *Appl. Clay Sci.* **2007**, *36*, 122.
50. Khan, A. I.; Lei, L. X.; Norquist, A. J.; O'Hare, D.; *Chem. Comm.* **2001**, *22*, 2342.
51. Ambroggi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L.; *Int. J. Pharm.* **2001**, *220*, 23.
52. Tronto, J.; Crepaldi, E. L.; Pavan, P. C.; Paula, C. C.; Valim, J. B.; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2001**, *356*, 227.
53. Ambroggi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Nocchetti, M.; Perioli, L.; *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1407.
54. Nakayama, H.; Takeshita, K.; Tsuhako M.; *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2419.
55. Tronto, J.; Reis, M. J.; Silvério, F.; Balbo, V. R.; Marchetti, J. M.; Valim, J. B.; *J. Phys. Chem. Solids* **2004**, *65*, 475.
56. Bin Hussein, M. Z.; Long, C. W.; *Mater. Chem. Phys.* **2004**, *85*, 427.
57. Del Arco, M.; Gutiérrez, S.; Martín, C.; Rives, V.; Rocha, J.; *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 3954.
58. Del Arco, M.; Cebadera, E.; Gutierrez, S.; Martín, C.; Montero, M. J.; Rives, V.; Rocha, J.; Sevilla, M. A.; *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1649.
59. Choy, J. H.; Jung, J. S.; Oh, J. M.; Park, M.; Jeong, J.; Kang, Y. K.; Han, O. J.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 3059.
60. Dupin, G. C.; Martinez, H.; Guimon, C.; Dumitriu, E.; Fechete, I.; *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 95.
61. Li, B. X.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X.; *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 199.
62. Li, B.; He, J.; Evans, D. V.; Duan, X.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *287*, 89.
63. Tyner, K. M.; Schiffman, S. R.; Giannelis, E. P.; *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 501.
64. Wei, M.; Shi, S. X.; Wang, J.; Li, Y.; Duan, X.; *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 253.
65. Gordijo, C. R.; Barbosa, C. A. S.; Ferreira, A. M. C.; Constantino, V. R. L.; Silva, D. O.; *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1135.
66. Mohanambe, L.; Vasudevan, S.; *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 15651.
67. Schoubben, A.; Blasi, P.; Giovagnoli, S.; Nocchetti, M.; Ricci, M.; Perioli, L.; Rossi, C.; *Pharm. Res.* **2005**, *23*, 604.
68. Wang, Z.; Wang, B.; Gao, L.; Xu, L.; *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 736.
69. Li, W. Z.; Lu, J.; Chen, J. S.; Li, G. D.; Jiang, Y. S.; Li, L. S.; Huang, B. Q.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 89.
70. Yang, Q. Z.; Yang, J.; Zhang, C. K.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *326*, 148.
71. Oh, J. M.; Choi, S. J.; Kim, S. T.; Choy, J. H.; *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1411.
72. Li, S. P.; *Colloids Surf. A.* **2006**, *290*, 56.
73. Del Arco, M.; Fernandez, A.; Martin, C.; Rives, V.; *Appl. Clay Sci.* **2007**, *36*, 133.
74. Kantonis, G.; Trikeriotis M.; Ghanotakis, D. F.; *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *185*, 62.
75. Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D. F.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *332*, 176.
76. Tammaro, L.; Costantino, U.; Bolognese, A.; Sammartino, G.; Marenzi, G.; Calignano, A.; Tete, S.; Mastrangelo, F.; Califano, L.; Vittoria, V.; *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2007**, *29*, 417.
77. Yang, J. H.; Han, Y. S.; Park, M.; Park, T.; Hwang, S. J.; Choy, J. H.; *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2679.
