UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

MICHELE APARECIDA ROCHA

**MATERIAIS HÍBRIDOS NANOESTRUTURADOS À
BASE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES
E O FÁRMACO SULINDACO**

Versão Corrigida

São Paulo

Data de depósito na SPG

08/07/2015

MICHELE APARECIDA ROCHA

**MATERIAIS HÍBRIDOS NANOESTRUTURADOS À
BASE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES
E O FÁRMACO SULINDACO**

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

Orientador: Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Michele Aparecida Rocha

Materiais híbridos nanoestruturados à base de hidróxidos duplos lamelares e o fármaco sulindaco.

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Profa. Dra Vera Regina Leopoldo Constantino
(Orientadora e Presidente)
IQ - USP

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

São Paulo
08 de julho de 2015

Dedico este trabalho àqueles que são a razão de tudo em minha vida:

Meus pais, Gilson e Rosângela;

Meu irmão Issac;

E meu porto seguro, Marcio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho. De forma muito especial agradeço à Profa. Dra. Vera Regina Constantino, pela orientação e, acima de tudo, pelos anos de compreensão. À sua família, Fernando e Joaquim, pelo apoio e cordialidade.

Aos Professores e estudantes colaboradores que desempenharam papel fundamental no desenvolvimento deste estudo:

Profa. Dra. Helena M. Petrilli e Philippe A. D. Petersen, do IF-USP pelo desenvolvimento dos cálculos de DFT e pelas discussões.

Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria e Otávio Mendes Gil, do Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQ-USP, pela ajuda na obtenção e interpretação dos espectros Raman e principalmente pela participação nos estudos *in vivo*.

Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh e Rodrigo Barbosa, da EPM-UNIFESP, pelas discussões enriquecedoras e por possibilitarem a realização dos estudos *in vivo*.

Profa. Dra. Christine Taviot-Gueho e Dr. Fabrice Leroux da *Université Blaise Pascal*, na França, pela recepção durante duas breves e produtivas semanas e pela ajuda com os experimentos de ^{13}C -RMN CP MAS e *1D Plot*.

Dr. Erico Teixeira Neto do LNNano pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Agradeço de forma especial a todos os colegas de trabalho da Central Analítica, pelo convívio diário, amizade e apoio. Sobretudo às Chefes de Seção: Luzia Narimatsu e Alessandra Ramalho pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar em decorrência do Doutorado.

Aos amigos e funcionários do grupo de pesquisa LaSol: Ana Lúcia, Patrícia, Ana Paula, Vaeudo, Gustavo, Vanessa, Vanessa Sakai, Danilo, Eduardo, Victor, Mariana, Rafael, Amanda, Ricardo, Maria Aparecida, Efigênia e Armando, pelos longos anos de convivência, amizade e grande apoio. Agradeço à Caroline, pela ajuda em diversas situações e à Vanessa por compartilhar os conhecimentos sobre esses sistemas fascinantes que são os HDLs.

À Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, pela colaboração com nosso grupo de pesquisa, pelos seminários semanais e discussões enriquecedoras.

Aos amigos de longa data que me deram suporte mais que o esperado e provam diariamente o quanto tenho sorte em tê-los em minha vida: Cerize, Cristiane, Evelize, Janaína, Daiana, Ana Paula: obrigada! Agradeço à Rebeca pelo convívio harmonioso ao longo de todos esses anos, pelas palavras e conselhos sempre certos. Agradeço ao Alfredo pela amizade, conselhos e ainda pela ajuda na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À minha família: meus pais Rosângela e Gilson, meu irmão Isaac, ao Marcio e à Akiko pela presença constante, amor, carinho e paciência. Vocês são minha fonte de força e inspiração para poder continuar.

Às agências de fomento: Capes, pela bolsa concedida de 2009 a 2011, e à FAPESP, pelo auxílio através do projeto temático.

À todos os funcionários do IQ-USP e demais pessoas que de alguma forma auxiliaram neste longo processo.

“Quem conheceu a alegria da compreensão conquistou um amigo infalível para a vida. O pensar é para o homem, o que é voar para os pássaros. Não toma como exemplo a galinha quando podes ser uma cotovia.”

Albert Einstein (1951)

(Em carta recentemente descoberta no Colégio Anchieta, em Porto Alegre)

RESUMO

Rocha, M. A. **Materiais híbridos nanoestruturados à base de hidróxidos duplos lamelares e o fármaco sulindaco**. 2015. 170 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são matrizes inorgânicas bidimensionalmente estruturadas que apresentam propriedades diversas e interessantes para a formação de materiais híbridos. Em especial na área medicinal e farmacológica, o emprego de HDLs com lamelas contendo os íons Mg/Al e Zn/Al tem mostrado resultados promissores como antiácidos e como carregadores de fármacos. Por outro lado, anti-inflamatórios não esteroidais como o sulindaco são moléculas orgânicas ionizáveis que podem ser intercalados em HDLs levando à formação de materiais híbridos com potencial para uso na área farmacêutica.

Este trabalho consistiu na síntese e na caracterização de materiais híbridos baseados em matrizes de HDLs de Zn_RAl e Mg_RAl (R é a razão molar M^{II}/Al) e o ânion derivado do fármaco sulindaco (abreviados $M_2^{II}Al-Sul$). Foram avaliadas as condições experimentais mais apropriadas para a obtenção de materiais com alta cristalinidade e alto conteúdo do fármaco. Os materiais híbridos preparados por um método simples de coprecipitação (*one pot*) à temperatura ambiente e a 55°C apresentaram capacidade de carregamento de 50 a 55% (em massa) de sulindaco.

Os difratogramas de raios X dos híbridos $M_2^{II}Al-Sul$ indicaram a formação de materiais mais cristalinos a 55°C, com várias reflexões basais indicando alto grau de organização das lamelas e distância interplanar de cerca de 2,74 nm. O arranjo bidimensional interdigitado dos ânions sulindaco entre as lamelas foi proposto através do *mapa de densidade eletrônica* unidimensional (*1D Plot*). A análise morfológica por microscopias eletrônicas de varredura e transmissão revelou a formação de estruturas nanométricas planas, flexíveis e desordenadas no caso do $Mg_2Al-Sul$; as partículas de $Zn_2Al-Sul$ também apresentam *nanoscrolls*, com cerca de 100 nm de diâmetro, uma morfologia que não havia sido reportada até então para HDLs.

Os espectros vibracionais no infravermelho dos materiais híbridos mostraram bandas típicas do sulindaco atribuídas ao $\nu S=O$ em 1011 e 1039 cm^{-1} , ao $\nu C-F$ em 1163 cm^{-1} e bandas referentes aos estiramentos antissimétrico e simétrico do grupo COO^- em

aproximadamente 1564 e 1394 cm^{-1} , que confirmam a presença do sulindaco na forma aniônica no sistema híbrido. Deslocamentos de picos observados nos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 no estado sólido sugerem que o confinamento entre as lamelas promove alterações na densidade de carga da espécie orgânica. As técnicas espectroscópicas confirmam a manutenção da integridade química do fármaco após o processo de intercalação. As atribuições dos espectros vibracionais e de ressonância magnética nuclear foram efetuadas com o auxílio do método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) para a espécie orgânica.

A avaliação do comportamento térmico por termogravimetria acoplada à calorimetria exploratória diferencial e à espectrometria de massas (TG-DTA-MS) evidencia sensível aumento na estabilidade térmica do fármaco intercalado em matriz de Zn_2Al . Esse fato foi interpretado através da análise dos espectros vibracionais de amostras aquecidas a 250°C. Propõe-se que a desidroxilação das lamelas do HDL de zinco promove a coordenação do grupo carboxilato do ânion sulindaco ao metal divalente, aumentando sua estabilidade térmica.

Os ensaios de dissolução *in vitro* evidenciam um mecanismo difusional de liberação modificada (prolongada) do fármaco a partir do material híbrido, que ocorre em cerca do dobro do tempo observado para o sulindaco não intercalado. Resultados preliminares de estudo *in vivo* de pastilhas dos materiais híbridos implantadas em região intramuscular de ratos atestam a biocompatibilidade e a antigenicidade dos materiais HDL-Cl e dos híbridos HDL-Sul.

Palavras-chave: Hidróxidos duplos lamelares, sulindaco, compostos de intercalação, e liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

Rocha, M. A. **Nanostructured hybrid materials based on layered double hydroxides and the sulindac drug**. 2015. 170 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Layered double hydroxides (LDHs) are two-dimensionally structured inorganic matrices that show diverse and interesting properties for hybrid materials development. Particularly in the medical and pharmaceutical area, the use of LDHs with layers containing Zn/Al and Mg/Al ions has shown promising results. On the other hand, nonsteroidal drugs such as sulindac are ionizable organic molecules that can be intercalated into LDH leading to the formation of hybrid materials with potential usage in the pharmaceutical area.

This work involved the synthesis and characterization of hybrid materials based on matrices of LDHs Zn_RAl and Mg_RAl (R is the M^{II}/Al molar ratio) and the anion derived from the sulindac drug (abbreviated $M_2^{II}Al-Sul$). The most suitable experimental conditions for obtaining materials with high crystallinity and also high drug contents were evaluated. Hybrid materials prepared by a simple coprecipitation method (one pot) at room temperature and 55 °C showed loading capacity of about 50 - 55% (by mass) of sulindac.

X-ray diffraction revealed the formation of higher crystalline materials at 55 °C; various basal reflections indicate a high degree of layers stacking and an interlayer distance of about 2.74 nm to $M_2^{II}Al-Sul$ hybrids. A two-dimensional array of interdigitated sulindac anions between the layers was proposed by one-dimensional electron density map (1D Plot). The morphological analysis by electronic scanning and transmission microscopies revealed the formation of flat, flexible and disordered nanoscale structures in the case of $Mg_2Al-Sul$; nanoscrolls particles of about 100 nm in diameter are also present in $Zn_2Al-Sul$ sample, a morphology which had not been reported so far for LDHs.

The vibrational spectra of hybrid materials in the infrared showed the characteristic sulindac bands assigned to $\nu S=O$ at 1011 and 1039 cm^{-1} , the νCF at 1163 cm^{-1} and bands related to the antisymmetric and symmetric stretching of the $-COO-$ group at approximately 1564 and 1394 cm^{-1} which confirmed the presence of the anion sulindac in the hybrid system. Shift peaks observed in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra in solid state suggest that the confinement between the layers promotes variations in the organic species charge density. Spectroscopic techniques confirm the maintenance of the chemical integrity

of the drug after the intercalation process. The spectral assignments of the organic species were supported by Density Functional Theory (DFT).

The evaluation of the thermal behavior by thermogravimetry coupled with differential scanning calorimetry and mass spectrometry (TG-DSC-MS) shows substantial increase in the thermal stability of the drug intercalated into Zn_2Al matrix.—This effect was interpreted by analysis of vibrational spectra of samples calcined at 250 °C. It is proposed that dehydroxylation of the Zn_2Al layers promotes the coordination of the sulindac carboxylate group to the divalent metal.

In vitro dissolution tests of hybrid material show a diffusional mechanism of modified drug release (sustained), which occurs in about twice the time observed for sulindac not intercalated. Preliminary results from *in vivo* study of hybrid materials' pellets implanted in the intramuscular region of rats attest to biocompatibility and antigenicity of LDH-Cl and LDH-Sul hybrid materials.

Keywords: Layered double hydroxides, intercalation compounds, sulindac and drug delivery.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COX	Enzima ciclo-oxigenase
COX-1	Isoforma ciclo-oxigenase 1
COX-2	Isoforma ciclo-oxigenase 2
CIF	Ficha de informação cristalográfica
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DFT	Density Functional Theory (Teoria do Funcional da Densidade)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)
DTA	Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)
DTG	Derivative thermogravimetry (primeira derivada da curva TG)
EGA	<i>Evolved Gas Analysis</i> (análise de gases desprendidos)
HDL	Hidróxido duplo lamelar
MS	Mass spectrometry (Espectrometria de Massas)
SDF	Sidestream Dark Field Imaging
PTFE, Teflon®	Politetrafluoretileno
TG	Thermogravimetry (Termogravimetria)

GLOSSÁRIO

Adenoma: são pólipos do cólon, ou seja, neoplasias epiteliais benignas que se originam no revestimento de células epiteliais do cólon e tem potencial muito pequeno para malignidade.

Antigenicidade: capacidade de uma substância de estimular a produção de anticorpos.

Condição *sink*: condições com volume de solução que permite pelo menos três vezes a concentração de saturação do fármaco.

Displasia: é um termo geral usado para designar o surgimento de anomalias durante o desenvolvimento de um tecido ou órgão.

SDF: Técnica videomicroscópica de imagem chamada *Sidestream Dark Field* (SDF).

Efeito turbostrático: termo usado para descrever uma estrutura cristalina na qual os planos basais estão desalinhados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Ilustração de um íon divalente ou trivalente coordenado a íons hidroxila. (B) Estrutura de um hidróxido duplo lamelar.....	27
Figura 2. Foto do medicamento antiácido Talcid®, comercializado pela Bayer, no qual a hidrotalcita é o princípio ativo.	28
Figura 3. Esquema da conversão do ácido araquidônico nos mediadores inflamatórios: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrieno. São indicados também os locais no organismo onde esses compostos são normalmente encontrados. ⁵⁹⁻⁶¹ _ENREF_53 _ENREF_55	32
Figura 4. Estrutura molecular de alguns dos principais anti-inflamatórios não esteroidais.....	33
Figura 5. Estruturas moleculares do indol e da serotonina.	34
Figura 6. (A) Comprimido de sulindaco de 200 mg comercializado nos EUA pela empresa Mylan®. ⁶⁴ (B) estrutura molecular do sulindaco.	35
Figura 7. Isômeros (A) <i>Z</i> e (B) <i>E</i> do sulindaco.	36
Figura 8. Conformação molecular do sulindaco nos polimorfos I (A) e II (B). Figuras obtidas no programa Discovery Studio 4.0 a partir dos arquivos CIF depositados por Grzesiak et al. ⁷⁵ (N° CCDC N°. 625435) e Koo et al. ⁷³ (CCDC N° 1143612).....	38
Figura 9. Empacotamento das moléculas de sulindaco na estrutura cristalina dos polimorfos I e II. Figuras obtidas nos programas de visualização de estrutura cristalina Discovery Studio 4.0 e Mercury, a partir dos arquivos CIF depositados por Grzesiak et al. (N° CCDC N°. 625435) e Koo et al. (CCDC N° 1143612).....	40
Figura 10. Vias de biotransformação do sulindaco: redução formando o metabólito ativo sulfeto e oxidação formando a sulfona. A hidroxilação e conjugação com ácido glicurônico produzem metabólitos que são excretados. Figura adaptada de Larini et al., ⁵² Shen et al., ⁶³ e Duggan et al. ⁸⁰	43
Figura 11. Exemplo de curva de nível sanguíneo de um fármaco hipotético em função do tempo a partir de uma forma farmacêutica de liberação convencional e de liberação modificada. Figura adaptada de Howard et al. ⁷⁹ e Uhrich et al. ¹¹⁰	51

Figura 12. Ilustração simplificada dos processos de dissolução e liberação de um fármaco. (Adaptado de Siepmann et al. ¹¹⁸)	54
Figura 13. Esquema da vidraria e dos equipamentos utilizados nas sínteses dos hidróxidos duplos lamelares. (A) Balão de três bocas contendo água deionizada ou solução da espécie de interesse; (B) Funil de adição contendo solução básica; (C) Eletrodo medidor de pH; (D) Titulador automático; (E) Funil de adição contendo solução dos metais que constituirão as lamelas dos HDLs; (F) Bomba de adição; (G) Chapa de aquecimento com agitação mecânica e (H) Condensador.....	65
Figura 14. Foto de pastilhas de 7 mm de diâmetro preparadas para ensaio de dissolução <i>in vitro</i>	75
Figura 15. Esquema ilustrativo do arranjo experimental correspondente ao método 1 de dissolução: cestas. Ilustração adaptada da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. ¹⁰⁸	76
Figura 16. Difrátogramas de raios X das matrizes intercaladas com íons cloreto obtidas sem tratamento térmico e com tratamento a 55°C durante a síntese por coprecipitação e 24 horas após seu término.....	81
Figura 17. (A) DRX de sulindaco adquirido em farmácias de manipulação e da empresa Sigma-Aldrich. (B) Principais picos de difração e distâncias interplanares para cada uma das amostras. *Picos característicos do polimorfo II.	83
Figura 18. (A) DRX típico dos polimorfos I e II do sulindaco reportados por Tros De Ilarduya et al. ⁷⁴ (B) Comparação entre o DRX do sulindaco Aldrich e aquele da Forma II reportado por Koo et al. ⁷³	84
Figura 19. Curvas DSC das amostras de sulindaco realizadas em panelinha de alumínio hermeticamente fechada, com taxa de aquecimento de 5°C min ⁻¹ , em atmosfera de N ₂ (g) com vazão de 50 mL min ⁻¹	85
Figura 20. Fotos que representam as etapas típicas das sínteses de HDLs realizadas nesta tese: (A) e (B) Dissolução do sulindaco; (C) Gotejamento da solução dos sais; (D) Suspensão contendo o produto sendo formado; (E) Produto depositado e seu sobrenadante; (F) Produto após secagem; (G) Trituração; (H) Passagem em peneira 100 Mesh; (I) Produto final em frasco adequado para armazenagem.....	86
Figura 21. Difrátogramas de raios X dos materiais Mg ₂ Al-Sul, obtidos em diferentes condições de síntese: (A) sem tratamento térmico; (B) 12 horas sob agitação à temperatura	

ambiente; (C) aquecimento a 55°C durante a coprecipitação e 24 horas após a síntese; (D) tratamento hidrotérmico a 115°C por cinco dias.....	87
Figura 22. Difrátogramas de raios X dos materiais Zn ₂ Al-Sul, obtidos em diferentes condições de síntese: (A) sem tratamento térmico; (B) 12 horas sob agitação à temperatura ambiente; (C) aquecimento a 55°C durante a coprecipitação e 24 horas após a síntese; (D) tratamento hidrotérmico a 115°C por cinco dias.....	88
Figura 23. Comparação entre os perfis dos difratogramas de raios X do sulindaco (A); das matrizes HDL-Cl (B) e (D), dos materiais híbridos Zn ₂ Al-Sul 55 (C) e Mg ₂ Al-Sul 55 (E).....	89
Figura 24. Dimensões da molécula de sulindaco calculadas a partir de cálculos DFT conforme descrito no item 3.3.	90
Figura 25. Mapa 1D de densidade eletrônica projetado ao longo do eixo c e representação esquemática do arranjo assumido pelas moléculas de sulindaco na região interlamelar do Zn ₂ Al-Sul 55.....	92
Figura 26. Planos imaginários passando pelas regiões da molécula de sulindaco que possivelmente apresentam maior densidade eletrônica e dão origem aos picos observados no mapa 1D de densidade eletrônica.....	93
Figura 27. Molécula de sulindaco vista em diversas perspectivas. Figuras obtidas a partir de otimização de estrutura por DFT e utilização do programa DS visualizer 4.0.	94
Figura 28. Parte da estrutura cristalina do polimorfo II do sulindaco obtido a partir do CIF file nº 1143612 depositado no CCDC por Koo et al. ⁷³ e tratado no programa DS visualizer 4.0. As moléculas em destaque na cor rosa têm um arranjo similar àquele observado quando o sulindaco foi intercalado entre as lamelas de HDLs.....	95
Figura 29. Representação do arranjo dos íons sulindaco intercalados no espaço interlamelar dos materiais M ^{II} ₂ Al-Sul. Os íons cloretos não estão representados na figura.	97
Figura 30. Imagem de microscopia eletrônica de varredura pelo método LEI da amostra de Zn ₂ Al-Cl 55 e das amostras de Mg ₂ Al-Sul 55 e Zn ₂ Al-Sul 55.....	99
Figura 31. Imagens de campo claro obtidas por microscopia eletrônica de varredura por transmissão (BF-STEM) das amostras de HDL-Cl 55 e HDL-Sul 55.....	100

Figura 32. Imagem de microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) no modo HAADF, das amostras HDL-Sul. Como <i>insert</i> na imagem do Zn ₂ Al-Sul 55, mostra-se a medição da separação entre algumas lamelas.....	101
Figura 33. Espectros vibracionais (A) no IR e (B) Raman, experimentais e calculados por DFT, para o sulindaco e para o NaSul.....	104
Figura 34. Espectros vibracionais das matrizes Mg ₂ Al-Cl e Zn ₂ Al-Cl: (A) FTIR e (B) FT-Raman.....	107
Figura 35. Espectros vibracionais dos materiais híbridos Mg ₂ Al-Sul e Zn ₂ Al-Sul e do sal NaSul: (A) FTIR e (B) FT-Raman.	109
Figura 36. Espectros FT-Raman do material híbrido Zn ₂ Al-Sul e da matriz Zn ₂ Al-Cl.....	110
Figura 37. Espectros, calculados e experimentais, de ¹³ C-RMN de estado sólido do (A) sulindaco e (B) sal NaSul.....	111
Figura 38. Correlação entre os deslocamentos químicos de ¹³ C-RMN experimentais e calculados pelo método DFT. O átomo C5 não foi plotado.	111
Figura 39. Espectros experimentais de ¹³ C-RMN no estado sólido obtidos para o sulindaco, NaSul, e amostras de Zn ₂ Al-Sul 55 e Mg ₂ Al-Sul 55. As flechas indicam os picos mais afetados pelos processos de intercalação do sulindaco.	114
Figura 40. Mapa de potencial eletrostático calculado pelo método DFT para o sulindaco (A) e sua forma desprotonada (Sul ⁻) (B).....	115
Figura 41. Curvas TG-DTA e DTG-MS obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para: (A) Sulindaco e (B) NaSul.	117
Figura 42. Curvas TG-DTA e DTG-MS obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para (A) Mg ₂ Al-Sul 55 e (B) Zn ₂ Al-Sul 55. <i>Insert</i> : fotos das amostras aquecidas até 250°C sob atmosfera dinâmica de ar sintético.....	119
Figura 43. Curvas TG-DTA-MS obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para as amostras (A) Mg ₂ Al-Cl 55 e (B) Zn ₂ Al-Cl 55.....	121
Figura 44. Espectros vibracionais (A) FTIR e (B) FT-Raman de amostras dos híbridos Mg ₂ Al-Sul 55 e Zn ₂ Al-Sul 55 aquecidos a 250°C em atmosfera dinâmica de ar sintético.	122
Figura 45. Modos vibracionais mais afetados pela calcinação das amostras dos híbridos HDL-Sul a 250°C. ν = estiramento, δ = deformação angular.	124

Figura 46. (A) Pastilhas das amostras dos materiais híbridos HDL-Sul 55. (B) Cubas do Dissolutor no início do experimento e (C) ao seu término. (D) Curva de calibração do sulindaco até 30 mg L ⁻¹	126
Figura 47. Perfis de dissolução do sulindaco não intercalado e do liberado a partir das amostras de Zn ₂ Al-Sul 55 e Mg ₂ Al-Sul 55 durante: (A) 12 horas de experimento e (B) 84 horas de experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).	126
Figura 48. Modelos cinéticos aplicados à amostra Zn ₂ Al-Sul 55 considerando 24 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).	128
Figura 49. Modelos cinéticos aplicados à amostra Mg ₂ Al-Sul 55 considerando 24 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).	129
Figura 50. Modelos cinéticos aplicados à amostra de sulindaco considerando 12 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).	129
Figura 51. Esquema simplificado do processo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco sulindaco das amostras M ^{II} ₂ Al-Sul 55 em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).	132
Figura 52. DRX das pastilhas de HDL-Sul 55 após 6 e 24 h de ensaio de dissolução em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).	134
Figura 53. Reação de troca iônica: fases intermediárias.	135
Figura 54. Espectro vibracional Raman de pontos ao longo da secção meridional das pastilhas de (A) Mg ₂ Al-Sul 55 e (B) Zn ₂ Al-Sul 55 coletadas após 24 h de ensaio de dissolução (70% de liberação do sulindaco). (C) Os espectros foram coletados nos pontos indicados na figura da direita: P0 e P4 correspondem às regiões mais externas da pastilha, enquanto P1 e P3, às internas.	137
Figura 55. (A) DRX (B) Espectro vibracional Raman e (C) Espectro vibracional FTIR de pastilhas das amostras de Mg ₂ Al-Sul 55 e Zn ₂ Al-Sul 55 coletadas após 84 h de ensaio de dissolução.	138
Figura 56. (A) Pastilhador. (B) Pastilhas de HDL-Sul e HDL-Cl preparadas para implante nos ratos. O diâmetro é de aproximadamente 5 mm e a espessura é de 2 mm no caso da pastilha de HDL-Sul e 1 mm no caso de HDL-Cl.	142

Figura 57. Esquema ilustrando a localização do implante da pastilha de HDL-Sul, entre os músculos oblíquo externo e interno, no abdômen de um rato. Figura inspirada em Wingerd ²⁰¹ e Brown et al. ²⁰²	142
Figura 58. (A) Posicionamento da sonda de <i>Sidestream Dark Field</i> (SDF) <i>imaging</i> . (B) Captura de imagem da microcirculação.....	143
Figura 59. Divisão da região contendo a pastilha implantada. Cada porção contém a secção meridional da pastilha com folhetos do músculo acima e abaixo dela.	144
Figura 60. Fotomicrografias de corte histológico, mostrando: controle após (A) 7 e (B) 35 dias. Região do implante de pastilha de Zn ₂ Al-Cl após (C) 7 e (D) 35 dias. Região do implante de pastilha de Zn ₂ Al-Sul após (E) 7 e (F) 35 dias. Imagens ampliadas 10 vezes.	145
Figura 61. Fotomicrografias de corte histológico mostrando a região onde uma pastilha de argila não biocompatível foi implantada. O aumento foi de 10 vezes.....	146
Figura 62. Fotomicrografias de corte histológico mostrando: controle após (A) 7 e (B) 35 dias. Região do implante de pastilha de Mg ₂ Al-Cl após (C) 7 e (D) 35 dias. Região do implante de pastilha de Mg ₂ Al-Sul após (E) 7 e (F) 35 dias. Imagem ampliada 10 vezes.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações encontradas na literatura sobre as formas polimórficas I e II do sulindaco.....	37
Tabela 2. Nome, fórmula e procedência dos reagentes utilizados.	63
Tabela 3. Condições de síntese dos materiais HDL-Sul e abreviações atribuídas aos materiais obtidos. Todos foram preparados com razões molares $M^{II}/M^{III} = 2$ e $Sul^{-}/Al^{3+} = 1$...	67
Tabela 4. Valores de ângulo 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) obtidos a partir dos DRX das amostras Mg_2Al-Cl e Zn_2Al-Cl	82
Tabela 5. Valores de ângulo 2θ (graus) e distâncias interplanares (d_{003}) obtidos a partir dos DRX dos materiais $Mg_2Al-Sul$ e $Zn_2Al-Sul$	90
Tabela 6. Dados de análise química e fórmula proposta para as amostras de $Zn_2Al-Sul$ e $Mg_2Al-Sul$ obtidos pelas condições 2 e 3.....	97
Tabela 7. Dados experimentais e calculados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Raman, do sulindaco e seu sal sódico.....	105
Tabela 8. Deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN experimentais do sulindaco, do NaSul, das amostras $Zn_2Al-Sul$ 55, $Mg_2Al-Sul$ 55 e calculados para Sulindaco e SulNa, valores em ppm.	112
Tabela 9. Valores médios de quantidade de sulindaco dissolvido a partir de pastilhas do fármaco não intercalado e a partir dos materiais híbridos $Mg_2Al-Sul$ 55 e $Zn_2Al-Sul$ 55.....	127
Tabela 10. Concentração dos metais Al, Mg e Zn determinada após ensaio de dissolução em pH 7,2 e 37°C.....	136

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	23
1.0 Introdução	24
1.1 Hidróxidos Duplos Lamelares.....	26
1.2 A Reação Inflamatória e os Medicamentos Anti-inflamatórios.....	29
1.3 Sulindaco	33
1.4 Ensaios de Liberação de Fármacos	48
CAPÍTULO 2	60
2.0 Objetivos	61
CAPÍTULO 3	62
3.0 Materiais e métodos.....	63
3.1 Procedimento geral de síntese dos HDLs.....	63
3.2 Síntese dos materiais híbridos HDL-Sulindaco	66
3.3 Métodos computacionais	70
3.4 Técnicas de caracterização	71
3.5 Ensaio de dissolução do sulindaco <i>in vitro</i>	74
3.6 Estudos <i>in vivo</i> : implantes de pastilhas de HDL-Sul em ratos	77
CAPÍTULO 4	79
4.0 Resultados e discussão	80
4.1 Materiais híbridos Zn ₂ Al-Sul e Mg ₂ Al-Sul: estrutura e morfologia	82
4.2 Caracterização por espectroscopias vibracional IR e Raman	102
4.3 Caracterização espectroscópica por ¹³ C-RMN no estado sólido	110
4.4 Análise Térmica.....	116
4.5 Processo de liberação do fármaco sulindaco intercalado nos HDLs	125
4.6 Estudo <i>in vivo</i> : Implantes das pastilhas de HDL-Sul	140
CAPÍTULO 5	151
5.0 Conclusões e perspectivas	152
CAPÍTULO 6	155

6.0	Referências bibliográficas	156
	Súmula Curricular	167

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

Materiais híbridos, também chamados de híbridos orgânico-inorgânicos ou nanocompósitos, são definidos pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como aqueles constituídos por uma mistura íntima de componentes inorgânicos, orgânicos ou uma combinação entre eles, sendo que ao menos uma das dimensões dessas fases se encontra em escala submicrônica ou nanométrica.¹ Os compósitos convencionais são constituídos por múltiplas fases, usualmente combinadas em escala macroscópica, sendo uma delas contínua ou dominante. Deste modo, materiais compósitos e híbridos diferem entre si nas dimensões e na dispersão de seus componentes.^{2, 3}

Embora os híbridos sejam macroscopicamente homogêneos, suas propriedades refletem a natureza química dos blocos a partir dos quais foram formados. A combinação de componentes em nível molecular dá origem a materiais com propriedades diferenciadas que vão além da simples soma daquelas das fases que lhe deram origem.⁴

Em decorrência de suas propriedades ímpares, os híbridos são considerados de grande interesse para a obtenção de materiais multifuncionais voltados para o desenvolvimento de armazenadores de energia, catalisadores, filmes finos, membranas, sensores analíticos, dispositivos ópticos, suportes cromatográficos, nanocompósitos orgânico-inorgânicos e carregadores de fármacos, por exemplo.^{5, 6}

De uma forma geral, quase todos os materiais naturais são materiais híbridos, sendo constituídos de uma quantidade relativamente pequena de um componente orgânico polimérico, como por exemplo, proteínas ou polissacarídeos, e de um material inorgânico cerâmico, como sílica ou sais de cálcio. A madeira, os ossos e o nacre são exemplos de materiais estruturados encontrados na natureza, que combinam fases orgânicas e inorgânicas, em estruturas hierárquicas, com dimensões que vão de nano à macroescala e resultam em materiais extraordinariamente perfeitos, que são leves e exibem combinações únicas de força e tenacidade. Assim, os biomateriais, cuja síntese vem sendo aperfeiçoada

pela natureza a milhões de anos de evolução, servem como inspiração para a fabricação de novas estruturas sintéticas.⁷

Os materiais híbridos são classificados de acordo com a natureza das interações entre as fases orgânica e inorgânica.^{5, 8, 9} Nos materiais da **classe I**, as fases estabelecem interações fracas como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Os híbridos da **classe II** estão unidos por uma ligação química forte (covalente, iônica ou ligação ácido-base de Lewis). Considerando essas definições, os materiais lamelares intercalados com espécies orgânicas de diferentes origens e dimensões são considerados materiais híbridos, uma vez que as fases estão dispersas entre si em escala nanométrica.

O grupo de pesquisa coordenado pela profa. Vera R. L. Constantino trabalha há mais de quinze anos na área de Química de Intercalação, desenvolvendo sistemas nos quais matrizes lamelares inorgânicas como hidróxidos duplos (HDLs), silicatos e niobatos têm sido empregadas para a intercalação, principalmente, de complexos metálicos,¹⁰ corantes sintéticos e naturais, alquilaminas,¹¹ polímeros sintéticos (polianilina e polibenzidina)¹² e fármacos anti-inflamatórios.¹³ Mais recentemente, o grupo vem estudando espécies naturais com propriedades antioxidantes como corantes,¹⁴ polímeros de origem vegetal¹⁵ e fármacos¹⁶ com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas dessas substâncias orgânicas através da formação de materiais híbridos com compostos inorgânicos lamelares.

Dando continuidade nessa linha de pesquisa, esta tese apresenta a preparação e caracterização de um novo material híbrido orgânico-inorgânico formado pelo fármaco anti-inflamatório sulindaco ($C_{20}H_{17}FO_3S$), disponível no medicamento Clinoril®,^{17, 18} e hidróxidos duplos lamelares.

Dentre as estruturas lamelares de interesse, escolheu-se a classe dos hidróxidos duplos lamelares (HDLs), também conhecidos como compostos do tipo hidrotalcita ou como argilas aniônicas, por serem materiais biocompatíveis e apresentarem diversas possibilidades em termos de estratégias sintéticas que podem conduzir à intercalação de espécies de interesse.

