



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química -PPGQuim

Desenvolvimento de sistemas bionanohíbridos a base de sólidos inorgânicos lamelares e matrizes biopoliméricas como sistemas dispensadores de espécies de interesse farmacológico

MAYARA SANTOS LEITE

São Luís-MA

2019

MAYARA SANTOS LEITE

Desenvolvimento de sistemas bionanohíbridos a base de sólidos inorgânicos lamelares e matrizes biopoliméricas como sistemas dispensadores de espécies de interesse farmacológico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

São Luís -MA
Dezembro-2019

Leite, Mayara Santos.

Desenvolvimento de sistemas bionanohíbridos a base de sólidos inorgânicos lamelares e matrizes biopoliméricas como sistemas dispensadores de espécies de interesse farmacológico / Mayara Santos Leite. - 2019.

71 p.

Orientador(a): Ana Clécia Santos de Alcântara.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, Sao Luis, 2019.

1. Bionanocompósitos. 2. Ciprofloxacino. 3. Hidróxidos duplos lamelares. 4. Liberação controlada. 5. Montmorillonita. I. Santos de Alcântara, Ana Clécia. II. Título.

MAYARA SANTOS LEITE

Desenvolvimento de sistemas bionanohíbridos a base de sólidos inorgânicos lamelares e matrizes biopoliméricas como sistemas dispensadores de espécies de interesse farmacológico

Aprovada em 27/05/2019

Essa dissertação foi julgada adequada a obtenção do título de Mestre em Química Analítica e aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Clécia Santos de Alcântara
(Orientadora) - DEQUI/UFMA

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima
DEQUI/UFMA

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Magalhães Rebelo Alencar
DEFIS/UFMA

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos irão inicialmente ao laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos e Nanoestruturados-Bionanos, que me adotou e me abraçou tornando essa caminhada de dois anos muito mais fácil. Nesse sentido não posso deixar de mencionar o respeito, a amizade e apoio que recebi de todos que fazem parte desse grupo. Desde os momentos que estão ligados a pesquisa científica até as horas tomando café, serviram para fomentar e solidificar os laços que posso considerar como ‘familiares’.

Como representante desse grupo de pesquisa, tenho que destacar o papel da minha orientadora Ana Clécia Santos de Alcântara, agradeço pelo voto de confiança dado a mim ainda no início desse projeto. Destaco acima de tudo sua relação comigo de firmeza, dedicação e compreensão nos momentos em que precisei. Fazendo-me admirá-la ainda mais por sua forma justa (em suas broncas) e amiga de me guiar nesse período.

Aos amigos mais antigos que se tornaram também companheiros de laboratório, Gabriel, Welton, Rodrigo e Jeovan, agradeço a paciência e ajuda sem medida que me emprestaram nesse período. E aos novos companheiros de laboratório, como Elaine, Elizaura, Barbara e Hiza agradeço a possibilidade de ter nesse curto período de tempo formado laços que também possam ser levados além do âmbito científico/acadêmico.

Aos companheiros de outros laboratórios, como Wemerson, Geyse e Paulina, obrigada por deixarem que eu também fizesse me sentir parte da família ‘LELQ’.

Agradeço a parceria firmada entre minha orientadora, eu e a Professora Dr^a. Ligia da Unicamp, ela foi parte fundamental em diversas etapas desse projeto, desde fornecimento de algumas matrizes utilizadas nesse trabalho, bem como de uma integra disponibilidade de tempo para esclarecimento de dúvidas, que facilitaram a compreensão de todo o trabalho realizado.

Minha mais profunda admiração a professora Vera Regina Leopoldo Constantino por ter aberto as portas de seu laboratório e tornado o desenvolvimento desse trabalho ainda mais prazeroso para mim. Agradeço aos alunos do LaSoL, Mariana, Caroline, Victor, Vagner e outros, por terem me abraçado e me feito sentir em casa no curto período que permaneci no convívio com eles.

As amizades além laboratório que fiz e tenho feito, o meu sincero agradecimento por estarem me acompanhando nessa jornada de crescimento profissional e humano. Obrigada Vanessa, Wesley Mateus, Welder, Wallison, Alynne, Adriano...

Por fim, agradeço a minha família, em especial minha irmã Nayara e minha mãe Linguinalva, que no último ano me deram suporte de todas as formas imagináveis, me

fazendo perceber ainda mais o quanto são importantes para mim e como são o alicerce que preciso para continuar seguindo em frente.

Finalizo esses agradecimentos enfatizando minha fé e gratidão a Deus, que com seu imenso amor por mim, me fez desejar aproveitar cada dia da minha vida.

RESUMO

O presente trabalho relata a síntese, caracterização e avaliação de sistemas bionanocompósitos baseados em argilas lamelares e biopolímeros como nanodispositivos para transporte e liberação de ciprofloxacino. Para este estudo, os materiais híbridos foram preparados através da intercalação de ciprofloxacino nas argilas hidróxido duplo lamelar e montmorillonita empregando os métodos de co-precipitação e reação de troca iônica, respectivamente. Para proteger os híbridos argila-ciprofloxacino contra os fluidos gastrointestinais, esses compostos de intercalação foram incorporados em uma mistura de biopolímeros a base do polissacarídeo i-carrageenana e da proteína gelatina formando sistemas bionanocompósitos, os quais foram conformados como esferas através de reação de gelificação iônica com íons Ca^{2+} e secos pelo processo de liofilização. Ambos os híbridos argila-ciprofloxacino e bionanocompósitos foram caracterizados por diferentes técnicas experimentais, como DRX, FTIR, TG / DTA e SEM. De modo a avaliar a etapa de congelamento, as esferas bionanocompósitos foram congeladas de forma convencional ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou N_2 líquido ($-196,1^{\circ}\text{C}$), e os estudos *in vitro* da liberação de ciprofloxacino, demonstraram que a cinética de liberação é significativamente influenciada pelo processo de congelamento, onde uma diferença no perfil de liberação nos fluidos que simulam o trato intestinal (pH 6,8 e 7,4). Estes resultados apontam que sistemas bionanocompósitos baseados em sólidos lamelares e biopolímeros podem atuar como nanodispositivos de liberação de fármacos, onde a liberação do princípio ativo pode ser modulada dependendo do método de congelamento do gel bionanocompósito, tornando-se um material promissor para a área biomédica.

Palavras-chave: bionanocompósitos; ciprofloxacino; liberação controlada; montmorillonita; hidróxidos duplos lamelares.

ABSTRACT

The present work reports the synthesis, characterization and the evaluation of the bionanocomposite systems based on layered clays and biopolymers as nanodevices for transport and release of ciprofloxacin. For this study, hybrid materials were prepared through the intercalation of ciprofloxacin into layered double hydroxide and montmorillonite clay employing the co-precipitation and ion exchange reaction, respectively. In order to protect the resulting ciprofloxacin-clay hybrids against the gastrointestinal fluids, these intercalation compounds were incorporated into a biopolymer mixture based on i-carrageenan polysaccharide and gelatin protein forming bionanocomposites systems, which were conformed as beads through ionic gelification reaction with Ca^{2+} ions and dried by the freeze-dried process. Both ciprofloxacin-clay hybrids and bionanocomposites were characterized by means of different experimental techniques, such as XRD, FTIR, TG/DTA and SEM. In order to evaluate the freeze step, bionanocomposite beads were freezing by conventional freeze (-20 °C) or liquid N₂ (-196.1 °C), and the in vitro studies of release of ciprofloxacin demonstrated that the release kinetics is significantly influenced by the process of freezing, where a difference in the release profiles mainly in fluids that simulate the intestinal zone (pH 6.8 and 7.4). These results point out bionanocomposite systems based on layered solids and biopolymers can act as drug delivery nanodevices, where the release of the active principle can be modulated depending on the freezing method of the bionanocomposite gel becoming a promising material for the biomedical area.

Keywords: bionanocomposites; ciprofloxacin; drug delivery system; montmorillonite; layered double hydroxides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução no tempo da concentração no sangue do fármaco administrado (linha azul) por um método de multidoses, e um sistema de liberação controlada (linha vermelha).	19
Figura 2. . Sistemas bionanocompósitos, apresentando diferentes formas de interação entre o sólido lamelar e o biopolímero.....	21
Figura 3. Espécies de carrageenana.....	23
Figura 4. Fontes de colágeno (esquerda) e estrutura da gelatina (direita).....	24
Figura 5. Representação esquemática da estrutura do HDL.....	25
Figura 6. Esquema de preparo do híbrido HDL-CFX encapsulado em quitosana.	26
Figura 7. Representação esquemática de um cristal de Montmorillonita.....	28
Figura 8. Perfil de microespecies de ciprofloxacino com a variação do pH.	29
Figura 9. Representação esquemática da obtenção do híbrido MMT-CFX.	35
Figura 10. Representação esquemática da obtenção do HDL ZnAl-Cl.....	36
Figura 11. Representação esquemática da obtenção do híbrido HDL-CFX.	37
Figura 12. Representação esquemática do processo de síntese das esferas de i-Carrageenana: Gelatina (i-CARR: GEL).....	38
Figura 13. Padrões de difração de raios X do Montmorillonita (MMT), hidróxido duplo lamela (HDL de ZnAl-Cl) e respectivos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.....	44
Figura 14. Simulação dos valores de ressonância do fármaco ciprofloxacino e espectros de RMN ¹³ C do fármaco (CFX) e dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.	46
Figura 15. Espectros infravermelhos (IV-ATR) para CFX, MMT, HDL ZnAl-Cl, MMT-CFX e HDL-CFX híbridos.....	47
Figura 16. Curvas de TG obtidas para o fármaco ciprofloxacino (CFX), e os híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.	49
Figura 17. Imagens de MEV dos híbridos MMT-CFX (A) e HDL-CFX (B).	50
Figura 18. Espectros na região do infravermelho correspondente aos biopolímeros i-carrageenana gelatina e os respectivos sistemas bionanocompósitos a base dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.	52
Figura 19. Imagens das esferas: i-CARR: GEL/CFX (a), i-CARR: GEL/MMT-CFX (b), i-CARR: GEL: HDL-CFX (c) em N ₂ , i-CARR: GEL/CFX (d), i-CARR: GEL/MMT-CFX (e), i-CARR: GEL: HDL-CFX (f) em congelamento convencional.	53
Figura 20. Absorção de água de esferas de bionanocompósitos a base de i-carrageenana-gelatina com diferentes processos de congelamento: N ₂ líquido (A) e congelador convencional (B) em esfera com água deionizada pH 5,9 (1) e tampão fosfato pH 6,8 (2).	55

Figura 21. Perfis da liberação de CFX de i-CARR: GEL CFX encapsulado, MMT-CFX e HDL-CFX obtidos de diferentes métodos de congelamento: líquido N2 (1) e congelador convencional (2) em condições que simulam a passagem do trato gastrointestinal (pH e tempo) a 37 ° C 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados nas sínteses de materiais utilizados nesse trabalho bem como em outros experimentos.	34
Tabela 2. Eficiência de encapsulamento e quantidade de CFX encapsulado como fármaco puro ou como MMT-CFX e HDL-CFX no sistema biopolimérico i-CARR: GEL. (Os dados são médios \pm DP, n = 3).	51
Tabela 3. Valores de Densidade Aparente das esferas encapsulados como fármaco puro ou como MMT-CFX e HDL-CFX no sistema biopolimérico i-CARR: GEL. (Os dados são médios \pm DP, n = 3).	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	19
2.2. BIONANOCOMPÓSITOS.....	20
2.2.1. Matrizes biopoliméricas	22
2.2.2. Sólidos Inorgânicos Lamelares	24
A) HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES- HDL.....	24
B) MONTMORILLONITA	27
2.3. FÁRMACOS.....	28
2.3.1. Antibiótico: Ciprofloxacino	28
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. REAGENTES	34
4.2. PREPARO DO MATERIAL HÍBRIDO MONTMORILLONITA-CIPROFLOXACINO (MMT-CFX).....	34
4.3. PREPARO DO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR HDL ZNAL-CL	35
4.4. PREPARO DO MATERIAL HÍBRIDO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR-CIPROFLAXACINO (HDL-CFX)	36
4.5. PREPARO DO SISTEMA BIONANOCOMPÓSITO NA CONFORMAÇÃO DE ESFERAS.....	37
4.5.1. Preparo de esferas à base de i-carrageenana: gelatina	37
4.5.2. Preparo de esferas à base de i-carrageenana-gelatina que incorporam ciprofloxacino	38
4.6. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DOS MATERIAIS BIONANOCOMPÓSITOS A BASE DE I-CARRAGEENANA: GELATINA QUE INCORPARAM O CIPROFLOXACINO	39

4.6.1. Determinação da quantidade de ciprofloxacino incorporada e eficiência de encapsulação na matriz i-carrageenana: gelatina	39
4.6.2. Determinação de absorção de água	39
4.6.3. Densidade Aparente	40
4.7. CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL, ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA.....	40
4.7.1. Difração de Raios X	40
4.7.2. Composição Elementar	40
4.7.3. Espectrometria na Região do Infravermelho (IV-ATR)	41
4.7.4. Análises Térmicas	41
4.7.5. Análise de RMN	41
4.8. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS BIONANODISPOSITIVOS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1. MATERIAIS HÍBRIDOS E BIONANOCOMPÓSITOS.....	44
5.1.1. Síntese e caracterização do híbrido MMT-CFX e HDL-CFX	44
5.1.2. Sistemas bionanocompósitos a base de i-Carrageenana e Gelatina	50
5.1.3. Avaliação dos materiais bionanocompósitos como dispositivos de liberação controlada de fármaco	57
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS.....	65

Capítulo I

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de moléculas farmacologicamente ativas, associada aos estudos de melhoramento da atividade clínica dos fármacos, foram os principais responsáveis pelo crescimento da indústria farmacêutica nos últimos anos. Esses estudos permitiram observar que medicamentos amplamente indicados dentro de processos terapêuticos, como antibióticos e antiinflamatórios eram majoritariamente consumidos por via oral e que exigiam das pacientes repetições da dosagem em um curto período de tempo. Como consequência, foram associados ao uso contínuo desses fármacos efeitos colaterais indesejados, oriundos das altas concentrações de fármaco na corrente sanguínea dos pacientes (ALLEN JR., POPOVICH, ANSEL, 2013). Como forma de solucionar os problemas relacionados a sistemas de liberação convencional, diversas áreas de interesse, como química, farmácia e engenharia de materiais passaram a criar sistemas capazes de proteger essas moléculas ativas e modular as taxas de liberação do fármaco, sendo estes conhecidos como sistema de liberação controlada de fármacos (Drug Delivery System).