78. Xue, Y. H.; Zhang, R.; Sun, X. Y.; Wang, S. L.; *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *19*, 1197.
79. Hou, W. G.; Jin, Z. L.; *Colloid Polym. Sci.* **2007**, *285*, 1449.
80. Ni, Z. M.; Xia, S. J.; Wang, L. G.; Xing, F. F.; Pan, G. X.; Hu, J.; *Chem. J. Chinese U.* **2007**, *28*, 1214.
81. Ambroggi, V.; Perioli, L.; Marmottini, F.; Rossi, C.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 253.
82. Cunha, V. R. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
83. Ni, Z.; Xing, F.; Wang, P.; Cao, G.; *Appl. Clay Sci.* **2008**, *40*, 72.
84. Bonina, F. P.; Giannossi, M. L.; Medici, L.; Puglia, C.; Summa, V.; Tateo, F.; *Appl. Clay Sci.* **2008**, *41*, 165.
85. Sun, Y.; Zhou, Y.; Ye, X.; Chen, J.; Wang, Z.; *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 2943.
86. Choi, S. J.; Oh, J. M.; Choy, J. H.; *J. Phys. Chem. Solids* **2008**, *69*, 1528.
87. Gu, Z.; Thomas, A. C.; Xu, Z. P.; Campbell, J. H.; Lu, G. Q.; *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 3715.
88. Del Arco, M.; Fernandez, A.; Martin, C.; Sayalero, M. L.; Rives, V.; *Clay Miner.* **2008**, *43*, 255.
89. Aisawa, S.; Yasutake, A.; Takahashi, S.; Hirahara, H.; Narita, E.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 428.
90. Del Arco, M.; Fernandez, A.; Martin, C.; Rives, V.; *Appl. Clay Sci.* **2009**, *42*, 3.
91. Gunawan, P.; Xu, R.; *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4367.
92. Liu, C.; Hou, W.; Li, L.; Li, Y.; Liu, S.; *J. Solid State Chem.* **2008**, *181*, 1792.

93. Wei, M.; Pu, M.; Guo, J.; Han, J.; Li, F.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X.; *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 5169.
94. Xia, S.-J.; Ni, Z.-M.; Xu, Q.; Hu, B.-X.; Hu, J.; *J. Solid State Chem.* **2008**, *181*, 2610.
95. Darder, M.; Blanco, M. L.; Aranda, P.; Leroux, F.; Hitzky, E. R.; *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969.
96. Whilton, N. Y.; Vickers, P. J.; Mann, S.; *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1623.
97. O'Hare, D. M.; *WO 2002/ 47729* **2002**.
98. O'Hare, D. M.; *US pat. 0052849* **2004**.
99. Choy, J. H.; Park, T.; Kim, S. T.; Son, Y. H.; *WO 2006/ 091009* **2006**.
100. Marenzi, G.; Bolognese, A.; Califano, L.; Calignano, A.; Costantino, U.; Sammartino, G.; Vittoria, V.; *WO 2007/ 010584* **2007**.
101. Stockel, R. F.; *US pat. 0013893* **2006**.
102. Slaghek, T. M.; Batenburg, L. F.; Fischer, H. R.; *WO 2007/ 067043* **2007**.
103. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; Portier, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1399.
104. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Jeong, Y. J.; Park, J. S.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4042.
105. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 1671.
106. Kwak, S. Y.; Jeong, Y. J.; Park, J. S.; Choy, J. H.; *Solid State Ionics* **2002**, *151*, 229.
107. Choy, J. H.; Oh, J. M.; Park, M.; Sohn, K. M.; Kim, J. W.; *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1181.
108. Desigaux, L.; Belkacem, M. B.; Richard, P.; Cellier, J.; Le'one, P.; Cario, L.; Leroux, F.; Taviot-Gueho, C.; Pitard, B.; *Nano Lett.* **2006**, *6*, 199.
109. Oh, J. M.; Kwak, S. Y.; Choy, J. H.; *J. Phys. Chem. Solids* **2006**, *67*, 1028.
110. Thyveetil, M. A.; Coveney, P. V.; Greenwell, H. C.; Suter, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12485.
111. Thyveetil, M. A.; Coveney, P. V.; Greenwell, H. C.; Suter, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4742.
112. Tyner, K. M.; Roberson, M. S.; Berghorn, K. A.; Li, L.; Gilmour, Jr, R. F.; Batt, C. A.; Giannelis, E. P.; *J. Controlled Release* **2008**, *100*, 399.