1.1 Hidróxidos Duplos Lamelares

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) apresentam estruturas bidimensionalmente organizadas, lamelas positivas e poros que se adaptam às dimensões da espécie intercalante (Figura 1). Os HDLs incorporam ânions entre suas lamelas para que ocorra a neutralização da carga elétrica. Esses materiais são encontrados na Natureza e podem ser sintetizados em laboratório através de procedimentos simples que conduzem à formação de compostos de alta pureza e custo baixo.¹⁹⁻²¹

A fórmula geral dos HDLs é $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_x(OH)_2](A^{n-})_{x/n} \cdot zH_2O$, sendo M^{2+} e M^{3+} íons metálicos di e trivalente e A^{n-} o ânion de carga n . A porção $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_x(OH)_2]$ da fórmula representa a lamela e a porção $(A^{n-})_{x/n} \cdot zH_2O$ representa a composição interlamelar com ânions e moléculas de água intercaladas; o coeficiente estequiométrico x pode variar de intervalos que dependem da natureza química dos cátions.^{19, 22}

A estrutura de um HDL se assemelha a do mineral brucita, $Mg(OH)_2$,²³ na qual as lamelas neutras constituídas de octaedros contendo íon Mg^{2+} no sítio central e íons hidroxila nos vértices compartilham suas arestas (Figura 1A). As lamelas se empilham e interagem por ligações de hidrogênio. A substituição isomórfica de cátions divalentes por cátions trivalentes com raio iônico semelhante no sítio octaédrico, gera cargas positivas nas lamelas que, como mencionado acima, são balanceadas por ânions hidratados na região interlamelar. O mineral hidrotalcita, $[Mg_6Al_2(OH)_{16}](CO_3) \cdot 4H_2O$, exemplifica a estrutura de um HDL (Figura 1B).

Os HDLs podem ser intercalados por ânions orgânicos (carboxilatos, sulfonatos, fosfonatos, polímeros aniônicos, macrocíclos) e inorgânicos (haletos, sulfato, nitrato, fosfato, silicato, cromato, arsenato, polioxometalatos).²⁴ Ressalta-se a grande afinidade que os HDLs possuem pelo ânion carbonato em virtude da sua habilidade em ocupar sítios interlamelares bem definidos do ponto de vista cristalográfico e estabelecer ligações eletrostáticas fortes (e

ligações de hidrogênio) com as lamelas.²⁵ [ENREF 21](#) Os HDLs apresentam interessantes propriedades estruturais, iônicas, químicas, eletrônicas, ópticas e catalíticas.¹⁹

Figura 1. (A) Ilustração de um íon divalente ou trivalente coordenado a íons hidroxila. (B) Estrutura de um hidróxido duplo lamelar.

Importantes trabalhos de revisão e capítulos de livros podem ser encontrados sobre a estrutura dos HDLs, suas propriedades, os métodos de preparação e o interesse despertado por esses materiais lamelares em áreas tão diversificadas como catálise,²⁶ armazenamento de energia,²⁷ captura de dióxido de carbono,²⁸⁻³⁰ cimento³¹ e até a origem da vida^{32, 33} é evidenciado.

O HDL com composição da hidrotalcita é biocompatível e utilizado nas áreas medicinal e farmacológica em decorrência de sua propriedade como antiácido.³⁴⁻³⁷ O HDL de magnésio e alumínio intercalado com íons carbonato é o princípio ativo do medicamento Talcid®, comercializado pela Bayer AG (Figura 2).

A propriedade antiácida dos HDLs somada às propriedades de uma espécie bioativa pode gerar um material híbrido com estabilidade química, térmica e/ou fotoquímica melhorada. Ainda, o confinamento pode promover a liberação modificada da espécie intercalada por reação de troca iônica ou pela dissolução da matriz carregadora em meio ácido.

Figura 2. Foto do medicamento antiácido Talcid®, comercializado pela Bayer, no qual a hidrotalcita é o princípio ativo.

Na literatura há trabalhos sobre a intercalação das seguintes espécies em HDLs: regulador de crescimento vegetal,³⁸ porfirina para terapia fotodinâmica,³⁹ aminoácidos,⁴⁰ herbicidas,⁴¹ molécula de DNA,^{42, 43} fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais,⁴⁴ fármacos orgânicos anticancerígenos,^{45, 46} entre outras. A intercalação de moléculas bioativas é de interesse por promover :⁴⁷⁻⁴⁹ (i) liberação modificada do fármaco mediada por alterações no pH; (ii) aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis no meio fisiológico; (iii) aumento da estabilidade química de substâncias frente à luz, calor, umidade, oxigênio molecular etc; (iv) manutenção da concentração plasmática do fármaco em níveis desejados por um período maior de tempo; (v) superfície da matriz de HDL pode ser modificada para atingir células ou tecidos específicos para diminuir riscos de toxicidade; (vi) passagem através da membrana celular para alcançar alvos específicos e (vii) diminuição de efeitos colaterais de anti-inflamatórios, como as lesões gastrointestinais.

Todas as propriedades acima mencionadas abrem a possibilidade futura da aplicação clínica de HDLs como carregadores de fármacos. Ressalta-se que o processo de intercalação de espécies bioativas em HDLs produz novas formulações (produtos com agregação de valor) a partir de componentes orgânicos e inorgânicos que já possuem uso na área farmacêutica, facilitando provavelmente a aprovação para uso por órgãos reguladores. As

melhorias advindas do desenvolvimento desses materiais híbridos, como a melhor absorção do fármaco pelo organismo ou o aumento do tempo de prateleira, podem ser caracterizados como inovações.

1.2 A Reação Inflamatória e os Medicamentos Anti-inflamatórios

A inflamação é tradicionalmente definida por quatro palavras do latim: *calor, dolor, rubor e tumor*, que significam calor, dor, rubor e inchaço, e refletem os efeitos dos mediadores inflamatórios nos vasos sanguíneos locais. O processo inflamatório consiste na resposta do sistema imunológico a uma infecção ou lesão dos tecidos. Por esse processo, o fluxo sanguíneo para a região atingida aumenta, transportando células do sistema imunológico com o intuito de combater o agente agressor.⁵⁰

Os principais eventos vasculares no processo da inflamação envolvem a dilatação e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. A vasodilatação é responsável pelo maior aporte de sangue para a região inflamada, causando rubor e calor. Com o aumento da permeabilidade vascular pode ocorrer acúmulo de plasma no tecido, o que ocasiona o edema. Tal acúmulo de líquido pode pressionar as terminações nervosas e então causar a dor.⁵¹

O processo inflamatório envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido lesionado com liberação de numerosas substâncias, chamadas de *mediadores inflamatórios*. Os mediadores mais importantes de origem celular são os quatro a seguir: (i) a histamina; (ii) a bradicinina; (iii) os leucotrienos e os eicosanoides (prostaglandinas e tromboxanos) e (iv) as citocinas.

Os eicosanoides, de modo especial, estão incluídos entre os mais importantes moduladores da reação inflamatória, de modo que eles estão certamente presentes em locais inflamados. A principal fonte desses compostos é o ácido araquidônico, que é biotransformado pelas enzimas ciclo-oxigenases (COX).⁵²

A enzima ciclo-oxigenase (COX) apresenta duas isoformas intituladas COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima presente na maioria dos tecidos e tem papel fundamental na proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária e manutenção da função renal. Diante de quadros inflamatórios, a atividade dessa isoforma não parece ser alterada ou apresenta um aumento discreto de duas a quatro vezes na sua expressão. Em menores quantidades, a COX-2 encontra-se em determinados tecidos como cérebro, intestinos, rins, testículos, glândula tireóide, pâncreas e, diferentemente da COX-1, diante de um quadro inflamatório, sua expressão é aumentada cerca de vinte vezes ou mais.^{53, 54} Uma terceira isoforma da ciclo-oxigenase, a COX-3, foi recentemente elucidada e parece ocorrer principalmente no coração e no córtex cerebral, mas suas propriedades não foram ainda seguramente definidas.⁵⁵

Os mediadores da inflamação, em geral, são substâncias normalmente produzidas no organismo para realizar funções fisiológicas, porém em situações patológicas, concentrações excessivas dessas moléculas mediadoras de inflamação, causadas por aumento da sua síntese ou por degradação ineficiente, podem causar efeitos deletérios, justificando uma intervenção farmacológica, que pode ser feita com fármacos que inibem a síntese ou que bloqueiam os receptores específicos do mediador em questão. Dessa forma, fármacos que inibem a síntese de prostaglandinas, inibem toda ou parte da reação inflamatória.⁵¹

Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os principais sintomas da inflamação citados anteriormente e proporcionando maior conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são divididos em dois grandes grupos: os anti-inflamatórios esteroidais, também chamados de glicocorticoides, e os anti-inflamatórios não-esteroidais (abreviadamente AINEs ou *NSAIDs*, do inglês).

Os anti-inflamatórios esteroidais atuam por meio da inibição da ação enzimática da fosforilase A₂ impedindo a liberação do ácido araquidônico e, em consequência, a formação

das prostaglandinas e dos leucotrienos, que são os principais mediadores inflamatórios. Costumam ser indicados nos tratamentos de asma e doenças inflamatórias autoimunes, mas podem causar efeitos colaterais graves que resultam de suas ações hormonais. São exemplos a hipertensão arterial e intracraniana, aumento de gordura abdominal, osteoporose, toxicidade para as células do fígado e rins, entre outros.⁵²

Os AINEs por sua vez inibem a síntese da prostaglandina pelo bloqueio das enzimas ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2. Esses medicamentos também apresentam ação antipirética (redução da febre) e analgésica (diminuição da dor). Eles constituem uma das classes de fármacos mais difundidas em todo mundo e mais utilizadas na prática médica no controle de dor aguda ou crônica, provocada por processos inflamatórios (estes decorrentes do aumento da síntese de prostaglandinas) como é o caso na artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias autoimunes, sobretudo aquelas relacionadas com as articulações.

Vane et al.⁵⁶⁻⁵⁸ foram os primeiros a propor que os efeitos terapêuticos e colaterais dos anti-inflamatórios não-esteroidais resultavam da inibição da enzima ciclo-oxigenase por estes compostos. Assim, tais agentes reduzem a síntese de prostaglandinas a partir do sistema nervoso central, diminuindo a intensidade do processo inflamatório e, conseqüentemente, a recepção de estímulos interpretados como dor.

A Figura 3 ilustra de forma resumida as principais substâncias atuantes no processo de produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Em uma situação de dor causada por inflamação, ocorre a formação da fosfolipase A₂, uma enzima que é responsável pela formação do ácido araquidônico. Esse por sua vez é convertido pelas ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2 em endoperóxidos intermediários (PGG₂ e PGH₂) que pela ação das isomerases tissulares específicas geram múltiplas prostaglandinas e tromboxanos.

Figura 3. Esquema da conversão do ácido araquidônico nos mediadores inflamatórios: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrieno. São indicados também os locais no organismo onde esses compostos são normalmente encontrados.⁵⁹⁻⁶¹ [ENREF 53](#) [ENREF 55](#)

A inibição da COX, e por consequência, da síntese das prostaglandinas vasodilatadoras (PGE_2 e PGI_2) resulta em menor vasodilatação e indiretamente diminui o sintoma de edema. No efeito analgésico, a diminuição na produção de prostaglandinas resulta em menor sensibilização das terminações nervosas dos nociceptores (terminações nervosas responsáveis pela sensação de dor) a mediadores inflamatórios. O efeito antipirético deve-se à diminuição de prostaglandinas que interferem na produção de interleucina-1 que é responsável pela elevação do ponto de ajuste do hipotalâmico para o controle da temperatura na febre.

Assim como os demais mediadores, além de estarem envolvidos nas reações inflamatórias, os eicosanoides são responsáveis pelo controle de diversos processos

fisiológicos como a coagulação sanguínea, a ovulação, o metabolismo ósseo, o crescimento e o desenvolvimento neuronal, a cicatrização de feridas, a função renal, o tônus vascular e as respostas imunes. É devido justamente a esse papel importante na manutenção de órgãos e tecidos que ocorrem vários efeitos colaterais mediante o uso de AINEs. Ao inibir as isoenzimas e os eicosanoides, a regulação normal desses órgãos é afetada, induzindo alterações funcionais tais como disfunções cerebrovasculares, renais, hepáticas, cardiovasculares e trombóticas, gastrintestinais, gestacionais e fetais.

Alguns dos AINES mais conhecidos e de uso corrente são o ácido acetilsalicílico e os salicilatos; derivados do ácido indolacético como a indometacina e o sulindaco; derivados de ácidos arilalcanóicos como o ibuprofeno; derivados do ácido antranílico como o ácido mefenâmico e os oxicans (ou ácidos enólicos) como o piroxicam (Figura 4).⁵²

Figura 4. Estrutura molecular de alguns dos principais anti-inflamatórios não esteroidais.

1.3 Sulindaco

Na década de 1950, a busca por novos anti-inflamatórios estava centrada em derivados do indol, que é estruturalmente semelhante à molécula de serotonina (Figura 5). Na época, especulava-se que a serotonina era um possível mediador da inflamação e a

empresa farmacêutica Merck Company tinha domínio de um grande número de antagonistas de serotonina disponíveis para testes como anti-inflamatórios.

Figura 5. Estruturas moleculares do indol e da serotonina.

Mais tarde foi constatado que não havia relação entre atividade antisserotonina e efeito anti-inflamatório, mas no processo de rastreamento (screening) de compostos semelhantes ao indol, chegou-se a um composto ativo: a indometacina (mostrada na Figura 4), que foi introduzida no mercado farmacêutico em 1963 para o tratamento de artrite reumatóide, mas seu uso foi limitado devido a sua alta toxicidade gastrointestinal. Na busca por derivados da indometacina, a Merck Company identificou o sulindaco, que apresentava efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos assim como a indometacina, mas causava menores efeitos tóxicos para o trato gastrointestinal.¹⁷

O sulindaco, ácido (Z)-5-Fluoro-2-metil-1-[p-(metil-sulfinil)]benzilideno]-1H-indeno-3-acético, comercializado como Clinoril®, é um ácido orgânico fraco, forma um pó cristalino amarelo (Figura 6A). É praticamente insolúvel em água em valores de pH abaixo de 4,5 (0,003 mg mL⁻¹) mas bastante solúvel como sal sódico ou em soluções tampão em pH igual ou acima de 6,0 (3,0 mg mL⁻¹). O sulindaco é estável em soluções ácida e alcalina.⁶² Como mencionado anteriormente, é análogo estrutural da indometacina e sua estrutura molecular é apresentada na Figura 6B. Esse fármaco é indicado nos tratamentos de sintomas de osteoartrite, artrite reumatóide, espondilite anquilosante, artrite gotosa aguda e ombro doloroso agudo.⁶³

Figura 6. (A) Comprimido de sulindaco de 200 mg comercializado nos EUA pela empresa Mylan®.⁶⁴ (B) estrutura molecular do sulindaco.

A molécula de sulindaco apresenta isomeria geométrica e pode existir nas formas comumente designadas *cis* ou *trans*. Porém, em casos como esse, onde há três ou mais substituintes diferentes nos átomos da ligação dupla, a IUPAC recomenda o sistema de nomenclatura *Z-E*, que serve para todos os alquenos.⁶⁵ As letras *Z* e *E* são as iniciais das palavras provindas do vocabulário alemão "*Zusammen*", que significa "juntos", e "*Entgegen*", que significa opostos.

Para determinar se a configuração da molécula é *Z* ou *E*, os grupos substituintes são classificados em ordem de prioridade. Tem maior prioridade o grupo substituinte cujo átomo imediatamente ligado ao carbono da dupla ligação tiver maior número atômico; em caso de empate, verifica-se o número atômico dos demais átomos desse grupo. A configuração é *Z* quando os dois substituintes de maior prioridade estiverem do mesmo lado do plano que passa pela dupla ligação e *E* quando estiverem de lados opostos.⁶⁶

Na Figura 7 pode ser notada a diferença entre os isômeros *Z* e *E* do sulindaco. A ligação que dá origem à isomeria é aquela entre os carbonos C1 e C10.^{67, 68} O sulindaco comercializado é o isômero *Z* por ser aquele farmacologicamente ativo, assim como ocorre para a indometacina, que também apresenta dois isômeros, sendo a forma *Z* cinco vezes

mais potente que a forma *E*.⁶⁹⁻⁷¹ Isso ocorre porque os isômeros na forma *Z* possuem a conformação adequada para se ligarem ao sítio ativo das isoenzimas COX-1 e COX-2.^{68, 72}

Figura 7. Isômeros (A) *Z* e (B) *E* do sulindaco.

Além de apresentar isomeria *Z-E*, o sulindaco apresenta também polimorfismo. Esse assunto tem sido investigado há décadas e quatro polimorfos já foram descritos para o isômero *Z*: as formas I, II, III e IV. Porém, os polimorfos mais conhecidos são o I e o II e, até o momento, a determinação da estrutura cristalina por difratometria de raios X de monocristal foi reportada somente para essas duas formas.^{62, 73-76}

As formas cristalinas I e II geralmente são diferenciadas pelo seu ponto de fusão, sendo o da forma I em 191°C e o da forma II em 186°C.⁷⁵ A forma II é o polimorfo mais comum, encontrado comercialmente por ser o mais estável à temperatura ambiente e abaixo da temperatura de transição (de uma forma polimórfica para outra), a qual foi estimada a partir dos pontos de fusão e calor de fusão dos dois polimorfos e também a partir de extrapolações de medidas de solubilidade. O valor médio a partir dessas determinações foi de 161°C.⁶² A forma II é cerca de sete vezes mais solúvel que a forma I.⁷⁷

A forma I é mais estável acima da temperatura de transição até a temperatura de seu ponto de fusão (191°C). Embora seja metaestável com relação à forma II à temperatura ambiente, a velocidade de conversão da forma I para a II depende de condições como

aquelas citadas a seguir. A partir da forma I, a velocidade de conversão é tão baixa que não pode ser convenientemente medida. Em contato com água ou soluções tampão, a conversão leva semanas ou meses. Contudo, relata-se que em contato com etanol, a forma I converte-se na forma II em 16 horas.⁶²

À temperatura ambiente e na presença da maioria dos solventes comuns como metanol, etanol e 2-propanol, ocorre preferencialmente a formação do polimorfo II, enquanto o polimorfo I é formado a partir da forma II por sublimação ou recristalização em acetona, metanol ou na presença de polímeros como nylon, resina de poliamida, copolímeros estireno/etileno-butileno ABA e poli cloreto de vinil carboxilado/ vinil acetato.^{74, 75}

Os principais autores que estudaram as formas polimórficas e determinaram a estrutura cristalina das formas I e II a partir de difratometria de raios X de monocristal, assim como os parâmetros cristalográficos e os dados da ficha de informação cristalográfica (*CIF file*), estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Informações encontradas na literatura sobre as formas polimórficas I e II do sulindaco.

Autores e data de depósito	RefCode e N° CCDC ^a	Parâmetros de cela
Koo CH et al. ⁷³ 26/3/1987	DOHREX, CCDC N° 1143612	Grupo espacial: Pbca a = 8,166 Å b = 18,291 Å c = 23,245 Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$
Zeng et al. ⁷⁸ 27/9/2005	DOHREX02, CCDC N° 285193	Grupo espacial: Pbca a = 8,1885 Å, b = 18,269 Å c = 23,270 Å $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$
Grzesiak et al. ⁷⁵ 25/10/2006	DOHREX03, CCDC N° 625435	Grupo espacial: P2 ₁ /c a = 12,68581 Å b = 8,18939 Å c = 17,7934 Å $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 106,0111^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$
Llinas et al. ⁷⁷ 15/2/2007	DOHREX01, CCDC N° 637252	Grupo espacial: P2 ₁ /c a = 12,645 Å b = 7,8887 Å c = 17,788 Å $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 106,0111^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$

^a Cambridge Crystallographic Data Centre

A estrutura cristalina da forma II do sulindaco foi resolvida em 1985 por Koo et al.⁷³ que obtiveram monocristais, por recristalização em temperatura ambiente a partir de uma solução etanólica. Em 2005, Zeng et al.⁷⁸ propuseram uma nova rota de obtenção do isômero *Z*-sulindaco e a estrutura cristalina do produto também foi resolvida por difratometria de raios X. As informações cristalográficas foram depositadas no CCDC e o polimorfo foi identificado como o II, sendo os dados do arquivo CIF condizentes com aqueles depositados por Koo et al.⁷³

A estrutura da forma I foi determinada somente mais tarde, em 2006, por Grzesiak et al.⁷⁵ que obtiveram monocristais desse polimorfo usando uma técnica de heteronucleação induzida por polímero. No ano seguinte, Llinas et al.⁷⁷ também reportaram a elucidação da estrutura da forma I.

A principal diferença entre as conformações adotadas pela molécula de sulindaco em cada polimorfo é mostrada na Figura 8. O grupo carboxílico é quase perpendicular ao anel indênico e o ângulo diedro entre o anel indênico e o anel fenílico é de 35°. Adotando o mesmo padrão de visualização do anel indênico, pode-se observar que na forma I o grupo carboxílico e o metilsulfinil estão rotacionados na mesma direção, e em direções opostas no caso da forma II.

Figura 8. Conformação molecular do sulindaco nos polimorfos I (A) e II (B). Figuras obtidas no programa Discovery Studio 4.0 a partir dos arquivos CIF depositados por Grzesiak et al.⁷⁵ (N° CCDC N° 625435) e Koo et al.⁷³ (CCDC N° 1143612).

Em função dessas diferenças o empacotamento das moléculas na forma I resulta em uma estrutura cristalina do tipo monoclinica e, na forma II, do tipo ortorrômica.^{73, 75} As principais

características dos dois arranjos cristalinos são mostradas na Figura 9. As moléculas são arranjadas em folhas onduladas perpendiculares ao eixo cristalográfico *a*. Entre as folhas ocorre a sobreposição parcial dos anéis indênicos. Observa-se a ocorrência de ligação de hidrogênio entre os grupos carboxílico e sulfinil, que interconectam as folhas moleculares. Na Figura 9A é mostrada uma visão 2D da cela unitária, em (B) são enfatizadas as moléculas de folhas distintas, em (C) são mostradas duas moléculas e a sobreposição parcial dos anéis indênicos, em (D) é apresentada uma visão 2D do arranjo das moléculas na cela unitária e, finalmente, em (E) são enfatizadas as folhas moleculares onduladas.

A obtenção de outros dois polimorfos, o III e o IV, também foi relatada. Em 1997, Tros De Ilarduya et al.⁷⁴ prepararam uma nova forma, que chamaram de III (ponto de fusão igual a 145°C), pela dissolução do sulindaco comercial em clorofórmio (15 mg/mL) a 25°C sob agitação e seguida de resfriamento a -20°C. Em 2006, no mesmo estudo em que determinaram a estrutura cristalina da forma I, Grzesiak et al.⁷⁵, por evaporação de metanol e 2-propanol na presença de polietileno clorado, obtiveram outro polimorfo até então não descrito e chamaram de forma IV (ponto de fusão igual a 131°C). Porém, nos dois casos a estrutura cristalina não pôde ser determinada por difratometria de raios X.

As principais técnicas de caracterização que têm sido empregadas na diferenciação entre as formas polimórficas são a difratometria de raios X, a espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman e a calorimetria exploratória diferencial.

No espectro Raman, a forma I apresenta as principais bandas em 192, 225, 283, 306, 395, 438, 869, 1182, e 1211 cm⁻¹ e no FTIR em 871, 1008, 1023, 1403, 1602, e 1713 cm⁻¹. A partir do DSC, o ponto de fusão da forma I é observado em 191,08°C com entalpia de fusão de 27,6 kJ mol⁻¹.⁷⁴

Figura 9. Empacotamento das moléculas de sulindaco na estrutura cristalina dos polimorfos I e II. Figuras obtidas nos programas de visualização de estrutura cristalina Discovery Studio 4.0 e Mercury, a partir dos arquivos CIF depositados por Grzesiak et al. (N° CCDC N°. 625435) e Koo et al. (CCDC N° 1143612).

A forma II apresenta espectro Raman típico com bandas em 173, 208, 236, 289, 393, 416, 433, 878, 1188 e 1211 cm^{-1} , espectro no infravermelho com bandas típicas em 879, 1007,

1019, 1407, 1589, 1603 e 1701 cm^{-1} e no DSC o ponto de fusão da forma II é de 187,58°C e a entalpia de fusão é de 31,1 kJ mol^{-1} .⁷⁵

Comparações de difratogramas típicos das duas formas mais comuns foram reportados por Fotios et al.⁶², Tros De Ilarduya et al.⁷⁴, Grzesiak et al.⁷⁵, e recentemente, por Sánchez-González et al.⁷⁶ Ambas as formas, apresentam os picos de difração mais intensos em valores muito próximos, sendo eles em $2\theta = 15,0; 18,0; 22,5; 24,0$ e $26,5^\circ$. Por isso, ao avaliar um difratograma de raios X para identificar uma das formas, é necessário considerar outros picos, de menor intensidade mas característicos de cada uma. A forma I apresenta picos característicos em $2\theta = 11,0; 12,0; 13,5; 19,5$ e $26,5^\circ$ e a forma II em $2\theta = 9,5; 12,5; 14,0; 15,0; 16,0; 24,8; 27,0$ e $28,5^\circ$.

O sulindaco é na verdade um pró-fármaco. Esse termo é empregado para descrever um composto que requer biotransformação metabólica após sua administração para produzir a atividade farmacológica desejada. A conversão de um pró-fármaco inativo ocorre principalmente por meio de clivagem enzimática. Dependendo da interação específica fármaco-enzima, a biotransformação pode ocorrer em qualquer lugar do organismo em que as enzimas estejam presentes.⁷⁹

No caso do sulindaco, ele é administrado na forma sulfóxido (Figura 6 B, pág. 35), que possui um átomo de enxofre quiral e parcialmente oxidado. Seu metabolismo envolve a oxidação irreversível (no fígado) à sulfona e a redução reversível (pela ação de bactérias presentes na flora intestinal) ao correspondente sulfeto, que é o metabólito ativo (Figura 10).^{63, 80} Além disso, a biotransformação do sulindaco envolve a hidroxilação e conjugação com ácido glicurônico, produzindo metabólitos menos reativos, e consequentemente menos tóxicos, que são excretados majoritariamente na urina (cerca de 50%) e nas fezes (cerca de 25%).⁸¹

O sulindaco é um ácido fraco com valor de pKa igual a 4,7; quando o grupo acetato é desprotonado, ocorre a formação de um ânion carboxilato que é capaz de interagir com as

proteínas plasmáticas carregadas positivamente. De fato, quando presente na corrente sanguínea, levando em consideração que o valor do pH desse meio é de 7,4, o sulindaco e seus metabólitos, sulfona e sulfeto, estão 93,1, 95,4, e 97,9 % ligados à proteínas, (predominantemente à albumina).⁸²

O sulindaco é bem absorvido pela via oral (90% da dose administrada), tendo um pico máximo no plasma em 2 a 4 horas. A dose máxima recomendada é de 400 mg por dia; geralmente administra-se de 150 a 200 mg, duas vezes ao dia, de preferência durante as refeições.⁷²

No plasma sanguíneo, o sulfóxido tem meia vida de 8 horas, enquanto o metabólito ativo sulfeto tem meia vida de 16,4 horas. O longo tempo de meia vida do metabólito ativo se dá devido à circulação entero-hepática (substâncias excretadas pelo fígado são reabsorvidas pela mucosa intestinal e retornam ao fígado) que permite a reabsorção do sulfóxido e a sustentação dos níveis plasmáticos do sulfeto por períodos mais prolongados.

Figura 10. Vias de biotransformação do sulindaco: redução formando o metabólito ativo sulfeto e oxidação formando a sulfona. A hidroxilação e conjugação com ácido glicurônico produzem metabólitos que são excretados. Figura adaptada de Larini et al.,⁵², Shen et al.,⁶³ e Duggan et al.⁸⁰

A forma sulfeto do sulindaco age inibindo a síntese das duas isoformas da enzima ciclooxygenase, COX-1 e COX-2, e com isso impede a síntese de prostaglandinas atenuando os efeitos da inflamação.⁸³

Piazza et al.⁸⁴ determinaram a atividade inibitória do sulfeto de sulindaco para as isoformas da COX. Nesses ensaios, normalmente determina-se a concentração inibitória 50% (IC₅₀), que representa a concentração do fármaco requerida para inibir 50% da atividade da COX. Os valores de IC₅₀ encontrados foram 1,8 µmol L⁻¹ para COX-1 e 6,8 µmol L⁻¹ para COX-2, enquanto que para as formas sulfóxido e sulfona o IC₅₀ para COX-1 e 2 os valores estão acima de 300 µmol L⁻¹. Além disso, os autores mostraram que a orientação do sulfeto é similar no sítio ativo tanto da COX-1 quanto da COX-2 e que o grupo carboxílico forma uma

ligação de hidrogênio com o resíduo positivo de arginina 120, o que restringe a posição do resto da molécula nas demais regiões que são essencialmente não polares.

Brideau et al.⁸⁵ relataram valores um pouco diferentes daqueles reportados por Piazza et. al.⁸⁴ para o sulfeto, ($IC_{50} = 1,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ para COX-1 e $10,73 \mu\text{mol L}^{-1}$ para COX-2). Porém, relata-se que os testes *in vitro* para esse tipo de estudo não são reprodutíveis. Dessa forma, para avaliação dos AINEs geralmente utiliza-se um índice de especificidade *relativa* entre as isoformas da COX, que corresponde à razão $IC_{50} \text{ COX-2}/IC_{50} \text{ COX-1}$. De acordo com esse critério, quanto menor o valor do quociente relativo, maior será a seletividade do fármaco sobre a COX-2. O valor do índice de especificidade relativa da indometacina e do sulindaco, que são reconhecidamente AINEs não seletivos às isoformas da COX, é de 60 e 10, respectivamente. AINEs inibidores específicos da COX-2 apresentam índices típicos de 0,1 a 0,03.⁵³

As reações adversas apresentadas pelo uso contínuo do sulindaco são as que ocorrem tipicamente com o uso dos AINEs, porém menos graves do que no caso da indometacina. Em longo prazo é possível a ocorrência de irritação ou lesão do sistema gastrointestinal, hemorragia e ulceração, além de risco de disfunções cardiovasculares.⁵²

Algumas alternativas para diminuir os danos causados pelo sulindaco ao trato gastrointestinal têm sido relatadas e consistem em imobilizar o fármaco em matrizes ou veículos de liberação modificada. Kim et al.,⁸⁶ por exemplo, preparam sistemas de liberação usando um método de dispersão em solvente no qual o polímero poli(L-ácido láctico), PLLA, contendo concentrações variadas de sulindaco foi dissolvido em solventes orgânicos que em seguida foram evaporados, levando à formação de materiais porosos e não porosos. Ensaios de liberação *in vitro* em fluidos corporais simulados mostraram liberação de 50 a 80% do sulindaco em uma hora.

El-Kamel et al.⁸⁷ descreveram outra metodologia que consiste em formulações para administração oral contendo carreadores cólon específicos. Nesse caso, o sulindaco foi

ligado covalentemente através do grupo carboxílico com uma unidade de ácido aspártico ou a um grupo hidroxila de uma ciclodextrina.

Em 2009, Zanella et al.⁸⁸ depositaram uma patente que descreve o desenvolvimento de diversas formulações contendo sulindaco e polímeros biodegradáveis. A principal inovação nesse caso é a possibilidade dessas formulações serem implantadas próximas ou no sítio de dor e inflamação causadas por hérnia de disco e outras disfunções correlatas. Os autores propõem que os implantes sejam realizados antes do fechamento de uma insisão ou usando cânulas ou agulhas para aplicar o medicamento no sítio desejado.

As formulações descritas por Zanella et al.⁸⁸ podem conter de 20 a 40 % (m/m) de sulindaco ou algum de seus sais ou derivados farmacologicamente ativos, um polímero biodegradável, excipientes e ainda em alguns casos outro tipo de agente terapêutico. Exemplos de polímeros biodegradáveis empregados foram os listados a seguir (ou uma mistura deles): poli(L-ácido láctico-co-caprolactona) (PLCL), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (orto éster) (POE), poli(ácido glicólico) (PGA) e outros.

Os autores realizaram testes *in vitro* e *in vivo* e relatam que dependendo da proporção e natureza dos constituintes empregados e da via de administração, o sulindaco pode ser liberado em períodos de 3 a até 180 dias, numa taxa de 8 a 10 mg/dia.

Entre as alternativas recentemente propostas para a diminuição dos efeitos causados ao trato gastrointestinal pelos AINEs está a utilização de hidróxidos duplos lamelares como matrizes hospedeiras para a preparação de materiais híbridos com possibilidade de liberação modificada e/ou pH dependente. A combinação entre HDLs, que são materiais básicos, e os AINEs que são ácidos orgânicos fracos, passíveis de serem intercalados como íons hospedeiros, pode dar origem a sistemas com propriedades ácido-base únicas.⁴⁴

Em artigo de revisão recente, Rives et al.^{44, 89} compilaram um grande número de estudos que têm sido realizados e mostram a possibilidade de intercalação de AINEs como fenbufeno, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno e outros em matrizes de Mg/Al, Al/Li,

Al/Mg/Fe e Zn/Al. Vantagens como alta capacidade de carregamento do fármaco, aumento da solubilidade e possibilidade de liberação modificada foram relatadas.

Em 2012 Minagawa et al.⁹⁰ relataram um sistema híbrido contendo sulindaco intercalado em matriz de Mg/Al. Mesmo testando várias rotas de síntese como coprecipitação, troca iônica e reconstrução, o material obtido apresentou baixa cristalinidade. Nos ensaios de liberação *in vitro*, 96 % do fármaco foi liberado em três horas em solução tampão de fosfato de pH igual a 8. O trabalho reportado nessa tese foi iniciado antes da publicação mencionada e, como será observado adiante, gerou materiais com maior cristalinidade e buscou aprofundar a caracterização estrutural, morfológica, espectroscópica e térmica dos sistemas hidróxido duplo lamelar contendo sulindaco (HDL-Sul).