Os sistemas de liberação controlada podem ser obtidos de diversas formas e a partir de diferentes matrizes, essas matrizes para serem consideradas eficientes excipientes de fármacos precisam possuir algumas características: manter a atividade do fármaco após encapsulamento, ou seja devem ser inativas perante a substância a ser protegida; as matrizes devem ser biologicamente compatíveis (levando-se em conta principalmente a possibilidade de bioacumulação em tecidos e órgãos e a possível toxicidade dessas matrizes). Dessa forma é possível encontrar na literatura uma quantidade relativamente grande de trabalhos que descrevem a obtenção desses sistemas (JAIN, DATTA, 2016; RIBEIRO et al., 2014; ALCÂNTARA, 2010), onde podemos destacar alguns tipos:

Lipossomas: esse sistema de liberação controlada consiste basicamente na formação de um sistema micelar capaz de envolver a molécula ativa no seu interior, obtido principalmente a partir da mistura de um tensoativo e água;

Sistemas poliméricos: sistemas de liberação controlada a base de polímeros podem ser obtidos de diversas maneiras; a partir da formação do hidrogéis estáveis que encapsulam o fármaco diretamente na rede polimérica através de ação mecânica, formação de sistemas nanoparticulados e nanocápsulas; formação de sistemas micelares e outros...

Sistemas Inorgânicos:esses sistemas podem ser obtidos através de sistemas híbridos a base de silicatos; outra forma de utilizar esses sistemas é através da formação de nanopartículas metálicas ou a base de carbono.

Ao procurarmos por sistemas poliméricos e inorgânicos, invariavelmente encontramos pesquisas que associam essas duas matrizes em um único sistema de liberação, que formam em conjunto um sistema híbrido, contendo uma parte inorgânica também polimérica, que pode ser chamado de nanocompósito, por conter um polímero de origem sintética, ou mesmo formando sistemas bionanocompósitos, já que a parte polimérica do sistema é de origem biológica (animal, vegetal, fúngica).

Os biopolímeros têm sido imensamente explorados para fins de formação de novos materiais, sua origem a partir de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana-de açúcar, ou mesmo derivada de fonte animal como quitosana e proteínas, associada à sua biodegradabilidade fazem desse material uma escolha bastante eficaz. A facilidade das espécies biopoliméricas para formar estruturas microencapsuladas ou mesmo a possibilidade de sofrer reações de complexação, permite a essas matrizes serem usadas como catalisadores, na remediação ambiental, como agente trocador de íons na cromatografia, e principalmente como carreador de moléculas farmacologicamente ativas (DARDER et al., 2011; REDDY et al., 2013; SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014). Os biopolímeros utilizados como sistemas de liberação controlada encontram-se em suas mais variadas formas, uma vez que como propriedade desses materiais, encontra-se a formação de hidrogéis estáveis, capazes de adquirir diferentes conformações; tais como: filmes, espumas e até mesmo microesferas (KHAN et al., 2017; LYNDON et al., 2014; NUSSINOVITCH, 2010; PEREIRA et al., 2011).

Quando a espécie biopolimérica possui em sua estrutura grupos funcionais com algum tipo de carga capaz de interagir com íons de carga oposta, alguns polímeros se destacam, como por exemplo, o alginato e a carboximetilcelulose, esses biopolímeros são comumente utilizados para fins de obtenção de sistemas de liberação controlada, uma vez que possuem em sua estrutura grupos carboxílicos carregados negativamente, que capazes de formar estruturas de rede estáveis, a ponto de obterem excelentes respostas como carreadores de fármaco. Um outro exemplo a ser citado são as carrageenanas, que possuem em sua estrutura grupos sulfatados carregados negativamente, e que dependendo da espécie (kappa, lambda ou iota), interagem com diferentes cátions (di, trivalentes), através do processo chamado *crosslinking* (KEPPELER et al., 2009; KHAN et al., 2017); sendo os

materiais formados utilizados para diversos fins (PADHI et al., 2016; SIPAHIGIL; DORTUNÇ, 2001; THRIMAWITHANA et al., 2010).

Ainda que apresentem significativas vantagens quando utilizados como sistemas de liberação controlada, os biopolímeros também podem gerar estruturas porosas, sensíveis a mudanças de pH, que podem promover a liberação precoce de grandes quantidades de fármaco em um curto período (efeito *burst* de liberação) (REBTISKI, 2015).

Essa limitação dos biopolímeros foi o que possibilitou o interesse na formação de sistemas bionanohíbridos. Esses sistemas são formados invariavelmente por partes inorgânicas que interagem diretamente com o fármaco em uma escala nanométrica (10^{-9}), formando uma estrutura híbrida do tipo inorgânica-orgânica, que é capaz de melhorar significativamente as propriedades de um fármaco, tais como propriedade de barreira, solubilidade. Dessa forma, esse material híbrido ao ser associado a uma matriz biopolimérica consegue associar a um único sistema características de ambas as matrizes individuais.

Invariavelmente a parte inorgânica que compõe esses sistemas bionanohíbridos, mais especificamente bionanocompósitos são os sólidos lamelares. Esses sólidos podem ser encontrados na natureza, como argilas do tipo montmorillonita (MMT), ou eles podem ser sintetizados em laboratório, como os hidróxidos duplos lamelares (HDL). Como características principais, ambos possuem a possibilidade de trocar íons presentes em suas estruturas, enquanto a MMT troca cátions de suas regiões interlamelares, aos HDLs são permitidas as trocas aniônicas. Esse fenômeno permite que as estruturas lamelares desses sólidos se mantenham estáveis através da compensação de cargas na sua estrutura (KEVADYIA et al., 2014; ALCÂNTARA et al., 2016, NALAWADE et al., 2009; SEPEHR et al., 2017, ABDUL LATIP et al., 2013). Dessa forma, a possibilidade de trocar íons, sejam eles de carga positiva ou negativa, permite que moléculas orgânicas sejam capazes de interagir com a estrutura desses sólidos, principalmente se em suas estruturas for permitido a ativação de grupos funcionais capazes de adquirir alguma carga, para facilitar assim o processo de troca iônica e formar o híbrido desejado (CUNHA; FERREIRA, CONSTANTINO, 2010; FRUNZA et al., 2008; ROJAS, et al., 2015).

Com a formação desse híbrido e a adição de uma parte biopolimérica ao sistema é possível tornar o processo de liberação ainda mais eficiente, neste caso através da formação de um sistema criado a partir de um biopolímero envolvendo o híbrido, capaz de gerar uma combinação das propriedades de ambas as matrizes que integram o material conhecido como

bionanocompósito, resultando em um sistema potencialmente biodegradável e biocompatível (RIBEIRO et al., 2014;). Neste contexto, o presente trabalho tem como proposta a obtenção de sistemas bionanocompósitos baseados em híbridos de sólidos lamelares (MMT, HDL) com suas respectivas propriedades de troca iônica, intercalando com a molécula de ciprofloxacino. Estes híbridos serão encapsulados em uma matriz biopolimérica formada pelos biopolímeros i-carrageenana e gelatina, utilizando dentro do processo de obtenção destes bionanodispositivos diferentes formas de congelamento, a fim de obter um sistema de liberação controlada de fármacos que seja capaz de reduzir a repetição das doses desse fármaco dentro do processo terapêutico e minimizar os efeitos colaterais que resultam das formulações convencionais.

Capítulo II

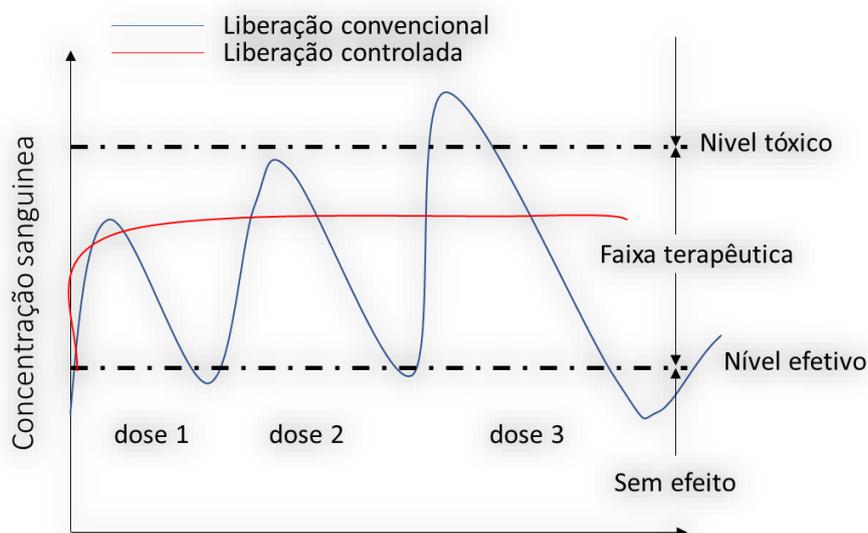
Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

As últimas décadas observa-se uma particular atenção para o desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármacos. Esses sistemas são capazes de modular as taxas de fármacos liberadas, a ação do mesmo em regiões específicas do corpo, levando o paciente a diminuir as doses administradas em um tratamento à base de métodos convencionais de liberação (WHATELEY, 2002). O interesse em desenvolver esses sistemas está diretamente ligado ao que ocorre ao paciente quando o medicamento usado pelo método convencional (oral) passa a ser consumido em curtos intervalos de tempo. Como pode ser observado na **Figura 1**, é possível notar que a liberação convencional (linha azul) ocorre em três etapas, forçando o paciente a um dado intervalo de tempo repetir a dosagem do medicamento, elevando as concentrações do fármaco na corrente sanguínea, a cada nova dose, como efeito dessas repetições é observado a possibilidade dessa concentração ser tão alta que pode atingir níveis tóxicos, levando assim o paciente a sentir efeitos colaterais indesejados, como náuseas, dores estomacais, sangramentos e outros.

Figura 1. Evolução no tempo da concentração no sangue do fármaco administrado (linha azul) por um método de multidoses, e um sistema de liberação controlada (linha vermelha).



Adaptado de Rebitski (2015)

Por outro lado, nessa mesma figura é observada como um sistema de liberação controlada ideal deve agir (linha vermelha). Nesse sistema, apenas uma dose é necessária, no qual a liberação do princípio ativo ocorre ininterruptamente, porém de forma gradativa. Essa gradação permite que a concentração do fármaco na corrente sanguínea seja mantida constante e dentro da zona terapêutica.

O desenvolvimento desses dispositivos tem como objetivos a melhora na biodisponibilidade, a redução da toxicidade e como consequência o aumento do índice terapêutico. A priori, a ideia principal de um dispositivo de liberação controlada é proteger o fármaco e por isso eles são encapsulados em diferentes matrizes, sendo estabelecido para isso diferentes mecanismos de retenção, que incluem a imobilização do fármaco em nanopartículas, solubilização, conjugação ou mesmo adsorção (BIZERRA; SILVA; BRUSCHI et al., 2006; LANZILLOTTI, 2012). Esses mecanismos dependem inteiramente das propriedades da molécula farmacologicamente ativa, tais como solubilidade, absorção (cutânea), rotas de aplicação. Dessa forma há um interesse particular em utilizar materiais nanoparticulados para o desenvolvimento de carreadores de fármacos, destacando-se lipossomas, nanopartículas lipídicas, micelas e as nanopartículas poliméricas (OTA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2014 SOPPIMATH et al., 2001).

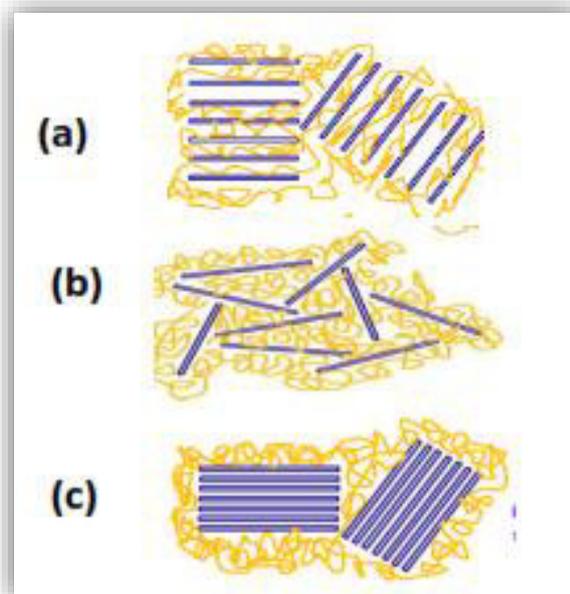
De todas as matrizes desenvolvidas para liberação de fármacos citados anteriormente, os materiais biopoliméricos tem sido extensamente explorado, uma vez que se mostram versáteis, abrangem a ação de fármacos em tecidos específicos do organismo, através do transporte teleguiado (sendo eles direcionados para regiões inflamadas ou com células tumorais) (RUIZ-HITZKY et al., 2010; ZAFAR et al., 2016), esses sistemas podem ser aplicados também em áreas de regeneração tecidual suportando moléculas modelo. Esses sistemas podem ainda ser melhorados, quando agregados a híbridos de sólidos lamelares, formando assim um sistema bionanocompósito.