113. Bin Hussein, M. Z.; Zainal, Z.; Yahaya, A. H.; Foo, D. W. V.; *J. Controlled Release* **2002**, *82*, 417.
114. Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuchiko, M.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 469.
115. Cardoso, L. P.; Celis, R.; Cornejo, J.; Valim, J. B.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5968.
116. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, J. Wiley: New York, 1990.
117. Xu, Z. P.; Niebert, M.; Porazik, K.; Walker, T. L.; Cooper, H. M.; Middelberg, A. P. J.; Gray, P. P.; Bartlett, P. F.; Lu, G. Q.; *J. Controlled Release* **2008**, *130*, 86.
118. Kwak, S. Y.; Kriven, W. M.; Wallig, M. A.; Choy, J. H.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 5995.
119. Park, T.; Choy, J. H.; Oh, J. M.; Jung, J. S.; *WO 2006/ 129893* **2006**.
120. Choi, S. J.; Oh, J. M.; Park, T.; Choy, J. H.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 4017.
121. Tronto, J.; Cardoso, L. P.; Marchetti, J. M.; Bentley, M. V. B.; Valim, J. B.; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2003**, *390*, 79.
122. Du, Na; Hou, W.-G.; Song, S.-E.; *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 13909.
123. Nakayama, H.; Kuwano, K.; Tsuchiko, M.; *J. Phys. Chem. Solids* **2008**, *69*, 1552.
124. Arizaga, G. G. C.; Satyanarayana, K. G.; Wypych, F.; *Solid State Ionics* **2007**, *178*, 1143. Os Sais Básicos Lamelares (SBL) são sólidos com estrutura lamelar, tendo em comum com os HDL o fato que ambos apresentam camadas do tipo da brucita, $Mg(OH)_2$, formadas por octaedros de $M(OH)_6$ compartilhando arestas, com cargas residuais positivas. No caso do SBL de zinco, a estrutura das lamelas é formada apenas por cátions Zn, apresentando vacâncias em sítios octaédricos, e a compensação de cargas é realizada pela presença de grupamentos aniônicos completando a coordenação tetraédrica do metal divalente. Nesses últimos, os tetraedros são localizados fora da camada do tipo da brucita, acima e abaixo das lacunas octaédricas.
125. <http://www.nanohybrid.com>, acessada em Outubro 2008.
126. Barhoumi, H.; Maaref, A.; Rammah, M.; Martelet, C.; Jaffrezic, N.; Mousty, C.; Vial, S.; Forano, C.; *Mater. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2006**, *26*, 328.
127. Vial, S.; Forano, C.; Shan, D.; Mousty, C.; Barhoumi, H.; Martelet, C.; Jaffrezic, N.; *Mater. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2006**, *26*, 387.
128. Vial, S.; Prevot, V.; Leroux, F.; Forano, C.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 190.
129. Geraud, E.; Prevot, V.; Forano, C.; Mousty, C.; *Chem. Commun.* **2008**, *13*, 1554.
130. Zhang, Y.; Chen, X.; Wang, J.; Yang, W.; *Electrochem. Solid State Lett.* **2008**, *11*, 19.
131. Cornejo, J.; Celis, R.; Pavlovic, I.; Ulibarri, M. A.; *Clay Miner.* **2008**, *43*, 155.
132. Lakraimi, M.; Legrouri, A.; Barroug, A.; De Roy, A.; Besse, J. P.; *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 1007.
133. Olanrewaju, J.; Newalkar, B. L.; Mancino, C.; Komarneni, S.; *Mater. Lett.* **2000**, *45*, 307.
134. Choy, J. H.; Kimb, Y. K.; Sona, Y. H.; Choy, Y. B.; Oha, J. M.; Junga, H.; Hwang, S. J.; *J. Phys. Chem. Solids* **2008**, *69*, 1547.
135. Greenwell, H. C.; Jones, W.; Coveney, P. V.; Stackhouse, S.; *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 708.