Nos últimos anos ressurgiu e aumentou o interesse pelo sulindaco devido a um grande número de estudos que têm demonstrado que o fármaco e seus metabólitos apresentam atividade antiproliferativa contra vários tipos de tumores^{91, 92} como, por exemplo, câncer de cólon,^{93, 94} de próstata,⁹⁵ de mama⁹⁶ e de pulmão.⁹⁷

Piazza et al.,⁸⁴ por exemplo, vêm desde 1995 investigando os efeitos quimioprotetores dos AINEs, em especial os mecanismos pelos quais o sulindaco, seus metabólitos e derivados inibem o crescimento das células tumorais.^{98, 99} Os autores sintetizaram uma série de derivados do metabólito sulfeto, com substituições no grupo carboxila, visando eliminar a parte que confere carga negativa à molécula para diminuir sua atividade inibitória frente às enzimas COX-1 e COX-2 e aumentá-la frente às células de câncer de cólon. A molécula substituída com um grupo N,N-dimetil amida mostrou resultados promissores em ensaios *in vitro* não só contra câncer de cólon, mas também contra câncer de pulmão¹⁰⁰ e próstata.¹⁰¹

Ensaio *in vivo* e estudos clínicos também têm sido conduzidos. Meyskens e uma grande equipe,¹⁰² por exemplo, realizaram um estudo clínico randomizado¹ de três anos, envolvendo 375 pessoas de 40 a 80 anos com histórico de pólipos intestinais, às quais foi administrado

¹ Estudo clínico randomizado (ECR) é um tipo de estudo experimental, desenvolvido em seres humanos, que visa o conhecimento do efeito de intervenções em saúde e é usado para obtenção de evidências para a prática clínica.

uma combinação de 500 mg de Eflornitina® (2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO) e 150 mg de sulindaco. O resultado do estudo indicou que o emprego da medicação reduziu em 70% a recorrência de adenomas e em 92% a progressão para adenomas avançados. Os pesquisadores trabalham agora em um novo estudo com um grupo de 1300 pessoas, que deve ser concluído em 2019, no qual buscam investigar os efeitos dos dois fármacos separadamente.¹⁰³

No caso de estudos de efeitos protetores contra a carcinogênese de pulmão, existem várias dificuldades envolvidas, como revisado por Hecht et al.,¹⁰⁴ sendo as principais a natureza desse tipo de tumor, que geralmente é induzido pelo uso contínuo de cigarro, e a disponibilidade de um modelo animal ideal para os testes *in vivo*.

Na década de 1990, Castonguay e colaboradores¹⁰⁵ investigaram e discutiram a importância de utilizar um modelo adequado para a avaliação do efeito quimioprotetor do sulindaco e outros AINEs contra a carcinogênese de pulmão e relataram que, principalmente o metabólito sulfona, atua reduzindo a incidência desse tipo de tumor.^{106, 107} Observa-se, portanto, que um metabólito não ativo como anti-inflamatório passa a ser ativo no tratamento de outras doenças.

No período de 2006 a 2009, Limburg et al.⁹⁷ conduziram um estudo clínico randomizado de fase II, incluindo 31 participantes de 40 a 79 anos de idade, atuais ou ex-fumantes, aos quais foram administradas doses de 150 mg de sulindaco ou placebo durante 6 meses. Através de broncoscopia e biópsias foram avaliadas mudanças no grau histológico de displasia e no número de lesões displásicas. Além disso, a proliferação da mucosa brônquica foi avaliada por imunoensaio. Porém, os resultados do estudo quando comparados ao placebo não foram estatisticamente relevantes e não justificaram a realização de uma fase III.

Tendo em vista esse panorama, estudar uma nova possibilidade de aplicação do sulindaco pode ser relevante e justifica a escolha do fármaco para este estudo.

1.4 Ensaios de Liberação de Fármacos

Apesar de ser muito usado, sobretudo popularmente, o termo **remédio** é desaconselhado, devendo ser substituído por **medicamento**. A definição dada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para **medicamento** é: "produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico."²³ **Fármaco**, segundo definição oficial dada pela portaria ministerial nº 3.916 de 30/11/1998³⁸, é a substância química que atua como princípio ativo do medicamento.

Os fármacos raramente são administrados isoladamente, e sim como parte de uma formulação, em combinação com uma ou mais substâncias inativas que possuem funções como solubilizar, suspender, conservar, etc. O uso desses agentes denominados **adjuvantes farmacêuticos** ou **excipientes** resulta na obtenção de diversas **formas farmacêuticas**.

Assim, medicamento é uma forma farmacêutica terminada que contém o fármaco, geralmente em associação com coadjuvantes farmacocinéticos em dose ou concentração terapêutica adequada para uma dada via de administração.^{79, 108}

Além disso, um fármaco pode estar ainda em formulações mais complexas, como é o caso das **formas farmacêuticas de liberação modificada**, que são aquelas elaboradas para modificar a taxa de liberação ou o local onde a substância ativa será liberada, e que possuem a cinética de liberação modulada.

Com relação às possibilidades de liberação, em documento de 2011, a ANVISA¹⁰⁹ define:

(i) Liberação imediata: tipo de liberação de formas farmacêuticas que não são modificadas intencionalmente por um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação.

(ii) Liberação modificada: o termo é usado para descrever as formas farmacêuticas para as quais as características de liberação do fármaco *versus* tempo e/ou condições no local de dissolução são selecionadas para obter objetivos terapêuticos ou de conveniência para o paciente, e não oferecidos pelas formas tradicionais de liberação imediata ou convencional. Em consonância com a Farmacopéia Americana, em seu "Vocabulário Controlado de Formas

Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos”, a ANVISA diferencia as formas de liberação modificada em liberação prolongada e retardada, como segue:

Liberação prolongada: tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que permite pelo menos uma redução na frequência de dose quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação imediata. É obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação.

Liberação retardada: tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que apresenta uma liberação retardada do princípio ativo. A liberação retardada é obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação. As preparações gastrorresistentes são consideradas formas de liberação retardada, pois são destinadas a resistir ao fluido gástrico e liberar o princípio ativo no fluido intestinal.

Os casos que não se enquadram em nenhuma das duas definições podem ser chamados somente de “comprimidos de liberação modificada”.

Quando administrados no organismo, os componentes ativos devem ser liberados a partir da forma farmacêutica em quantidades apropriadas, de maneira a alcançar os receptores em concentração adequada para proporcionar a ação desejada. Nesse contexto a solubilidade de um fármaco, especialmente em sistemas aquosos, é uma das propriedades físico-químicas mais importantes para sua eficácia terapêutica, pois independente da via pela qual seja administrado, ele precisa ser solubilizado para entrar na circulação sistêmica e então exercer o efeito terapêutico.

O corpo humano é composto de 70 a 75% de água, o que corresponde a cerca de 55 L para uma pessoa de 73 kg, por exemplo. A concentração de uma molécula média de massa molecular de 200 g mol^{-1} , administrada em uma dose de 20 mg, seria portanto de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ no organismo dessa pessoa.⁷² Assim, para um fármaco ser terapeuticamente eficaz, deve possuir solubilidade aquosa aproximada a esse valor.

A velocidade pela qual a substância se dissolve em um meio também é de grande importância. Os dados de velocidade de dissolução, quando considerados em conjunto com os dados de solubilidade, constante de dissolução e coeficiente de partição podem ser indicativos da biodisponibilidade e do potencial de absorção do fármaco.

Uma vez solúvel e em concentração adequada, o fármaco precisa difundir-se através de várias barreiras biológicas até chegar a seu sítio de ação. Normalmente, suas características de absorção são demonstradas por meio da medida de sua concentração no sangue em vários intervalos após a administração.

Conforme ilustrado na Figura 11, a concentração de um fármaco hipotético no sangue atinge a concentração mínima efetiva hipotética (CME) duas horas após sua administração, eleva-se até um pico em quatro horas e diminui abaixo da CME em dez horas. Se fosse necessário manter a concentração acima do CME por um período maior, uma segunda dose deveria ser administrada após oito horas. O segundo nível de concentração refere-se à concentração mínima tóxica (CMT). Idealmente a concentração do fármaco no organismo deveria ser mantida entre a CME e a CMT, que é a região chamada de **janela terapêutica** do fármaco.⁷⁹

A ação desejável de um sistema de liberação modificada é justamente manter a concentração de fármaco liberado (Figura 11, linha vermelha), através de uma cinética de liberação modulada, na faixa terapêutica, evitando que ultrapasse a faixa tóxica ou decaia para a subterapêutica. Assim, a grande importância desses sistemas está em possibilitar a permanência do fármaco por maior tempo no organismo, a partir de um número menor de doses ou até mesmo de uma única dose, com consequente aumento de eficácia e diminuição do risco de toxicidade.^{79, 110}

Figura 11. Exemplo de curva de nível sanguíneo de um fármaco hipotético em função do tempo a partir de uma forma farmacêutica de liberação convencional e de liberação modificada. Figura adaptada de Howard et al.⁷⁹ e Uhrich et al.¹¹⁰

Inúmeros sistemas para liberação modificada têm sido descritos, inclusive com possibilidade de vetorização a sítios de interesse.¹¹¹ Hidróxidos duplos lamelares contendo fármacos intercalados são potenciais sistemas de liberação modificada, uma vez que o HDL apresenta caráter básico e pode ser lentamente dissolvido liberando o fármaco. Visando administração oral, existe ainda a possibilidade de usar um recobrimento entérico para que o HDL não sofra ação do meio ácido estomacal e possa liberar a espécie de interesse somente mais tarde por troca iônica no intestino.¹¹²

Estudos publicados por Xu et al.¹¹³ e Choi et al.¹¹⁴ mostram que dependendo da morfologia, HDLs nanoestruturados podem ser direcionados para regiões específicas das células. Dessa forma, os materiais híbridos formados a partir de HDLs e fármacos apresentam diversas possibilidades de aplicações e inovações na área de liberação modificada.

Um das primeiras características a serem investigadas em um potencial sistema de liberação modificada é o *perfil de dissolução* do fármaco, que pode ser definido em um

ensaio *in vitro* que permite a construção de uma curva de porcentagem da espécie dissolvida em função do tempo, empregando-se geralmente as condições estabelecidas no teste de dissolução descrito em farmacopeias ou em compêndios autorizados pela legislação vigente.

Dessa forma, os ensaios de dissolução *in vitro* fornecem o perfil de dissolução de uma forma farmacêutica em estudos que são de fundamental importância nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de um novo produto ou compará-lo a um de referência. A legislação brasileira, por exemplo, estabelece que para um medicamento ser registrado como similar ou genérico é necessário que se comprove a equivalência farmacêutica em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA, sendo o perfil de dissolução um dos requisitos necessários.^{115, 116}

Os aspectos fundamentais do teste de dissolução estão baseados nas condições do corpo humano, por isso ele é conduzido a uma temperatura de 37°C e sob agitação para remover a camada saturada com o fármaco dissolvido formada ao redor da forma farmacêutica, de forma a substituí-la com meio novo sem causar mudança física significativa no corpo de prova. O volume adequado deve ser aquele suficiente para alcançar a chamada condição *sink*, que corresponde a pelo menos três vezes a concentração de saturação. Os meios de dissolução devem ser desenvolvidos preferencialmente de forma a mimetizar o valor do pH do trato gastrointestinal ou da região onde o fármaco será administrado.¹¹⁷

A inserção de espécies bioativas em veículos ou carregadores pode promover alterações nas seguintes propriedades do fármaco encapsulado:¹¹⁸

- (i) estabilidade química: fármacos sensíveis ao calor, à luz, à umidade e/ou ao oxigênio molecular estarão menos propensos à ação deletéria desses fatores externos se inseridos em uma matriz ou veículo;
- (ii) solubilidade (biodisponibilidade): a solubilidade de um fármaco não depende apenas da temperatura, mas também do arranjo das espécies no sólido (tipo de polimorfo) e do tamanho das partículas do sólido.¹¹⁸ No processo de imobilização de um fármaco em

uma matriz ou carregador, o arranjo sólido pode não mais existir e as espécies que compõem o fármaco (moléculas ou íons) interagem com o carregador. Logo, a solubilidade do fármaco pode ser alterada;

- (iii) velocidade de dissolução: a dissolução de um fármaco sólido em um líquido (solvente) envolve principalmente as seguintes etapas: (a) umedecimento da superfície das partículas do sólido pelo solvente; (b) rompimento das ligações (intermoleculares ou iônicas) entre as espécies que compõem o sólido; (c) solvatação das espécies (íons ou moléculas); (d) difusão das espécies através de uma camada de líquido não agitado localizado muito próximo à superfície da partícula (mesmo os sistemas submetidos à agitação possuem uma camada de líquido estático na superfície sólida cuja espessura depende da força de agitação); (e) processo de transporte por convecção da espécie dissolvida em direção ao meio líquido sob agitação. O transporte do fármaco ocorre através do transporte difusional de massa, isto é, a difusão espontânea de uma espécie dissolvida em um meio a partir de regiões de maior concentração para aquelas de menor concentração. A força-motriz desse processo é a agitação térmica das moléculas do solvente. Quando o fármaco se encontra inserido em um carregador, o processo acima descrito é modificado em virtude da interação com a matriz.

Assim, é importante destacar que se o fármaco se encontra encapsulado ou imobilizado em um carregador, o termo "dissolução" deve ser substituído por "liberação". Se o fármaco está presente no estado sólido na matriz, a dissolução será uma das etapas da liberação. Logo, a liberação do fármaco ("*drug release*") é um processo mais complexo que a dissolução do fármaco ("*drug dissolution*").¹¹⁸ A Figura 12 ilustra a principal diferença entre os dois processos.

De acordo com a Anvisa, os sistemas de liberação modificada podem se apresentar na forma de cápsula, comprimido, granulado, pó liofilizado para suspensão injetável, pó para suspensão injetável, ou suspensão injetável e existem ensaios de dissolução mais adequados

e recomendáveis para cada um dos tipos. Para o caso de pastilhas ou comprimidos, o ensaio utilizando aparato tipo 1 (cesta) é um dos mais indicados.

Figura 12. Ilustração simplificada dos processos de dissolução e liberação de um fármaco. (Adaptado de Siepmann et al.¹¹⁸)

A velocidade de dissolução ou de liberação do fármaco irá depender da velocidade da etapa mais lenta, entre as cinco anteriormente descritas e, por isso, é difícil elaborar um tratamento matemático que descreva todos esses mecanismos.

Desde o início dos estudos sobre dissolução que ocorreu em 1897 com Noyes e Whitney,¹¹⁹ na área de físico-química e não exatamente relacionados com fármacos, vários pesquisadores procuraram correlacionar a velocidade de dissolução de uma substância com os diversos fatores envolvidos nesse processo. A partir de 1950, quando o interesse no processo de dissolução começou a aumentar na área farmacêutica, as bases para descrição desses processos já estavam disponíveis e novos modelos têm sido propostos,

especificamente elaborados para as matrizes mais empregadas, como é o caso das constituídas de polímeros orgânicos.¹²⁰

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nesses testes é facilitada pelo uso de equações empíricas e semi-empíricas que traduzem matematicamente a curva de dissolução em função de parâmetros relacionados às características de composição, tamanho e forma geométrica do composto em estudo.¹¹⁶

Vários trabalhos de revisão como os de Dash et al.,¹²¹ Costa & Lobo¹²² e Manadas et al.¹²³ trazem compilações desses modelos matemáticos. Uma breve descrição dos principais modelos empregados neste trabalho segue abaixo:

O **Modelo de ordem zero** descreve o processo convencional de dissolução e baseia-se na liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não degradam, sendo considerado ideal quando se deseja uma ação prolongada com velocidade de liberação constante. Porém essa situação de liberação é muito difícil de obter na prática. A aplicação deste modelo apresenta muitas limitações devido aos poucos fatores de ajuste. A (Equação 1) descreve esse tipo de liberação:

$$1 - \frac{M_t}{M_0} = k_0 t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde M_t é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t (ou a porcentagem de fármaco liberado no tempo t), M_0 é a quantidade inicial de fármaco presente na forma farmacêutica (ou 100 %) e k_0 é a constante de liberação de ordem zero. Um gráfico da fração não liberada do fármaco *versus* tempo será linear.

O **Modelo de primeira ordem** é aplicável para fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, para as quais a liberação é proporcional à quantidade remanescente no interior da matriz, de maneira que a quantidade de fármaco liberado em função do tempo diminui.

$$\ln(M_0 - M_t) = \ln M_0 - k t \quad (\text{Equação 2})$$

Onde M_t é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t , M_0 é a quantidade inicial de fármaco no carregador. Um gráfico do logaritmo neperiano ($\ln$) da fração não liberada de fármaco *versus* o tempo produz uma reta e k é a constante de velocidade de primeira ordem.

O **Modelo de Higuchi** é usado para descrever a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes e formas farmacêuticas de liberação modificada nas quais o processo de dissolução é controlado pela difusão e obedece à lei de Fick, ou seja, a liberação é dependente da raiz quadrada do tempo. O modelo considera que o meio penetra os poros da matriz e dissolve lentamente o fármaco, formando uma solução saturada que então se difunde também pelos poros até chegar ao meio externo.¹²⁴

Dessa forma, esse não é um modelo adequado para sistemas que sofrem intumescimento, pois não leva em conta a possibilidade de ocorrência de relaxamento da matriz. O modelo inicialmente proposto em 1961 por Higuchi era para filmes finos de pomadas sobre a pele e mais tarde diversas considerações foram feitas para que fosse aplicável a outras matrizes, especialmente as poliméricas. A (Equação 3 é conhecida como o modelo simplificado de Higuchi e expressa a dependência do transporte do fármaco em $t^{1/2}$, indicando um processo baseado na lei de difusão de Fick e é que é válida para 60 % do tempo total da liberação.¹²⁵

$$M_t = K_H \sqrt{t} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde M_t é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t e K_H é a constante de liberação de Higuchi. Um gráfico da quantidade liberada do fármaco *versus* a raiz quadrada do tempo será linear. É importante destacar que a constante de liberação K_H engloba vários fatores como o coeficiente de difusão do fármaco pelos canais da matriz, a densidade do fármaco e os fatores de forma da matriz.¹²⁶

O **Modelo de Korsmeyer-Peppas** leva em consideração uma combinação de difusão (transporte Fickiano) e de transporte Caso II (não fickiano, controlado pelo relaxamento das

cadeias poliméricas de uma matriz orgânica) e é geralmente usado para analisar a liberação em casos nos quais o mecanismo ainda não está bem esclarecido ou quando mais de um fenômeno pode estar envolvido. O valor do expoente n da (Equação 4 indica qual o provável mecanismo de liberação: n menor que 0,5 indica difusão Fickiana, n entre 0,5 e 1,0 indica transporte anômalo, n igual a 1,0 sugere que o mecanismo de transporte é de ordem zero e n superior a 1,0 sugere que o mecanismo de transporte não obedece à lei de Fick.^{127, 128}

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad \text{ou} \quad \log \frac{M_t}{M_0} = \log k + n \log t \quad (\text{Equação 4})$$

Um gráfico do logaritmo da quantidade de fármaco liberada *versus* logaritmo do tempo deve resultar num gráfico linear, cuja inclinação corresponde ao expoente n .

O **Modelo de Hixson-Crowell**^{129, 130} assume que a taxa de liberação é limitada pela dissolução das partículas do fármaco a partir da superfície em contato com uma solução e não pela difusão que venha a ocorrer através da matriz. Mais tarde essa expressão começou a ser aplicada para formas farmacêuticas, tais como comprimidos, nos quais a dissolução ocorre em planos que são paralelos à superfície da forma farmacêutica e as dimensões do comprimido diminuem proporcionalmente, de tal modo que a forma geométrica inicial se mantém constante durante todo o processo. A equação final proposta por esse modelo é:¹¹⁸

$$\left(1 - \frac{M_t}{M_0}\right)^{\frac{1}{3}} = 1 - K_{\beta} t \quad (\text{Equação 5})$$

Onde M_0 é a quantidade inicial de fármaco contido no comprimido e M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t . A fração $f_t = 1 - (M_t - M_0)$ representa a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t e K_{β} é a constante de liberação que combina os vários fatores mantidos constantes, mas que podem influenciar o experimento, como forma da pastilha, velocidade de agitação e concentração. Um gráfico que relacione a raiz cúbica da fração não liberada do fármaco *versus* tempo será linear se as condições de equilíbrio não forem

atingidas e se a forma geométrica da pastilha diminuir proporcionalmente ao longo do tempo.¹²³

O **Modelo de Bhaskar** tem sido usado para descrever a liberação quando a difusão através de partículas (intra-partícula) é a etapa limitante de velocidade, como ocorre na liberação de espécies iônicas imobilizados em trocadores orgânicos do tipo resinatos.¹³¹⁻¹³³. O modelo assume que o mecanismo predominante no processo de liberação compreende a resistência à difusão pelos poros da matriz. Na (Equação 6, M_t é a quantidade de substância liberada no tempo t , M_0 é quantidade total do fármaco contida no resinato em $t = 0$, d_p corresponde ao diâmetro das partículas que compõem o resinato e D é a constante de difusão. Nesse caso, um gráfico de $\ln[M_0/(M_0 - M_t)]$ *versus* $t^{0.65}$ deverá ser linear.

$$-\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_0}\right) = \ln\left(\frac{M_0}{M_0 - M_t}\right) = 1.59\left(\frac{6}{d_p}\right)^{1.3} (Dt)^{0.65} \quad (\text{Equação 6})$$

O **Modelo da difusão parabólica** é geralmente empregado para descrever a liberação cuja velocidade é controlada por difusão no interior das partículas de argilominerais constituintes de solos ((Equação 7).¹³⁴

$$\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = \frac{4}{\pi^{0.5}} \left(\frac{Dt}{r^2}\right)^{0.5} - \frac{Dt}{r^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Esse modelo é usado nos casos em que o fenômeno de difusão é o limitante da velocidade. É baseado na difusão radial em um cilindro no qual a concentração das espécies que se difundem é constante na superfície e inicialmente sua concentração em toda a extensão do cilindro é uniforme. Assume-se também que a difusão da espécie através das faces superior e inferior do cilindro é negligenciável. A relação é expressa na (Equação 7, na qual M_t é a quantidade restante no cilindro no tempo t e M_0 é a quantidade presente no equilíbrio, r corresponde ao raio do cilindro e D ao coeficiente de difusão.¹³⁴ Um gráfico de $(M_t/M_0)/t$ *versus* $1/t^{0.5}$ deverá ser linear assumindo uma difusão radial da espécie de interesse em

sólidos com sítios de troca de difícil acesso, como é o caso de argilominerais constituintes do solo. Assim, de acordo com esse modelo, a velocidade de reação é controlada pela difusão intra-partícula, como ocorre nos casos de absorção e dessorção iônica em solos e feldspatos.^{135, 136} Os dois últimos modelos, de Bhaskar e da difusão parabólica, têm sido frequentemente usados para descrever a desintercalação de espécies a partir de hidróxidos duplos lamelares.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2.0 Objetivos

O objetivo geral desta tese de Doutorado foi sintetizar materiais de alta cristalinidade à base de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) intercalados com o fármaco sulindaco e efetuar a caracterização estrutural, morfológica, espectroscópica e térmica detalhada dessas amostras. Foi investigado o processo de liberação ou desintercalação do fármaco em meio aquoso tamponado.

Os objetivos específicos do trabalho foram os seguintes:

- i) Avaliação de condições de síntese para a intercalação do fármaco sulindaco em HDLs de magnésio-alumínio e zinco-alumínio na razão molar M^{II}/Al igual a dois e isolamento de materiais de alta cristalinidade e alto conteúdo de fármaco na matriz inorgânica;
- ii) Caracterização dos materiais híbridos através de um conjunto de técnicas físico-químicas: análise química elementar (CHS e metais), difratometria de raios X (DRX); análise térmica acoplada à espectrometria de massas (TG-DSC-MS), espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman; ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido; microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET);
- iii) Estudo do processo de liberação *in vitro* do fármaco sulindaco intercalado em HDLs, na forma de pastilhas, em solução aquosa tamponada (pH 7,2 e 37°C) através da análise de dados cinéticos provenientes dos resultados de liberação cumulativa de sulindaco em função do tempo; aplicar modelos matemáticos de liberação de fármacos a partir de matrizes carregadoras a fim de conhecer o mecanismo dominante do processo de liberação; realizar a caracterização estrutural e espectroscópica das pastilhas após contato com a solução tampão.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 Materiais e métodos

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia, exceto quando especificado. Na Tabela 2 são apresentados os reagentes utilizados, assim como suas fórmulas e procedência. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada em um equipamento Elga modelo Purelab Máxima com condutividade de 18 MΩ.

Tabela 2. Nome, fórmula e procedência dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula	Procedência
Ácido nítrico 65%	HNO ₃ 65%	Synth ou Merck
Cloreto de alumínio hexahidratado	AlCl ₃ ·6H ₂ O	Aldrich
Cloreto de magnésio hexahidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck
Cloreto de sódio	NaCl	Synth
Cloreto de potássio	KCl	Synth
Cloreto de zinco	ZnCl ₂	Merck
Dihidrogeno fosfato de sódio	NaH ₂ PO ₄	Synth
Monofosfato de potássio heptahidratado	KH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	Synth
Hidróxido de sódio	NaOH	Merck
Peróxido de hidrogênio 30 %	H ₂ O ₂	Merck
Sulindaco (ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-[p-(metil-sulfinil)]benzilideno]-1H-indeno-3-acético)	C ₂₀ H ₁₇ FO ₃ S	Farmácias Rhamus e Ananda; Sigma-Aldrich

3.1 Procedimento geral de síntese dos HDLs

Hidróxidos duplos lamelares de fórmula geral $[M^{II}_2M^{III}(OH)_6]Cl \cdot xH_2O$, intercalados apenas com íons cloreto e contendo lamelas formadas por íons Zn²⁺ ou Mg²⁺, como metal divalente, e íons Al³⁺, como metal trivalente, foram sintetizados e utilizados ao longo do trabalho como matrizes de referência ou “branco”.

As matrizes, abreviadas como $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, e todos os demais HDLs mencionados nesta tese, foram sintetizados pelo método da coprecipitação em pH constante. O método consiste na adição simultânea de uma solução contendo sais dos cátions divalente e trivalente e de uma solução alcalina, geralmente hidróxido de sódio ou potássio, sobre uma solução contendo o ânion a ser intercalado.

Essa metodologia, descrita na literatura há longa data e conhecida como método de Miyata,¹³⁷ vem sendo empregada pelo grupo em trabalhos correlatos^{13, 16} e por vários pesquisadores para obtenção de materiais híbridos de HDLs intercalados com fármacos,¹³⁸ espécies antioxidantes¹³⁹ e biomoléculas como enzimas e proteínas.¹⁴⁰

Além disso, a escolha desse método deu-se também por ser de única etapa (*one pot*) e porque materiais preparados por ele apresentam menor tamanho de partícula, boa cristalinidade, alta área superficial, menor contaminação com íon carbonato e maior capacidade de carregamento da espécie escolhida em relação a outros métodos.¹⁴¹ O arranjo experimental que foi utilizado em todas as sínteses é mostrado na Figura 13 e o procedimento geral empregado é descrito na sequência.

Em um balão de três bocas, em atmosfera de nitrogênio para evitar contaminação com íons carbonato (Figura 13A), adicionou-se apenas água deionizada no caso da síntese das matrizes intercaladas com íons cloreto, ou uma suspensão contendo o sulindaco, no caso dos materiais híbridos.

Ajustou-se o valor do pH da solução pela lenta adição de uma solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹ (Figura 13B) com auxílio de um eletrodo medidor de pH (Figura 13C) conectado a um titulador automático (Figura 13D). Em seguida, iniciou-se o gotejamento de uma solução 0,1 mol L⁻¹ contendo uma mistura dos íons bivalentes e trivalentes na razão molar $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$ igual a 2 ($6,66 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de ZnCl_2 ou de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $3,33 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Figura 13E).

Figura 13. Esquema da vidraria e dos equipamentos utilizados nas sínteses dos hidróxidos duplos lamelares. (A) Balão de três bocas contendo água deionizada ou solução da espécie de interesse; (B) Funil de adição contendo solução básica; (C) Eletrodo medidor de pH; (D) Titulador automático; (E) Funil de adição contendo solução dos metais que constituirão as lamelas dos HDLs; (F) Bomba de adição; (G) Chapa de aquecimento com agitação mecânica e (H) Condensador.

Tipicamente, à medida que a solução dos sais metálicos é adicionada, ocorre uma diminuição no valor do pH da mistura reacional. Então, para mantê-lo na faixa adequada de formação de cada HDL desejado, configurou-se o titulador automático de forma que, toda vez que o valor de pH diminuísse, a bomba de adição (Figura 13F) conectada ao funil contendo a solução de NaOH fosse acionada e permitisse o gotejamento da solução até que o pH fosse elevado ao valor ideal. Dessa forma, durante todas as sínteses a solução de sais permaneceu gotejando lentamente (aproximadamente $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) e o titulador automático acionou a bomba de adição, que por sua vez induziu a adição de solução de NaOH de forma a manter o pH do sistema reacional no valor preestabelecido, que foi de 7,5 durante a síntese de matrizes Zn_2Al e 9,5 no caso de matrizes Mg_2Al .²²

Em todas as sínteses utilizou-se um agitador mecânico com barra magnética (Figura 13G) para manter a mistura reacional em agitação constante. Em alguns casos foi realizado tratamento térmico durante ou após a síntese e para isso foi empregada uma chapa aquecedora e agitação mecânica e um condensador foi conectado à terceira boca do balão de reação (Figura 13H).

Os sólidos formados foram isolados por centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, os sólidos restantes foram ressuspensos em água deionizada e separados por centrifugação. Esse procedimento foi repetido de oito a dez vezes para total remoção de íons restantes da síntese e em seguida os materiais foram secos em dessecador sob pressão reduzida e na presença de sílica gel. Depois de secos, os sólidos foram triturados em almofariz e armazenados em frascos devidamente vedados e em dessecador.

3.2 Síntese dos materiais híbridos HDL-Sulindaco

O sulindaco é um ácido fraco que apresenta um grupo carboxílico ionizável com constante de dissociação ácida, pK_a , igual a 4,7. Como reportado por Fini *et al.*,¹⁴² a solubilidade de seu sal sódico é da ordem de 720 mmol L^{-1} , sendo muito maior que aquela de sua forma ácida, que é $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Portanto, nos valores de pH de 7,5 e 9,5, ideais para a formação das matrizes Zn_2Al e Mg_2Al respectivamente, o fármaco encontra-se desprotonado e totalmente solúvel podendo assim ser submetido à intercalação. O ânion derivado do sulindaco, $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FO}_3\text{S}^-$, será abreviado ao longo desta tese como Sul^- .

As sínteses foram conduzidas de acordo com o procedimento descrito no item 3.1: a $3,33 \times 10^{-3}$ mols de sulindaco dispersos em 500 mL de água ($[\text{Sul}] = 6,7 \text{ mmol L}^{-1}$), foi adicionada uma solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ até total dissolução do fármaco de modo que o pH da mistura atingisse o valor requerido para síntese (vide Tabela 3). Em seguida foi iniciada a adição de 100 mL de solução dos cloretos metálicos com razão molar $\text{M}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ igual a 2 e 100 mL de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ para manter o pH no valor adequado para cada tipo de matriz.

Tabela 3. Condições de síntese dos materiais HDL-Sul e abreviações atribuídas aos materiais obtidos. Todos foram preparados com razões molares $M^{II}/M^{III} = 2$ e $Sul^-/Al^{3+} = 1$.

Condição	Amostra	Tratamento térmico	Outros detalhes	pH de síntese
1	Zn ₂ Al-Sul ST	Sem tratamento	Isolamento do sólido logo pós a síntese	7,5
2	Zn ₂ Al-Sul ST24	Sem tratamento	24 h sob agitação antes do isolamento do sólido	
3	Zn ₂ Al-Sul 55	Sistema de refluxo a 55°C durante a coprecipitação e 24 h após a síntese	12 h sob agitação antes do isolamento do sólido	
4	Zn ₂ Al-Sul HT	Hidrotérmico a 115°C por cinco dias	O sólido inicial é o da condição 1	
1	Mg ₂ Al-Sul ST	Sem tratamento	Isolamento do sólido logo pós a síntese	9,5
2	Mg ₂ Al-Sul ST 24	Sem tratamento	24 h sob agitação antes do isolamento do sólido	
3	Mg ₂ Al-Sul 55	Sistema de refluxo a 55°C durante a coprecipitação e 24 h após a síntese	12 h sob agitação antes do isolamento do sólido	
4	Mg ₂ Al-Sul HT	Hidrotérmico a 115°C por cinco dias	O sólido inicial é o da condição 1	

A razão molar entre os cátions divalente e trivalente (M^{2+}/M^{3+}) determina a densidade de carga na lamela do HDL e influencia sua propriedade de troca iônica. Por isso, neste trabalho utilizou-se razão molar M^{2+}/Al^{3+} igual 2, e Sul^-/Al^{3+} igual a 1 para garantir um maior carregamento do fármaco e possibilidade de liberação uma vez que a densidade de carga neste tipo de lamela não é tão elevada a ponto de não permitir a desintercalação.