2.2. BIONANOCOMPÓSITOS

Com os intensos esforços em diversas áreas de pesquisa como química, engenharia de materiais, farmácia e o conhecimento à cerca das propriedades da matéria, hoje é possível desenvolver materiais com propriedades estruturais únicas,

com características biodegradáveis; de baixo custo e com infinitudes de aplicações. Entre a grande variedade de materiais sintetizados que se utilizam de propriedades nanométricas, os sistemas *bionanocompósitos* merecem lugar de destaque, principalmente pela versatilidade de suas aplicações. Os bionanocompósitos são materiais funcionais, oriundos da combinação de sólidos inorgânicos, tais como argilas e hidróxidos duplos lamelares e espécies orgânicas, como os biopolímeros. A característica nanométrica (10^{-9} m) desse material é adquirida da interação entre a região nano existente nos sólidos inorgânicos, utilizados para a formação do bionanocompósito (DARDER et. al., 2005). No caso de sistemas lamelares, é possível obter diferentes interações entre as partes nanométricas e os polímeros, sendo possível obter materiais com diferentes propriedades mudando-se apenas fatores de síntese, como por exemplo: o tempo de contato entre o biopolímero e o sólido lamelar, as mudanças de pH do meio também colaboram para a formação de materiais com características diferentes, temperatura, etc. As diferentes formas em que um sólido lamelar pode interagir com um polímero são observadas na **Figura 2** e são explicadas por Barik & Badamali (2007):

Figura 2. . Sistemas bionanocompósitos, apresentando diferentes formas de interação entre o sólido lamelar e o biopolímero.



Adaptado de Barik & Badamali (2017).

(a) **Intercalação**- onde as moléculas biopoliméricas interagem com as regiões interlamelares do sólido, mantendo a estrutura lamelar do mesmo. Esse

processo pode ocorrer através da mistura mecânica entre as duas fases, ou mesmo pela interação de grupos funcionais presentes no biopolímero com a parte carregada negativa ou positivamente desse sólido.

(b) *Exfoliação*- processo no qual há perda da estrutura lamelar do sólido com a presença do biopolímero no sistema.

(c) *Fases dispersas*- a interação entre o sólido lamelar e o biopolímero é apenas superficial, não interferindo diretamente nas características de intercalação do sólido. Este último é mais observado em sistemas bionanohíbridos de liberação controlada de fármacos, onde o sólido contendo um fármaco previamente intercalado é misturado a um ou mais polímeros formando uma blenda biopolimérica.

A partir de um novo material bionanocompósito é possível listar as principais propriedades que são melhoradas com a obtenção desse sistema e direcionar suas aplicações para diferentes áreas. Por isso a obtenção de uma matriz de bionanocompósito se torna ainda mais interessante quando aplicadas, tendo em vista que a adição de um sólido inorgânico, pode aumentar significativamente as propriedades de barreira, diminuir o caráter hidrofílico de moléculas farmacologicamente ativas, sendo então, materiais extremamente úteis na biomedicina. Entretanto, o perfil desses materiais e suas pretendidas propriedades estão ligadas a matrizes utilizadas para a obtenção de um sistema bionanocompósito, no caso deste trabalho, será focado em dois tipos distintos de sólidos inorgânicos e fases biopoliméricas, como será descrito a seguir.

2.2.1. Matrizes biopoliméricas

As matrizes biopoliméricas utilizadas para obtenção de sistemas bionanocompósitos são abundantes na natureza e são provenientes de três fontes distintas: animal, vegetal e algas, sendo os polissacarídeos as espécies mais comumente utilizadas. Os biopolímeros se destacam também por sua versatilidade, uma vez que podem ser obtidos materiais processados como espumas, filmes, esferas de caráter biodegradável e biocompatível.

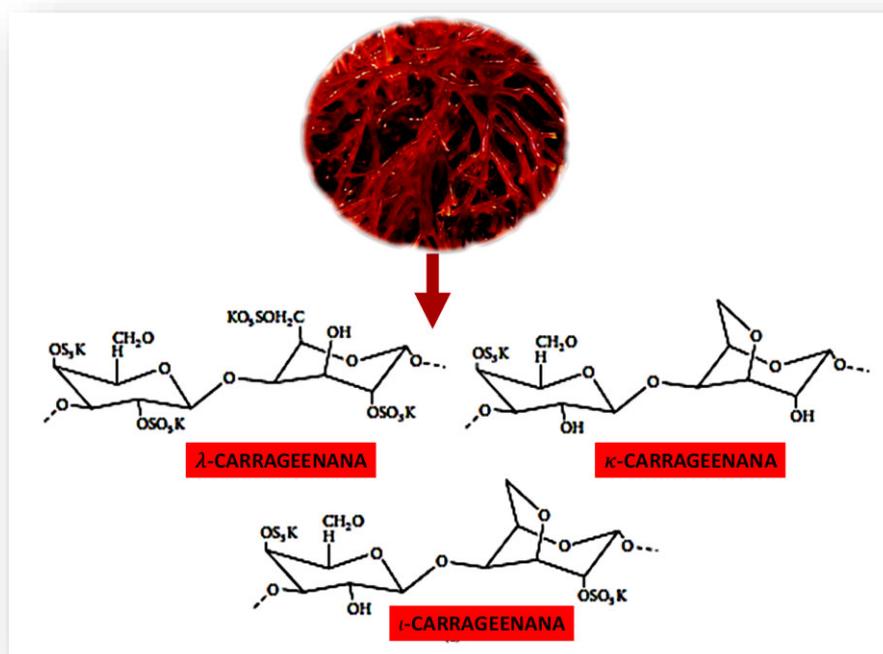
A) Carrageenanas

As Carrageenanas são biopolímeros aniônicos obtidos da extração de algas vermelhas. Esse polissacarídeo possui grupamentos sulfatados em sua estrutura, e

dependendo do número e posição desses grupos, três carrageenanas principais podem ser identificadas: iota (i) -, kappa (k) e lambda (λ)-carrageenana (**Figura 3**). As carrageenanas

são comumente utilizadas na indústria alimentícia como estabilizantes e clarificantes de bebidas, entretanto devido a sua biodegradabilidade e não-toxicidade este polímero vem sendo explorado na área biomédica em sistemas implantados (*scaffold*) ou como sistemas de liberação controlada, muitas vezes combinado com outros polímeros como alginato, carboximetilcelulose (SELVAKUMARAN et al., 2016; SHARMA et al., 2013; ZIA et al., 2016).

Figura 3. Espécies de carrageenana.



Adaptado de Khan et.al (2017)

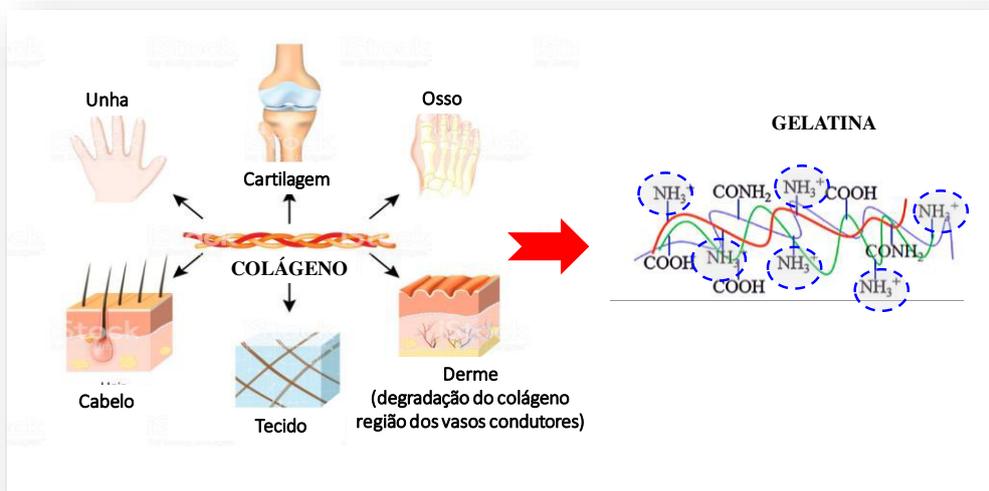
B) Gelatina

Gelatinas são biopolímeros proteicos extraídos da pele de animais e obtidos através do processo controlado de hidrólise do colágeno (Figura 4). Sua estrutura é basicamente composta de aminoácidos mudando-se apenas a composição e a posição dos grupos funcionais conforme a origem dessa proteína, podendo ser ela bovina, conhecida como tipo B, ou suína, denominada gelatina tipo A (DUCONSEILLE et al., 2015). Gelatinas de pele bovina e suína são amplamente utilizadas na fabricação de

alimentos, porque as fontes são mais abundantes e animais de pequeno porte mesmo ricos em colágeno, não supririam a demanda de consumo (HAFIDZ, 2011).

As características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bem como sua origem biológica fazem da gelatina um biopolímero de custo relativamente baixo, fazendo com que amplie suas aplicações, principalmente na biomedicina. Nos campos da medicina e farmácia, a gelatina tem sido utilizada como curativos de cicatrização de feridas, partes de ferramentas biomédicas e cirúrgicas, bem como transporte de moléculas de fármacos (KEVADIYA et al., 2014).

Figura 4. Fontes de colágeno (esquerda) e estrutura da gelatina (direita).



Fonte: Shutterstock.com, Araújo (2019).

2.2.2. Sólidos Inorgânicos Lamelares

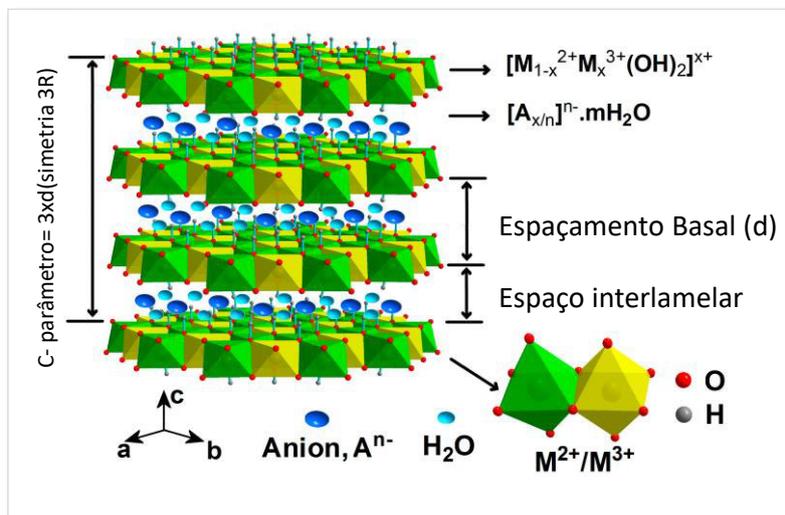
A) HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES- HDL

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL), ou compostos do tipo hidrotalcita são considerados por alguns autores como “argilas aniônicas” (**Figura 5**), sendo que as hidrotalcitas são argilas aniônicas naturais, que contém ânions carbonatos intercalados entre as lamelas de hidróxido duplo lamelar de magnésio e alumínio (CREPALDI; VALIM, 1998). Ainda que os hidróxidos duplos lamelares não sejam abundantes na natureza, eles podem ser facilmente sintetizados em laboratório, pois, possuem um baixo custo de síntese (WU et al., 2018). Esses compostos são representados pela seguinte fórmula:



Onde o M y M' são íons metálicos e An⁻ é o ânion interlamelar.

Figura 5. Representação esquemática da estrutura do HDL.