Variando-se as condições de tratamento térmico como listado na Tabela 3, foi sintetizada uma série de materiais de fórmula geral:

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

No total, quatro condições de síntese foram testadas e sua descrição é dada a seguir. Inicialmente os materiais híbridos foram preparados sem tratamento térmico e os sólidos foram isolados por centrifugação assim que a síntese terminou (condição 1). A próxima condição foi semelhante, porém após total adição dos reagentes, o sistema foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação e em atmosfera de $N_2(g)$ por 12 horas (condição 2).

HDLs com maior cristalinidade foram obtidos mantendo-se o sistema a 55°C durante toda a síntese e 24 h após, em atmosfera inerte e agitação constante. O sistema permaneceu por mais 12 h à temperatura ambiente para total resfriamento e só então a separação e lavagem foi realizada (condição 3). Testou-se ainda um tratamento hidrotérmico no qual cerca de 400 mg do HDL-Sul obtidos na condição 1, após secagem, foram suspensos em 25 mL de água deionizada; a mistura foi transferida para um recipiente de politetrafluoretileno (PTFE, Teflon®), que foi tampado e fechado em reator de aço sem controle de pressão. Esse conjunto permaneceu em estufa a 115°C por cinco dias e ao término separou-se o sólido por centrifugação (condição 4).

A forma típica de HDLs preparados pelos métodos convencionais de coprecipitação são plaquetas hexagonais em escala micrométrica, cujo crescimento preferencial ocorre tipicamente nas direções *ab*, perpendiculares à direção *c*, na qual ocorre o empilhamento das lamelas. Além disso, devido aos átomos reativos na superfície e arestas da estrutura cristalina, os HDLs preparados por esses métodos, antes de serem isolados do meio reacional, sofrem agregação espontaneamente, o que contribui para o aumento do tamanho das partículas.¹⁴³

Recentemente, inúmeros métodos de síntese para obtenção de HDLs cristalinos e nanoestruturados têm sido relatados, porém na maioria dos casos trata-se de matrizes intercaladas com ânions inorgânicos.¹⁴³ Quando moléculas orgânicas são incorporadas, os HDLs podem apresentar falhas de empilhamento, interestratificação e efeitos turbostráticos que diminuem a cristalinidade do material. Esses fatos dão origem a picos largos e pouco definidos nos difratogramas de raios X, o que dificulta a obtenção de informações mais detalhadas de sua estrutura e do arranjo adotado pela espécie intercalada entre as lamelas.²²

O grupo de pesquisa dirigido pelo Dr. Fabrice Leroux, que desenvolve suas atividades no *Laboratoire des Matériaux Inorganiques*, na Universidade Blaise Pascal, em Clermont Ferrand, França, e conta com a participação da Profa. Dra. Christine Taviot-Guého, tem

grande experiência no desenvolvimento de materiais híbridos orgânico-inorgânicos contendo hidróxidos duplos lamelares.¹⁴⁴ A Profa. Taviot-Guého em especial vem trabalhando nos últimos anos no desenvolvimento de métodos de refinamento dos dados experimentais de difratometria de raios X, como a técnica de cálculo de densidade eletrônica em uma dimensão (*1D Plot*)^{145, 146}, que auxilia no entendimento de como espécies intercaladas podem estar arrançadas em matrizes bidimensionalmente organizadas, como no caso dos HDLs. Porém, para o emprego dessa técnica é necessário que os dados de difração de raios X sejam adquiridos a partir de amostras com o maior grau de cristalinidade possível.

Por esse motivo, foi realizado um curto estágio no *Laboratoire des Matériaux Inorganiques*, em Clermont Ferrand, sob a orientação da Profa. Taviot-Guého, a fim de testar modificações no método de síntese dos HDLs e obter materiais com cristalinidade suficiente para emprego da técnica de *1D Plot*.

A partir de então as sínteses passaram a ser realizadas usando temperatura moderada (55°C) e, após seu término, os materiais formados permaneceram em tratamento térmico por 24 h, sendo em seguida interrompido o aquecimento, mas mantendo-se a agitação por 12 horas adicionais. Só então os materiais foram isolados por centrifugação como já descrito anteriormente. Introduziu-se também uma modificação nas sínteses realizadas sem tratamento térmico: após o término da adição dos sais, os sólidos passaram a ser mantidos sob agitação por 24 h e só então foram separados, lavados e secos.

Em alguns casos foi necessário realizar comparações entre resultados de caracterização do sulindaco ácido e de sua forma desprotonada. Para isso preparou-se o sal sódico NaSul por meio de uma reação ácido-base, utilizando os mesmos equipamentos e vidrarias mostrados na Figura 13. Reagiram-se 244 mg (0,68 mmol) de sulindaco com 7,6 mL de solução padronizada de NaOH 0,09 mol L⁻¹ (0,68 mmol). Após total dissolução do sulindaco, a solução contendo NaSul foi congelada e o solvente foi removido por liofilização.

3.3 Métodos computacionais

Foram realizadas simulações computacionais para otimizar a geometria molecular do sulindaco (polimorfo II), do ânion Sul^- e do sal NaSul a fim de auxiliar na interpretação dos resultados experimentais. Assim, foram calculados os espectros vibracionais na região do infravermelho (IR), Raman e de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C -RMN). Os cálculos teóricos foram conduzidos pelo estudante de doutorado Philippe A. D. Petersen, sob orientação da Profa. Dra. Helena M. Petrilli, no Departamento de Física de Materiais e Mecânica do Instituto de Física da USP.

Os cálculos foram realizados considerando as moléculas em fase gasosa. A metodologia utilizada foi a Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory-DFT) com o funcional híbrido de troca e correlação B3LYP¹⁴⁷ e usando o pacote computacional Gaussian09.¹⁴⁸

A otimização da geometria molecular do sulindaco foi realizada usando a base 6-311++G(2d,p) e os dados cristalográficos do seu polimorfo II, reportados por Koo et al.⁷³ e disponíveis no banco de dados Cambridge Crystallographic Date Centre - CCDC, (RefCode DOHREX e CCDC N° 1143612). Para efetuar os cálculos do sal NaSul, o átomo de hidrogênio do grupo carboxilato foi trocado pelo íon sódio.

Os espectros de ^{13}C -RMN foram calculados usando o método dos Orbitais Atômicos Incluindo Invariância de Gauge (Gauge Including Atomic Orbital-GIAO)^{149, 150}. Tetrametilsilano (TMS), calculado nas mesmas condições, foi usado como referência para a obtenção do deslocamento químico de ^{13}C .

No caso dos espectros no IR e Raman, os valores de número de onda foram corrigidos com o fator 0,9742 de acordo com o recomendado por Anderson et al.¹⁵¹ para correção de efeitos de anarmonicidade (desvio da idealidade do modelo em relação ao sistema de um oscilador harmônico).

As ilustrações mostradas nesta tese da estrutura molecular do sulindaco, Sul⁻ ou NaSul foram obtidas a partir dos resultados de otimização da geometria molecular dessas espécies e da manipulação do arquivo gerado nos programas GaussView 5.0 e Discovery Studio 4.0.

As otimizações de estrutura molecular foram realizadas a partir dos dados cristalográficos do polimorfo II, depositados no CCDC por Koo et al.⁷³ Com o intuito de realizar comparações entre as estruturas dos polimorfos I e II, foram também realizados cálculos de otimização de estrutura molecular para a forma I, a partir dos dados cristalográficos depositados no CCDC por Grzesiak et al.⁷⁵ (Tabela 1).

A obtenção dos mapas 1D de densidade eletrônica ao longo do eixo c (*1D Plot*) do material Zn₂Al-Sul 55 foi efetuado conforme tratamento matemático descrito na literatura.¹³

3.4 Técnicas de caracterização

A análise química dos elementos carbono e hidrogênio foi realizada em duplicata em um analisador de CHN da marca Perkin Elmer modelo 2400 no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – CA-IQUSP, localizado no Instituto de Química da USP. A quantificação dos metais alumínio, magnésio, zinco e enxofre foi realizada em duplicata pela técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) usando um espectrômetro da marca Spectro, modelo Spectro Arcos radial, também na CA-IQUSP. O preparo das amostras para essas quantificações consistiu na pesagem de cerca de 10 mg dos materiais diretamente em tubos de digestão *DigiTube* da marca SCP Science, seguida de adição de 3 mL de ácido nítrico concentrado (65%), 3 gotas de peróxido de hidrogênio concentrado (30%) e aquecimento a 80°C por 1 hora, com os tubos tampados, em bloco de digestão da marca SCP Science. Diluíram-se as amostras para 50 mL e diluição adicional de 10 vezes foi necessária para que a concentração de todos os elementos ficasse dentro da faixa de medição das curvas de calibração empregadas. Os elementos foram quantificados nas seguintes linhas de emissão: Al: 396,152 nm, Mg: 279,553 nm, S: 180,731 nm e Zn: 213,856 nm.

As curvas TG-DTA e TG-MS foram registradas em uma termobalança da marca Netzsch, modelo STA 409 PC Luxx acoplada a um espectrômetro de massas Aëolos 403C, também da Netzsch. Os ensaios foram realizados utilizando cadinho de alumina, atmosfera dinâmica de ar sintético com vazão de 50 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ a partir da temperatura ambiente até 1000°C . Registrou-se também curvas DSC em um calorímetro exploratório diferencial da marca TA Instruments, modelo DSC-Q10 da CA-IQUSP, usando 2 mg de amostra em cadinho de alumínio hermeticamente fechada, taxa de aquecimento de 5°C min^{-1} na faixa de 25 a 400°C e atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} .

Os difratogramas de raios X (DRX) foram obtidos pelo método do pó em um difratômetro Rigaku modelo Miniflex, operando com tensão de 30 kV, corrente de 15 mA, radiação com comprimento de onda de $1,541 \text{ \AA}$ gerada por fonte de Cobre ($\text{CuK}\alpha$) e filtro de Ni. As varreduras foram feitas com velocidade de $0,03^\circ \text{ s}^{-1}$ no intervalo de varredura (2θ) de $1,5$ a 70° . Alguns difratogramas foram registrados no Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da USP, em um difratômetro Rigaku, modelo X'Pert-MRD, utilizando fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($1,541 \text{ \AA}$), 40 kV de tensão, 30 mA de corrente, monocromador de grafite e intervalo de varredura (2θ) de 2 a 70° com velocidade de $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$. Os difratogramas para análise de cálculo de densidade eletrônica em uma dimensão (*1D Plot*) foram obtidos no laboratório da Profa. Christine Taviot-Guého em um difratômetro Philips X-Pert Pro equipado com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha 1/\text{K}\alpha 2$ ($1,5406 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite, usando tensão de 40 kV e 30 mA de corrente. Os dados foram coletados com passo de $0,02^\circ/2\theta$ em uma faixa de $1,0$ a $90^\circ/2\theta$ e velocidade de varredura de $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$. As amostras em forma de pó foram compactadas em suportes de alumínio para produzir uma superfície ampla e minimizar efeitos de orientação preferencial.

Os espectros eletrônicos UV-vis de soluções foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC e os espectros eletrônicos de sólidos foram registrados a partir de

pastilhas preparadas pela dispersão das amostras em BaSO₄ sólido, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC com esfera integradora.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR) foram registrados em um equipamento IR-ABB Bomem, modelo MB 102, na região de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e média de 64 *scans*. Foi usado o modo de refletância difusa e amostras dispersas em KBr ou no modo transmitância com amostras dispersas em KBr e prensadas em forma de pastilhas.

Os espectros Raman foram obtidos com auxílio do mestrando Otávio Mendes Gil, no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do IQ-USP em um espectrômetro FT-Raman Bruker RFS-100/S, com laser de 1064 nm (Nd:YAG laser Coherent Compass) operando a 100 mW e detector de Ge. Os espectros foram obtidos pelo acúmulo de 100 *scans* e com resolução de 4 cm⁻¹. Na análise estratigráfica por espectroscopia Raman das pastilhas coletadas após o ensaio de liberação *in vitro* do sulindaco, foi utilizado um espectrofotômetro Renishaw System 3000 equipado com câmera CCD (Renishaw, 600x400 pixels) refrigerado termoeletricamente e acoplado a um microscópio Leica modelo DM2500M; a linha laser em 632,8 nm (He-Ne, Coherent) foi focalizada na amostra por uma objetiva Leica x50 (abertura numérica de 0,75) e sua potência foi mantida abaixo de 1 mW. Foram realizadas cinco acumulações por amostra.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (¹³C-RMN) do sulindaco em solução de CDCl₃ (10 mg em 600 µL) foram obtidos na CA-IQUSP em um espectrômetro Bruker AIII 500 MHz operando a 125,77 MHz para ¹³C e usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Espectros de ¹³C-RMN no estado sólido foram obtidos no *Laboratoire des Matériaux Inorganiques* pelo Dr. Fabrice Leroux em um espectrômetro Bruker Advance 300 MHz a 75,47 MHz para o ¹³C. Os experimentos foram realizados com as amostras confinadas em rotor de zircônia de 4 mm de diâmetro, empregando-se as técnicas de Rotação no Ângulo Mágico (Magic Angle Spinning, MAS) a 10kHz e ¹H Polarização Cruzada (*Proton*

enhanced Cross-Polarization, CP) com tempo de contato de 1 ms e tempo de reciclagem de 5s. A calibração foi baseada na carbonila do padrão glicina (176,03 ppm *vs* TMS) e para a obtenção de sinal apropriado foram necessárias de 2.000 a 10.000 acumulações.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas na CA-IQUSP em um microscópio eletrônico Jeol - JSM 7401F (FEG), com voltagem de 5 kV no modo LEI (*lower secondary electron image*). Para obtenção dessas imagens as amostras foram coletadas logo após cada síntese, na última etapa de lavagem dos materiais, e diluídas cerca de 600 vezes com água deionizada. Uma gota da suspensão foi depositada sobre substratos de silício, seca em temperatura ambiente em dessecador e recoberta com uma fina camada de ouro usando um sistema de deposição HHV Auto 306, também da CA-IQUSP.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução no modo HAADF (*high-angle annular dark-field imaging*) foram obtidas pelo Dr. Érico Teixeira Neto, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)-CNPEM, em Campinas, em um microscópio eletrônico JEOL-JEM 2100F operando a 200 kV. As distâncias basais d_{003} foram determinadas nas imagens por medidas feitas com o software Digital Micrograph 2.02 (Gatan Inc.)

3.5 Ensaio de dissolução do sulindaco *in vitro*

Para os ensaios de dissolução *in vitro*, as amostras foram compactadas em forma de pastilhas de aproximadamente 12 mm de diâmetro 1 mm de espessura (Figura 14), usando um pastilhador destinado ao preparo de amostra para espectroscopia FTIR e uma prensa da marca Carver, aplicando-se 1,5 Ton durante 5 minutos. Foi empregado cerca de 80 mg de $M^{II}_2Al-Sul$ 55, que corresponde a cerca de 40 mg de sulindaco.

Figura 14. Foto de pastilhas de 7 mm de diâmetro preparadas para ensaio de dissolução *in vitro*.

O ensaio de liberação foi conduzido em um Dissolutor modelo PTWS 820D da marca Pharma Test, usando o método 1 (de cesta), de acordo com o recomendado pela farmacopéia norte-americana (*United States Pharmacopeia - USP*) no capítulo <711>.¹⁵² O método de cesta geralmente é indicado para o estudo de formas farmacêuticas sólidas em formulações de liberação imediata ou modificada.¹¹⁷

Uma breve descrição do Dissolutor e do método de cestas é dada a seguir. O aparelho de dissolução consiste de um sistema de três componentes:

- (1) Recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico (cubas), feitos em vidro boro silicato, plástico ou outro material transparente e inerte, com tampas para evitar a evaporação e com aberturas adequadas para o agitador e coleta de amostras.
- (2) Hastes em aço inoxidável para prover agitação do meio, que na extremidade inferior têm fixadas cestas cilíndricas (Método 1, Figura 15).
- (3) Um motor que possibilite ajustar a velocidade de rotação da haste e um banho termostaticado, que permita manter a temperatura do meio de dissolução a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o ensaio. De preferência, o aparelho deve possibilitar a visualização das amostras e dos agitadores durante o teste.

Figura 15. Esquema ilustrativo do arranjo experimental correspondente ao método 1 de dissolução: cestas. Ilustração adaptada da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição.¹⁰⁸

O ensaio de dissolução foi realizado em triplicata, na temperatura de 37°C e com velocidade de rotação de 200 rpm. Como meio de dissolução usou-se 500 mL de tampão fosfato com pH = 7,2 e força iônica = 0,16 mol L⁻¹. O tampão foi preparado pela dissolução em água deionizada de uma mistura contendo dihidrogeno fosfato de sódio (1,5 mmol L⁻¹), monohidrogenofosfato de sódio (5,6 mmol L⁻¹), cloreto de sódio (136,9 mmol L⁻¹) e cloreto de potássio (2,7 mmol L⁻¹).

Coletou-se alíquotas de 3 mL de solução em intervalos de 30 minutos nas primeiras 6 horas de ensaio, em seguida em intervalos de 1 h até as 12 horas do experimento, e na sequência foram coletadas alíquotas em 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72 e 84 horas. Após cada alíquota retirada, houve reposição de igual volume de meio. Para isso, durante todo o experimento, uma das cubas do Dissolutor foi mantida apenas com o tampão na temperatura do ensaio. Mesmo utilizando tampa nas cubas, observou-se que após longos

períodos ocorre evaporação significativa de solvente. Então a cada 12 horas o volume total em cada cuba foi conferido e quando necessário, completado para 500 mL.

A concentração de sulindaco dissolvido a cada intervalo de tempo foi determinada por espectrofotometria UV-vis no comprimento de onda λ_{max} igual a 326 nm, a partir de curva de calibração 0 a 30 mg L⁻¹ de sulindaco. Quando necessário, as alíquotas foram diluídas com o meio de dissolução.

3.6 Estudos *in vivo*: implantes de pastilhas de HDL-Sul em ratos

Inicialmente foi confeccionado um pastilhador para preparação de pastilhas com tamanho adequado para os implantes. Para o preparo das pastilhas, pesou-se de 42 a 45 mg dos materiais híbridos Mg₂Al-Sul 55 e Zn₂Al-Sul 55. A massa foi transferida para o pastilhador e prensada, aplicando-se uma força de 0,25 Ton por um minuto. Ao término, as pastilhas foram pesadas e medidas e continham cerca de 40 mg, 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Durante o processo de prensagem normalmente ocorre perda de massa por aderência ao pastilhador. Por isso a massa inicial pesada foi sempre cerca de 5 mg acima do valor desejado.

A quantidade de sulindaco nas matrizes de Zn₂Al-Sul 55 e Mg₂Al-Sul 55 corresponde a 52,1 % e 57,6 %, respectivamente. Dessa forma, 40 mg de Zn₂Al-Sul e Mg₂Al-Sul possuem 20,82 mg e 23,06 mg do fármaco, respectivamente. Portanto, nos casos em que se fez necessária a comparação com pastilhas das matrizes controle, Zn₂Al-Cl e Mg₂Al-Cl, essas foram preparadas de forma a pesar a mesma quantidade de material inorgânico presente nos materiais híbridos, que é de 47,6 % e 42,4 %, respectivamente. Por isso a massa empregada dessas matrizes foi o suficiente para resultar em pastilhas de cerca de 20 mg, no caso de Zn₂Al-Cl e de 17 mg, no caso de Mg₂Al-Cl.

A esterilização das pastilhas foi realizada em autoclave a 120°C por 90 minutos. Os implantes em ratos foram realizados pelo Prof. Ivan Hong Jun Koh e sua equipe. Essa etapa

foi inteiramente realizada nas dependências da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), no Laboratório de Pesquisa Experimental.

O estudo *in vivo* foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da EPM-UNIFESP e consistiu no implante das pastilhas de HDL-Sul no espaço entre os músculos oblíquo externo e interno de ratos, fêmeas de cerca de 250 g da raça Wistar-EPM. Como controle, para mimetizar a separação dos folhetos musculares causados quando as pastilhas foram implantadas, em local adjacente ao implante foi realizado um trauma cirúrgico, ou seja, uma leve separação entre as camadas do músculo oblíquo.

Decorridos períodos de 7, 14, 21, 27 e 35 dias de pós-operatório foi realizada cirurgia no local dos implantes para analisar a resposta biológica da microcirculação, na região da pastilha implantada, pela técnica de *Sidestream Dark Field (SDF) imaging*. Em seguida os animais foram sacrificados e coletou-se os tecidos da região adjacente ao implante, da região do controle e de tecido muscular sadio, que foi usado como padrão. Parte dos tecidos foi armazenada em solução apropriada para imediatamente após a coleta serem analisados por espectroscopia Raman, cujos resultados não fazem parte desta tese, e outra parte dos tecidos seguiu para o preparo de lâminas para o estudo histológico.

O preparo das amostras (lâminas) para a histologia assim como a obtenção das fotomicrografias dos cortes histológicos foram inteiramente realizados pela equipe do Prof. Koh.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0 Resultados e discussão

Matrizes de fórmula $[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{Cl}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Zn}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{Cl}\cdot x\text{H}_2\text{O}$, abreviadas como $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, foram preparadas para serem utilizadas como referência. Como sua caracterização já foi intensamente investigada e descrita em outras dissertações^{153, 154} e teses^{16, 155} desenvolvidas pelo grupo, no presente trabalho não será dedicado um item integralmente para a discussão de todos os seus resultados, mas eles serão apresentados juntamente com a caracterização dos materiais híbridos, na ordem em que cada técnica for discutida, a fim facilitar a comparação.

Inicialmente, para evidenciar a relevância de tratamento térmico na síntese dos HDLs, na Figura 16 são apresentados os difratogramas de raios X apenas das matrizes intercaladas com íons cloreto e obtidas em duas condições: (i) sem tratamento térmico e efetuando a separação do sólido por centrifugação e lavagem logo após a síntese (Figura 16A e C); (ii) com tratamento térmico a 55°C durante a etapa de coprecipitação, seguido de 24 h nessa temperatura, e separação do sólido somente após 12 h de resfriamento, sob agitação (Figura 16B e D). A diferença de intensidade dos picos de difração de raios X e a melhor definição dos mesmos evidenciam o efeito e a importância do tratamento térmico, que é fundamental no processo de obtenção de HDLs de alta cristalinidade. Possivelmente, o mecanismos de recristalização e crescimento de cristais como o amadurecimento de Ostwald desempenham papel fundamental na formação das estruturas mais cristalinas observadas após aplicação de tratamento térmico.^{156, 157}

As matrizes HDL-Cl de magnésio e de zinco apresentam a estrutura cristalina e, consequentemente, DRX muito semelhantes, uma vez que possuem o mesmo íon intercalado e a diferença entre os raios iônicos dos metais divalentes, que formam as lamelas, é muito pequena (raios iônicos em nm: $\text{Al}^{3+} = 0,054$; $\text{Mg}^{2+} = 0,072$; $\text{Zn}^{2+} = 0,074$ e $\text{Cl}^- = 0,18$)¹⁵⁸.

Os picos de difração observados correspondem àqueles característicos de compostos do tipo hidrotalcita: na região abaixo de 30 graus (2θ), os picos (003) e (006) são referentes às

ordens sucessivas da reflexão basal, derivada da organização das lamelas dos HDLs ao longo do eixo de empilhamento c . Os valores de distância interplanar (d_{hkl}) podem ser calculados substituindo-se os valores de θ , obtidos a partir do difratograma, na equação de Bragg. Esses valores são apresentados na Tabela 4. Para o plano (003), têm-se que $d_{003} = 0,77$ nm para todas as amostras, o que coincide com o valor reportado na literatura para os HDLs de Zn-Al-Cl e Mg-Al-Cl por Miyata et al.¹³⁷ Além disso, o parâmetro cristalográfico c também pode ser obtido, uma vez que é um múltiplo do valor do espaçamento basal d_{003} . Para o caso de compostos do tipo hidrotalcita, que cristalizam no sistema cristalino romboédrico e pertencem ao grupo espacial $R3m$, $c' = (d_{003} + 2d_{006})/2$ e $c = 3c'$. Os valores do parâmetro c estão listados na Tabela 4 e correspondem ao relatado na literatura.¹³⁷

Figura 16. Difratogramas de raios X das matrizes intercaladas com íons cloreto obtidas sem tratamento térmico e com tratamento a 55°C durante a síntese por coprecipitação e 24 horas após seu término.

Para valores de 2θ acima de 30° , são observados os picos devido às reflexões não basais relacionadas à estrutura interna das lamelas. A reflexão 110 , em especial, dá a medida direta do parâmetro cristalográfico a ($a = 2d_{110}$), que corresponde à distância entre dois centros metálicos dentro das lamelas. Para as amostras em questão, tem-se que $d_{110} = 0,15$ nm, e portanto $a = 0,30$ nm, o que está de acordo com o valor esperado.^{22, 137}

Tabela 4. Valores de ângulo 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) obtidos a partir dos DRX das amostras Mg_2Al-Cl e Zn_2Al-Cl .

hkl	Mg ₂ Al-Cl sem trat. térmico		Mg ₂ Al-Cl 55°C		Zn ₂ Al-Cl sem trat. térmico		Zn ₂ Al-Cl 55°C	
	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)
(003)	11,37	0,78	11,46	0,77	11,49	0,77	11,46	0,77
(006)	23,04	0,39	23,07	0,39	22,98	0,39	22,95	0,39
(012)	34,89	0,26	34,86	0,26	34,59	0,26	34,59	0,26
(015)	39,12	0,23	39,27	0,23	39,03	0,23	38,97	0,23
(018)	46,53	0,20	46,65	0,19	46,44	0,20	46,17	0,20
(1010)	52,14	0,18	52,14	0,18	52,41	0,17	52,14	0,18
(0111)	55,44	0,17	55,44	0,17	55,65	0,17	55,44	0,17
(110)	61,11	0,15	60,81	0,15	60,27	0,15	60,15	0,15
(113)	62,10	0,15	62,13	0,15	61,47	0,15	61,41	0,15
(116)	65,91	0,14	65,94	0,14	65,22	0,14	65,22	0,14
c (nm)	2,32		2,31		2,31		2,32	
a (nm)	0,30		0,30		0,31		0,31	

4.1 Materiais híbridos Zn₂Al-Sul e Mg₂Al-Sul: estrutura e morfologia

Como descrito anteriormente, o anti-inflamatório não-esteroidal sulindaco é normalmente comercializado como o isômero *Z* (Figura 7A), que no estado sólido pode apresentar diferentes formas polimórficas, sendo a forma II a mais estável à temperatura ambiente e a farmacologicamente ativa. Assim, a fim de confirmar que o sulindaco empregado nesse trabalho se tratava do isômero *Z* e do polimorfo II, inicialmente foram registrados seu difratograma de raios X e curva DSC.

O perfil dos difratogramas de raios X (Figura 17A), os valores de ângulo 2θ e as distâncias interplanares das três amostras são equivalentes entre si, e apresentam os picos característicos do polimorfo II, que são aqueles destacados em negrito na tabela inserida na Figura 17B.

Figura 17. (A) DRX de sulindaco adquirido em farmácias de manipulação e da empresa Sigma-Aldrich. (B) Principais picos de difração e distâncias interplanares para cada uma das amostras. *Picos característicos do polimorfo II.

Na Figura 18A são apresentados os difratogramas típicos dos polimorfos I e II. Foi realizada também uma comparação entre o perfil do difratograma da forma II, obtido a partir do arquivo de dados cristalográficos depositado no CCDC por Koo et al.,⁷³ e aquele do sulindaco adquirido da Sigma-Aldrich (Figura 18B).

Figura 18. (A) DRX típico dos polímeros I e II do sulindaco reportados por Tros De Ilarduya et al.⁷⁴ (B) Comparação entre o DRX do sulindaco Aldrich e aquele da Forma II reportado por Koo et al.⁷³

Dessa forma, apesar de apresentarem diferenças de intensidade em alguns picos quando comparados àqueles reportados na literatura (como os picos em 16,5; 18,7 e 24,2°) os difratogramas de raios X dos lotes de sulindaco adquiridos indicam que trata-se do polímero II, pois as principais reflexões esperadas para essa forma são observadas em valores de 2θ iguais a 9,5; 12,5; 14,0; 15,0; 16,0; 24,8; 27,0 e 28,5°. As diferenças de intensidade, como reportado por Tros De Ilarduya et al.⁷⁴, são comuns e ocorrem dependendo do solvente utilizado durante a recristalização.

Na Figura 19 são apresentadas as curvas DSC das amostras de sulindaco e os valores de ponto de fusão e de $\Delta H_{fusão}$, os quais estão de acordo com os valores reportados por Fotios et al.,⁶² Grzesiak & Matzger⁷⁵ e Tros De Ilarduya et al.⁷⁴ para o polímero II.

Figura 19. Curvas DSC das amostras de sulindaco realizadas em panelinha de alumínio hermeticamente fechada, com taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em atmosfera de $\text{N}_2(\text{g})$ com vazão de 50 mL min^{-1} .

Na Figura 20 são mostradas as etapas típicas das sínteses realizadas neste trabalho. Inicialmente, o sulindaco foi suspenso em água deionizada e, sob atmosfera de $\text{N}_2(\text{g})$ e agitação, foi dissolvido pela adição de solução de NaOH. A mistura contendo o sólido apenas em água apresentou valor de pH de 4,1 a 4,5. Com a adição de NaOH ocorreu uma reação ácido-base (Equação 8) formando o sal NaSul, que é solúvel e estável em solução básica⁶² e apresenta-se totalmente dissociado, permitindo que uma reação de intercalação por coprecipitação fosse possível.

Figura 20. Fotos que representam as etapas típicas das sínteses de HDLs realizadas nesta tese: (A) e (B) Dissolução do sulindaco; (C) Gotejamento da solução dos sais; (D) Suspensão contendo o produto sendo formado; (E) Produto depositado e seu sobrenadante; (F) Produto após secagem; (G) Trituração; (H) Passagem em peneira 100 Mesh; (I) Produto final em frasco adequado para armazenagem.

Os efeitos das condições de síntese (descritas no Capítulo 3 e resumidas na Tabela 3) sobre a cristalinidade dos materiais formados podem ser comparados nos difratogramas de raios X apresentados nas Figuras 21 e 22. Assim como no caso das matrizes HDL-Cl, o tratamento térmico foi essencial para a organização da estrutura cristalina dos materiais híbridos.

As condições 3 e 4 (Tabela 3), nas quais foi empregada temperatura de 55°C na etapa de coprecipitação, e tratamento hidrotérmico pós-síntese a 115°C, respectivamente, aumentaram consideravelmente a cristalinidade dos produtos. Porém, as demais etapas do

estudo foram conduzidas comparando-se as amostras obtidas nas condições 2 e 3 (sem tratamento térmico e com tratamento térmico a 55°C na etapa de coprecipitação, Tabela 3) visto que a condição 4 precisa ser efetuada em duas etapas, sendo assim mais demorada e podendo induzir à formação de subprodutos, como óxido de zinco, ou ainda decompor a molécula do fármaco devido à temperatura mais elevada.

Figura 21. Difrátogramas de raios X dos materiais $Mg_2Al-Sul$, obtidos em diferentes condições de síntese: (A) sem tratamento térmico; (B) 12 horas sob agitação à temperatura ambiente; (C) aquecimento a 55°C durante a coprecipitação e 24 horas após a síntese; (D) tratamento hidrotérmico a 115°C por cinco dias.

Figura 22. Difratogramas de raios X dos materiais $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$, obtidos em diferentes condições de síntese: (A) sem tratamento térmico; (B) 12 horas sob agitação à temperatura ambiente; (C) aquecimento a 55°C durante a coprecipitação e 24 horas após a síntese; (D) tratamento hidrotérmico a 115°C por cinco dias.

Os difratogramas de raios X das amostras de HDL-Sulindaco, comparados na Figura 23 com aqueles do sulindaco e das matrizes HDL-Cl, apresentam perfis típicos de hidróxidos duplos lamelares e a posição dos picos de difração confirmam que o ânion derivado do fármaco foi intercalado. A reflexão 003, observada em 2θ igual a $3,60^\circ$ e $3,20^\circ$, corresponde às distâncias basais d_{003} iguais a 2,37 e 2,74 nm para os materiais $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ 55 e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55, respectivamente, preparados a 55°C . Além disso, vários picos basais estão presentes (Tabela 5), indicando a formação de partículas com empilhamento bem ordenado ao longo do eixo c .

Figura 23. Comparação entre os perfis dos difratogramas de raios X do sulindaco (A); das matrizes HDL-Cl (B) e (D), dos materiais híbridos $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ (C) e $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ (E).

Além de maior espaçamento basal d_{003} , as amostras preparadas a 55°C também apresentam maior cristalinidade quando comparadas àquelas obtidas à temperatura ambiente e sem tratamento térmico pós-síntese (Figura 21 e Figura 22). Os dados de difração de raios X confirmam a maior organização estrutural dos sistemas HDL-Sul formados a 55°C na presença da espécie orgânica.

A distância interplanar dos híbridos HDL-Sul, calculada subtraindo-se a espessura lamelar do HDL, de 0,48 nm, dos valores de espaçamento basal apresentados na Tabela 5, foi de 2,26 e 2,27 nm para as amostras de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$, respectivamente. Comparando esses valores com as dimensões da espécie convidada (1,4 x 0,6 x 0,9 nm,

Figura 24) sugere-se a formação de uma bicamada de ânions de sulindaco interdigitados na região interlamelar, tendo o grupo carboxilato voltado para as lamelas positivamente carregadas do HDL.

Tabela 5. Valores de ângulo 2θ (graus) e distâncias interplanares (d_{003}) obtidos a partir dos DRX dos materiais $Mg_2Al-Sul$ e $Zn_2Al-Sul$.

hkl	$Mg_2Al-Sul$ sem trat. térmico		$Mg_2Al-Sul$ 55		$Zn_2Al-Sul$ sem Trat. térmico		$Zn_2Al-Sul$ 55	
	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)	2θ	d (nm)
(003)	3,80	2,32	3,23	2,74	3,65	2,42	3,21	2,75
(006)	8,16	1,08	6,40	1,38	7,24	1,22	6,44	1,37
(009)	12,10	0,73	9,36	0,94	12,30	0,72	9,61	0,92
(0012)	-	-	12,80	0,69	16,00	0,55	12,80	0,69
(0015)	-	-	-	-	19,70	0,45	16,10	0,55
(0018)	21,20	0,42	19,60	0,45	23,30	0,38	19,60	0,45
(0021)	-	-	22,60	0,39	-	-	22,60	0,39
(012)	35,00	0,26	34,80	0,26	34,10	0,26	34,10	0,26
(110)	61,30	0,15	60,90	0,15	60,80	0,15	60,60	0,15
c (nm)	6,67		8,33		7,02		8,25	
a (nm)	0,30		0,31		0,30		0,31

Figura 24. Dimensões da molécula de sulindaco calculadas a partir de cálculos DFT conforme descrito no item 3.3.

Para o material híbrido $Zn_2Al-Sul$ 55 foi possível empregar a técnica de cálculo de densidade eletrônica em uma dimensão, projetada ao longo do eixo de empilhamento c das

lamelas (*1D plot* ou mapa 1D). A técnica baseia-se no fato da intensidade dos picos de difração em um padrão de difração de raios X ser proporcional à distribuição de densidade eletrônica ao longo de uma dimensão.

A técnica consiste no refinamento dos dados de DRX, e tem sido utilizada para auxiliar no entendimento de como moléculas intercaladas se arranjam em matrizes unidimensionais¹⁵⁹ ou bidimensionais, como no caso dos HDLs.^{145, 160} O mapa 1D de densidade eletrônica, $\rho(Z)$, fornece informações sobre a orientação e estrutura da espécie intercalada, ou pelo menos elimina certas conformações que são incompatíveis com os dados de DRX.

Na Figura 25 é mostrado o mapa 1D de densidade eletrônica obtido a partir do refinamento dos dados do DRX do material $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ (mostrado na Figura 23). Os valores de $\rho(Z)$ foram obtidos a partir das intensidades das reflexões (006), (009), (0012), (0015), (0018) e (0021). Tem-se no eixo y a densidade eletrônica ρ , em elétron/Å, em função da distância, em Å, ao longo do eixo c (direção dos planos 00 l).

De acordo com o mapa 1D, o sulindaco assume uma orientação inclinada de aproximadamente 45° com respeito às lamelas do HDL (ângulo entre o plano da lamela e uma linha passando através dos grupos carboxilato e S-O). Os picos mais intensos na origem e em aproximadamente 27,5 Å correspondem à densidade atômica/eletrônica das lamelas (grupos M-OH). Entre esses dois picos de densidade eletrônica relacionados às lamelas, nove sinais adicionais de menor intensidade podem ser vistos e atribuídos ao arranjo dos íons derivado de sulindaco intercalados.

Figura 25. Mapa 1D de densidade eletrônica projetado ao longo do eixo c e representação esquemática do arranjo assumido pelas moléculas de sulindaco na região interlamelar do $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$.

Uma sugestão de quais são os átomos que dão origem aos nove picos adicionais observados é dada na Figura 26. O primeiro sinal mais intenso após aquele relacionado às lamelas é observado em aproximadamente 3,8 Å, e coincide com o plano que passa pelo grupo carboxilato, pelo grupo 3-CH₂ e pela metila 2-CH₃. Sugere-se que o segundo plano, em 7,0 Å, passa pelos átomos C4, C9, C1 e C10; o terceiro plano, em 9,5 Å, passa pelos átomos de F, C5, C6, C7 e C12; o quarto plano, em aproximadamente 11,2 Å, passa pelos átomos C13 e C15 e por fim, o quinto passa pelos átomos de oxigênio das duas moléculas que estão em uma configuração interdigitada. Na sequência repetem-se os mesmos planos passando pela segunda molécula do arranjo.

Figura 26. Planos imaginários passando pelas regiões da molécula de sulindaco que possivelmente apresentam maior densidade eletrônica e dão origem aos picos observados no mapa 1D de densidade eletrônica.

Para ajudar na compreensão do arranjo adotado pelas espécies intercaladas, sugerido pelos dados de DRX e pelo mapa 1D de densidade eletrônica, foi levado em consideração também a configuração espacial que a molécula do sulindaco apresenta na estrutura cristalina reportada por Koo et al.⁷³

No sulindaco, existe uma ligação dupla entre os átomos C1 e C10 (Figura 6B)⁷³ que permite a ocorrência de rotação do anel fenil de modo a restar o menor impedimento estérico entre este e o anel indênico, especialmente entre os átomos C7 e C12. Assim, na forma cristalina do polimorfo II, o sulindaco apresenta os dois anéis em planos diferentes que formam cerca de 43° entre si, conforme descrito por Koo et al.⁷³ e mostrado na Figura 27. Em consequência dessa conformação molecular, a estrutura cristalina do polimorfo II é diferente daquela do polimorfo I.

Figura 27. Molécula de sulindaco vista em diversas perspectivas. Figuras obtidas a partir de otimização de estrutura por DFT e utilização do programa DS visualizer 4.0.

Curiosamente, o arranjo de um par de ânions adjacentes intercalados no espaço interlamelar sugerido pelo mapa 1D é comparável àquele presente no arranjo cristalino do polimorfo II do sulindaco, comentado no item 1.3 (pág. 40) e mostrado novamente e com mais detalhes na Figura 28. Esse fato foi observado também para outros fármacos intercalados em HDLs, como a pravastatina e o ácido mefenâmico, que mantêm uma organização espacial análoga àquela do cristal dos fármacos.¹³

A Figura 28 mostra parte do arranjo cristalino do sulindaco inclinado cerca de 45° para ser comparado àquele sugerido para o fármaco intercalado. Com grupo carboxila voltado para cima, podem ser identificados pares de moléculas interdigitadas com dois padrões de repetição (marcados na figura como padrão 1 e padrão 2). Cada uma dessas moléculas tem outra correspondente de posição inversa, que são aquelas com os grupos carboxila voltados para baixo, marcados em cores correspondentes na Figura 28A. Colorindo em rosa e verde os pares interdigitados correspondentes, pode ser visto, na Figura 28B, que existem dois tipos de distância S...S, uma de 10,5 Å entre as moléculas rosas, e uma de 5,2 Å entre as moléculas rosa e verde.

Além disso, girando o arranjo e mudando de ângulo de visão, pode ser visto ainda que para cada uma das moléculas, verde ou rosa, existe uma cinza correspondente, com os grupos carboxila e S-CH₃ de frente um para o outro como realçados na Figura 28C.

Figura 28. Parte da estrutura cristalina do polimorfo II do sulindaco obtido a partir do CIF file n° 1143612 depositado no CCDC por Koo et al.⁷³ e tratado no programa DS visualizer 4.0. As moléculas em destaque na cor rosa têm um arranjo similar àquele observado quando o sulindaco foi intercalado entre as lamelas de HDLs.

O sulindaco na orientação inclinada sugerida pelo resultado de mapeamento 1D, ou seja 45° com relação a um eixo passando entre a carboxila e o átomo de enxofre, como reproduzido na Figura 28D, ocuparia uma área de 0,59 nm² quando projetado na superfície de uma lamela de HDL. A área por unidade de carga para um HDL do tipo Zn₂Al é de 0,25

nm²/carga.²² A área ocupada por um íon sulindaco é portanto maior que a superfície disponível do HDL para cada carga negativa, dessa forma possivelmente os ânions devem estar empacotados em um arranjo mais compacto que aquele adotado pelas moléculas de sulindaco no cristal. Considerando o ângulo de 43° entre os anéis indeno e fenil da molécula, é possível propor um arranjo com ânions eclipsados como mostrado na Figura 29.

Essa restrição estérica poderia também ser compensada se parte da carga positiva das lamelas fosse parcialmente neutralizada por íons pequenos cointercalados, como íons cloreto que estão presentes durante a síntese. As fórmulas propostas para os materiais HDL-Sul, baseadas nos resultados de análise química de C, H, S e metais Mg, Zn e Al, mostram que, de fato, a razão molar sulindaco/Al³⁺ é menor que 1 (Tabela 6). Para neutralizar o excesso de carga positiva, assume-se, portanto a cointercalação de íons cloreto (área de aproximadamente 0,14 nm² ¹⁶¹), que foi confirmada pela formação de precipitado branco de AgCl, quando amostras dos materiais híbridos foram dissolvidas em HNO₃ e testadas gotejando solução de AgNO₃. Dessa forma, as considerações feitas acima estão de acordo com a composição química dos materiais.

Os resultados mostrados na Tabela 6 indicam também que o aquecimento durante o processo de coprecipitação, apesar de influenciar significativamente na cristalinidade dos materiais, não influencia significativamente sua composição, com exceção da amostra Mg₂Al-Sul. A quantidade de fármaco carregado compreende pouco mais de 50% da massa total do carregador, o que é um resultado importante e desejável para aplicações como em sistemas de liberação modificada ou controlada.

Minagawa et al. ⁹⁰ relataram a preparação do material Mg₂Al-Sul por coprecipitação em pH igual a 8, à temperatura ambiente e usando nitratos metálicos como sais precursores. O DRX do material formado apresentou um espaçamento basal de 2,94 nm e baixa cristalinidade se comparado com os materiais preparados nesta tese. Os autores propuseram um arranjo em monocamadas de íons sulindaco dispostos em configuração alternada, ou

seja, um íon com o grupo carboxilato voltado para cima, o próximo ao contrário e, assim, sucessivamente. Ainda, o híbrido carregava 45% de sulindaco. O presente trabalho de tese mostra que modificações no procedimento de síntese podem gerar materiais com estrutura e morfologia diferenciadas, como será apresentado adiante.

Figura 29. Representação do arranjo dos íons sulindaco intercalados no espaço interlamelar dos materiais $M^{II}_2Al-Sul$. Os íons cloretos não estão representados na figura.

Tabela 6. Dados de análise química e fórmula proposta para as amostras de $Zn_2Al-Sul$ e $Mg_2Al-Sul$ obtidos pelas condições 2 e 3.

Amostra	M^{2+}/Al^{3+}	Sul/Al^{3+}	H_2O/Al^{3+}	% C	% H	% S	g Sul/100 g	Fórmula Proposta
$Zn_2Al-Sul$ 55	(2,03) 2,03	(0,94) 0,94	(2,22) 2,22	(35,34) 35,56	(3,67) 4,29	(4,72) 4,34	(52,28) 52,36	$[Zn_{2,0}Al(OH)_{6,0}](C_{20}H_{16}O_3FS)_{0,9}Cl_{0,1} \cdot 2,2 H_2O$
$Zn_2AlSul-ST24$	(2,02) 2,02	(0,91) 0,91	(1,71) 1,71	(35,30) 34,90	(3,52) 4,32	(4,71) 4,26	(52,23) 52,33	$[Zn_{2,0}Al(OH)_{6,0}](C_{20}H_{16}O_3FS)_{0,9}Cl_{0,1} \cdot 1,7 H_2O$
$Mg_2Al-Sul$ 55	(1,91) 1,91	(0,90) 0,90	(1,40) 1,37	(41,50) 39,21	(4,02) 4,93	(5,54) 4,77	(61,39) 61,30	$[Mg_{1,9}Al(OH)_{5,8}](C_{20}H_{16}O_3FS)_{0,9}Cl_{0,1} \cdot 1,4 H_2O$
$Mg_2Al-Sul$ ST24	(1,87) 1,87	(0,72) 0,72	(1,40) 1,42	(37,61) 36,06	(3,77) 4,78	(5,02) 4,31	(55,64) 55,59	$[Mg_{1,9}Al(OH)_{5,8}](C_{20}H_{16}O_3FS)_{0,7}Cl_{0,3} \cdot 1,4 H_2O$

() Valores obtidos baseados na fórmula proposta.

Com relação ao método de coprecipitação na síntese de HDLs, é importante salientar que a presença de espécies convidadas pode alterar as propriedades estruturais, a morfologia e a porosidade do produto.¹⁶² HDLs do tipo M^{II}_2Al-Cl geralmente apresentam partículas hexagonais que agregam formando estruturas do tipo *sand-rose*,¹⁶³ como aquelas

vistas nas duas imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra Zn₂AlCl 55, apresentadas na Figura 30. A matriz contendo magnésio apresentou morfologia semelhante e não é mostrada aqui.

A presença de grupos funcionais orgânicos pode direcionar o crescimento das lamelas resultando em tamanhos, formas e padrões de agregação muito particulares, como é o caso das amostras dos materiais híbridos HDL-Sul, preparadas neste trabalho, onde as lamelas foram formadas na presença do sulindaco. Como pode ser visto nas demais imagens na Figura 30, o sulindaco influenciou significativamente no hábito cristalino dos materiais formados. Os materiais híbridos apresentam menor tamanho de partícula que os HDL-Cl correspondentes, e espessura reduzida o suficiente para permitir um processo de enrolamento das partículas primárias, principalmente no caso do híbrido Zn₂Al-Sul 55, onde são observadas estruturas do tipo *nanoscrolls*. A equação de Scherrer¹⁶⁴ ((Equação 9), foi usada para estimar as dimensões dos cristais de Mg₂Al-Sul 55 e Zn₂Al-Sul 55 ao longo do plano (00l) e foram obtidos os valores de 15,3 e 17,7 nm respectivamente.

$$\beta_s(2\theta)_{hkl} = \frac{K\lambda}{T\cos\theta_{hkl}} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde T é a espessura média do cristal na direção normal ao plano hkl; $\beta(2\theta)_{hkl}$ corresponde a largura à meia altura do pico hkl e foi calculada usando o método de Pearson VII que leva em consideração a assimetria do pico; e K é uma constante reflete a forma da partícula, para partículas em forma de plaquetas como as encontradas em sistemas lamelares, o valor recomendado é de K= 0,886.¹⁶⁵

Considerando os dados de DRX ($d_{003} = 2,74$ nm) e a espessura das partículas calculadas pela equação de Scherrer, cada partícula primária de HDL-Sul é formada, em média, por uma pequena quantidade de lamelas (de 5 a 6) e essa espessura reduzida das partículas do HDL pode ser o fator responsável por promover o processo de enrolamento observado

Figura 30. Imagem de microscopia eletrônica de varredura pelo método LEI da amostra de Zn₂Al-Cl 55 e das amostras de Mg₂Al-Sul 55 e Zn₂Al-Sul 55.

A estrutura das partículas dos HDLs, intercalados com cloreto e com sulindaco, foi melhor investigada através de imagens de campo claro obtidas por microscopia eletrônica de varredura por transmissão (*Scanning transmission electron microscopy by bright field mode*, BF-STEM). As imagens são apresentadas na Figura 31 e evidenciam a formação das estruturas hexagonais típicas de HDLs, no caso das matrizes HDL-Cl e de estruturas formadas

por folhas finas, no caso dos híbridos HDL-Sul. Novamente as estruturas do tipo *nanoscrolls* foram observadas no caso do material híbrido $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55.

Figura 31. Imagens de campo claro obtidas por microscopia eletrônica de varredura por transmissão (BF-STEM) das amostras de HDL-Cl 55 e HDL-Sul 55.

Para os híbridos HDL-Sul 55 foram obtidas, também, imagens de STEM no modo de campo escuro anular de grande ângulo (HAADF, high-angle annular dark field), que são mostradas na Figura 32. A partir delas, a distância média entre as lamelas de $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55 pôde ser medida e foi de aproximadamente 2,8 nm, o que está de acordo com os valores encontrados pela técnica de difratometria de raios X. A amostra de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ 55 é mais sensível ao feixe de elétrons que a amostra contendo Zn^{2+} na composição lamelar e degrada

durante o processo de obtenção da imagem. De fato, verificou-se que esse material apresenta estabilidade térmica menor quando comparado ao $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$. Esses dados serão apresentados e discutidos adiante na tese.

Figura 32. Imagem de microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) no modo HAADF, das amostras HDL-Sul. Como *insert* na imagem do $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$, mostra-se a medição da separação entre algumas lamelas.

Tais formas não foram observadas para o composto $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ preparado por Minagawa et al.⁹⁰ No caso de híbridos de HDLs, em especial de Zn/Al e Mg/Al com espécies orgânicas intercaladas, esse tipo de nanoestrutura tubular na verdade não é comumente observada e relatada na literatura. Em 2007, Ren et al.¹⁶⁶ descreveram um método hidrotérmico para obtenção de *nanoscrolls* de Mg/Al -carbonato. Porém, as estruturas obtidas parecem com

folhas muito finas e encurvadas, mas não totalmente enroladas, como observado no presente trabalho.

É importante mencionar que tamanho e forma são fatores importantes a serem considerados quando se trabalha com sistemas destinados à liberação de fármacos. A internalização de nanopartículas por fagocitose por células do tipo macrófagos, por exemplo, depende do tamanho e forma das partículas, bem como do caráter hidrofóbico ou hidrofílico de sua superfície.¹⁶⁷

Considerando os HDLs como carregadores de fármacos, estudos de captação celular e retenção de partículas inorgânicas realizados por Choy et al.¹⁶⁸ mostraram que a faixa ideal para tamanho de partículas para que esses processos ocorram é de 100 a 200 nm. Xu et al.¹¹³ relataram que a forma das partículas de HDLs, é também, um parâmetro muito importante a ser considerado nos casos de aplicação desses materiais em sistemas biológicos. Por exemplo, partículas de HDL em forma de bastões nanométricos podem acessar o núcleo de células, enquanto folhas nanométricas permanecem na região do citosol. O tamanho e hábito cristalino são fatores que podem afetar também a manufatura de formas farmacêuticas sólidas de administração oral, tais como comprimidos, uma vez que esses parâmetros influenciam propriedades como escoamento, compactação e aderência.¹⁶⁹

4.2 Caracterização por espectroscopias vibracional IR e Raman

A atribuição dos espectros vibracionais na região do infravermelho e Raman, do sulindaco e do sal NaSul, mostrada na Figura 33 e na Tabela 7, foi realizada baseando-se nos dados disponíveis na literatura¹⁷⁰ e nos cálculos de DFT realizados. Para discussão desses resultados, é conveniente pensar nos principais grupos que formam a molécula de sulindaco: grupo acetato, anel indênico (ou seja, anel benzênico fundido à um ciclopenteno), metileno, anel fenílico e grupo metilsulfinil, como mostrado na Figura 6 (pág. 35). Na Figura 33A são apresentados os espectros vibracionais no IR, experimentais e calculados, do sulindaco e do NaSul. Na Figura 33B são mostrados os espectros FT-Raman. Uma boa concordância entre os

valores experimentais e calculados foram notados, embora os cálculos tenham sido conduzidos considerando as moléculas em fase gasosa e os espectros experimentais tenham sido registrados para as amostras em estado sólido.

Figura 33. Espectros vibracionais (A) no IR e (B) Raman, experimentais e calculados por DFT, para o sulindaco e para o NaSul.

Tabela 7. Dados experimentais e calculados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Raman, do sulindaco e seu sal sódico.

Sulindaco Calculado ^a (cm ⁻¹)	Sulindaco Experimental ^b (cm ⁻¹)		NaSul Calculado ^a (cm ⁻¹)	NaSul Experimental (cm ⁻¹)		Atribuição para os principais grupos envolvidos na vibração ^c
	FT-Raman	FTIR		FT-Raman	FTIR	
1762		1701				$\nu(\text{C=O})$ carboxílico
1626	1623	1622	1625	1626	-----	$\nu(\text{C1=C10})$
1609	1616		1607	1615 sh	-----	$\nu(\text{C=C})$ indeno
1596		1602	1594	-----	1601	$\nu(\text{C=C})$ indeno
1585	1589	1589	1584	1590	1583	$\nu(\text{C=C})$ fenil
1581	1616 sh	1602				$\nu(\text{C=C})$ indeno + $\nu(\text{C=C})$ fenil
			1544	1563 w	1564	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2)$
1479	1492 w	1491	1479	1490 w	1489	$\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ fenil
1460		1469	1460	---	1466	$\delta(2\text{-CH}_3) + \nu(\text{C=C}) +$ $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno
1424		1416				$\nu(\text{C=C})$ benzeno do indeno
1392						$\nu(\text{C=C})$ fenil + $\delta(2\text{-CH}_3)$
			1370	1391	1394 br	$\nu(\text{C-COO}^-) + \delta(2\text{-CH}_3) +$ $\delta(\text{C10-H})$
			1358	1368	1375 br	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-) + \nu(\text{C-COO}^-) +$ $\delta_{\text{ip}}(\text{C10-H})$
			1314	---	1328	$\nu(\text{C=C})$ indeno + $\delta(2\text{-CH}_3) +$ $\nu(\text{C-COO}^-) + \delta_{\text{ip}}(\text{C10-H})$
1312, 1278		1271				$\delta_{\text{ip}}(\text{OH}) + \nu(\text{C-C})$ acetato
			1280	1285	---	$\nu(\text{C=C})$ fenil + $\delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2) +$ $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno
			1265	1276 sh	1276? ----	$\delta_{\text{s}}(3\text{-CH}_2) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno
1195	1211	1211 w	1195	1208	---	$\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno + $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ fenil + $\delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2) +$ $\delta(\text{C10-H})$
			1183	1181 sh	1196	$\nu(\text{C-F}) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2) +$ $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno
1170	1157 w					$\delta(3\text{-CH}_2)$ acetato
1166		1157				$\nu(\text{C-F}) + \delta(\text{CH}_2)$ acetato
			1146	-----	1163	$\nu(\text{C-F}) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2) +$ $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno + $\delta(2\text{-CH}_3)$
			1129	1137	1134	$\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno + $\delta(2\text{-CH}_3)$

1119		1134				$\delta(3\text{-CH}_2) + \delta(\text{OH}) + \delta(2\text{-CH}_3) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno
1057	1089	1088	1057	1089	1089	$\nu(\text{C14-S}) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ fenil + $\delta_{\text{ip}}(\text{CH}) + \delta(2\text{-CH}_3)$ indeno
1013	1018	1020	1011	---	1039 br	$\nu(\text{S=O}) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH}) + \delta(\text{CH}_3)$ fenil
1002		1007	1002	1021	1011 br	$(\text{S=O}) + \nu(\text{C=C}) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH}) + \delta_s(\text{CH}_3)$ fenil
944		967	942	---	958	$\delta_{\text{ass}}(\text{CH}_3) + \delta_{\text{oop}}(\text{CH})$ fenil
			916	921		$\delta(\text{COO}^-) + \delta(3\text{-CH}_2)$
886, 867, 849	879	892	884, 866, 847	869 br	864 br	$\delta_{\text{oop}}(\text{C10-H}) + \delta_{\text{oop}}(\text{CH})$ fenil + $\nu(\text{CH})$ indeno + $\delta_s(2\text{-CH}_3) + \delta\text{C-F}$
			654, 668	662 br		$\delta(\text{COO}^-) + \delta(2\text{-CH}_3) + \delta(3\text{-CH}_2) + \delta_{\text{oop}}(\text{C10-H})$
670		636				$\delta_{\text{oop}}(\text{O-H})$

a) Valores de número de onda obtidos pelo conjunto base/funcional B3LYP/6-31G**. Os números de onda foram deslocados pelo fator de 0,9742, de acordo com o recomendado por Scoot & Radom.¹⁷¹

b) Polímorfo II. c) ν_s = estiramento simétrico, ν_{ass} = estiramento antissimétrico, δ = deformação angular, ip = no plano, oop = fora do plano, sh = ombro, br = larga, w = fraca.

Foi observado que o tratamento térmico não causou modificações nos espectros vibracionais no IR e Raman dos materiais HDL-Sul isolados neste trabalho. Dessa forma, serão mostrados na sequência os dados referentes apenas aos materiais obtidos por coprecipitação a 55°C. Primeiramente, na Figura 34A e B são apresentados os espectros vibracionais FTIR e FT-Raman, respectivamente, das matrizes de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$.

Os espectros vibracionais FTIR das duas matrizes são semelhantes e apresentam as bandas típicas de HDL-Cl.¹³⁷ A banda larga na região de 3500 cm^{-1} é característica de HDLs e é atribuída ao estiramento da ligação O-H de grupos hidroxila das lamelas e também de moléculas de água presentes na região interlamelar, ou adsorvidas externamente nas partículas dos materiais. O modo de deformação angular das moléculas de água dá origem ainda à banda observada em 1620 cm^{-1} . A banda em $1352\text{-}1356\text{ cm}^{-1}$ revela a ocorrência de pequena contaminação com íons carbonato, sendo a banda atribuída ao seu estiramento antissimétrico.^{170, 172} Mesmo utilizando atmosfera de $\text{N}_{2(\text{g})}$ durante a síntese, para evitar a absorção de CO_2 e formação de CO_3^{2-} , devido a sua grande afinidade por HDLs,¹⁹ íons

carbonato geralmente são incorporados e permanecem presentes em baixas concentrações, de tal forma que não podem ser quantificados por técnica de CHN, por exemplo, mas por técnicas sensíveis como é o caso da espectroscopia vibracional.

As bandas de baixa intensidade presentes na região abaixo de 1000 cm^{-1} dos espectros FTIR, observadas em 405 cm^{-1} e 436 cm^{-1} para $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, respectivamente, estão relacionadas aos modos translacionais de rede, que ocorrem devido à deformação das ligações Mg-OH, Zn-OH e Al-OH que formam as lamelas.^{172, 173}

Figura 34. Espectros vibracionais das matrizes $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$: (A) FTIR e (B) FT-Raman.

Os espectros vibracionais FT-Raman das matrizes $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ (Figura 34B) também apresentam as bandas típicas de HDLs, como relatado por Klopogge et. al.¹⁷⁰ Na região com um máximo em 3300 cm^{-1} , assim como no FTIR, várias contribuições de estiramento de ligação OH (de metal-OH que forma as lamelas) e de moléculas de água estão presentes. A banda em 1060 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico, inativo no FTIR, do íon carbonato.¹⁷⁴ Em seguida, são observadas bandas relacionadas aos modos vibracionais de rede, referente às lamelas dos HDLs. As bandas em 554 e 548 para $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, respectivamente, são derivadas do modo translacional do grupo Al-OH; as bandas em 475 e 490 cm^{-1} são atribuídas ao modo translacional $\text{M}^{\text{II}}\text{-OH}$, e em 153 e 147 cm^{-1} são observadas as bandas referentes à deformação angular Oxigênio-Metal-Oxigênio.¹⁷⁵

Os espectros vibracionais experimentais FTIR e FT-Raman das amostras $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ 55, $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55 e do sal NaSul, são mostrados na Figura 35. Os espectros vibracionais do fármaco intercalado entre as lamelas são equivalentes àquele do sal NaSul. Assim, a atribuição proposta para as bandas observadas nos espectros dos materiais híbridos é a mesma do sal sódico mostrada na Tabela 7.

Os valores das bandas atribuídas aos estiramentos antissimétrico ($\nu_{\text{ass}}\text{COO}^-$) e simétrico ($\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$) do grupo carboxilato nos espectros dos híbridos HDL-Sul 55 estão próximos daqueles do NaSul (Figura 35A), indicando que possivelmente o ânion Sul^- está interagindo eletrostaticamente com as lamelas (isto é, não está coordenado aos metais que as compõem). De uma forma geral, somente as bandas relacionadas ao grupo carboxilato (estiramento (νCOO^-) e deformação angular (δCOO^-)) apresentam pequenas modificações quando os espectros dos híbridos e do NaSul são comparados, sugerindo que somente esse grupo está estabelecendo interação com as lamelas, como proposto anteriormente na Figura 29.

Na região de $1000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, o espectro FTIR não é bem definido devido à absorção da estrutura do HDL.¹⁷⁰ Por outro lado, o espectro Raman dos híbridos mostra bandas

exclusivamente relacionadas ao sulindaco, uma vez que a matriz inorgânica apresenta bandas de intensidade muito baixa na região abaixo de 1500 cm^{-1} , como exemplificado na comparação feita na Figura 36, que mostra a diferença de intensidade da ordem de 100 vezes entre os sinais. A banda em 1056 cm^{-1} , atribuída ao íon carbonato, por exemplo, não pode ser identificada, no espectro do híbrido.

Figura 35. Espectros vibracionais dos materiais híbridos $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ e do sal NaSul :

(A) FTIR e (B) FT-Raman.

Figura 36. Espectros FT-Raman do material híbrido $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ e da matriz $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$.

Dessa forma, levando em consideração que o perfil dos espectros, tanto de FTIR quanto de Raman, dos materiais híbridos se assemelham àquele do sulindaco desprotonado, sugere-se que não ocorreu nenhum tipo de dano ao fármaco no processo de intercalação.

4.3 Caracterização espectroscópica por ^{13}C -RMN no estado sólido

Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 no estado sólido das amostras de HDL-Sul, do sulindaco e do sal NaSul foram obtidos a fim de: (i) confirmar a integridade química do fármaco após a intercalação e (ii) investigar as possíveis interações locais com o carregador inorgânico. Na Figura 37 são mostrados os espectros de ^{13}C RMN, experimentais e os calculados, do sulindaco e do seu sal sódico. Todos os deslocamentos químicos (δ) experimentais e também aqueles calculados pelo método DFT estão listados na Tabela 8.

Uma boa correlação linear entre os valores de deslocamento químico experimental e calculado foi obtida, como mostrado na Figura 38. Algumas discrepâncias entre os valores teóricos e experimentais têm sido observadas em trabalhos que empregaram esse tipo de correlação, como relatado, por exemplo, por Liu et al.¹⁷⁶ e Nangoi et al.¹⁷⁷, o que pode estar

relacionado com o fato da simulação ter sido realizada considerando-se a molécula do fármaco no vácuo.

Figura 37. Espectros, calculados e experimentais, de ^{13}C -RMN de estado sólido do (A) sulindaco e (B) sal NaSul.

Figura 38. Correlação entre os deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN experimentais e calculados pelo método DFT. O átomo C5 não foi plotado.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN experimentais do sulindaco, do NaSul, das amostras $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$, $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e calculados para Sulindaco e SulNa, valores em ppm.

Atribuição	Sul Calculado	Sul Experimental	NaSul Calculado	NaSul Experimental	$\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ Experimental	$\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ Experimental
C17	12,3	7,8	12,6	10,2	10,2	10,1
C18	33,8	32,7	38,6	36,1	35,9	35,8
C20	48,2	41,7	48,4	42 - 44,2	42,9	42,9
C4	111,5	103,4	113,3	107,7	105,7	105,7
C6	115,0	108,9	113,4	107,7	109,9	109,9
C7	127,6	124,3	126,7	122,2	124,5	124,5
C15	127,5	124,3	127,2	124,6	124,5	124,5
C13	129,0	124,3	128,6	124,6	124,5	124,5
C10	137,8	127,8	134,6	129,3	127,0	126,9
C9	134,0	128,7	134,8	129,3	130,0	129,9
C16	134,4	130,2	134,4	129,3	130,0	129,9
C12	135,7	130,2	135,8	129,3	130,0	129,9
C3	139,7	130,2	146	137,4	133,9	133,9
C2	144,1	138,1	141,4	137,4	137,8	137,7
C11	144,5	139,5	145,8	137,4	140,5	140,5
C1	148,9	141,6	150,3	142,8	140,5	140,5
C14	158,3	146,4	156,6	144sh	145,3	145,2
C8	150,4	146,4	152,3	149,4	148,4	148,3
C5	173,5	160,9	173,5	161,2	161,8	161,6
C5	-	164,2	-	164,6	164,9	164,9
C19	175,3	174,9	187,5	179,2	179,7	179,5

É bem estabelecido na literatura que cálculos DFT para compostos contendo o átomo de flúor ainda representam um desafio.¹⁷⁸ No caso particular do espectro de ^{13}C -RMN experimental da molécula de sulindaco, o pico de ressonância do carbono (C5), ligado ao átomo de flúor, é desdobrado em dois (164,2 ppm e 160,9 ppm, com constante de acoplamento $^1J(\text{C5 Sul}) = 241,6 \text{ Hz}$). No espectro calculado, um único valor de deslocamento químico é encontrado para o átomo C5 (Tabela 8). Gryff-Keller & Szczecinski¹⁷⁸ sugerem um procedimento de correção de escala para que ocorra uma correspondência entre os valores

experimentais e calculados. Porém, uma vez que não há um consenso na literatura sobre esta abordagem para análise desse tipo de dado, e uma vez que sabe-se que a diferença resultante entre os valores teóricos e experimentais para o carbono C5 é devido à presença do átomo de flúor, esse procedimento sugerido pelos autores acima citados não foi empregado neste trabalho (ou seja, os valores foram mantidos da forma que foram obtidos).

Na Tabela 8 e na Figura 39 são apresentadas as atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do sulindaco, do NaSul e das amostras Zn₂Al-Sul 55 e Mg₂Al-Sul 55. As atribuições foram feitas com base nos valores calculados, e nos estudos realizados por Douglas¹⁷⁹, que investigou os espectros de ¹³C-RMN do sulindaco, do seu sal sódico e de moléculas análogas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e/ou clorofórmio (CDCl₃). Até o momento nenhum trabalho descrevendo o espectro de ¹³C-RMN do sulindaco ou do seu sal em estado sólido foi encontrado na literatura.