Fonte: Li, Miras e Song (2017)

Os HDLs possuem estrutura similar a Brucita ($Mg(OH)_2$). Porém, neste caso, a substituição isomórfica do Mg^{2+} por cátions di e trivalentes (como por exemplo Al^{3+}) em suas camadas, geram um excesso de carga positiva, no qual é compensada pela introdução de ânions em seus espaços interlamelares. Esses hidróxidos duplos lamelares podem ser sintetizados de diferentes formas, como descrito a seguir:

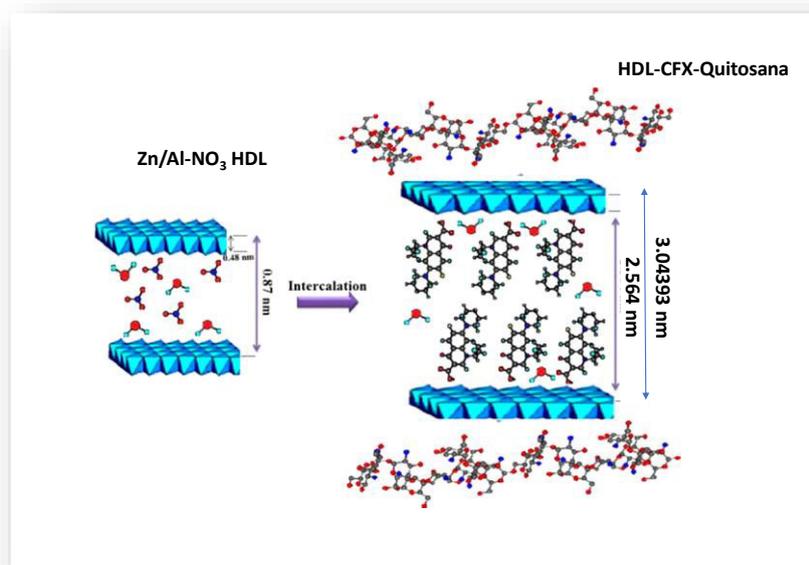
- *Método de co-precipitação:* é um dos métodos mais reproduzidos, por considerar as relações molares entre os cátions di e trivalente ao preparar uma solução, de forma que esses íons sejam adicionados simultaneamente em uma solução contendo o ânion a ser intercalado. O pH desse tipo de síntese é controlado com a adição constante de uma solução alcalina.
- *Método de Troca Iônica:* a síntese de um novo HDL pode ser realizada por processo de troca iônica, onde um hidróxido duplo lamelar é colocado em contato com uma solução contendo o íon de troca, esse processo ocorre pelas propriedades eletrostáticas exercida pela estrutura do HDL carregada positivamente, e os ânions que se querem intercalar nas regiões interlamelares do sólido.
- *Método de reconstrução:* semelhante ao método de troca iônica, o método de co-precipitação utiliza-se de um HDL preparado previamente, neste caso, porém, o sólido em questão será calcinado a uma temperatura elevada, a

fim de obter óxidos do material. Aos serem colocados em contato com uma solução aquosa contendo o ânion que se deseja intercalar, a estrutura desse material volta a se hidratar, adquirindo novamente a estrutura de um HDL agora contendo novos ânions intercalados. Esse fenômeno é conhecido também como *efeito memória*.

Além dessas formas de síntese comumente utilizadas, os HDLs podem passar por diferentes otimizações dentro desses processos, como uso de temperatura durante ou após a formação do sólido, variação do pH básico da síntese, tempo, são alguns fatores que podem influenciar diretamente na qualidade no HDL obtido (ROJAS, 2015).

Devido ao excesso de carga positiva na lamela, são necessários ânions compensadores de carga na região interlamelar, sendo esta propriedade um dos principais fatores para o uso de HDLs como suporte para moléculas orgânicas (RIVES; DEL ARCO; MARTÍN, 2014), formando assim um sistema híbrido inorgânico-orgânico. A **Figura 6** indicada abaixo representa esquematicamente a possibilidade de formação um híbrido de HDL com antibiótico ciprofloxacino, obtendo-se o híbrido HDL-CFX, posteriormente encapsulado no biopolímero quitosana:

Figura 6. Esquema de preparo do híbrido HDL-CFX encapsulado em quitosana.



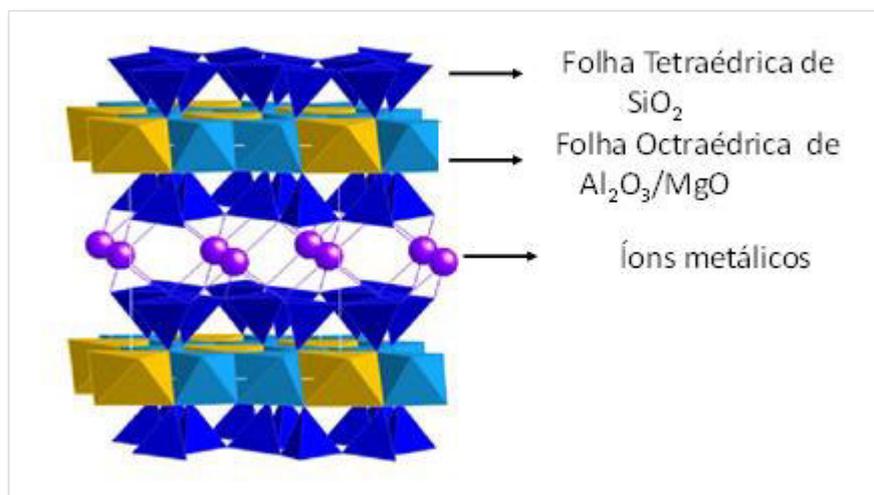
Fonte: Rezvani & Shahbaei (2015).

O ajuste de moléculas orgânicas nas regiões interlamelares de HDL é intensamente estudado pela comunidade científica, principalmente na obtenção de híbridos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos. Esses híbridos compostos por moléculas de fármacos quimicamente ativos são uma nova forma de garantir a proteção dessas moléculas em diferentes meios, principalmente na passagem pela região gastrointestinal, bem como manter os níveis de fármacos no organismo nos limites mínimos de concentração efetiva e abaixo dos níveis de concentração de toxicidade (CUNHA; FERREIRA, CONSTANTINO, 2010; CHOI, CHOY, 2011;) (CHOI; CHOY, 2011) Outro fator positivo para o uso de HDL como suporte de moléculas de fármacos, é a resposta do sistema formado frente as análises *in vitro* e microbiológicas, esses estudos já foram aplicados em diferentes fármacos como antibióticos, anti-inflamatórios, antidepressivos (LI et al., 2004; XU et al., 2016), no qual é possível observar como resultados uma perceptível melhora na resposta de liberação quando comparados ao processo convencional.

B) MONTMORILLONITA

A montmorillonita é um argilomineral do grupo das esmectitas, possui fórmula estrutural $(\text{Na})_{0.33}(\text{Al}, \text{Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Sua estrutura é do tipo 2:1 onde são compostas por camadas estruturais constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica e uma folha central octaédrica de alumina, unidas entre si por átomos de oxigênio comum a ambas as folhas (RUIZ-HITZKY et al., 2010) (**Figura 7**). A montmorillonita sódica (contendo cátions sódio na região interlamelar) é a mais empregada para preparações de bionanocompósitos para as mais diversas aplicações, devido à sua tendência de expandir na presença de água e por apresentar elevada capacidade de troca iônica (70 – 100 mEq /100 g de argila) e superfície específica.

Figura 7. Representação esquemática de um cristal de Montmorillonita.



Fonte: próprio autor, Software: CrystalMaker

As características apresentadas favorecem sua combinação com moléculas e macromoléculas na preparação dos mais diversos materiais híbridos, resultando em sistemas nanoestruturados para diferentes aplicações. Neste contexto, compostos híbridos podem ser preparados por reações de troca iônica, onde os cátions interlamelares são deslocados por compostos orgânicos, carregados positivamente ou inclusive neutros, tais como fármacos na preparação de sistemas de liberação (ARISTILDE et al., 2016; KEVADIYA et al., 2014; RAPACZ-KMITA et al., 2017).

2.3. FÁRMACOS

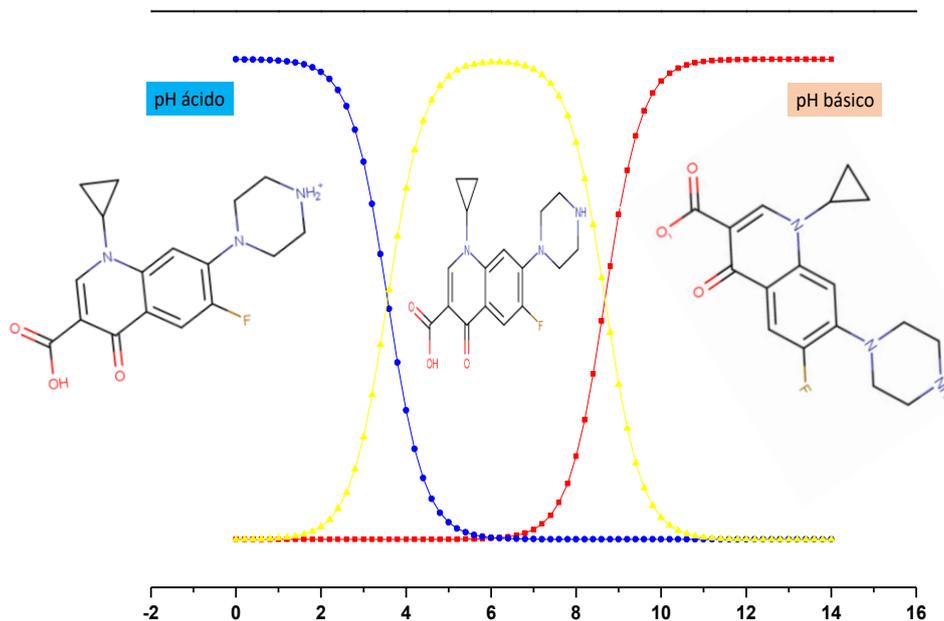
2.3.1. Antibiótico: Ciprofloxacino

A descoberta do efeito de antibióticos no combate a atividade de microrganismos patogênicos que podem incapacitar ou matar seres humanos e animais tornou-se um marco na medicina. O uso da penicilina foi efetivo para revolucionar os princípios terapêuticos utilizados no tratamento de doenças infecciosas. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Ao longo dos anos e com o crescimento da indústria farmacêutica, esse antibiótico e derivados da mesma classe clínica (b-lactâmicos) foram sendo substituídos ou associados a outra classe de antibióticos, as **fluoroquinolonas**. As fluoroquinolonas são apontados como os únicos agentes antimicrobianos sintéticos capazes de competir com as b-lactâmicas em uso clínico, uma vez que invariavelmente são utilizadas em tratamentos contra bactérias resistentes

a essa classe de antibióticos (APPELBAUM; HUNTER, 2000). Desse grupo em específico, destaca-se o uso da **ciprofloxacino**, dentro de suas propriedades farmacológicas é reconhecidamente eficiente em diferentes tratamentos terapêuticos.

O ciprofloxacino é considerado um eficiente antibiótico da classe das fluoroquinolonas, caracterizada principalmente dentro do aspecto química por possuir em sua estrutura grupos amino e carboxílicos que lhe conferem propriedades zwitterionicas (adquirindo aspecto ácido ou básico dependendo do pH) (EL-GAMEL; HAWASH; FAHMEY, 2012; MOHAMED, 2005). A presença desses grupos funcionais garante que dentro de uma faixa de pH coexistam espécies aniônicas e catiônicas, como pode ser observado na (**Figura 8**), a medida que se altera o pH, o percentual de espécies zwitterionicas vão se alterando, quando mais ácido o pH, mais espécies protonados de ciprofloxacino são formadas, da mesma forma ocorre para pH básico, que neste caso formam-se preferencialmente estruturas carregadas negativamente. O ponto isoelétrico desse fármaco é próximo de 7,0, logo a existência de moléculas carregadas é praticamente nula, o que diminui significativamente a solubilidade desse fármaco nessa região de pH.

Figura 8. Perfil de microespecies de ciprofloxacino com a variação do pH.



Fonte: Marvin Sketch.

No aspecto prático esse antibiótico constitui uma das principais escolhas na terapia de infecções urinarias e diarreias bacterianas. Seu espectro de ação se torna ainda mais abrangente quando este é utilizado de forma alternativa para tratamentos de

doenças sexualmente transmissíveis e periodontites (infecções na região bucal e gengival).

Com base nestas premissas, o presente trabalho apresenta como proposta o desenvolvimento de um bionanodispositivo capaz de modular as taxas de liberação de um fármaco, tendo em vista uma liberação controlada que permita uma concentração adequada de fármaco na corrente sanguínea. Como proposta, se propõe proteger a molécula farmacológica de interesse, neste caso o antibiótico ciprofloxacino, através da intercalação dela em sólidos lamelares com propriedades de troca iônica, de origem natural, como a Montmorillonita, ou sintética, tal como os hidróxidos duplos lamelares. Esses sólidos já apresentaram resultados positivos como sistemas carreadores de fármacos, principalmente quando comparados formulações farmacêuticas convencionais (OLIVEIRA, 2018, REBITHSKI,2019). Desejando que este material obtido tenha características biocompatíveis e biodegradáveis, propõe-se ainda utilizar polímeros naturais como polissacarídeos e proteínas a fim criar um sistema bionanocompósito, que possa proteger o material híbrido argila-fármaco resultante, permitindo que ele seja processado como esferas para uma proposta de administração por via oral.

Capítulo III

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas bionanocompósitos a base de híbridos de sólidos inorgânicos lamelares e biopolímeros a base de polissacarídeo e proteína, para a liberação do fármaco ciprofloxacino para administração oral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar na superfície lamelar de sólidos inorgânicos montmorillonita e hidróxidos duplos lamelares, o fármaco ciprofloxacino, para formação do híbrido sólido inorgânico-fármaco (SI-CFX);
- Caracterizar as diferentes etapas do processo (formação do sistema híbrido SI-CFX, biopolímero/SI-CFX, através de técnicas físico-químicas de análise de materiais (DRX, IV-ATR, TG, MEV, CHN, RMN ¹³C);
- Obter esferas biopoliméricas a base de i-carrageenana: gelatina (i-CARR: GEL), incorporando o fármaco ciprofloxacino direto ou previamente imobilizada em um sólido inorgânico do tipo lamelar;
- Caracterizar as esferas obtidas através de técnicas físico-químicas de análise de materiais (IV-ATR, MEV);
- Avaliar a quantidade e eficiência de encapsulamento do fármaco incorporado ao bionanodispositivo formando;
- Avaliar a liberação do fármaco ciprofloxacino incorporado somente na matriz biopolimérica, bem como em um sistema bionanocompósito, em um estudo comparativo de ambos os materiais nos quais serão processados como esferas;
- Comparar os sistemas obtidos com uma matriz convencional de liberação de fármaco.

Capítulo IV

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as etapas para a formação dos sistemas bionanodispositivos de interesse.

4.1. REAGENTES

São apresentados na **Tabela 1** os reagentes e precursores utilizados nesse trabalho para formação dos sistemas de liberação, incluindo a procedência e seus respectivos graus de pureza.

Tabela 1. Reagentes utilizados nas sínteses de materiais utilizados nesse trabalho bem como em outros experimentos.

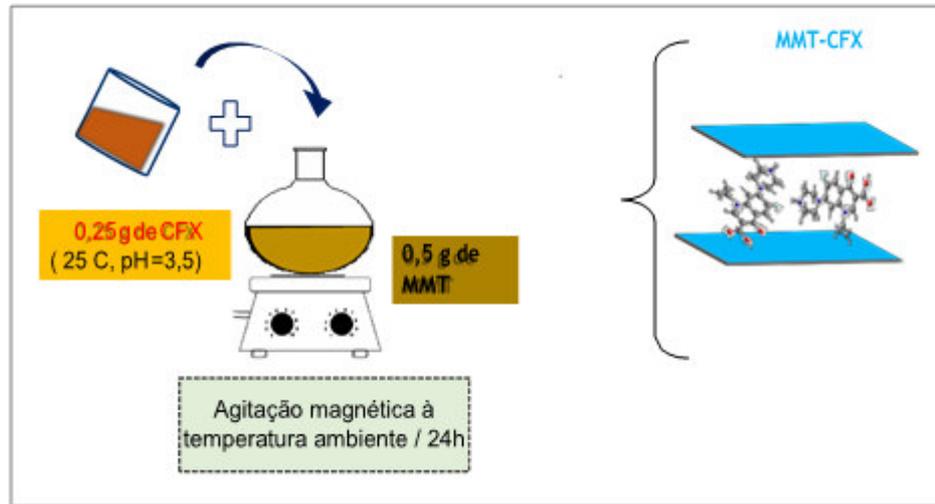
Reagentes	Fórmula	Procedência	Pureza (%)
Ciprofloxacino	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	Sigma-Aldrich	>99
Cloreto de Alumínio hexahidratado	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich	>99
Cloreto de Cálcio	$CaCl_2$	Isofar	
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$	Isofar	
Gelatina	-	Sigma-Aldrich	--
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	Merck	>99
Iota-Carrageenana	-	Sigma-Aldrich (type ii)	--
Montmorillonita	$(Na)_{0,33}(Al, Mg)_2(Si_4O_{10})(OH)_2 \cdot nH_2O$	Southern Clay Products(USA)	--

4.2. PREPARO DO MATERIAL HÍBRIDO MONTMORILLONITA-CIPROFLOXACINO (MMT-CFX)

O preparo do híbrido contendo o fármaco foi realizado da seguinte maneira: 0,25 g do fármaco foram adicionados em 25 mL de água deionizada, deixado em ultrassom por 30 minutos, a fim de obter uma maior fração do fármaco solubilizado. Em seguida pesou-se 0,5 g do argilomineral montmorillonita, o qual foi disperso em 25 mL de água deionizada por 30 minutos. Após essa etapa, a suspensão contendo o fármaco foi adicionada a dispersão do argilomineral previamente preparada, o qual permaneceu em agitação por 24 horas à

temperatura ambiente. O pH do sistema foi reduzido a pH 3,5, para possibilitar a protonação das aminas do fármaco. Passado as 24 horas, o material foi centrifugado e lavado com água deionizada e seco em estufa a 60 °C por uma noite (Erro! Fonte de referência não encontrada.).

Figura 9. Representação esquemática da obtenção do híbrido MMT-CFX.

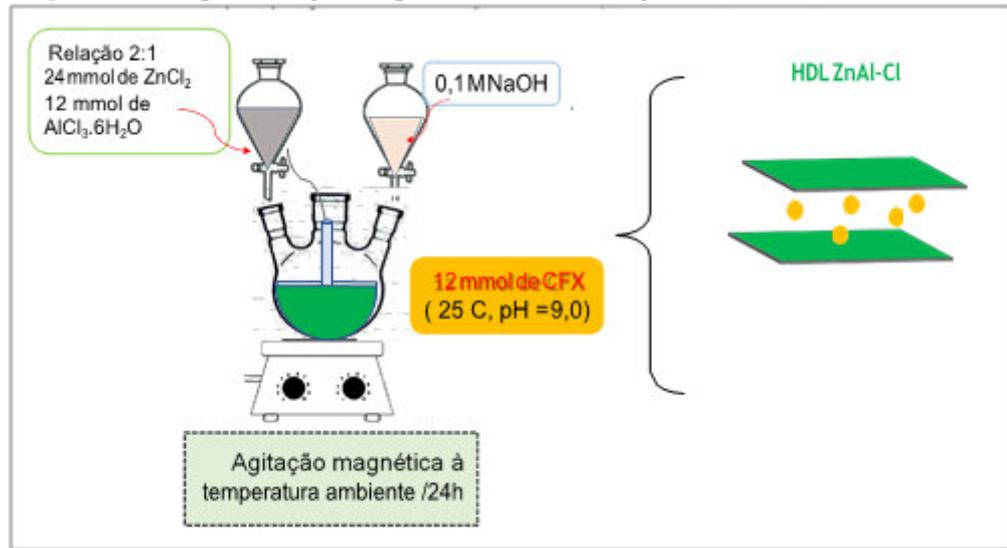


Fonte: Autor-Próprio (2019).

4.3. PREPARO DO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR HDL ZNAL-CL

O hidróxido duplo lamelar de ZnAl-Cloreto [$Zn_{0.67}Al_{0.33}(OH)_2$] (Cl^-) $_{0.33 \cdot nH_2O}$]n a proporção de 2:1 (Zn: Al), o sólido foi preparado pelo método de co-precipitação, a partir da combinação de 3,40 g (25 mMol) de $ZnCl_2$ e 3,02 g (12,5 mMol) de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ dissolvida em 250 mL de água deionizada. A solução contendo os metais foi transferida para um balão de separação a fim de ser adicionada lentamente via gotejamento a um balão contendo 250 mL de água deionizada e descarboxada. Em seguida, iniciou-se a adição da solução dos sais metálicos em agitação constante e à temperatura ambiente, mantendo-se o sistema sob atmosfera inerte através da imersão de uma agulha conectada ao cilindro de argônio, com o monitoramento do pH a 9,0 com adição de uma solução 0,1 mol/L de NaOH, como observado na (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática da obtenção do HDL ZnAl-Cl.



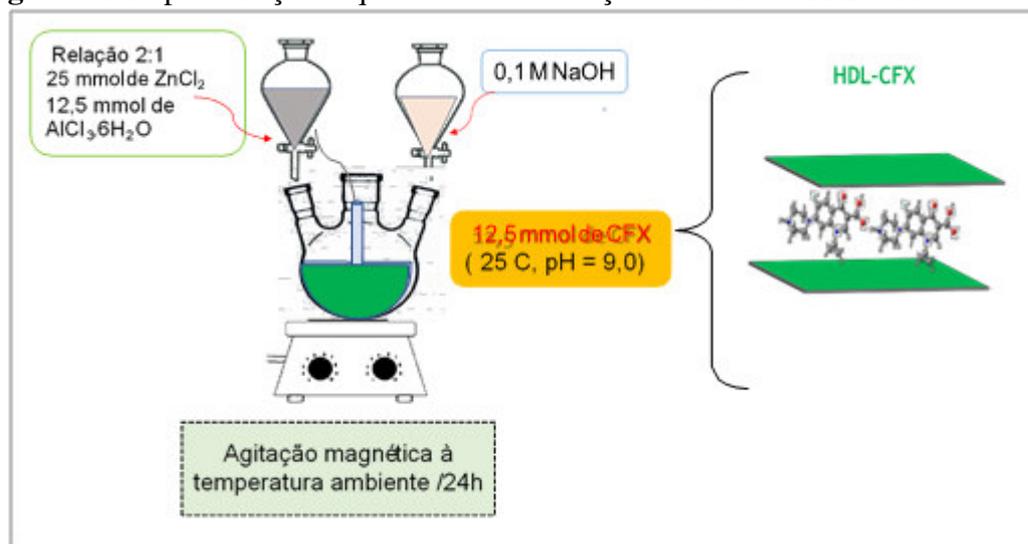
Fonte: Autor-Próprio (2019).

4.4. PREPARO DO MATERIAL HÍBRIDO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR-CIPROFLAXACINO (HDL-CFX)

Para preparação do híbrido HDL-CFX, foi utilizado um método análogo a obtenção do HDL puro (item 4.3), só que nessa nova síntese foram mudados alguns parâmetros para a obtenção desse híbrido, que é descrita abaixo:

Foi preparada uma solução de 250 mL contendo 12,5 mMol e 25 mMol de sais metálicos de alumínio (AlCl₃.6H₂O) zinco (ZnCl.6H₂O) respectivamente, que posteriormente foi transferida para um balão de separação. Em um outro balão de separação foi adicionada uma solução aquosa de NaOH (0,1 mol/L). Uma solução de 250 mL contendo 12,5 mMol de ciprofloxacino foi preparada e ajustada a um pH 9,0, e foi posteriormente transferida para um balão de fundo redondo e ajustada para receber o gotejamento das soluções de metais (Zn²⁺ e Al³⁺) e da solução de NaOH. Em seguida, iniciou-se a adição da solução dos sais metálicos em agitação constante e à temperatura ambiente, mantendo-se o sistema sob atmosfera inerte através da imersão de uma agulha conectada ao cilindro de argônio, com o monitoramento do pH ainda em 9.0 (**Figura 11**).

Figura 11. Representação esquemática da obtenção do híbrido HDL-CFX.



Fonte: Autor-Próprio (2019).

4.5. PREPARO DO SISTEMA BIONANOCOMPÓSITO NA CONFORMAÇÃO DE ESFERAS

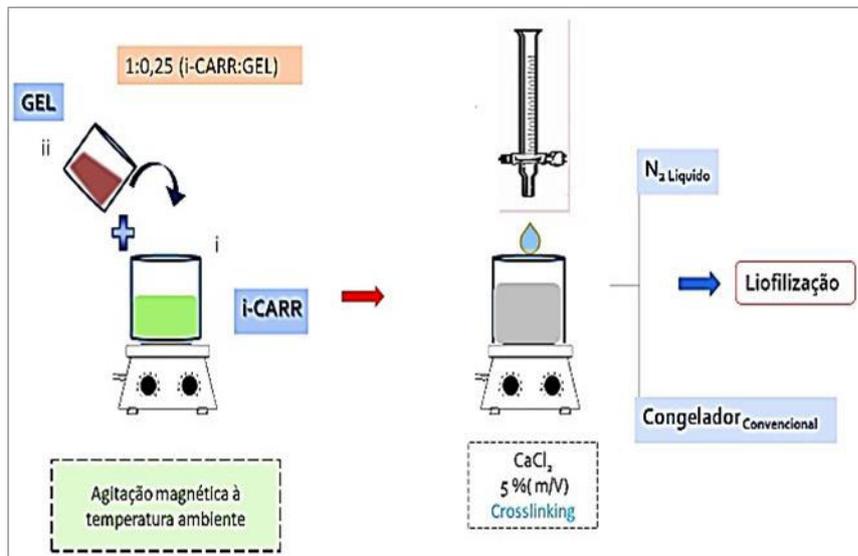
4.5.1. Preparo de esferas à base de i-carrageenana: gelatina

Para o preparo das blends biopoliméricas, manteve-se a proporção de i-carrageenana: gelatina a 1:0 e 1:0,25, no qual a concentração final de biopolímeros no sistema permaneceu igual a 1% (m/v). Inicialmente pesou-se 0,4 g de i-carrageenana, que foi solubilizado em 40 mL de água deionizada e mantido em agitação constante à temperatura de ± 70 °C. Cerca de 0,1 g de gelatina foi solubilizada em 10 mL de água deionizada e mantidos em agitação constante a temperatura de 35 °C até completa homogeneização do biopolímero. A fração contendo gelatina foi adicionada vagarosamente ao béquer contendo o i-carrageenana, já a temperatura ambiente. Posteriormente a matriz biopolimérica formada foi transferida para uma bureta e gotejada em uma solução de $CaCl_2$ (5 % m/v).

O gotejamento do sistema biopolimérico nessas soluções permite que as gotas possam adquirir conformação de esferas, garantindo estabilidade da solução hidrogel formada, esse processo recebe o nome de *crosslinking*, pela presença dos íons Ca^{2+} , que serão interagirão com os grupos sulfatados presentes na estrutura da i-carrageenana. Por fim, deixou-se envelhecer as esferas por cerca de 40 minutos nessa solução e posteriormente lavou-se com água deionizada a fim de retirar os íons Ca^{2+} residuais. As esferas obtidas passaram por diferentes processos de congelamento: uma fração delas foi mantida durante

±24 horas em congelador (-20°C), enquanto uma segunda fração foi submetida ao congelamento por N₂ líquido, após a obtenção das esferas congeladas, procedeu-se o processo de liofilização das mesmas por um período de 24 horas, como mostrado na **Figura 12**.

Figura 12. Representação esquemática do processo de síntese das esferas de i-Carrageenana: Gelatina (i-CARR: GEL).