Os dados experimentais e calculados sugerem que a desprotonação da molécula de sulindaco causa alteração, principalmente, nos valores de deslocamento químico dos átomos do grupo acetato (C19 e C18) e do anel indênico (C3, C4, C7 e C8). Os átomos menos afetados pela desprotonação são o carbono ligado ao flúor (C5) e os carbonos do anel fenil (C12, C13, C15 e C16). Com a perda do íon de hidrogênio, os picos atribuídos aos átomos C4 (103,4 ppm) e C6 (108,9 ppm) convergem para um único pico em 107,7 ppm. Analisando esses valores, que são apresentados na Tabela 8, pode-se notar que tal comportamento é previsto pelo cálculo DFT. O pico do C8 e do C14, atribuídos ao mesmo deslocamento químico em 146,4 ppm no sulindaco protonado, é desdobrado no espectro do NaSul e pode ser observado em 149,4 ppm e 144 ppm (ombro). Nos espectros em solução reportados por Douglas,¹⁷⁹ os átomos C8 e C14 do sulindaco apresentam picos distintos e apresentam maior separação quando se considera a forma desprotonada da molécula.

Figura 39. Espectros experimentais de ^{13}C -RMN no estado sólido obtidos para o sulindaco, NaSul, e amostras de $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$. As flechas indicam os picos mais afetados pelos processos de intercalação do sulindaco.

Os deslocamentos químicos nucleares são influenciados pelo ambiente eletrônico de cada núcleo na estrutura química. Comparando-se os mapas de potencial eletrostático calculados por DFT para o sulindaco e sua forma desprotonada, Sul^- , mostrados na Figura 40, observa-se um aumento significativo da densidade eletrônica nas regiões do acetato e do anel indênico. A densidade eletrônica sobre o grupo sulfinil também diminui após a desprotonação, o que poderia justificar o deslocamento do sinal do C14 de 146,6 para aproximadamente 144 ppm.

Figura 40. Mapa de potencial eletrostático calculado pelo método DFT para o sulindaco (A) e sua forma desprotonada (Sul^-) (B)

Embora os dados de espectroscopia vibracional tenham mostrado pequena variação entre os espectros do NaSul e dos materiais híbridos HDL-Sul, a técnica de ^{13}C -RMN parece ser mais sensível às mudanças ocorridas no ânion devido à intercalação. A Figura 39 indica que os sinais de ^{13}C -RMN do sulindaco que se deslocaram de forma mais acentuada após a intercalação foram aqueles referentes ao C4 (de 107,7 para 105,7 ppm), ao C3 (de 137,4 para 133,9 ppm), ao C1 (de 142,8 para 140,5 ppm) e ao C14 (de aproximadamente 144 para 145,2 ppm). É importante salientar que os deslocamentos químicos desses picos são intermediários entre os da forma protonada e os da forma desprotonada do sulindaco. Dessa forma, os resultados de ^{13}C -RMN em estado sólido sugerem que o processo de intercalação pode ter promovido alterações na densidade de carga da molécula. Efeito semelhante foi relatado também por Taviot-Gueho et al.¹⁸⁰ na intercalação de um corante sulfônico em HDL do tipo Zn_2Al . Os autores consideraram esse comportamento como indício da ocorrência de atração eletrostática entre o ânion intercalado e as lamelas positivamente carregadas do HDL.

4.4 Análise Térmica

Uma das vantagens da intercalação de espécies orgânicas em carregadores como os HDLs é a possibilidade de aumentar a estabilidade térmica das espécies confinadas no domínio interlamelar.¹⁸¹ No caso da intercalação de fármacos, um aumento de estabilidade térmica pode promover, por exemplo, um tempo de prateleira maior. Levando isso em consideração, os comportamentos térmicos do sulindaco e do NaSul foram comparados àqueles dos híbridos, em atmosfera de ar sintético.

O estudo de análise térmica desses materiais foi conduzido em uma termobalança que registra simultaneamente a curva termogravimétrica (TG) e a curva de análise térmica diferencial (DTA). Além disso, ela é acoplada a um espectrômetro de massas que permite a análise de gases desprendidos, (*Evolved Gas Analysis*, EGA). Os resultados consistem, portanto, de curvas TG-DTA-MS que serão apresentadas a seguir em conjuntos TG-DTA e DTG-MS.

Os resultados de análise térmica do sulindaco, apresentados na Figura 41A, mostram um pico endotérmico de fusão em 190°C na curva DTA. É importante lembrar que o equipamento usado na obtenção desse dado não é o mais indicado na determinação do ponto de fusão. Para essa finalidade em específico foi usado um equipamento de DSC não acoplado e o resultado foi apresentado na Figura 19. Em aproximadamente 200°C inicia-se o processo de decomposição térmica do sulindaco, que ocorre em três etapas, como evidenciado pelas curvas TG e DTG, com perda de fragmentos de massa/carga (m/z) iguais a 18, 44 e 64. Os processos foram então atribuídos à perda de moléculas de água e dióxido de carbono (pico DTG em 270°C), água e dióxido de enxofre (pico DTG em 361°C) e H₂O, CO₂ e SO₂ (pico DTG em 596°C). Um fragmento referente ao átomo de flúor ($m/z = 19$) foi observado com baixa intensidade em temperatura acima de 500°C. Como esperado, nenhum resíduo foi observado após aquecimento do sulindaco a 900°C em atmosfera de ar sintético.

A curva TG do sal NaSul (Figura 41B) apresenta uma perda de massa inicial de 4,54% atribuída à saída da molécula de água e o sal anidro é estável termicamente até próximo a 200°C. A temperatura inicial (T_{onset}) de decomposição, com saída de CO_2 , é de 170°C, sendo o pico DTG em 228°C. O restante do comportamento térmico do sal é similar ao do sulindaco, mas um resíduo de aproximadamente 8,3% é observado devido à formação de Na_2O . Considerando os dados da análise térmica, a composição proposta para o sal é $\text{NaSul} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ou $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FO}_3\text{SNa} \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Figura 41. Curvas TG-DTA e DTG-MS obtidas a 10°C min⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para: (A) Sulindaco e (B) NaSul.

As curvas TG-DTA e DTG MS para o $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e para o $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ são mostradas na Figura 42. Os materiais híbridos contêm de 5 a 6% de moléculas de água (Tabela 6, pág. 97), intercaladas e/ou adsorvidas, que são liberadas a partir da temperatura ambiente até 200°C no caso do $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e até 160°C no caso do $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$. Após a etapa de desidratação, os processos térmicos são diferentes para cada um dos materiais: o $\text{Zn}_2\text{AlSul 55}$ perde moléculas de água (pico DTG em 196°C) enquanto o $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ libera CO_2 (pico DTG em 246°C). Essa diferença de comportamento entre as duas amostras de HDL-Sul parece influenciar na estabilidade do fármaco intercalado. As fotos inseridas como detalhe na Figura 42 foram obtidas depois do aquecimento das amostras a 250°C, sob atmosfera dinâmica de ar sintético. De forma interessante, observou-se que o híbrido $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ mantém sua cor amarela enquanto o $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ escurece, indicando carbonização.

Figura 42. Curvas TG-DTA e DTG-MS obtidas a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para (A) $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e (B) $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$. *Insert*: fotos das amostras aquecidas até 250°C sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

Na literatura é relatado que HDLs de Zn/Al são geralmente menos estáveis, com relação ao processo de desidroxilação, do que os HDLs de Mg/Al.^{182, 183} Para entender melhor esse ponto, na Figura 43 são mostradas as curvas TG-DTA e DTG-MS das matrizes intercaladas com íons cloreto. Normalmente, HDLs de $\text{Mg}_R\text{Al-Cl}$, onde R pode ser diferente de 2, sofrem processo de desidroxilação em aproximadamente 300°C e perdem o cloreto na forma de HCl acima de 350°C.^{184, 185} O $\text{Mg}_2\text{Al-Cl 55}$, sintetizado nas mesmas condições do $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$, começa a perder moléculas de água por reação de desidroxilação em

aproximadamente 180°C (em dois eventos com picos DTG em 344°C e 402°C) e fragmento de m/z igual a 36, atribuído a $H^{35}Cl$, acima de 400°C, como pode ser visto na Figura 43A.

Para HDLs de Zn_RAl-Cl a desidroxilação das lamelas é relatada em temperaturas acima de 200°C.¹⁸⁶ A amostra de Zn_2Al-Cl 55 apresentou dois processos de perda de água na faixa de 170 a 262°C (pico DTG em 179 e 262°C, respectivamente, Figura 43), confirmando que com relação à desidroxilação das lamelas, a matriz de zinco tem menor estabilidade térmica que a de magnésio. Dessa forma, os eventos observados em 196°C e 246°C (Figura 42), podem ser atribuídos respectivamente ao processo de desidroxilação do $Zn_2Al-Sul$ 55 e à desidroxilação e decomposição do $Mg_2Al-Sul$ 55.

O processo de desidroxilação das lamelas diminui o número de coordenação dos íons zinco criando sítios vazios para o estabelecimento de novas ligações. Levando em conta que Prévot et al.¹⁸⁷ relataram que, ânions orgânicos aromáticos substituíram grupos hidroxila das lamelas de um HDL de Zn/Al , por reação do tipo *grafting* durante a realização de tratamento térmico a 120°C, é plausível sugerir que a desidroxilação do híbrido $Zn_2Al-Sul$ 55 promove a coordenação do sulindaco, através do grupo carboxilato, ao íon metálico da lamela. Essa nova ligação poderia causar então a estabilização da espécie orgânica frente às reações de descarboxilação, por exemplo. Embora pareça contraditório, pode-se dizer que a menor estabilidade da lamela da fase Zn_2Al frente à desidroxilação promove a estabilização térmica do sulindaco intercalado.

Para investigar um pouco melhor essa proposta, foram obtidos espectros vibracionais FTIR e Raman de amostras de $Mg_2Al-Sul$ 55 e $Zn_2Al-Sul$ 55 aquecidas na termobalança até 250°C, a 10°C min⁻¹, em atmosfera dinâmica de ar sintético. Os resultados são mostrados na Figura 44 e as principais bandas que sofreram alterações após o aquecimento estão destacadas por linhas tracejadas. A partir da atribuição reportada na Tabela 7 (pág. 37), as principais bandas que sofrem alteração estão relacionadas com os grupos acetato e anel

indênico. Para melhor compreensão dessas modificações, os modos vibracionais atribuídos a essas bandas são mostrados na Figura 45.

Figura 43. Curvas TG-DTA-MS obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de ar sintético para as amostras (A) $\text{Mg}_2\text{Al-Cl 55}$ e (B) $\text{Zn}_2\text{Al-Cl 55}$.

Figura 44. Espectros vibracionais (A) FTIR e (B) FT-Raman de amostras dos híbridos Mg₂Al-Sul 55 e Zn₂Al-Sul 55 aquecidos a 250°C em atmosfera dinâmica de ar sintético.

O espectro vibracional FTIR do produto do Mg₂Al-Sul 55 aquecido a 250°C mostra uma diminuição de intensidade das bandas em 1558 e 1380 cm⁻¹, ambas envolvendo o estiramento do grupo COO⁻, e também da banda em 918 cm⁻¹, atribuída ao modo de dobramento angular do carboxilato, sugerindo a possível ocorrência de descarboxilação do material Mg₂Al-Sul 55. De fato, os dados de análise térmica mostram a saída de CO₂ em aproximadamente 230°C (Figura 42A). As bandas do anel indeno em 1466, 1196, 1163 e 1135

cm^{-1} diminuíram de intensidade ou foram deslocadas. Embora a liberação do fragmento SO_2 seja observada nas curvas MS somente acima de 500°C , o aquecimento a 250°C causou alterações nos grupos metilsulfinil e fenil uma vez que ocorreu alteração na banda em 1045 cm^{-1} , atribuída aos modos $\nu(\text{S}=\text{O})$, $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ do grupo fenil e $\delta(\text{CH}_3)$ do grupo metilsulfunil. O espectro vibracional Raman do material híbrido $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$, registrado após o tratamento térmico, apresenta poucas bandas de baixa intensidade, sugerindo também a decomposição do material.

As alterações observadas nas bandas em 1558 cm^{-1} ($\nu_{\text{ass}}\text{COO}^-$) e 1380 cm^{-1} ($\nu_s\text{COO}^-$) do espectro FTIR do $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ são diferentes daquelas descritas acima para o híbrido contendo magnésio (Figura 44A). A banda em 1558 cm^{-1} está deslocada para maiores números de onda, o que aumentaria a variação entre os valores de estiramento simétrico e antissimétrico ($\Delta > 178\text{ cm}^{-1}$), sugerindo que a interação do grupo COO^- com o íon metálico da lamela possivelmente envolve uma coordenação na forma monodentada.¹⁸⁸ A intensidade da banda em 1466 cm^{-1} permanece inalterada, indicando que a espécie orgânica não sofreu decomposição ou que ocorreu em extensão muito inferior àquela observada para o $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$. Modificações nas bandas em 1196 e 1163 cm^{-1} podem ser devidas à contribuição do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo carboxilato. No caso de existência de coordenação do grupo COO^- ao íon divalente das lamelas do HDL, tais bandas podem ter sofrido os deslocamentos observados.

O espectro Raman da amostra de $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ isolada a 250°C (Figura 44B) apresenta as bandas bem definidas do fármaco, corroborando com a proposta de que até essa temperatura não ocorre decomposição apreciável do ânion sulindaco. São notadas apenas algumas modificações nas bandas em 918 , 669 e 600 cm^{-1} , relacionadas ao modo vibracional de dobramento do grupo COO^- . Dessa forma, estes resultados atestam que o híbrido obtido com matriz de Zn/Al é mais estável do que aquele obtido com matriz de Mg/Al .

<p>1558 cm⁻¹ $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2)$</p>	<p>1466 cm⁻¹ $\delta(2\text{-CH}_3) + \nu(\text{C}=\text{C}) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno</p>	<p>1380 cm⁻¹ $\nu_s(\text{COO}^-) + \nu(\text{C-COO}^-)$ $+ \delta_{\text{ip}}(\text{C10-H})$</p>
<p>1196 cm⁻¹ $\nu(\text{C-F}) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2)$ $+ \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno</p>	<p>1163 cm⁻¹ $\nu(\text{C-F}) + \delta_{\text{ass}}(3\text{-CH}_2)$ $+ \delta(2\text{-CH}_3) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno</p>	<p>1135 cm⁻¹ $\delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ indeno $+ \delta(2\text{-CH}_3)$</p>
<p>1045 cm⁻¹ $\nu(\text{S}=\text{O}) + \delta_{\text{ip}}(\text{CH})$ fenil $+ \delta\text{CH}_3$ metilsulfinil</p>	<p>918 cm⁻¹ $\delta(\text{COO}^-) + \delta(3\text{-CH}_2)$</p>	<p>669 cm⁻¹ $\delta(\text{COO}^-) + \delta(2\text{-CH}_3)$ $+ \delta(3\text{-CH}_2) + \delta_{\text{oop}}(\text{C10-H})$</p>

Figura 45. Modos vibracionais mais afetados pela calcinação das amostras dos híbridos HDL-Sul a 250°C. ν = estiramento, δ = deformação angular.

4.5 Processo de liberação do fármaco sulindaco intercalado nos HDLs

Neste trabalho, efetuou-se experimentos de liberação do fármaco sulindaco, intercalado em HDLs (amostras Mg_2Al -Sul 55 e Zn_2Al -Sul 55), a partir de pastilhas (Figura 46A), que foram mantidas em solução tampão de pH igual a 7,2 e temperatura de 37°C por 84 h sob agitação em equipamento Dissolutor, conforme descrito no item 3.5 do Capítulo 3 (pág. 74). A dissolução do fármaco também foi investigada nas mesmas condições experimentais para comparação.

O experimento consistiu em determinar a porcentagem cumulativa de fármaco dissolvido no meio tamponado em intervalos definidos de tempo. A Figura 46 apresenta fotos das cubas do Dissolutor no início e ao término do experimento e a curva de calibração do sulindaco utilizada para o cálculo da concentração do fármaco ao longo do experimento, através de espectroscopia no UV Vis. A Figura 47 mostra os perfis de dissolução *in vitro* do sulindaco e do sulindaco intercalado nas matrizes de HDL. As quantidades dissolvidas em cada intervalo de tempo são mostradas na Tabela 9.

A dissolução do sulindaco é quase completa após 12 h, enquanto aproximadamente 50% do fármaco é liberado da matriz de HDL no mesmo intervalo de tempo, sugerindo um processo de liberação modificada (prolongada). O perfil das curvas cinéticas das amostras dos híbridos M^{II}_2Al -Sul 55 parece apresentar principalmente duas etapas, com padrões de liberação distintos (liberação bimodal). Tal comportamento é observado para outros sistemas de HDL com fármacos, conforme reportado no artigo de revisão publicado recentemente por Rives et al.⁸⁹

Figura 46. (A) Pastilhas das amostras dos materiais híbridos HDL-Sul 55. (B) Cubas do Dissolutor no início do experimento e (C) ao seu término. (D) Curva de calibração do sulindaco até 30 mg L^{-1} .

Figura 47. Perfis de dissolução do sulindaco não intercalado e do liberado a partir das amostras de Zn₂Al-Sul 55 e Mg₂Al-Sul 55 durante: (A) 12 horas de experimento e (B) 84 horas de experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$).

Tabela 9. Valores médios de quantidade de sulindaco dissolvido a partir de pastilhas do fármaco não intercalado e a partir dos materiais híbridos Mg₂Al-Sul 55 e Zn₂Al-Sul 55.

Sulindaco			Mg ₂ Al-Sul 55			Zn ₂ Al-Sul 55		
Tempo (h)	Sul liberado (mg L ⁻¹)	Sul liberado (%)	Tempo (h)	Sul liberado (mg L ⁻¹)	Sul liberado (%)	Tempo (h)	Sul liberado (mg L ⁻¹)	Sul liberado (%)
0,5	5,56	9,50	0,5	8,5	8,2	0,5	5,6	6,5
1,0	10,32	17,61	1,0	12,7	13,5	1,0	9,1	10,7
1,5	14,80	25,27	1,5	16,4	17,5	1,5	13,2	15,5
2,0	18,24	31,13	2,0	19,1	20,4	2,0	16,2	19,0
2,5	22,13	37,78	2,5	21,5	23,0	2,5	18,8	22,0
3,0	25,53	43,56	3,0	23,9	25,5	3,0	21,1	24,7
3,5	29,11	50,02	3,5	25,9	27,6	3,5	23,1	27,1
4,0	31,84	54,33	4,0	27,8	29,6	4,0		
4,5	34,47	58,82	4,5	29,4	31,4	4,5	26,8	31,4
5,0	36,81	62,80	5,0	31,0	33,1	5,0	28,3	33,1
5,5	39,07	66,66						
6,0	40,43	68,99	6,0	34,1	36,4	6,0	31,4	36,8
6,5	43,45	74,14						
7,0	45,26	77,23	7,0	36,8	39,3	7,0	34,4	40,3
8,0	47,54	81,12	8,0	39,3	42,0	8,0	37,0	43,3
9,0	50,80	86,68	9,0	41,7	44,5	9,0	39,6	46,3
10,0	53,10	90,60	10,0	43,8	46,7	10,0	41,8	49,0
11,0	54,58	93,13	11,0	45,7	48,7	11,0	43,8	51,3
12,0	55,76	95,13	12,0	47,3	50,4	12,0	45,6	53,4
24,0	53,86	91,90	24,0	65,8	70,1	24,0	65,8	77,0
			30,0	71,7	76,4	30,0	72,6	85,0
			36,0	75,6	80,5	36,0	75,3	88,1
			48,0	83,7	89,2	48,0	80,5	94,0
			54,0	96,6	102,9	54,0	91,4	106,9
			60,0	86,6	92,2	60,0	81,3	95,0
			72,0	90,5	96,4	72,0	82,6	96,6
			84,0	92,3	98,2	84,0	82,9	97,0

A partir dos dados de quantidade de sulindaco dissolvido em meio aquoso (Tabela 9), sete modelos (ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Higuchi, Bhaskar e difusão parabólica) foram testados para avaliar o comportamento de liberação das amostras de Zn₂Al-Sul e Mg₂Al-Sul após 24 h (ca. 70% de liberação) e também de dissolução do sulindaco após 12 h (dissolução quase completa). O resultado dos testes para a amostra Zn₂Al-Sul 55 é mostrado na Figura 48, para a Mg₂Al-Sul 55 é apresentado na Figura 49 e para o sulindaco, na Figura 50.

Observando o perfil das curvas mostradas na Figura 47, nota-se que as mesmas poderiam ser divididas em segmentos ao longo das 84 horas de monitoramento. Isso demonstra que no decorrer do processo o comportamento de liberação é alterado. Por isso, os modelos foram aplicados para o intervalo inicial de 24 h, que corresponde à liberação de aproximadamente 70 % do sulindaco presente nas matrizes de HDL.

Figura 48. Modelos cinéticos aplicados à amostra Zn₂Al-Sul 55 considerando 24 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).

Considerando o coeficiente de determinação (R^2), que indica o quanto os dados obtidos se ajustam a um modelo estatístico linear, os melhores resultados foram obtidos quando aplicado: (i) o modelo Hixson-Crowell para o sulindaco (Figura 50D) e (ii) os modelos Bhaskar, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e difusão parabólica para o sulindaco intercalado nas matrizes de HDLs (letras C, D, E e F das Figuras 47 e 48).

Figura 49. Modelos cinéticos aplicados à amostra Mg₂Al-Sul 55 considerando 24 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).

Figura 50. Modelos cinéticos aplicados à amostra de sulindaco considerando 12 h de liberação em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).

O modelo Hixson-Crowell considera que ocorre dissolução do fármaco e a modificação em sua forma em função do tempo; tal comportamento foi realmente observado experimentalmente para o sulindaco não intercalado. Como mencionado anteriormente, o modelo de Higuchi considera que a etapa limitante da velocidade de liberação depende da difusão Fickiana enquanto o modelo de Bhaskar (empregado para amostras de fármacos iônicos imobilizados em resinas trocadoras de íons) assume que o mecanismo é controlado pela difusão nos poros ou pela difusão intra-partícula. Esses dois modelos não são excludentes entre si. A maioria das matrizes usadas atualmente para a liberação modificada de fármacos é constituída de polímeros orgânicos para os quais o mecanismo de liberação não envolve troca iônica, mas, frequentemente, a desorção do fármaco, ou a ruptura de ligação covalente entre o carregador e o fármaco, ou ainda a solubilização do carregador. Embora menos usual, as matrizes orgânicas trocadoras de íons contendo fármacos como, por exemplo, a fentermina (supressor de apetite), já são comercializadas para liberação lenta no organismo.^{189, 190} Nas Figuras 47 e 48, pode-se observar que o modelo de Bhaskar também pode ser aplicado aos HDLs, que são trocadores aniônicos.

O modelo de difusão parabólica, frequentemente empregado em estudos de minerais em solos, também gerou bons resultados quando aplicado para descrever o mecanismo de liberação do sulindaco das amostras M^{II}_2Al -Sul 55 (Figura 48D e Figura 49D). Segundo esse modelo, a etapa limitante do processo envolve um fenômeno controlado por difusão. O modelo de cinética de primeira ordem parece não se aplicar aos sistemas HDL-Sulindaco, pois o coeficiente de correlação é mais baixo que aquele obtido para os demais modelos, sugerindo que a concentração do fármaco no sistema carregador não tem influência na sua velocidade de liberação.

Para Zn_2Al -Sul 55 e Mg_2Al -Sul 55, os valores do expoente n da equação derivada do modelo de Korsmeyer-Peppas são 0,636 e 0,542 respectivamente (coeficientes angulares), o que sugere também um processo Fickiano, como o modelo de Higuchi.

A maioria dos estudos sobre liberação de fármacos a partir de matrizes de HDLs faz uso de suspensão aquosa contendo as amostras na forma de pó. Nos experimentos de liberação *in vitro* realizados neste trabalho, as amostras M^{II}_2Al -Sul 55 foram usadas na forma de pastilhas, uma vez que alguns testes biológicos *in vivo* efetuados em colaboração com o Prof. Dr. Ivan Koh (UNIFESP-SP) foram realizados com os materiais híbridos HDL-Sulindaco na forma compactada. Assim, optou-se por efetuar os testes *in vitro* com as amostras na forma de pastilhas. Nessa forma, a superfície das partículas é menos exposta ao meio em comparação com as amostras em suspensão. Até o momento, apenas o trabalho de Rojas et al.¹⁹¹ reporta estudos sobre o uso de amostras de HDL na forma compactada. Os autores prepararam amostras de anti-inflamatórios intercalados em HDL de composição Mg_2Al e também observaram a liberação lenta dos fármacos como consequência do longo caminho de difusão. Exemplificando, após 25 h a porcentagem de liberação de ketoprofeno a partir da matriz de HDL foi de aproximadamente 45-50%, valor inferior ao observado quando se usa a amostra na forma de pó, a partir da qual o fármaco é totalmente liberado em apenas 15 minutos.

Considerando os dados reportados acima, pode-se propor que a liberação (ou desintercalação) do sulindaco envolve principalmente as seguintes etapas ilustradas na Figura 51: (A e B) difusão dos ânions como cloreto e/ou fosfato presentes na solução tampão em direção aos espaços intra-agregado e inter-partículas; (C) reação de troca iônica na interface líquido/sólido envolvendo as superfícies internas das partículas de HDL; (D) difusão dos íons de sulindaco dos espaços intra-partícula para a solução tampão. Se cada partícula primária de HDL-Sul for formada de 5 a 6 lamelas (como visto em imagens de microscopia eletrônica, Figura 32, e no cálculo de espessura de partícula pela equação de Sherrer), a porcentagem de área externa estimada é de 15 a 20% do total (área basal + superfícies internas das partículas). Logo, a liberação que ocorre em 24 h (ca. 70%) do fármaco nos

híbridos corresponde não apenas à sua fração nas superfícies externas, mas também à fração intercalada.

Figura 51. Esquema simplificado do processo de liberação *in vitro* do fármaco sulindaco das amostras M^{II}_2Al -Sul 55 em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).

Ambrogi et al.¹⁹² realizaram o estudo de liberação de diclofenaco a partir de matriz Mg_2Al , na forma de pó em fluido intestinal simulado (pH 7,5 a 37,0 °C) e também observaram uma boa concordância entre os dados cinéticos de liberação e os modelos de Higuchi e Bhaskar, sugerindo que a difusão através das partículas é a etapa determinante da velocidade de liberação. Os valores de porcentagem de fármaco diclofenaco liberado após 90 minutos (60%) e após 9 horas (90%), usando a amostra na forma de pastilhas, são superiores aqueles encontrados nesta tese.

Perioli et al.¹⁹³ relataram também o sistema $Zn_{2,6}Al$ intercalado com diclofenaco por troca iônica e constituído de partículas de pequeno diâmetro médio (200 nm). Os autores realizaram testes de liberação *in vitro* em fluido intestinal simulado (pH 7,0 a 37,0 °C) empregando uma solução contendo apenas tampão fosfato e uma outra solução contendo, além do tampão fosfato, sais sódicos de cloreto e carbonato. Após 24 horas, foi liberado 72%

do diclofenaco intercalado. Surpreendentemente, não há diferença, dentro do erro experimental, entre as duas curvas de liberação, indicando que a influência do cloreto ou do bicarbonato é pequena. Os autores propõem que em tampão fosfato pH 7,0 (mas não em tampão pH 7,5), os ânions H_2PO_4^- (em maior concentração que os íons HPO_4^{2-}) reagem com as hidroxilas do HDL formando hidroxofosfato de zinco e alumínio lamelar que obstrui a região interlamelar, interrompendo a reação de troca iônica. Neste estudo, empregando-se solução tampão de pH 7,2 e matriz Zn_2Al , não foi observado comportamento diferente daquele da matriz de Mg_2Al , sugerindo que não ocorreu tal obstrução das galerias do HDL.

Com o intuito de obter mais informações a respeito do processo de liberação do sulindaco, o experimento de liberação foi repetido e as pastilhas foram isoladas após 6 horas (cerca de 35 % de liberação) e 24 h (cerca de 70 % de liberação) para análise por difratometria de raios X (Figura 52).

Figura 52. DRX das pastilhas de HDL-Sul 55 após 6 e 24 h de ensaio de dissolução em meio aquoso tamponado (pH = 7,2).

Após 6 horas de ensaio de dissolução, as amostras de HDL-Sul 55 mantêm o perfil de DRX inicial e não foram observados novos picos que pudessem ser atribuídos a fases com íons cloreto ou fosfato provenientes da solução tampão. Pode ser que fases cloreto ou fosfato não sejam cristalinas. A reação de troca iônica, pode produzir fases intermediárias contendo: (i) o sulindaco intercalado e íons menores co-intercalados nos espaços disponíveis após a troca iônica, mantendo o espaçamento interlamelar constante, ou (ii) o sulindaco e os íons da troca arranjados em fase interestratificada (Figura 53).

Figura 53. Reação de troca iônica: fases intermediárias.

Os difratogramas de raios X das amostras após 24 h de ensaio apresentam picos largos sugerindo maior desordem no empilhamento das lamelas. Apesar disso, o pico (003) praticamente não sofre deslocamento, indicando que as lamelas ainda estão íntegras até essa etapa do ensaio. A amostra de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ parece mais desorganizada que aquela análoga de zinco, uma vez que a intensidade de seus picos de difração é menor.

A concentração dos cátions metálicos que compõem os HDLs foi quantificada nas soluções pela técnica de ICP OES para verificar se o carregador foi parcialmente dissolvido nas condições do experimento (pH igual a 7,2 e 37°C). A quantidade de alumínio na solução após 6 h de ensaio, no caso da amostra de $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$, ficou abaixo do limite de detecção do método (LD de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$), após 24 horas e 56 h, a linha de emissão do Al pode ser detectada pelo equipamento de ICP OES, mas a concentração do elemento permaneceu abaixo do limite de quantificação do método (LQ de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$). No caso do ensaio com a amostra de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$, depois de 6h e 24 h, a concentração de Al foi acima do LD, mas também abaixo do LQ do método. Contudo, medidas realizadas em soluções coletadas após 56 h de experimento apresentaram concentração de Al de $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ (3,46% do Al presente na matriz).

A quantidade de zinco na solução após 6 h de dissolução estava abaixo do LD, mas após 24 h e 56 h foi possível detectar e quantificar o elemento, sendo as concentrações de 0,15 mg L⁻¹ (0,48 % do zinco da matriz) e 0,19 mg L⁻¹ (0,59 % do zinco da matriz), respectivamente.

A concentração de magnésio nas soluções, após 6 h, 24 h e 56 h foi de 1,93 mg L⁻¹ (13,20 %), 4,20 mg L⁻¹ (28,8 %) e 5,96 mg L⁻¹ (40,8%), respectivamente, e praticamente não sofreu alteração após 56 h de liberação, uma vez que após um ensaio de 84 horas sua concentração foi de 6,78 mg L⁻¹ (ou 45,1 % do Mg presente na pastilha). Os dados da quantificação dos metais após 6, 24 e 56 h de ensaio são resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração dos metais Al, Mg e Zn determinada após ensaio de dissolução em pH 7,2 e 37°C.

Amostra	Concentração do metal após 6 h (mg L ⁻¹)			Concentração do metal após 24 h (mg L ⁻¹)			Concentração do metal após 56 h (mg L ⁻¹)		
	Al	Zn	Mg	Al	Zn	Mg	Al	Zn	Mg
Zn ₂ Al-Sul 55	< LD ^a	< LD	-	< LQ ^b	0,15 (0,48%)	-	< LQ	0,19 (0,59%)	-
Mg ₂ Al-Sul 55	< LQ	-	1,93 (13,20%)	< LQ	-	4,20 (28,80%)	0,26 (3,46%)	-	5,96 (40,80%)

a: abaixo do limite de detecção (LD = 0,01 mg L⁻¹)

b: abaixo do limite de quantificação (LQ = 0,05 mg L⁻¹)

A solubilidade dos três metais a partir das pastilhas de HDL-Sul estão de acordo com o valor do produto de solubilidade dos hidróxidos metálicos que compõem as lamelas (K_{ps} do $\text{Al}(\text{OH})_3 = 1,0 \times 10^{-33}$, do $\text{Zn}(\text{OH})_2 = 2,0 \times 10^{-17}$ e do $\text{Mg}(\text{OH})_2 = 1,1 \times 10^{-11}$)¹⁶¹. A lixiviação do magnésio para a solução, muito mais pronunciado do que aquele ocorrido no caso dos dois outros metais, Al e Zn, que praticamente se mantêm constante, aparentemente não afeta a liberação do sulindaco. Comparando os perfis de dissolução das duas amostras, Zn₂Al-Sul 55 e Mg₂Al-Sul 55, mostradas na Figura 47, observa-se que eles são similares durante toda a duração do experimento. Dessa forma, supõe-se que a solubilização do magnésio ocorre nas regiões da pastilha onde o material já sofreu reação de troca iônica e liberação do sulindaco, ou seja, da superfície da partícula. Como visto na Figura 47 e na Tabela 10, depois de 6, 24 e

56 h a quantidade de sulindaco liberada é maior que a porcentagem de magnésio lixiviado para a solução.

Para investigar essa possibilidade, foram obtidos espectros vibracionais Raman em diferentes regiões da secção meridional das pastilhas de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ 55 e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55 após 24 h de ensaio de dissolução (Figura 54). Como esperado, as bandas características do sulindaco monitoradas em 1622 e 1588 cm^{-1} , apresentaram intensidade muito menor nas superfícies mais externas da pastilha do que em seu interior.