Fonte: Autor-Próprio (2019).

4.5.2. Preparo de esferas à base de i-carrageenana-gelatina que incorporam ciprofloxacino

Para o preparo dos sistemas que incorporam o ciprofloxacino na blenda biopolimérica i-CARR: GEL, foram preparados dois esquemas: Preparou-se esferas que encapsulam diretamente o fármaco aos polímeros e também foram preparados sistemas a partir da adição do híbrido MMT-CFX ou HDL-CFX ao sistema biopolimérico:

O polissacarídeo i-carrageenana foi dissolvido em 25 mL de água deionizada, aquecida a 70°C e mantida a agitação constante. Após a atingir a temperatura ambiente, 0,1 g de gelatina foi previamente dissolvido em 10 mL de água deionizada e adicionado ao sistema. Simultaneamente uma quantidade de fármaco equivalente a 0,1g de ciprofloxacino foi previamente dissolvida em 15 mL de água deionizada e adicionada ao sistema recentemente preparado. Formando assim o sistema i-CARR: GEL/CFX.

Os sistemas bionanocompósitos foram preparados analogamente ao método descrito para a obtenção das esferas i-CARR: GEL/CFX, exceto que nesse caso, foram adicionadas

aos sistemas os híbridos MMT-CFX e HDL-CFX, utilizando para essa etapa respectivamente 0,39 g e 0,11 g desses sólidos, que equivalem a 0,1 g do fármaco ciprofloxacino.

Todas as esferas que incorporam o fármaco foram submetidas a congelamento convencional e N₂ líquido, passando posteriormente pelo processo de liofilização.

4.6. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DOS MATERIAIS BIONANOCOMPÓSITOS A BASE DE I-CARRAGEENANA: GELATINA QUE INCORPARAM O CIPROFLOXACINO

Nessa etapa do trabalho foram avaliadas algumas propriedades inerentes aos sistemas biopoliméricos a base de i-carrageenana: gelatina (esferas), tais como propriedades de absorção de água, densidade aparente, bem como características físico-químicas do sistema.

4.6.1. Determinação da quantidade de ciprofloxacino incorporada e eficiência de encapsulação na matriz i-carrageenana: gelatina

Após a encapsulação do fármaco ciprofloxacino na matriz biopolimérica i-CARR: GEL foi determinada a quantidade de fármaco incorporada e a eficiência de encapsulação. Para isso, 0,2g de esferas foram maceradas e submergidas em uma solução tampão de pH 6,8 preparada com 0,030 g de NaOH, 0,40 g de NaH₂PO₄.H₂O e 0,62 g de NaCl. O sistema foi mantido em agitação magnética por 24 horas a uma temperatura de 37°C. A fase líquida foi recuperada, sendo centrifugada por 10 minutos em 2000 rpm. O sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro UV-Vis, para determinação da quantidade de ciprofloxacino liberada. A absorbância foi medida em $\lambda=274$ nm e aplicando a lei de Lambert-Beer. A eficiência de encapsulação foi determinada a partir da diferença entre a quantidade de fármaco nas esferas e a incorporação máxima. Os resultados de porcentagem da incorporação de amoxicilina e a eficiência de encapsulação foram calculadas usando as equações (1) e (2).

$$\% \text{Fármaco incorporado} = \frac{\text{massa de fármaco encapsulado}}{\text{massa das esferas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{Eficiência da encapsulação} = \frac{\text{massa do fármaco encapsulado}}{\text{massa de encapsulamento teórico}} \times 100 \quad (2)$$

4.6.2. Determinação de absorção de água

Cerca de 0,031 g das microesferas foram submergidas em 50 mL de tampão fosfato (pH 6,8), simulando o fluido gastrointestinal e água deionizada (pH 5,9) a temperatura ambiente de ± 26 °C. Em intervalos pré-determinados, os materiais submergidos foram retirados do meio e o excesso de água foi eliminada com papel absorvente. Em seguida as microesferas hidratadas foram pesadas em balança analítica.

Os valores de absorção de água foram obtidos segundo a equação descrita por Alcântara et. al (2010):

$$\text{Absorção de água (g/g)} = \frac{P_2 - P_1}{P_1} \quad (3)$$

Onde:

P_1 é a massa inicial das esferas secos;

P_2 é a massa final das esferas hidratadas.

4.6.3. Densidade Aparente

A densidade aparente dos materiais bionanocompósitos obtidos foi avaliada seguindo o procedimento descrito por Sharma et al (2013) adaptada para sistemas esféricos. As esferas secas foram pesadas em balança analítica. Os valores equivalentes ao diâmetro das microesferas foram obtidos com um paquímetro, a fim de obter os valores referentes ao raio de uma esfera. A equação da densidade aparente é apresentada abaixo:

$$d = 3 \frac{W}{4\pi R^3} \quad (4)$$

4.7. CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL, ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

4.7.1. Difração de Raios X

Os sistemas híbridos obtidos através da intercalação do fármaco nas lamelas dos sólidos lamelares seus precursores foram caracterizados principalmente pelo aumento das distâncias basais em 2θ , no qual foi obtida por fluorescência de raios X, por comprimento de ondas dispersivo (WDXRF), modelo Miniflex, Rigaju, contendo um tubo de raios X refrigerado a água, com ânodo de Rh, janela de Berílio de 75 μm e uma tensão de aceleração máxima de 60 kV.

4.7.2. Composição Elementar

A composição elementar dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX foram calculados através de análise elementar (CHN) em equipamento Perkin-Elmer modelo 2400, da Central Analítica da Universidade de São Paulo USP.

4.7.3. Espectrometria na Região do Infravermelho (IV-ATR)

Na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho para obtenção do espectro de absorção na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} foram obtidos com o equipamento FTIR-Bomen, modelo MB serie 102.

4.7.4. Análises Térmicas

É possível monitorar a estabilidade térmica de diversos dos materiais, bem como eventos endotérmicos (fusão, perda de massa da amostra, vaporização de água, aditivos ou produtos voláteis de reação ou de decomposição) e exotérmicos (cristalização, reações de polimerização, cura, oxidação, degradação oxidativa, adsorção), mediante a transferência de calor de um forno com temperatura para a amostra a ser analisada (DSC/DTA).

As análises térmicas de TG foram realizadas em um equipamento da Netzch, acoplado a um espectrômetro de massa QMS 403 C Aeolos, utilizando cadinho de Al_2O_3 . As condições das análises foram feitas em atmosfera controlada de N_2 , na vazão de 50 mL/min a temperatura ambiente até 300 °C, para as nanopartículas e seus respectivos precursores, e até 1000 °C para os sólidos lamelares e sistemas de liberação biopoliméricos, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

4.7.5. Analise de RMN

As análises de RMN dos híbridos formados foram obtidas e o RMN padrão de ciprofloxacino foi simulada pelo software MarvinSketch.

4.8. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS BIONANODISPOSITIVOS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.

A liberação in vitro do ciprofloxacino foi avaliada suspendendo os híbridos MMT-CFX e HDL-CFX e as esferas a base de i-carrageenana: gelatina (equivalente a 10 mg de CFX). Os materiais foram colocados em 750 mL de meio que simula os fluidos gastrointestinais, mantendo a temperatura a 37 °C e 100 rpm de agitação usando o testador de

dissolução empregando o aparato 2 (pá) para a pastilha prensada do fármaco CFX puro, para as esferas de bionanocompósitos foi utilizada aparato 1 (cesta). Em intervalos de tempo pré-determinados, retirou-se uma alíquota da solução e a quantidade de CFX liberada das esferas carregadas com fármaco foi avaliada por espectrofotometria UV ($\lambda = 274 \text{ nm}$). O estudo da liberação controlada de CFX foi conduzido em condições simulando as mudanças sequenciais de pH que ocorrem durante o processo in vivo: as esferas foram mantidas por 2h em pH 1,2 (0,1 g de NaCl e 0,7 ml de HCl), atuando como fluido gástrico; depois durante 2 h a pH 6,8 (preparado adicionando 0,03 g de NaOH, 0,40 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ e 0,62 g de NaCl à solução de pH 1,2 acima mencionada), simulando a primeira zona do fluido intestinal; e finalmente durante 4 h a pH 7,4 (preparado pela adição de 1 M NaOH à solução de pH 6,8), imitando a segunda zona do fluido intestinal. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Capítulo IV

Resultados e Discussões

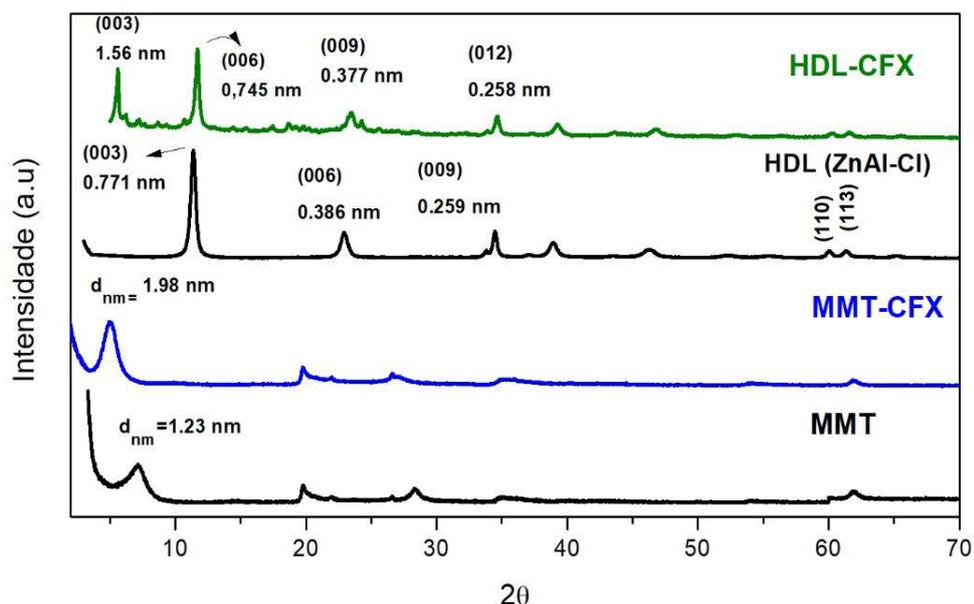
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. MATERIAIS HÍBRIDOS E BIONANOCOMPÓSITOS

5.1.1. Síntese e caracterização do híbrido MMT-CFX e HDL-CFX

Sabe-se que ambos os sólidos MMT e HDL podem ser empregados como matrizes hospedeiras para moléculas de fármacos através de mecanismos de troca catiônicas ou aniônicas, respectivamente. No caso em questão, a eventual intercalação do antibiótico ciprofloxacino (CFX) em ambos os sólidos foi explorado aproveitando-se a característica anfótero dessa molécula, que apresenta cargas positivas ou negativas, dependendo do pH (**Figura 8**). Os padrões de DRX da Montmorillonita pura (MMT), HDL e seus derivados após a reação com CFX são exibidas na **Figura 13**, onde pode-se observar claramente que a reflexão 001 da MMT pura apresenta uma distância basal inicial de 1.23 nm, deslocada para ângulos inferiores de 2θ após o processo de intercalação da molécula do fármaco CFX na região interlamelar do sólido, de valor correspondente a 1.98 nm no material MMT-CFX.

Figura 13. Padrões de difração de raios X do Montmorillonita (MMT), hidróxido duplo lamela (HDL de ZnAl-Cl) e respectivos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX



Por outro lado, através do DRX é possível confirmar a formação de HDL (ZnAl-Cl) (**Figura 13**), onde íons cloretos são incorporados como compensadores da carga apresentando as ordens racionais (003), (006), (012), (015), (018), (110) e (113). No entanto, quando este HDL é preparado na presença de uma solução contendo CFX na forma aniônica (HDL-CFX),

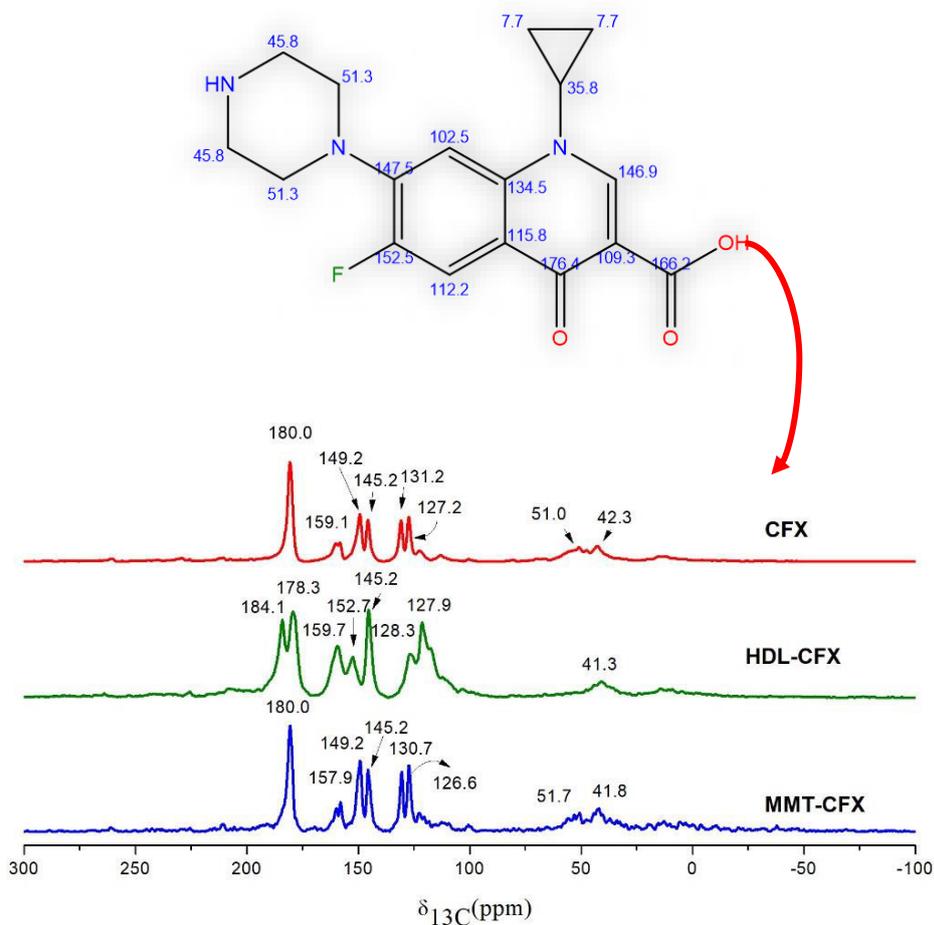
uma mudança clara na posição do pico mais intenso, atribuída ao plano de reflexão (003), em direção a ângulos inferiores de 2θ em comparação com HDL- (ZnAl-Cl) é evidenciada, confirmando a fase intercalada com CFX. Nesse caso, a distância basal resultante mudou de 0,771 nm em HDL ZnAl- Cl para 1,56 nm no híbrido HDL-CFX, sugerindo claramente a inclusão efetiva de moléculas do fármaco como o ânion compensador de carga nas camadas interlamelares do hidróxido duplo lamelar. Nesse mesmo material é possível observar picos de difração bem separados (110) e (113) em ângulos mais altos, confirmando uma estrutura lamelar bastante cristalina para esses materiais. Embora uma importante fase intercalada do fármaco tenha lugar no HDL-CFX, um pico adicional relacionado a presença de cristais CFX adsorvido na superfície externa da HDL também foram observados, bem como o pico de difração atribuído a (003) reflexão de HDL ZnAl-Cl ($d_{003}= 0,745$), indicando a presença de uma possível fase mista.

Considerando que a espessura da camada de MMT e da camada de brucita do HDL são aproximadamente 0.96 nm (Aranda e Ruiz-Hitzky, 1999) e 0.48 nm (Crepaldi e Valim, 1998), respectivamente, é possível deduzir um aumento do espaçamento basal de cerca de 0.75 nm para a MMT-CFX e 1.08 nm para HDL-CFX devido à intercalação do fármaco CFX. De acordo com as análises químicas de CHN, a quantidade de fármaco incorporadas por grama de sólidos nas lamelas foi de 76 mEq e 110 mEq de CFX para 100g de MMT e HDL, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C do antibiótico CFX e os valores correspondentes à molécula de CFX foram simuladas no software Marvin Sketch e estão apresentados na **Figura 14**. A partir disso, é possível observar sinais referentes a carbonos e grupos carboxílicos equivalentes a 175-180 ppm e são indicados por sinal de alta ressonância de CFX. Também são observados nas regiões 160, 150-145, 120-130 ppm ressonâncias correspondentes aos carbonos do anel aromático presentes na molécula do fármaco (CHATTAH et al., 2007; WU; CHEN; JIN, 2016). Dois sinais foram encontrados em 51,0 e 42,3 ppm que corroboram com a simulação e podem ser atribuídos a ligações de carbono ao nitrogênio (C-N). Todos os valores encontrados estão de acordo com aqueles simulados para a molécula de CFX no software Marvin Sketch (**Figura 14**). O espectro de ^{13}C RMN do fármaco para MMT-CFX (**Figura 14**) assemelha-se ao encontrado em CFX puro, indicando que as interações entre as lamelas do sólido e o fármaco foram semelhantes às dos prótons no fármaco puro, no entanto os intervalos de carbono de ressonância aumentaram de 51,0 e 42,3 ppm do CFX para 51,7 e 41,8 no híbrido MMT-CFX. Esses

valores correspondem as interações dos carbonos ligados aos nitrogênios presentes no fármaco, indicando uma possível mudança nas energias de ligação de C-N. Essa característica pode ter sido originada da intercalação de CFX na região interlamelar de MMT, causando uma possível interação de grupos amino protonados de CFX com as cargas negativas das lamelas de MMT. As alterações nos espectros de ressonância do HDL-CFX (**Figura14**) podem significar uma influência relativa na acomodação de CFX no espaço interlamelar do HDL, onde dois novos sinais relacionados aos agrupamentos C-O e C=O são observado sem 184,1 e 178,3 ppm, sugerindo que os principais tipos de interações com as lamelas de HDL ocorrem envolvendo os grupos carboxílicos presentes na molécula do fármaco (ROJAS et al.,2015).

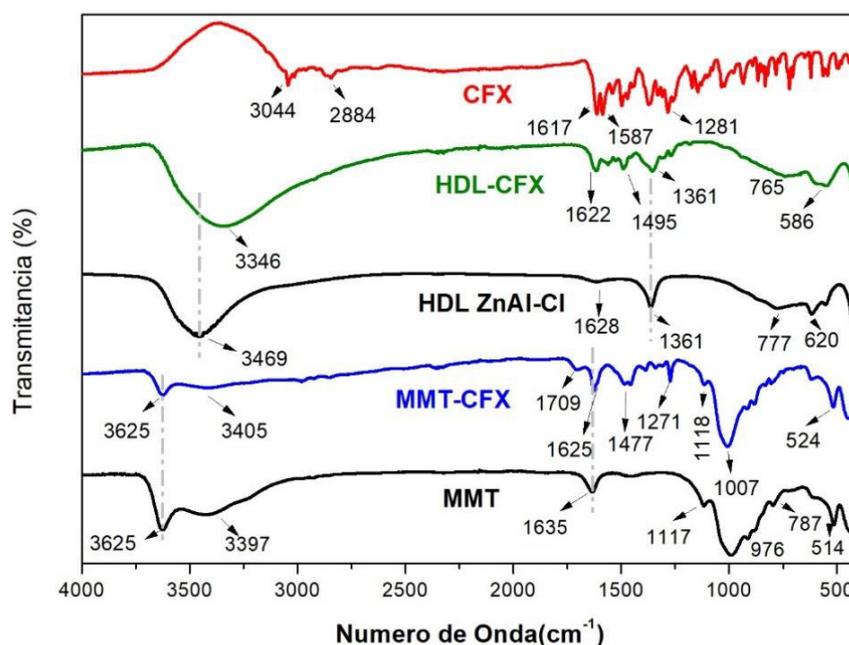
Figura 14. Simulação dos valores de ressonância do fármaco ciprofloxacino e espectros de RMN ^{13}C do fármaco (CFX) e dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.



Os espectros de infravermelho de CFX, MMT, HDL ZnAl-Cl e seus derivados são mostrados na **Figura 15**. No espectro de infravermelho de MMT, os modos de vibração característicos do silicato em camadas 2:1 são observados, onde o alongamento correspondente a OH aparece em 3625 cm^{-1} , δ_{Hoh} de moléculas de água na argila em 1635 cm^{-1}

¹, as bandas de alongamento Si-O são observadas em torno do 1100 – 990 cm^{-1} faixas de deformação atribuídas a (Al_2OH) e (MgAlOH) aparecem entre 930 e 840 cm^{-1} (BELVER et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2016). No espectro do híbrido MMT-CFX, a vibração de ambos $\nu_{\text{C-N}}$ e $\delta_{\text{N-H}}$ correspondentes aos grupos de amidas secundárias presentes no fármaco parecem ser sobrepostas pelas vibrações típicas dos modos vibracionais de moléculas de água da MMT em 1625 cm^{-1} , dificultando a interpretação de possíveis interações nesta zona espectral. Além disso, é observada uma nova banda em 1709 cm^{-1} que é atribuída aos grupos carboxilas protonados, indicando a presença de fármaco positivamente carregado intercalado em camadas da argila. Este efeito é induzido pela condição experimental (pH 3,5) que promove a estabilização da molécula de fármaco no espaço interlamelar da Montmorillonita na sua forma positiva.

Figura 15. Espectros infravermelhos (IV-ATR) para CFX, MMT, HDL ZnAl-Cl, MMT-CFX e HDL-CFX híbridos.

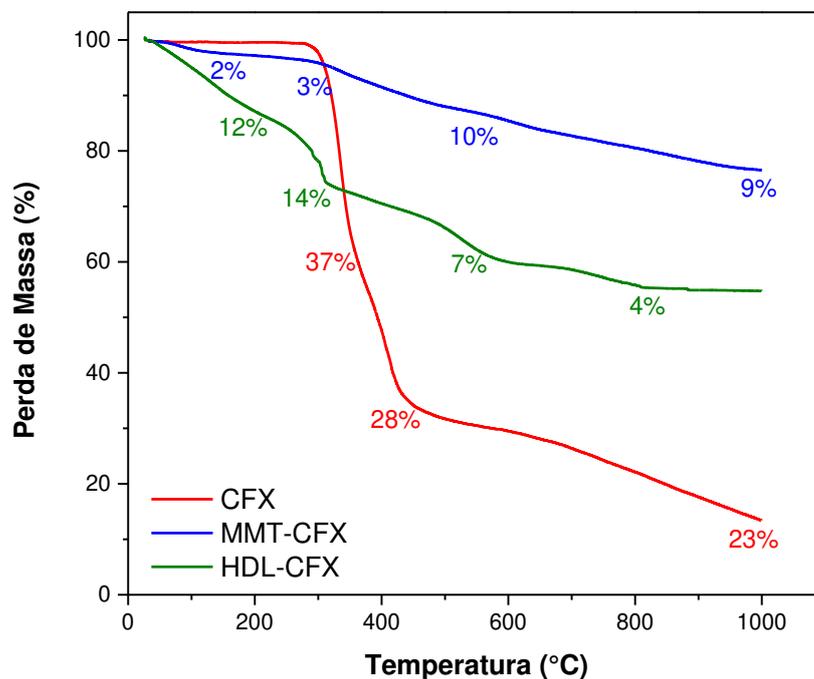


Por outro lado, o espectro HDL de ZnAl-Cl (**Figura 15**)exibe uma banda forte e ampla em torno de 3469 cm^{-1} que é atribuída à vibração de alongamento de grupos de OH das camadas de HDL e de moléculas de água na região interlamelar do sólido. A banda observada em 1361 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de alongamento simétricas de cloretos (Cl^-). Além daquelas bandas atribuídas ao HDL, no espectro do híbrido HDL-CFX, as faixas típicas que podem ser atribuídas ao fármaco intercalado, também são comparadas ao novo HDL ZnAl-Cl e seu composto híbrido, logo é possível evidenciar a presença de sinais adicionais de moléculas de CFX. Neste caso, a banda em 1620 cm^{-1} atribuídas à $\nu(\text{C}=\text{O})$ alongamento de

vibração do CFX livre é deslocado após a incorporação na matriz HDL, mostrado em 1622 cm^{-1} no material híbrido, corroborando a presença do CFX em sua forma aniônica (Rezvani & Shahbaei, 2014)

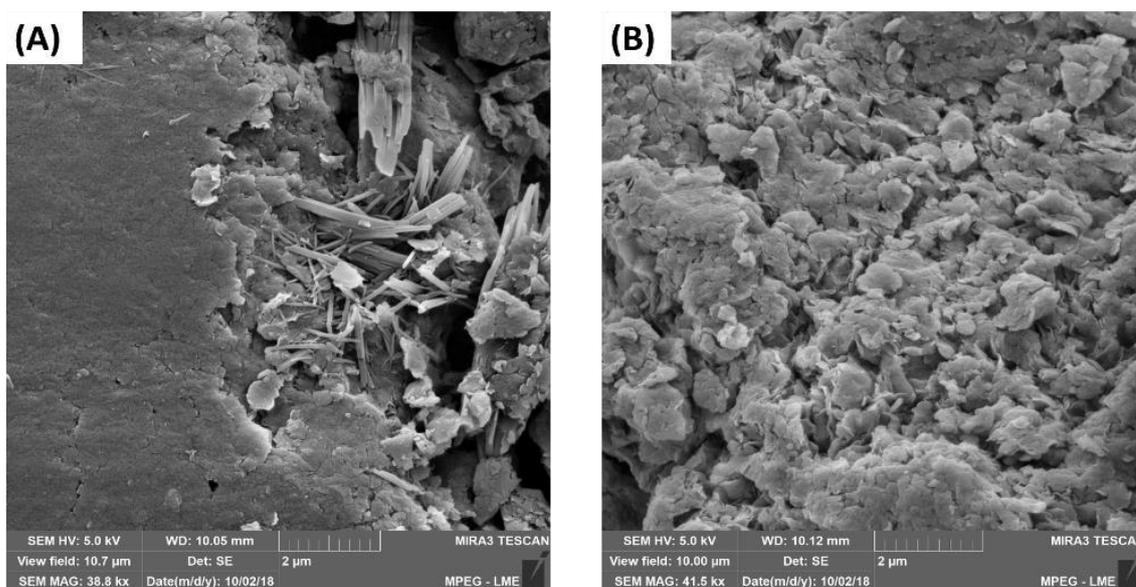
A **Figura 16** mostra as curvas termogravimétricas (TG) do fármaco ciprofloxacino (CFX) e dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX. O padrão de perda de massa de CFX apresenta decomposição em quatro etapas consecutivas. A primeira e segundo evento são observados em $273\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $380\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondem a 37% e 28% de perda de massa, respectivamente. Esses eventos são atribuídos na literatura como à decomposição e liberação de $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{H}_2 + \text{CO}]$ da molécula do fármaco (RIVERA et al., 2016). As etapas evidenciadas entre $380 - 600\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondem para a remoção do fármaco restante como $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FNO}$ da estrutura de ciprofloxacino (EL-GAMEL; HAWASH; FAHMEY, 2012). A curva de TG do híbrido MMT-CFX apresenta perdas de massa em torno de 2% em $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ devido à liberação de moléculas de água fisicamente adsorvidas no sólido lamelar. Outras três etapas de degradação são observadas em temperaturas acima $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, que pode estar relacionada com a decomposição térmica parcial da fármaco intercalada e a dehidroxilação da argila a temperaturas entre 600 e $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ (GE et al., 2015). O híbrido HDL - CFX exibe três estágios principais de decomposição térmica: o primeiro até 200 atribuídos à água fisicamente adsorvida e interlamelar presente no sólido; o segundo entre $250 - 500\text{ }^{\circ}\text{C}$ que é para a dehidroxilação das camadas HDL e decomposição parcial de CFX, seguido de decomposição final de CFX e HDL entre 400 e $780\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FRUNZA et al., 2008).