Figura 54. Espectro vibracional Raman de pontos ao longo da secção meridional das pastilhas de (A) $\text{Mg}_2\text{Al-Sul}$ 55 e (B) $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55 coletadas após 24 h de ensaio de dissolução (70% de liberação do sulindaco). (C) Os espectros foram coletados nos pontos indicados na figura da direita: P0 e P4 correspondem às regiões mais externas da pastilha, enquanto P1 e P3, às internas.

Após 84 h de experimento, o DRX das pastilhas apresenta apenas um pico largo em 61° 2θ atribuído à reflexão 110. No caso da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55, um pico também largo e de baixa intensidade pode ser observado em $11,5^\circ$ 2θ ($d_{003} = 0,77$ nm), indicando total desintercalação do sulindaco e possível presença de íons cloreto na região interlamelar

(Figura 55 A). Ressalta-se que os resultados gerados a partir das pastilhas retiradas do meio reacional podem não ser exatamente os mesmos que seriam obtidos se os difratogramas de raios X fossem obtidos *in situ*. O espectro vibracional Raman (Figura 55B) apresenta as bandas características do sulindaco ($1620\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$) com intensidades muito baixas, e apresenta também novas bandas em $980\text{-}995\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a ânions fosfato,¹⁹⁴ que também podem ser observadas no espectro vibracional FTIR¹⁹⁵ (bandas em 1369 e 1081 cm^{-1} , Figura 55C). Os íons cloreto podem igualmente estar presentes, mas não é possível detectá-los por espectroscopia vibracional.

Figura 55. (A) DRX (B) Espectro vibracional Raman e (C) Espectro vibracional FTIR de pastilhas das amostras de $\text{Mg}_2\text{Al-Sul 55}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul 55}$ coletadas após 84 h de ensaio de dissolução.

Os dados de liberação reportados neste trabalho não são diretamente comparáveis com aqueles reportados na literatura para outros tipos de carregadores de sulindaco devido às diferenças nos parâmetros experimentais, como composição e concentração do meio de

dissolução, valor de pH, aparato de teste de dissolução, etc. Por exemplo, Entre os estudos conduzidos que avaliaram a liberação do sulindaco a partir de matrizes orgânicas, Yegin et al.¹⁹⁶ propuseram um mecanismo de liberação do fármaco, carregado em grãos de polímero alginato, baseado na difusão e também na erosão das superfícies do polímero no pH do experimento (tampão fosfato com pH igual a 6,8).

Os trabalhos sobre a possibilidade de usar HDLs como carregadores de fármacos ganharam destaque a partir de 2001 quando justamente uma série de anti-inflamatórios não esteroidais foi intercalada em matrizes de LiAl_2 por troca aniônica pelo grupo de O'Hare.¹⁹⁷ O processo de desintercalação das amostras na forma de pó foi efetuado em tampão fosfato de pH 4 ou 7 a 37 °C. As curvas cinéticas revelaram que em ambas as soluções tamponadas o tempo para liberação de 50% do fármaco intercalado ocorreu em apenas 1 minuto. Aproximadamente 90% do fármaco diclofenaco, por exemplo, foi liberado em 28 minutos. Nos trabalhos posteriores reportados na literatura e compilados no artigo de revisão de Rives et al.,⁴⁴ observa-se de um modo geral que entre 90 e 100% de liberação dos anti-inflamatórios intercalados ocorre entre 2 e 3 horas. Outro aspecto interessante relatado no trabalho de revisão é que a velocidade de liberação diminui quando a densidade de carga do HDL é aumentada (provavelmente devido às interações eletrostáticas mais fortes entre o fármaco e a matriz).

Dessa forma, os materiais híbridos estudados no presente trabalho, nas condições de liberação investigadas, apresentam um perfil de liberação do sulindaco compatível com os sistemas de liberação modificada, mais especificamente de liberação prolongada visto que, uma mesma dose de sulindaco quando intercalado nos HDLs é liberada em pelo menos o dobro do tempo quando comparado ao sulindaco não intercalado.

4.6 Estudo *in vivo*: Implantes das pastilhas de HDL-Sul

Desde 2013 nosso grupo tem efetuado trabalhos em colaboração com a equipe de pesquisa liderada pelo Dr. Ivan Hong Jun Koh, professor da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP. Entre suas linhas de pesquisa, o Prof. Koh tem estudado o processo de inflamação associado a doenças graves, como a sepse, e tem buscado novos materiais, orgânicos ou inorgânicos, que possam ser aplicados em processos de inovação tecnológica nessa área.

Um dos primeiros trabalhos resultantes dessa colaboração foi realizado pela pós-doutoranda Vanessa R. R. Cunha e colaboradores e está em fase de submissão para publicação.¹⁹⁸ A pesquisa consistiu de um estudo *in vivo* no qual pastilhas, contendo hidróxidos duplos lamelares de Zn/Al e Mg/Al e intercalados com íons cloreto, foram implantadas em ratos. Esses HDL são considerados matrizes de referência ou “branco” para os materiais híbridos contendo moléculas bioativas ou fármacos, como é o caso do sistema HDL-Sulindaco.

O principal objetivo desse estudo inédito foi avaliar a antigenicidade dos HDL-Cl. Para isso, o local onde as pastilhas foram implantadas foi investigado por meio de análise da dinâmica microcirculatória, possibilitada pela técnica de videomicroscopia *Sidestream Dark Field* (SDF) *imaging*.¹⁹⁹ Posteriormente, o material biológico foi submetido à análise histológica. Resumidamente, foi constatada a biocompatibilidade dos HDL-Cl pelas duas técnicas, o que permitiu e impulsionou o início de novos estudos, incluindo os materiais híbridos HDL-Sulindaco, sintetizados e caracterizados nesta tese. Ressalta-se que a biocompatibilidade de HDLs de Mg/Al e Zn/Al tem sido avaliada por testes *in vitro*, como o de hemólise e o com sal de tetrazólio (MTT).²⁰⁰ O passo seguinte inclui testes *in vivo* que ainda são pouco reportados na literatura para HDLs. Uma maneira de avaliar *in vivo* a biocompatibilidade de um material é através de testes de implante subcutâneo.

Serão apresentadas aqui apenas as principais conclusões formuladas a partir dos resultados da resposta tecidual em ratos frente aos implantes de HDL-Sulindaco, pois a

maioria dos resultados faz parte da dissertação de Mestrado do estudante do programa de pós-graduação do IQ-USP, Otávio Mendes Gil, que desenvolve sua pesquisa sob orientação da Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria, em colaboração com o Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh e nosso grupo de pesquisa. O estudo busca, principalmente, avaliar o perfil dos componentes da resposta biológica através de espectroscopia Raman. Assim, este item foi inserido nesta tese para exemplificar estudos interessantes de caráter interdisciplinar que podem ser realizados com os materiais sintetizados e caracterizados neste trabalho.

Para realização do experimento, inicialmente foi necessário projetar um pastilhador que permitisse produzir pastilhas de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. O dispositivo foi feito em aço inoxidável, em formato semelhante àquele usado no preparo de pastilhas para análise de FTIR, porém com menor diâmetro (Figura 56A). Dessa forma, foi possível preparar pastilhas de 5 mm de diâmetro e espessura variável, uma vez que essa dimensão depende essencialmente da massa e do tipo de material empregado. Para implantar-se quantidades semelhantes da parte inorgânica (matriz ou carregador), as pastilhas de HDL-Cl (20 mg) por exemplo, continham aproximadamente metade da massa das pastilhas de HDL-Sul (40 mg, sendo 20 mg do ânion sulindaco e 20 mg da parte inorgânica). Como resultado dessa diferença de massa, as pastilhas de HDL-Sul apresentaram espessura de aproximadamente 2 mm enquanto as de HDL-Cl, espessura de 1 mm (Figura 56B).

Observou-se que existe certa diferença de densidade e textura entre as amostras de $Zn_2Al-Sul$ e $Mg_2Al-Sul$. Prensando a mesma massa dos dois materiais, nas mesmas condições (0,25 Ton por 2 min), a pastilha de $Mg_2Al-Sul$, por exemplo, adere e não se desprende do pastilhador, enquanto a de $Zn_2Al-Sul$ forma-se e desprende-se facilmente. A condição ideal de compactação, na qual as pastilhas dos dois materiais foram preparadas, foi de 0,25 Ton por apenas um minuto. Resolvidos os problemas iniciais de preparo, as amostras de HDL-Sul e HDL-Cl na forma compactada foram enviadas ao laboratório do Prof. Dr. Ivan Koh.

Figura 56. (A) Pastilhador. (B) Pastilhas de HDL-Sul e HDL-Cl preparadas para implante nos ratos. O diâmetro é de aproximadamente 5 mm e a espessura é de 2 mm no caso da pastilha de HDL-Sul e 1 mm no caso de HDL-Cl.

O estudo *in vivo* consistiu no implante das pastilhas de HDL-Cl e HDL-Sul no espaço entre os músculos oblíquo externo e interno de ratos, conforme exemplificado na Figura 57. Foram usadas pastilhas com quantidade de sulindaco equivalente a uma dose de 80 mg/kg de massa de animal.

Figura 57. Esquema ilustrando a localização do implante da pastilha de HDL-Sul, entre os músculos oblíquo externo e interno, no abdômen de um rato. Figura inspirada em Wingerd²⁰¹ e Brown et al.²⁰²

Após cada um dos períodos de pós-operatório (7, 14, 21, 27 e 35 dias) foi realizada cirurgia para avaliar a resposta biológica da microcirculação no local do implante pela técnica de SDF (Figura 58), que permite a avaliação direta da microcirculação de um tecido, e é uma ferramenta muito útil para avaliação de alterações ocorridas em situações clínicas diversas e, principalmente, em casos de sepse.^{203, 204}

Figura 58. (A) Posicionamento da sonda de *Sidestream Dark Field* (SDF) *imaging*. (B) Captura de imagem da microcirculação.

Pelos vídeos e imagens de SDF avaliados após todos os períodos pós-operatórios (dados não apresentados nessa tese), não foram observadas alterações da hemodinâmica microcirculatória sobre e ao redor dos implantes, sugerindo que em decorrência de sua antigenicidade, o material implantado não induziu a ocorrência de processo inflamatório, isto é, não provocou edemas e aumento de volume no tecido.

Após a análise de SDF, os animais foram sacrificados e coletaram-se os tecidos contendo a pastilha e ao redor do implante. Essas amostras foram divididas, resultando em duas porções, cada uma contendo metade da pastilha, com tecido muscular acima e abaixo dela, como pode ser visto na Figura 59. Uma das partes foi usada no preparo de lâminas para o estudo histológico, e a outra, foi utilizada no estudo por espectroscopia Raman, no trabalho de Mestrado do aluno Otávio Mendes Gil, como comentado anteriormente.

Figura 59. Divisão da região contendo a pastilha implantada. Cada porção contém a secção meridional da pastilha com folhetos do músculo acima e abaixo dela.

Serão apresentados a seguir, os principais resultados do período de sete dias pós-operatório, importante para avaliação, uma vez que corresponde à fase de ocorrência da resposta inflamatória aguda; e de 35 dias pós-operatório, que corresponde ao término da resposta inflamatória e à fase de reparação, regeneração e início de remodelamento da matriz extracelular.²⁰⁵ Na Figura 60 são apresentadas as fotomicrografias de corte histológico do controle, da matriz Zn_2Al-Cl 55 e do $Zn_2Al-Sul$ 55. A região mais clara nas imagens corresponde ao local onde a pastilha estava implantada. Geralmente, durante o preparo da amostra para obtenção dessas imagens, o restante de material inorgânico se desprende, resultando nos espaços vazios observados. O restante da imagem refere-se ao tecido imediatamente abaixo, ou em alguns casos, acima da pastilha.

O controle corresponde a uma região onde apenas uma incisão entre os músculos foi feita, para simular o trauma sofrido quando uma pastilha é inserida. Nas imagens da Figura 60A pode-se notar que em 7 dias ocorreu acúmulo de células de reparação (borda indicada pela seta em amarelo) e no 35º dia (Figura 60B) tem-se o tecido reparado e sadio.

Figura 60. Fotomicrografias de corte histológico, mostrando: controle após (A) 7 e (B) 35 dias. Região do implante de pastilha de Zn₂Al-Cl após (C) 7 e (D) 35 dias. Região do implante de pastilha de Zn₂Al-Sul após (E) 7 e (F) 35 dias. Imagens ampliadas 10 vezes.

Na região do implante das pastilhas, o primeiro fato importante, observado no 7º dia pós-operatório, é a ausência de reação inflamatória induzida por ambos os materiais (matriz cloreto, Figura 60C, e híbrido com sulindaco, Figura 60E). Um corpo estranho implantado geralmente pode causar inflamação, e para fazer uma comparação, na fotomicrografia da Figura 61, apresenta-se o caso de um implante subcutâneo de um material que induziu

inflamação no tecido. A área circulada em amarelo e as demais com a mesma característica correspondem ao restante da pastilha; a seta preta aponta para um polimorfo nuclear infiltrado para o interior da pastilha e a seta branca indica restos celulares, ou seja, indício de morte celular. Esse é, portanto, um quadro comum observado no período de 3 a 7 dias, que corresponde à fase aguda do processo inflamatório, quando um material não biocompatível é implantado.

Figura 61. Fotomicrografias de corte histológico mostrando a região onde uma pastilha de argila não biocompatível foi implantada. O aumento foi de 10 vezes.

Comparando a resposta do tecido na presença dos implantes de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ 55 e $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55, no período de 7 dias, observa-se que ocorreu um grande acúmulo de células de reparação, principalmente fibroblastos (células com núcleo escuro e alongado que formam uma espécie de borda ao redor da pastilha e estão destacados com a flecha amarela). Outra característica são os focos de neovascularização (rede de pequenos vasos sanguíneos sendo formados, circulados em amarelo), sendo que no caso do $\text{Zn}_2\text{Al-Sul}$ 55, a quantidade de neovasos formados é maior e ainda são observadas regiões de invaginação de células para o interior da pastilha (região circulada em azul).

Em seguida, comparando-se a resposta apresentada no 35° dia de pós-operatório, observa-se que a deposição de células de reparação diminuiu e essas foram substituídas por tecido conjuntivo denso e modelado, que possivelmente trata-se de colágeno tipo III. O comportamento foi muito semelhante para os dois casos, porém o processo integral de neoformação e maturação das fibras parece ser acelerado quando o Zn₂Al-Sul 55 está presente.

No caso dos implantes de Mg₂Al-Cl e Mg₂Al-Sul (Figura 62), foi observada menor espessura da deposição celular ao redor das pastilhas e ocorreu formação de colágeno menos denso e menos flexível (possivelmente colágeno tipo I). A principal diferença entre os dois períodos comparados foi a ocorrência de maior invaginação de células para o interior da pastilha, indicando sua fragmentação, sendo esse efeito mais evidenciado no período de 35 dias. No caso de um material não biocompatível, a formação de colágeno na região do trauma quase não é observada. As regiões marcadas na Figura 62 correspondem às mesmas descritas para o sistema Zn₂Al-Sul 55 (Figura 61).

Se um dos fatores que levam à desintegração das pastilhas for a dissolução da matriz, os resultados estão de acordo com o comportamento observado no ensaio de dissolução *in vitro*, no qual foi constatada dissolução da parte inorgânica da matriz de Mg₂Al-Sul, com saída de cerca de 40,8 % de magnésio, enquanto a matriz de Zn₂Al-Sul perde somente cerca de 0,6 % do zinco presente em sua composição.

Figura 62. Fotomicrografias de corte histológico mostrando: controle após (A) 7 e (B) 35 dias. Região do implante de pastilha de Mg₂Al-Cl após (C) 7 e (D) 35 dias. Região do implante de pastilha de Mg₂Al-Sul após (E) 7 e (F) 35 dias. Imagem ampliada 10 vezes.

Em um sistema aberto, como o organismo vivo, espera-se que as pastilhas se dissolvam totalmente com o passar do tempo. No trabalho desenvolvido por Cunha et al.¹⁹⁸ são considerados os papéis que os íons endógenos Mg²⁺ e Zn²⁺ exercem nos processos de reparação tecidual a fim de entender a biocompatibilidade do sistema HDL-Cl. Além da composição química dos HDLs testados, outro fator a ser considerado é o caráter básico dessas matrizes. É sabido que o processo inflamatório causa a diminuição no valor do pH do

local (extracelular) em decorrência ao aumento local da produção de (i) ácido lático pelos neutrófilos e de (ii) ácidos de cadeia carbônica pequena provenientes do metabolismo de bactérias. O fluido intersticial de tumores, por exemplo, possui pH inferior a 6.²⁰⁶ A diminuição do pH na região extracelular é acompanhada por imunodeficiência, diminuição de resposta à inflamação e atraso no processo de fagocitose. Dessa forma, o fato dos HDLs possuírem propriedades básicas, pode promover o aumento do pH no tecido lesionado, melhorando a resposta local do organismo ao trauma muscular provocado pelo implante das pastilhas.

De forma geral, comparando as respostas biológicas para as matrizes HDL-Cl e HDL-Sul, aparentemente as principais diferenças notadas se referem à velocidade de recuperação da região afetada pelo trauma cirúrgico, e à ocorrência de invaginação de células de reparação (7 dias) e de células de tecido conjuntivo (35 dias), para o interior das pastilhas. Tais fatos podem ser devidos ao efeito anti-inflamatório do sulindaco ou à diferença de morfologia existente entre os materiais. Os canais nanoestruturados do HDL-Sul poderiam, por exemplo, permitir o direcionamento do crescimento de células de colágeno. Logo, os estudos deverão ser ampliados futuramente, de modo a procurar esclarecer a possível influência desses fatores na integração celular.

Com relação à possibilidade do sulindaco atuar localmente como anti-inflamatório no caso dos implantes, ainda não há estudos na literatura que discorram sobre a metabolização do fármaco em tecidos ou mesmo sobre sua absorção pela circulação sanguínea local e distribuição pela circulação sistêmica. Não foi possível através deste estudo avaliar tal comportamento, mas há propostas para trabalhos futuros. Em artigo de revisão recente, Klinge et al.,²⁰⁷ por exemplo, relatam as vantagens do uso tópico de anti-inflamatórios não esteroidais, sendo uma das principais, a redução da exposição do sistema gastrointestinal, que é o mais afetado quando estes fármacos são administrados. De acordo com os autores,

vários efeitos positivos têm sido produzidos pelo uso local dos AINEs, motivando assim a condução de estudos mais aprofundados.

Finalmente, comparando Zn₂Al-Sul 55 e Mg₂Al-Sul 55, constata-se que não ocorreu indução do processo inflamatório, mas considerável biointegração das pastilhas provando que os materiais híbridos são biocompatíveis.

Esse item da tese se propôs a mostrar alguns resultados preliminares sobre a biocompatibilidade e biointegração de materiais à base de HDLs e as propriedades dessas matrizes como carregadores de fármacos abrindo caminho para novas possibilidades de estudos.

Capítulo 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.0 Conclusões e perspectivas

Pelo método da coprecipitação foi possível preparar materiais híbridos a partir do fármaco sulindaco e hidróxidos duplos lamelares contendo Zn/Al e Mg/Al com razões molares M^{II}/Al igual a 2 e Sulindaco/Al = 1. O tratamento térmico brando a 55°C durante a reação de coprecipitação levou à formação de materiais com maior cristalinidade do que aqueles obtidos à temperatura ambiente. Para as duas composições estudadas (Mg_2Al e Zn_2Al) a quantidade de fármaco carregado foi de cerca de 50 % em massa, um valor superior ao observado para carregadores como os polímeros orgânicos.

A caracterização por difratometria de raios X permitiu a verificação da estrutura cristalina dos materiais formados e evidenciou que o tratamento térmico é essencial para sua melhor organização estrutural. Com a obtenção de material de alta cristalinidade foi possível empregar a técnica de *1D Plot* e obter uma proposta da possível orientação dos ânions intercalados entre as lamelas: bicamada interdigitada. De forma interessante, esse arranjo é adotado pelo polimorfo II do sulindaco na forma cristalina, evidenciando que o fármaco deve estabelecer interações energeticamente favoráveis no arranjo observado.

Através das imagens de microscopia eletrônica, observou-se que o sulindaco exerce um papel importante na morfologia das nanoestruturas constituídas pelo fármaco e o HDL, de modo que a interação entre grupos da substância orgânica e a parte inorgânica direciona o crescimento das partículas primárias. Os sistemas híbridos estudados são formados por partículas de pequena espessura (5 ou 6 lamelas) e flexíveis. O emprego de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução no modo HAADF permitiu visualizar a presença de *nanoscrolls* entre as partículas de Zn_2Al -Sul 55. Vários materiais lamelares quando esfoliados sofrem o processo de enrolamento como, por exemplo, niobatos e pentóxido de vanádio. Porém, uma busca na literatura revela que esse é o primeiro exemplo de um *nanoscroll* de HDL. As técnicas de DRX e de microscopia eletrônica geraram resultados coincidentes quanto à estrutura lamelar dos híbridos isolados neste trabalho.

A avaliação de interações de curto alcance, como por espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman e ^{13}C -RMN, confirmaram a manutenção da integridade química do sulindaco após o processo de intercalação e a sua presença na forma desprotonada entre as lamelas, caracterizando a natureza eletrostática da ligação entre o fármaco e o carregador. Os cálculos de DFT foram ferramentas de grande valia e de suporte na atribuição espectroscópica dos materiais.

A análise térmica dos materiais híbridos por um conjunto de técnicas como TG, DTA e MS acoplados permitiu verificar que o material híbrido contendo Zn_2Al , apesar de ser menos estável do que aquele contendo magnésio com relação à desidroxilação das lamelas, propiciou a maior estabilização térmica do fármaco intercalado. Enquanto o sulindaco não intercalado começa a se decompor em 228°C , a intercalação em matriz Zn_2Al retarda esse processo.

Através do estudo dos perfis de dissolução de pastilhas em solução aquosa tamponada (pH 7,2 e 37°C), foi possível verificar que a liberação do sulindaco a partir dos materiais híbridos é diferente da dissolução do fármaco livre, sugerindo um perfil de liberação modificada (prolongada), possivelmente controlada por difusão.

Finalmente, foram iniciados estudos *in vivo* que atestam a biocompatibilidade dos materiais preparados. Esses resultados são bastante animadores e abrem caminho para várias perspectivas. Primeiramente no que diz respeito à síntese dos materiais, uma investigação mais detalhada dos efeitos do tratamento térmico na morfologia e na formação das nanoestruturas pode ser conduzido.

Novas possibilidades de estudo surgem quando se considera a preparação de materiais mais complexos para liberação modificada e estudos de dissolução/liberação para prever e aperfeiçoar e otimizar o tempo de liberação do fármaco.

Ainda, o que diz respeito aos ensaios *in vivo* um grande leque de possibilidade se abre: (i) investigação a ação local do sulindaco quando implantado em tecidos; (ii) estudos de

administração oral dos materiais híbridos aqui preparados podem ser conduzidos para avaliar a eficácia dos HDLs na possível redução dos efeitos colaterais típicos dos AINES; (iii) preparação de novos materiais híbridos contendo HDL-Sulindaco e recobrimento entérico visando liberação somente no intestino, entre outras.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.0 Referências bibliográficas

1. Aleman, J.; Chadwick, A. V.; He, J.; Hess, M.; Horie, K.; Jones, R. G.; Kratochvil, P.; Meisel, I.; Mita, I.; Moad, G.; Penczek, S.; Stepto, R. F. T., *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79* (10), 1801-1827.
2. Thostenson, E. T.; Li, C.; Chou, T.-W., *Composites Science and Technology* **2005**, *65* (3-4), 491-516.
3. Kelly, A., *Composites Science and Technology* **1985**, *23* (3), 171-199.
4. Gómez-Romero, P.; Sanchez, C., *Functional Hybrid Materials*. Wiley-VCH Weinheim, Alemanha, 2004.
5. Sanchez, C.; Julian, B.; Belleville, P.; Popall, M., *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (35-36), 3559-3592.
6. Sanchez, C.; Boissiere, C.; Cassaignon, S.; Chaneac, C.; Durupthy, O.; Faustini, M.; Grosso, D.; Laberty-Robert, C.; Nicole, L.; Portehault, D.; Ribot, F.; Rozes, L.; Sassoey, C., *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 221-238.
7. Wegst, U. G. K.; Bai, H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O., *Nat. Mater.* **2015**, *14* (1), 23-36.
8. Sanchez, C.; Lebeau, B.; Chaput, F.; Boilot, J. P., *Adv. Mater.* **2003**, *15* (23), 1969-1994.
9. Drisko, G. L.; Sanchez, C., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (32), 5097-5105.
10. Dias, P. M.; Kinouti, L.; Constantino, V. R. L.; Ferreira, A. M. D. C.; Gonçalves, M. B.; Nascimento, R. R. d.; Petrilli, H. M.; Caldas, M.; Frem, R. C. G., *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2135-2142.
11. Shiguihara, A. L.; Bizeto, M. A.; Constantino, V. R. L., *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1366-1376.
12. Silva, C. H. B.; Ferreira, A. M. d. C.; Constantino, V. R. L.; Temperini, M. L. A., *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2* (22), 8205-8214.
13. 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.* **2012**, *24* (8), 1415-1425.
14. Teixeira-Neto, Â. A.; Izumi, C. M. S.; Temperini, M. L. A.; Ferreira, A. M. d. C.; Constantino, V. R. L., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (32), 5411-5420.
15. Perotti, G. F.; Tronto, J.; Bizeto, M. A.; Izumi, C. M. S.; Temperini, M. L. A.; Lugão, A. B.; Parra, D. F.; Constantino, V. R. L., *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 320-330.
16. Cunha, V. R. R. Materiais híbridos orgânico-inorgânico: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares. Tese de Doutorado, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2012**.
17. Lione, A.; Scialli, A. R., *Reprod. Toxicol.* **1995**, *9* (1), 7-20.

18. Brogden, R. N.; Heel, R. C.; Speight, T. M.; Avery, G. S., *Drugs* **1978**, *16* (2), 97-114.
19. Cavani, F.; Trifirò, F.; Vaccari, A., *Catal. Today* **1991**, *11* (2), 173-301.
20. Vaccari, A., *Catal. Today* **1998**, *41* (1-3), 53-71.
21. Crepaldi, E. L.; Valim, J. B., *Quím. Nova* **1998**, *21*, 300-311.
22. Forano, C.; Hibino, T.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C., Chapter 13.1 Layered Double Hydroxides. In *Developments in Clay Science*, Faïza Bergaya, B. K. G. T.; Gerhard, L., Eds. Elsevier: 2006; Vol. 1, pp 1021-1095.
23. de Roy, A.; Forano, C.; Malki, K.; Besse, J.-P., Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry. In *Expanded Clays and Other Microporous Solids*, Occelli, M.; Robson, H., Eds. Springer US: 1992; pp 108-169.
24. Braterman, P. S.; Xu, Z. P.; Yarberry, F., Layered Double Hydroxides (LDHs). In *Handbook of Layered Materials*, Auerbach, S. M.; Carrado, K. A.; Dutta, P. K., Eds. Wiley: New York, 2004 pp 373-474.
25. Radha, A. V.; Kamath, P. V.; Shivakumara, C., *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (13), 3411-3418.
26. Fan, G.; Li, F.; Evans, D. G.; Duan, X., *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 7040-7066.
27. Zhao, M.-Q.; Zhang, Q.; Huang, J.-Q.; Wei, F., *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (4), 675-694.
28. Wang, Q.; O'Hare, D., *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 4124-4155.
29. Ishihara, S.; Sahoo, P.; Deguchi, K.; Ohki, S.; Tansho, M.; Shimizu, T.; Labuta, J.; Hill, J. P.; Ariga, K.; Watanabe, K.; Yamauchi, Y.; Suehara, S.; Iyi, N., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (48), 18040-18043.
30. Wang, Q.; Gao, Y.; Luo, J.; Zhong, Z.; Borgna, A.; Guo, Z.; O'Hare, D., *RSC Advances* **2013**, *3* (10), 3414-3420.
31. Yang, Z.; Fischer, H.; Polder, R., *Cement and Concrete Composites* **2015**, *58* (0), 105-113.
32. Greenwell, H. C.; Coveney, P., *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2006**, *36* (1), 13-37.
33. Swadling, J. B.; Suter, J. L.; Greenwell, H. C.; Coveney, P. V., *Langmuir* **2013**, *29* (5), 1573-1583.
34. Oh, J.-M.; Park, M.; Kim, S.-T.; Jung, J.-Y.; Kang, Y.-G.; Choy, J.-H., *J. Phys. Chem. Solids* **2006**, *67* (5-6), 1024-1027.
35. Serna, C. J.; White, J. L.; Hem, S. L., *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67* (3), 324-327.
36. Peterson, C. L.; Perry, D. L.; Masood, H.; Lin, H.; White, J. L.; Hem, S. L.; Fritsch, C.; Haeusler, F., *Pharm. Res.* **1993**, *10* (7), 998-1004.
37. Cosnier, S.; Mousty, C.; Gondran, C.; Lepellec, A., *Mater. Sci. Eng., C* **2006**, *26* (2-3), 442-447.

38. Hussein, M. Z. b.; Zainal, Z.; Yahaya, A. H.; Foo, D. W. V., *J. Control. Release* **2002**, *82* (2-3), 417-427.
39. Kantonis, G.; Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D. F., *J. Photochem. Photobiol., A* **2007**, *185* (1), 62-66.
40. Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuhako, M., *Int. J. Pharm.* **2004**, *269* (2), 469-478.
41. Cardoso, L. P.; Celis, R.; Cornejo, J.; Valim, J., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (16), 5968-5975.
42. Kwak, S.-Y.; Jeong, Y.-J.; Park, J.-S.; Choy, J.-H., *Solid State Ionics* **2002**, *151* (1-4), 229-234.
43. Choy, J. H.; Oh, J. M.; Park, M.; Sohn, K. M.; Kim, J. W., *Adv. Mater.* **2004**, *16* (14), 1181-1184.
44. Rives, V.; del Arco, M.; Martín, C., *J. Control. Release* **2013**, *169* (1-2), 28-39.
45. Li, L.; Gu, W.; Chen, J.; Chen, W.; Xu, Z. P., *Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3331-3339.
46. Riaz, U.; Ashraf, S. M., *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13* (4), 522-529.
47. Cunha, V. R. R.; Ferreira, A. M. D.; Constantino, V. R. L.; Tronto, J.; Valim, J. B., *Quim. Nova* **2010**, *33* (1), 159-171.
48. Kuthati, Y.; Kankala, R. K.; Lee, C.-H., *Appl. Clay Sci.* **2015**, *112-113* (0), 100-116.
49. Del Hoyo, C., *Appl. Clay Sci.* **2007**, *36* (1-3), 103-121.
50. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M., *Imunologia de Janeway* 7ª ed.; Artmed: Porto Alegre, 2010.
51. Calich, V.; Vaz, C., *Imunologia*. 2ª ed.; Revinter: Rio de Janeiro, 2009.
52. Larini, L., *Fármacos e Medicamentos*. Artmed: Porto Alegre, 2008.
53. Carvalho, W. A.; Carvalho, R. D. S.; Rios-Santos, F., *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2004**, *54*, 448-464.
54. Magolda, R.; Kelly, T.; Newton, R.; Skotnicki, J.; Ytraaskos, J., Recent advances in inflammatory and immunological diseases: focus on arthritis therapy. In *Comprehensive medicinal chemistry II*, Taylor, J.; DJ, T., Eds. Elsevier: Oxford, 2007.
55. Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (21), 13926-13931.
56. Vane, J. R., *Nature New Biology* **1971**, *231*, 232-235.
57. Vane, J., *Nature* **1994**, *367* (6460), 215-216.
58. Vane, J. R.; Botting, R. M., *Inflamm. Res.* **1998**, *47*, S78-S87.
59. Beale Jr, J. M.; Block, J., *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*. 12ª ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2004.

60. Kummer, C. L.; Coelho, T. C. R. B., *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2002**, *52*, 498-512.
61. Rao, P. N. P.; Knaus, E. E., *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2008**, *11*(2), 81-110.
62. Fotios M. Plakogiannis, J. A. M., Sulindac. In *Analytical Profiles of Drug Substances*, Florey, K., Ed. Academic Press, INC: Orlando, Flórida, 1984 pp 573-596.
63. Shen, T.-Y.; Winter, C. A., Chemical and Biological Studies on Indomethacin, Sulindac and their Analogs. In *Adv. Drug Res.*, Alma, B. S., Ed. Academic Press: 1977; Vol. Volume 12, pp 89-245.
64. Disponível em: <http://www.mylan.com/products/product-catalog/product-profile-page?id=63bea641-051a-4011-8b8b-947f98ac53e0>, acessado em 13/06/15.
65. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. Last update: 2014-02-24; version: 2.3.3.
66. Morrison, R. T.; Boyd, R. N., *Organic Chemistry*. 6th ed.; Prentice Hall: New Jersey, 1992.
67. Shuman, R. F.; Pines, S. H.; Shearin, W. E.; Czaja, R. F.; Abramson, N. L.; Tull, R., *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (11), 1914-1919.
68. Walters, M. J.; Blobaum, A. L.; Kingsley, P. J.; Felts, A. S.; Sulikowski, G. A.; Marnett, L. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*(12), 3271-3274.
69. Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Iyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C., *Nature* **1996**, *384* (6610), 644-648.
70. Hoogsteen, K.; Trenner, N. R., *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (2), 521-523.
71. Loll, P. J.; Picot, D.; Ekabo, O.; Garavito, R. M., *Biochemistry* **1996**, *35* (23), 7330-7340.
72. Lemke, T. L.; Williams, D. A., *Foyes Principles of Medicinal Chemistry*. 7^a ed.; LWW: Philadelphia, 2013.
73. Koo, C. H.; Kim, S. H.; Shin, W., *Bull. Korean Chem. Soc.* **1985**, *6* (4), 222-224.
74. Tros De Ilarduya, M. C.; Martín, C.; Goñl, M. M.; Martínez-Ohárriz, M. C., *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (2), 248-251.
75. Grzesiak, A. L.; Matzger, A. J., *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (11), 2978-2986.
76. Sánchez-González, E. G.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Abad, V. J.; Cook, H. J., *Pharm. Dev. Technol.* **2015**, *20* (3), 306-313.
77. Llinas, A.; Box, K. J.; Burley, J. C.; Glen, R. C.; Goodman, J. M., *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 379-381.
78. Zeng, Z.; Chen, C.-S.; Jin, G.-F.; Zhao, J.-W.; Zhu, S.-Z., *Chin. J. Chem.* **2006**, *24* (10), 1443-1446.

79. Howard C. Ansel; Lloyd Allen; Popovich, N. G., *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8 ed.; Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 2007.
80. Duggan, D. E.; Hooke, K. F.; Risley, E. A.; Shen, T. Y.; Vanarman, C. G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1977**, *201* (1), 8-13.
81. IARC, *Handbooks of Cancer Prevention: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*. World Health Organization: 1997; Vol. 1.
82. Waddell, W. R., *Clin. Sci.* **1998**, *95* (3), 385-388.
83. Salter, E. A.; Wierzbicki, A.; Sperl, G.; Thompson, W. J., *Journal of Molecular Structure-Theochem* **2001**, *549*, 111-121.
84. Piazza, G. A.; Keeton, A. B.; Tinsley, H. N.; Gary, B. D.; Whitt, J. D.; Mathew, B.; Thaiparambil, J.; Coward, L.; Gorman, G.; Li, Y.; Sani, B.; Hobrath, J. V.; Maxuitenko, Y. Y.; Reynolds, R. C., *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2009**, *2* (6), 572-580.
85. Brideau, C.; Kargman, S.; Liu, S.; Dallob, A. L.; Ehrich, E. W.; Rodger, I. W.; Chan, C. C., *Inflamm. Res.* **1996**, *45* (2), 68-74.
86. Kim, Y.-H.; Kim, I.-K.; Kim, T.-G.; Lee, J.-H.; Lim, Y.-K.; Kim, Y.-J.; Choi, S.-Y., *J. Porous Mater.* **2013**, *20* (1), 303-308.
87. El-Kamel, A. H.; Abdel-Aziz, A. A. M.; Fatani, A. J.; El-Subbagh, H. I., *Int. J. Pharm.* **2008**, *358* (1-2), 248-255.
88. Zanella, J. M.; Cordova, T.; King, V. M.; Hobot, C. M.; Bay, T.; Cox, S. M.; Biggs, D.; Shaw, K.; McKay, W. F.; Remsen, K. L., Sulindac formulations in a biodegradable material, US 2009/0264531 A1. Warsaw Orthopedic INC, Medtronic INC, United States 2009.
89. Rives, V.; del Arco, M.; Martín, C., *Appl. Clay Sci.* **2014**, *88-89* (0), 239-269.
90. Minagawa, K.; Berber, M. R.; Hafez, I. H.; Mori, T.; Tanaka, M., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (4), 973-981.
91. Gravitz, L., *Nature* **2011**, *471* (7339), S5-S7.
92. Liggett, J. L.; Zhang, X.; Eling, T. E.; Baek, S. J., *Cancer Lett.* **2014**, *346* (2), 217-224.
93. Giardiello, F., *Cancer Metastasis Rev.* **1994**, *13* (3-4), 279-283.
94. Mladenova, D.; Pangon, L.; Currey, N.; Ng, I.; Musgrove, E. A.; Grey, S. T.; Kohonen-Corish, M. R. J., *Cell Communication and Signaling* **2013**, *11*, 73.
95. Du, J. U. N.; Guo, Y.; Bao, Y.; Xing, M.; Mahmoud, A. M.; Che, Z.; Chen, Z.; Yang, W., *Oncology Letters* **2014**, *8* (1), 313-316.
96. Lim, J. T. E.; Joe, A. K.; Suzui, M.; Shimizu, M.; Masuda, M.; Weinstein, I. B., *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (11), 3478-3484.
97. Limburg, P. J.; Mandrekar, S. J.; Aubry, M. C.; Ziegler, K. L. A.; Zhang, J.; Yi, J. E.; Henry, M.; Tazelaar, H. D.; Lam, S.; McWilliams, A.; Midthun, D. E.; Edell, E. S.; Rickman, O. B.; Mazzone, P.;

- Tockman, M.; Beamis, J. F.; Lamb, C.; Simoff, M.; Loprinzi, C.; Szabo, E.; Jett, J., *Lung Cancer* **2013**, 79(3), 254-261.
98. Piazza, G. A.; Rahm, A. L. K.; Kruttsch, M.; Sperl, G.; Paranka, N. S.; Gross, P. H.; Brendel, K.; Burt, R. W.; Alberts, D. S.; Pamukcu, R.; Ahnen, D. J., *Cancer Res.* **1995**, 55(14), 3110-3116.
99. Li, N.; Xi, Y.; Tinsley, H. N.; Gurpinar, E.; Gary, B. D.; Zhu, B.; Li, Y.; Chen, X.; Keeton, A. B.; Abadi, A. H.; Moyer, M. P.; Grizzle, W. E.; Chang, W.-C.; Clapper, M. L.; Piazza, G. A., *Mol. Cancer Ther.* **2013**, 12(9), 1848-1859.
100. Gurpinar, E.; Grizzle, W. E.; Shacka, J. J.; Mader, B. J.; Li, N.; Piazza, N. A.; Russo, S.; Keeton, A. B.; Piazza, G. A., *Mol. Cancer Ther.* **2013**, 12(5), 663-674.
101. Zhang, Y.; Zhang, J.; Wang, L.; Quealy, E.; Gary, B. D.; Reynolds, R. C.; Piazza, G. A.; Lü, J., *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2010**, 3(7), 885-895.
102. Meyskens, F. L.; McLaren, C. E.; Pelot, D.; Fujikawa-Brooks, S.; Carpenter, P. M.; Hawk, E.; Kelloff, G.; Lawson, M. J.; Kidao, J.; McCracken, J.; Albers, C. G.; Ahnen, D. J.; Turgeon, D. K.; Goldschmid, S.; Lance, P.; Hagedorn, C. H.; Gillen, D. L.; Gerner, E. W., *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2008**, 1(1), 32-38.
103. Gravit, L., *Nature* **2015**, 521(7551), S6-S8.
104. Hecht, S. S.; Kassie, F.; Hatsukami, D. K., *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9(7), 476-488.
105. Castonguay, A.; Rioux, N., *Carcinogenesis* **1997**, 18(3), 491-496.
106. Malkinson, A. M.; Koski, K. M.; Dwyer-Nield, L. D.; Rice, P. L.; Rioux, N.; Castonguay, A.; Ahnen, D. J.; Thompson, H.; Pamukcu, R.; Piazza, G. A., *Carcinogenesis* **1998**, 19(8), 1353-1356.
107. Duperron, C.; Castonguay, A., *Carcinogenesis* **1997**, 18(5), 1001-1006.
108. *Farmacopeia Brasileira. 5 ed., volume 1, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; p. 59-76.* 2010.
109. Brasil. Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.
110. Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M., *Chem. Rev.* **1999**, 99(11), 3181-3198.
111. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K., *International Journal of Pharmaceutical Investigation* **2012**, 2(1), 2-11.
112. Li, B.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X., *Int. J. Pharm.* **2004**, 287(1-2), 89-95.
113. 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* **2008**, 130(1), 86-94.
114. Choi, S.-J.; Choy, J.-H., *Nanomed.* **2011**, 6(5), 803-814.
115. Brasil, Resolução RDC Nº 133, de 29 de Maio de 2003

116. Costa, P. J. C. d., *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2002**, *38*, 141-153.
117. Gray, V.; Kelly, G.; Xia, M.; Butler, C.; Thomas, S.; Mayock, S., *Pharm. Res.* **2009**, *26* (6), 1289-1302.
118. Siepmann, J.; Siepmann, F., *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 12-24.
119. Dokoumetzidis, A.; Macheras, P., *Int. J. Pharm.* **2006**, *321* (1-2), 1-11.
120. Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S.; Costa, P., *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2005**, *41*, 143-154.
121. Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; Chowdhury, P., *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67* (3), 217-223.
122. Costa, P.; Sousa Lobo, J. M., *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 123-133.
123. Manadas, R.; Pina, M. E.; Veiga, F., *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2002**, *38*, 375-399.
124. Higuchi, T., *J. Pharm. Sci.* **1963**, *52* (12), 1145-1149.
125. Lee, P. I., *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1), 18-27.
126. Siepmann, J.; Peppas, N. A., *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1), 6-12.
127. Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A., *J. Membr. Sci.* **1981**, *9* (3), 211-227.
128. Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A., *Int. J. Pharm.* **1983**, *15* (1), 25-35.
129. Hixson, A. W.; Crowell, J. H., *Ind. Eng. Chem.* **1931**, *23* (8), 923-931.
130. Hixson, A. W.; Crowell, J. H., *Ind. Eng. Chem.* **1931**, *23* (9), 1002-1009.
131. Bhaskar, R.; Murthy, R. S. R.; Miglani, B. D.; Viswanathan, K., *Int. J. Pharm.* **1986**, *28* (1), 59-66.
132. Junyaprasert, V. B.; Manwiwattanukul, G., *Int. J. Pharm.* **2008**, *352* (1-2), 81-91.
133. Pongjanyakul, T.; Prakongpan, S.; Rungsardthong, U.; Chancham, P.; Priprem, A., *Powder Technol.* **2005**, *152* (1-3), 100-106.
134. Sparks, D. L., Kinetics and Mechanisms of Chemical Reactions at the Soil Mineral-Water Interface In *Soil Physical Chemistry*, 2 ed.; Sparks, D. L., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, 1999; p 432.
135. Chute, J. H.; Quirk, J. P., *Nature* **1967**, *213* (5081), 1156-1157.
136. Jardine, P. M.; Sparks, D. L., *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1984**, *48* (1), 39-45.
137. Miyata, S., *Clays Clay Miner.* **1975**, *23* (5), 369-375.
138. Choi, S.-J.; Oh, J.-M.; Choy, J.-H., *J. Phys. Chem. Solids* **2008**, *69* (5-6), 1528-1532.

139. Kong, X. G.; Jin, L.; Wei, M.; Duan, X., *Appl. Clay Sci.* **2010**, *49* (3), 324-329.
140. Charradi, K.; Forano, C.; Prevot, V.; Madern, D.; Ben Haj Amara, A.; Mousty, C., *Langmuir* **2010**, *26* (12), 9997-10004.
141. Crepaldi, E. L.; Pavan, P. C.; Valim, J. B., *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11* (1), 64-70.
142. Fini, A.; Fazio, G.; Feroci, G., *Int. J. Pharm.* **1995**, *126* (1-2), 95-102.
143. Kuang, Y.; Zhao, L.; Zhang, S.; Zhang, F.; Dong, M.; Xu, S., *Materials* **2010**, *3* (12), 5220-5235.
144. Leroux, F.; Taviot-Gueho, C., *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (35-36), 3628-3642.
145. Demel, J.; Hynek, J.; Kovář, P.; Dai, Y.; Taviot-Guého, C.; Demel, O.; Pospíšil, M.; Lang, K., *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (46), 27131-27141.
146. Pisson, J.; Morel-Desrosiers, N.; Morel, J. P.; de Roy, A.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C.; Malfreyt, P., *Chem. Mater.* **2011**, *23* (6), 1482-1490.
147. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G., *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37* (2), 785-789.
148. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; et al; , *GAUSSIAN 09, Revision A.0*. Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2009.
149. Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (23), 8251-8260.
150. Cheeseman, J. R.; Trucks, G. W.; Keith, T. A.; Frisch, M. J., *J. Chem. Phys.* **1996**, *104* (14), 5497-5509.
151. Andersson, M. P.; Uvdal, P., *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (12), 2937-2941.
152. USP–NF, D. R., MD: US Pharmacopeial Convention; 2008. pp. 267–274.
153. Barbosa, C. A. S. *Preparação e caracterização de hidróxidos duplos lamelares intercalados com espécies macrocíclicas metaladas*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química. São Paulo, **1999**.
154. Cunha, V. R. R. *Intercalação de fármacos com atividade antiinflamatória (ácido mefenâmico e piroxicam) em Hidróxido Duplo Lamelar*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**.
155. Barbosa, C. A. S. *Imobilização de ftalocianinas metaladas em hidróxidos duplos lamelares: preparação, caracterização e atividade catalítica*. Tese de Doutorado, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, **2004**.
156. Buscaglia, M. T.; Buscaglia, V.; Bottino, C.; Viviani, M.; Fournier, R.; Sennour, M.; Presto, S.; Marazza, R.; Nanni, P., *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (10), 3847-3855.
157. Panda, H. S.; Srivastava, R.; Bahadur, D., *Bull. Mater. Sci.* **2011**, *34* (7), 1599-1604.

158. Shannon, R., *Acta Crystallogr. A* **1976**, 32 (5), 751-767.
159. Harris, K. D. M.; Hollingsworth, M. D., *Structural Properties of the Guest Species in Diacyl Peroxide/Urea Inclusion Compounds: An X-Ray Diffraction Investigation*. 1990; Vol. 431, p 245-269.
160. Bauer, J.; Behrens, P.; Speckbacher, M.; Langhals, H., *Adv. Funct. Mater.* **2003**, 13 (3), 241-248.
161. Haynes, W. M., *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th edition, Internet Version*. 2015-2016, available at: <http://www.hbcpnetbase.com/>.
162. Bravo-Suárez, J. J.; Páez-Mozo, E. A.; Ted Oyama, S., *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, 67(1), 1-17.
163. Leroux, F.; Besse, J. P., *Chem. Mater.* **2001**, 13 (10), 3507-3515.
164. Burton, A. W.; Ong, K.; Rea, T.; Chan, I. Y., *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, 117 (1-2), 75-90.
165. Smilgies, D.-M., *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, 42 (Pt 6), 1030-1034.
166. Ren, L.; Hu, J.-S.; Wan, L.-J.; Bai, C.-L., *Mater. Res. Bull.* **2007**, 42 (3), 571-575.
167. Sharma, G.; Valenta, D. T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J. W., *J. Control. Release* **2010**, 147 (3), 408-412.
168. Oh, J. M.; Choi, S. J.; Lee, G. E.; Kim, J. E.; Choy, J. H., *Chemistry-An Asian Journal* **2009**, 4(1), 67-73.
169. Waknis, V.; Chu, E.; Schlam, R.; Sidorenko, A.; Badawy, S.; Yin, S.; Narang, A., *Pharm. Res.* **2014**, 31 (1), 160-172.
170. Kloprogge, J. T., Infrared and Raman spectroscopy of naturally occurring hydrotalcites and their synthetic equivalents. In *The application of vibrational spectroscopy to clay minerals and layered double hydroxides* Kloprogge, J. T., Ed. The Clay Minerals Society Aurora, U.S.A, 2005; Vol. 13, pp 203-238.
171. Scott, A. P.; Radom, L., *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (41), 16502-16513.
172. Kloprogge, J. T.; Hickey, L.; Frost, R. L., *J. Raman Spectrosc.* **2004**, 35 (11), 967-974.
173. Kloprogge, J. T., *Infrared and Raman spectroscopy of naturally occurring hydrotalcites and their synthetic equivalents*. Clay Minerals Soc: Boulder, 2005; Vol. 13, p 203-238.
174. Frost, R. L.; Scholz, R.; López, A.; Theiss, F. L., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, 118 (0), 187-191.
175. Kloprogge, J. T.; Frost, R. L., *J. Solid State Chem.* **1999**, 146 (2), 506-515.
176. Liu, Y.; Junk, T.; Liu, Y.; Tzeng, N.; Perkins, R., *J. Mol. Struct.* **2015**, 1086 (0), 43-48.

177. Nangoi, I. M.; Vaiss, V. S.; Souza, W. F.; Chiaro, S. S. X.; Leitão, A. A., *Appl. Clay Sci.* **2015**, *107*(0), 131-137.
178. Gryff-Keller, A.; Szczecinski, P., *RSC Advances* **2014**, *4*(52), 27290-27296.
179. Douglas, A. W., *Can. J. Chem.* **1978**, *56*(16), 2129-2133.
180. Taviot-Gueho, C.; Illaïk, A.; Vuillermoz, C.; Commereuc, S.; Verney, V.; Leroux, F., *J. Phys. Chem. Solids* **2007**, *68*(5-6), 1140-1146.
181. Lakraimi, M.; Legrouiri, A.; Barroug, A.; De Roy, A.; Pierre Besse, J., *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*(4), 1007-1011.
182. Frost, R. L.; Martens, W.; Ding, Z.; Klopogge, J. T., *J. Therm. Anal. Calorim.* **2003**, *71*(2), 429-438.
183. Thomas, G. S.; Radha, A. V.; Kamath, P. V.; Kannan, S., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*(25), 12365-12371.
184. Constantino, V. R. L.; Pinnavaia, T. J., *Inorg. Chem.* **1995**, *34*(4), 883-892.
185. Kameda, T.; Yoshioka, T.; Watanabe, K.; Uchida, M.; Okuwaki, A., *Appl. Clay Sci.* **2007**, *35*(3-4), 173-179.
186. Lombardo, G. M.; Pappalardo, G. C., *Chem. Mater.* **2008**, *20*(17), 5585-5592.
187. Prévot, V.; Forano, C.; Besse, J. P., *Appl. Clay Sci.* **2001**, *18*(1-2), 3-15.
188. Pereira, D. C.; Faria, D. L. A. d.; Constantino, V. R. L., *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1651-1657.
189. Anand, V.; Kandarapu, R.; Garg, S., *Drug Discov. Today* **2001**, *6*(17), 905-914.
190. Yoshida, T.; Lai, T. C.; Kwon, G. S.; Sako, K., *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10*(11), 1497-1513.
191. Rojas, R.; Jimenez-Kairuz, A. F.; Manzo, R. H.; Giacomelli, C. E., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, *463*(0), 37-43.
192. Ambrogi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L.; Tiralti, M., *AAPS PharmSciTech* **2002**, *3*(3), 77-82.
193. Perioli, L.; Posati, T.; Nocchetti, M.; Bellezza, F.; Costantino, U.; Cipiciani, A., *Appl. Clay Sci.* **2011**, *53*(3), 374-378.
194. Frost, R. L.; Musumeci, A. W.; Klopogge, J. T.; Adebajo, M. O.; Martens, W. N., *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*(7), 733-741.
195. Huang, W.; Zhang, H.; Pan, D. K., *AIChE J.* **2011**, *57*(7), 1936-1946.
196. Yegin, B. A.; Moulari, B.; Tugba Durlu-Kandilci, N.; Korkusuz, P.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A., *J. Microencapsul.* **2007**, *24*(4), 371-382.

197. Khan, A. I.; Lei, L.; Norquist, A. J.; O'Hare, D., *Chem. Commun. (Camb.)* **2001**, (22), 2342-2343.
198. Cunha, V. R. R.; Barbosa, R.; Martins, A. M. C. R. P. F.; Koh, I. H. J.; Constantino, V. R. L., *Manuscrito em preparação* **2015**.
199. Treu, C.; Lupi, O.; Bottino, D.; Bouskela, E., *Arch. Dermatol. Res.* **2011**, 303 (2), 69-78.
200. Choi, S.-J.; Oh, J.-M.; Park, T.; Choy, J.-H., *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7 (11), 4017-4020.
201. Wingerd, B. D., *Rat Dissection Manual*. The Johns Hopkins University Press: Baltimore, 1988.
202. Brown, S. H. M.; Banuelos, K.; Ward, S. R.; Lieber, R. L., *J. Anat.* **2010**, 217 (3), 196-202.
203. Koh, I. H. J.; Menchaca-Diaz, J. L.; Koh, T. H.; Souza, R. L.; Shu, C. M.; Rogerio, V. E.; Liberatore, A. M. A., *Shock* **2010**, 34 (7), 27-33.
204. Ince, C., *Crit. Care* **2005**, 9 (Suppl 4), 1-7.
205. Carneiro, J.; Junqueira, L. C., *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 12ª ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2013.
206. Lardner, A., *J. Leukoc. Biol.* **2001**, 69 (4), 522-530.
207. Klinge, S.; Sawyer, G., *Phys Sportsmed.* **2013**, 41 (2), 64-74.

Súmula Curricular

Dados pessoais

Michele Aparecida Rocha

Nascida em 06/11/1983, Passo Fundo, RS.

E-mail: mirocha@iq.usp.br

Formação acadêmica

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR (2004)

Bacharelado e Licenciatura em Química

Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP (2009)

Mestrado em Química Inorgânica

Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP (2009 ao presente)

Doutorado em Química Inorgânica

Ocupação

01) Bolsista de Iniciação Científica na execução de parte do projeto de pesquisa "Desenvolvimento de Interfaces Moleculares e Sensores Baseados em Xerogéis de Pentóxido de Vanádio (V) e Compósitos Derivados" no período de 01/04/2003 a 31/08/2003.

02) Bolsista de Iniciação Científica do Programa de Bolsa/Pesquisa PIBIC/CNPq/UNICENTRO na execução do projeto de pesquisa "Nanocompósitos Baseados em Argila Modificada com Hidróxido de Níquel Coloidal" no período de 10/09/2003 a 31/07/2004.

03) Bolsista de mestrado do CNPq na execução do projeto de pesquisa "Estudo e Aplicações de Filmes e Compósitos de nanopartículas de Óxido/Hidróxido de Níquel" no período de 02/2005 a 02/2007.

04) Assistente de Pesquisa, Laboratório de Referências Metrológicas – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de SP no período de 05/2007 a 01/2008.

05) Técnica de Laboratório, Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica - Universidade de São Paulo, de 05/2008 a 11/2009.

06) Bolsista de doutorado da CAPES na execução do projeto de pesquisa "Materiais nanoestruturados baseados em espécies orgânicas naturais e hidróxidos duplos lamelares" no período de 10/2009 a 08/2011.

07) Especialista em Laboratório - ICP OES, DSC e TGA - Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo, de 06/2011 ao presente.

Publicações

Artigos

01) M.A. Rocha, P.A.D. Petersen, E. Teixeira-Neto, H.M. Petrilli, F. Leroux, C. Taviot-Gueho, V.R.L. Constantino. Scrolled and curly nanoparticles of layered double hydroxide and sulindac drug: physicochemical characterization and delivery properties (em preparação).

02) P.R. Martins, A.L.A. Parussulo, S.H. Toma, M.A. Rocha, H.E. Toma, K. Araki. Highly stabilized alpha-NiCo(OH)₂ nanomaterials for high performance device application. *Journal of Power Sources*, v. 218, p. 1-4, 2012.

03) M.A. Rocha, H. Winnischofer, K. Araki, F.J. Anaissi, H.E. Toma. A New Insight on the Preparation of Stabilized Alpha-Nickel Hydroxide Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 3985-3996, 2011.

04) P.R. Martins, M.A. Rocha, L. Angnes, H.E. Toma, K. Araki. Highly Sensitive Amperometric Glucose Sensors Based on Nanostructured -Ni(OH)₂ Electrodes. *Electroanalysis*, v. 23, p. 2541-2548, 2011.

05) M.A. Rocha, F.J. Anaissi, H.E. Toma, K. Araki, H. Winnischofer. Preparation and characterization of colloidal Ni(OH)₂/bentonite composites, *Materials Research Bulletin*, v. 44, p. 970-976, 2009.

Resumos em Congressos Científicos

01) *"Storage and delivery of anti-inflammatory drug from biocompatible layered-based materials"*. Autores: Rocha, M. A.; Petersen, P. A. D.; Teixeira-Neto, E.; Petrilli, H. M.; Leroux, F.; Taviot-Gueho, C.; Constantino, V. R. L. Apresentado no 18th International Symposium on Intercalation Compounds (ISIC 18), ocorrido no período de 31 de maio a 04 de junho de 2015, em Estrasburgo, França, (Apresentação oral feita pela orientadora).

02) *"Layered materials as nanocarriers to bioactive molecules"*. Autores: Matos, C. S.; Rocha, M. A.; Taviot-Gueho, C.; Leroux, F.; Constantino, V. R. L. Apresentado no XIII Encontro da SBPMat (Brazilian MRS Meeting), ocorrido no período de 28 de setembro a 02 de outubro de 2014, em João Pessoa, PB, (Painel). Painel premiado.

03) *"Derivative of folic acid molecule intercalated into layered double hydroxides"*. Autores: Matos, C. S.; Rocha, M. A.; Constantino, V. R. L. Apresentado na XV International Clay Conference (ICC), ocorrido no período de 07 a 11 de julho de 2013, no Rio de Janeiro, RJ, (Painel).

04) *"Effect of temperature on the properties of layered double hydroxides intercalated with sulindac"*. Autores: Rocha, M. A.; Petersen, P. A. D.; Leroux, F.; Taviot-Gueho, C.; Petrilli, H. M.; Constantino, V. R. L. Apresentado na XV International Clay Conference (ICC), ocorrido no período de 07 a 11 de julho de 2013, no Rio de Janeiro, RJ, (Painel).

05) *"Intercalação de corante natural em hidróxidos duplos lamelares"*. Autores: Matos, C. S.; Rocha, M. A.; Constantino, V. R. L. . Intercalação de corante natural em hidróxidos duplos lamelares. Apresentado na 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 36ªRASBQ, ocorrido no período de 25 a 28 de maio de 2013 em Águas de Lindóia, SP, (Painel).

06) *"Encapsulamento de molécula bioativa em carregadores à base de HDLs"* Autores: Matos, C. S.; Rocha, M. A.; Taviot-Gueho, C. Constantino, V. R. L. Apresentado no 21º Simpósio de Iniciação Científica da USP, ocorrido de 22 a 24 de outubro de 2013 em São Paulo, SP. (Painel)

07) *"Synthesis and Characterization of Hybrid Materials Based on Folic Acid and HDLs"* Autores: Matos, C. S.; Rocha, M. A.; Constantino, V. R. L. Apresentado no International

Workshop on Layered Materials, ocorrido de 26 a 28 de novembro de 2012 em Campinas, SP. (Painel).

08) *"Synthesis and characterization of Zn₂Al LDH intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drug Sulindac"*. Autores: Rocha M. A., Petersen P. A. D., Petrilli H. M., Constantino V. R. L. Apresentado no International Workshop on Layered Materials, ocorrido de 26 a 28 de novembro de 2012 em Campinas, SP.

09) *"Preparação e Caracterização de Materiais Híbridos Nanoestruturados a partir do Flavonol Morina e Hidróxidos Duplos Lamelares"*. Autores: Rocha, M. A.; Constantino, V. R. L. Apresentado na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 34ªRASBQ, ocorrido no período de 23 a 26 de maio de 2011 em Florianópolis, SC, (Painel).

10) *"Morphology and Structural Investigation of Colloidal Ni(OH)₂/Bentonite Nanocomposites"*. Autores: Araki, K.; Rocha, M. A.; Anaissi, F. J.; Toma, H. E.; Winnischofer, H.; Formiga, A. L. B. Apresentado no Simpósio Brasil-Japão, ocorrido no período de 14 a 16 de junho de 2008 em São Paulo, SP, (Painel).

11) *"Properties of Free and Intercalated Sol-Gel Ni(OH)₂"*. Autores: Rocha, M. A.; Anaissi, F. J.; Toma, S. H.; Toma, H. E.; Araki, K. Apresentado no 2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, ocorrido no período de 03 a 04 de maio de 2007 em São Carlos, SP, (Painel).

12) *"Estudo de Microbalança de Cristal de Quartzo do Sol e do Gel de Ni(OH)₂ Nanoparticulado"*. Autores: Rocha, M. A.; Toma, S. H.; Toma, H. E.; Araki, K. Apresentado na 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30ªRASBQ, ocorrido no período de 31 de maio a 03 de junho de 2007 em Águas de Lindóia, SP, (Painel).

13) *"Preparation and Properties of Sol and Gel Ni(OH)₂ Nanoparticles"*. Autores: Rocha, M. A.; Toma, S. H.; Toma, H. E.; Araki, K. Apresentado no XIII BMIC – 13th Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, ocorrido no período de 3 a 6 de setembro de 2006 em Fortaleza, CE, (Painel).

14) *"Influência do Cátion no Comportamento Eletroquímico do Material Sol-gel Misto Bentonita/Ni(OH)₂ em Soluções Alcalinas"*. Autores: Rocha, M. A.; Anaissi, F. J.; Lopes, M. C.;

Toma, H. E.; Araki, K. Apresentado no 13-SBQSul – XIII Encontro de Química da Região Sul, ocorrido no período de 02 a 04 de novembro de 2005 em Florianópolis, SC, (Painel).

15) *"Nanocompósito Baseado em Argila Bentonita e $Ni(OH)_2$ Coloidal"*. Autores: Rocha, M.A.; Anaissi, F.J. Apresentado XVI Seminário de Pesquisa e XI Semana de Iniciação Científica da UNICENTRO, no período de 04 à 08 de outubro de 2004 em Guarapuava, PR, (Apresentação oral).

16) *"Material Sol-gel Híbrido Baseado em Hidróxido de Cobalto(II) Coloidal e Argila Bentonita"*. Autores: Mussoi, S.C., Rocha, M.A.; Anaissi, F.J. Apresentado no XIII EAIC, no período de 29 de outubro a 01 de setembro de 2004 em Londrina, PR, (Painel).

17) *"Nanocompósito Baseado em Argila Bentonita e $Ni(OH)_2$ Coloidal"*. Autores: Rocha, M.A.; Anaissi, F.J. Apresentado no XIII EAIC, no período de 29 de agosto a 01 de setembro de 2004 em Londrina, PR, (Apresentação oral).

18) *"Nanocompósito Baseado em Argila Bentonita e $Ni(OH)_2$ Coloidal"*. Autores: Rocha, M.A.; Anaissi, F.J. Apresentado na 8ª Semana de Química da UNICENTRO, no período de 14 à 18 de junho de 2004, Guarapuava, PR, (Apresentação oral).

19) *"Materiais Eletroquímicos Nanocompósitos Como Interfaces moleculares"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A. e Toma, H.E. Apresentado no XVI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, SIBAE, no período de 9 à 14 de fevereiro de 2004, em San José, Costa Rica, (Apresentação oral feita pelo orientador).

20) *"Nanocompósito Baseado em Argila Bentonita e $Ni(OH)_2$ Coloidal"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A.; Villalba, J.C.; Pereira, C.D. e Toma, H.E. Apresentado no XI Encontro de Química da Região Sul, XI SBQ-Sul, no período de 05 à 07 de novembro de 2003 em Pelotas, RS, (Painel).

21) *"Material Híbrido Baseado em Argila Bentonita e $Ni(OH)_2$ Coloidal"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A.; Villalba, J.C.; Pereira, C. D. e Toma, H.E. Apresentado no XV Seminário de Pesquisa e X Semana de Iniciação Científica da UNICENTRO, no período de 06 à 11 de outubro de 2003 em Guarapuava, PR, (Apresentação oral).

22) *"Híbrido Nanomaterials Sol-Gel Basead In Clay Modified With Nickel Hydroxide Coloidal"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A. e Toma, H.E. Apresentado na 2ª Reunião Anual da Rede de Nanotecnologia Molecular e Interfaces, RENAMI, no período de 03 à 05 de agosto de 2003 em Búzios, RJ, (Painel).

23) *"Interface Molecular Baseada no Material Híbrido Bentonita/Ni(OH)₂ Coloidal: Incorporação Eletroquímica de [Fe(CN)₆]⁴⁻"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A.; Villalba, J.C.; Pereira, C.D. e Toma, H.E. Apresentado na 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26ªRASBQ, no período de 26 à 29 de maio de 2003 em de Poços de Caldas, MG, (Painel).

24) *"Material Híbrido Baseado em Argila Bentonita Modificada com Hidróxido de Níquel Coloidal: Preparação e Caracterização"*. Autores: Anaissi, F.J.; Rocha, M.A.; Villalba, J.C.; Pereira, C.D.; Silva da, M.C.V.M e Toma, H.E. Apresentado na 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26ªRASBQ, no período de 26 à 29 de maio de 2003 em Poços de Caldas, MG, (Painel).

Patentes e registros

01) Anaissi, F. J.; Danczuk, M.; Nunes, C. V.; Rocha, M. A.; Araki, K.; Toma, H. E. *"Processo de produção de materiais mistos eletroativos (MME) à base de alfa-Ni(OH)₂ em argilas esmectitas"*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140223029. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2014.

02) Martins, P. R.; Parussulo, A. L. A.; Toma, S. H.; Rocha, M. A.; Anaissi, F. J.; Araki, K.; Toma, H. E. *"Nanopartículas de alfa hidróxido misto de níquel e de cobalto, nanomateriais e uso"*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120169363. WIPO - World Intellectual Property Organization, 2012.

03) Araki, K.; Toma, H. E.; Anaissi, F. J.; Rocha, M. A. *"Método de Preparação e Uso de Nanopartículas de Alfa-Hidróxido de Níquel na Forma de Sol e Gel"*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10004823. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2010.