Figura 16. Curvas de TG obtidas para o fármaco ciprofloxacino (CFX), e os híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.



As imagens de MEV dos híbridos MMT-CFX (A) e HDL-CFX (B) são mostradas na **Figura 17**, a partir delas foi possível observar a morfologia dos materiais após intercalação do ciprofloxacino nos sólidos lamelares. A morfologia do MMT-CFX (**Figura 17-A**) apresenta uma região com alta concentração de cristais que podem caracterizar a presença do fármaco na superfície do sólido lamelar. Para o híbrido HDL-CFX (**Figura 17-B**) a micrografia apresenta semelhanças com híbridos de hidróxidos duplos lamelares e ciprofloxacino descritos na literatura (MUSUMECI et al., 2003), sugerindo que essa é uma morfologia típica desse tipo de híbrido.

Figura 17. Imagens de MEV dos híbridos MMT-CFX (A) e HDL-CFX (B).



5.1.2. Sistemas bionanocompósitos a base de i-Carrageenana e Gelatina

As esferas de bionanocompósitos incorporando os híbridos MMT-CFX ou HDL-CFX em uma matriz biopolimérica a base de i-Carrageenana e Gelatina (i-CARR: GEL), foram preparadas como matrizes de liberação de fármaco. Para efeito de comparação, foram obtidos também sistemas que incorporam o fármaco ciprofloxacino diretamente na matriz biopolimérica i-CARR: GEL. Todos os sistemas obtidos passaram por processo de reticulação das esferas com íons Ca^{2+} e posteriormente congeladas de forma convencional ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e por nitrogênio líquido ($-196.1\text{ }^{\circ}\text{C}$), as mesmas foram secas e passaram por processo liofilização. Os sistemas bionanocompósitos foram caracterizados mediante suas propriedades de encapsulamento, absorção de água, bem como por técnicas padrão de caracterização de materiais (IV-ATR, MEV). Por fim, foram submetidas aos testes de liberação *in vitro*, como são descritos a seguir:

A eficiência de encapsulamento e as quantidades incorporadas de antibiótico em cada sistema de liberação estão listadas na **Tabela 2**. Como esperado, a quantidade de CFX encapsulado e a eficiência de encapsulamento para os bionanocompósitos é muito semelhante quando são comparadas as esferas de mesma composição e com diferentes métodos de congelamento, uma vez que a incorporação do fármaco se realiza em um passo anterior ao congelamento. No entanto, nos sistemas em que o fármaco é previamente imobilizado numa matriz lamelar é observado valores de encapsulação superiores quando comparados aos sistemas onde CFX está diretamente associada à mistura biopolimérica. Um comportamento

similar foi relatado na literatura para o alginato-goma xantana (OLIVEIRA et al., 2017), os sistemas bionanocompósitos de alginato-zeína (ALCÂNTARA et al., 2010) ou quitosana – pectina (RIBEIRO et al., 2014a) que encapsulam olanzapina em MMT ou os fármacos ibuprofeno e 5-ASA em HDL, e tais sistemas foram mostrados para ser mais estável e compatíveis do que aqueles que encapsulam a fármaco livre.

Quando se compara os sistemas bionanocompósitos entre si, observa-se que as esferas contendo o híbrido do argilomineral montmorillonita (MMT-CFX) consegue encapsular três vezes mais a quantidade de fármaco que as esferas de bionanocompósitos contendo híbridos de hidróxidos duplos lamelares (HDL-CFX), esse perfil é apresentado, independente da forma de congelamento. Em trabalho similar encontrado na literatura realizado por Rebitski (2019), esse fenômeno também é observado, bionanocompósitos a contendo híbridos de MMT são capazes de encapsular maiores quantidades de fármaco do que aqueles bionanocompósitos a base de HDL. É possível associar esse fator a natureza desses sólidos, principalmente em relação a sensibilidade do HDL a pH ácido, que pode facilitar a saída do fármaco por difusão, ainda no processo de lavagem das esferas.

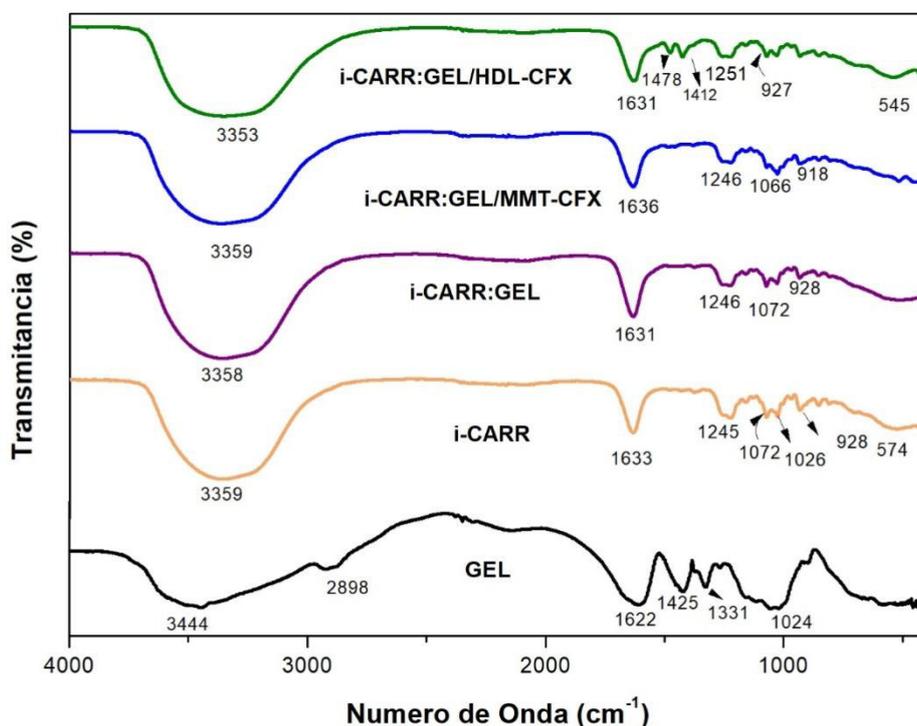
Tabela 2. Eficiência de encapsulamento e quantidade de CFX encapsulado como fármaco puro ou como MMT-CFX e HDL-CFX no sistema biopolimérico i-CARR: GEL. (Os dados são médios \pm DP, n = 3).

Método de congelação	Formulação	CFX (%)	Eficiência de encapsulamento (%)
Nitrogênio Líquido (N ₂)	i-CARR: GEL/CFX	4.61 \pm 0.29	8.92 \pm 1.19
	i-CARR: GEL/MMT-CFX	11.3 \pm 0.86	22.2 \pm 1.57
	i-CARR: GEL/HDL-CFX	9.31 \pm 0.64	18.2 \pm 0.49
Congelador Convencional	i-CARR: GEL/CFX	4,20 \pm 0.04	8.64 \pm 0.08
	i-CARR: GEL/MMT-CFX	12.2 \pm 0.47	24.5 \pm 1.8
	i-CARR: GEL/HDL-CFX	8.85 \pm 0.53	17.9 \pm 0.61

Os espectros IV-ATR dos polímeros puros e os respectivos bionanocompósitos são mostrados na **Figura 18**. Para as esferas formadas por i-carrageenana e gelatina (i-CARR: GEL), é observada uma banda atribuída ao alongamento de grupos hidroxila em 3358 cm⁻¹. Além disso, são evidenciados bandas em 928 e 1246 cm⁻¹ que podem ser atribuídas respectivamente à presença de 3, 6-anhidro-D-galactose e alongamentos de grupos sulfatados presentes nas carrageenanas (CHENG; JONES, 2017; KHAN et al., 2017). Normalmente, a banda em 1631 cm⁻¹ pode ser o resultado de uma possível sobreposição das vibrações

atribuída a $\nu_{\text{C=O}}$ e grupos amida I presentes na gelatina e COO^- dos grupos carboxilatos em i-CARR (atribuída a banda em 1622 e 1633 cm^{-1} nos espectros de gelatina pura e i-carrageenana, respectivamente), que pode estar relacionada com possíveis interações entre os grupos carboxilatos e os grupos amino protonados do polissacarídeo e a proteína, respectivamente.

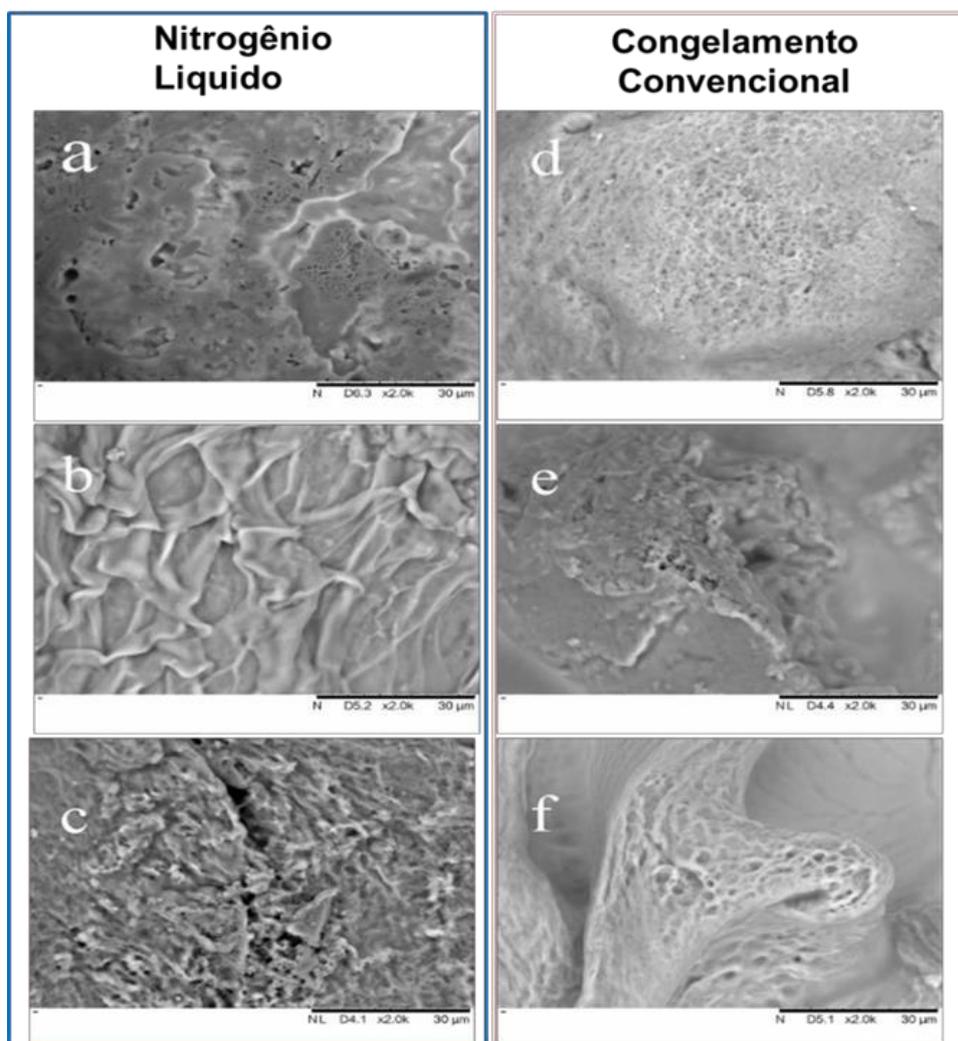
Figura 18. Espectros na região do infravermelho correspondente aos biopolímeros i-carrageenana gelatina e os respectivos sistemas bionanocompósitos a base dos híbridos MMT-CFX e HDL-CFX.



As esferas de bionanocompósitos à base de i-CARR:GEL obtido por diferentes métodos de congelamento são visualizados por MEV (**Figura 19**). As imagens mostraram que todos os sistemas apresentam aspecto rugoso e homogêneo, independentemente da presença do composto de intercalação. No entanto, uma mudança clara na morfologia é evidenciada quando há mudança no método de congelamento (nitrogênio líquido ou congelador convencional). Neste caso, observa-se que as esferas puras de i-CARR: GEL preparados a partir de N_2 líquido mostram um conjunto de pequenos poros em sua superfície. Por outro lado, as esferas submetidas a congelamento através do congelador convencional **Figura 19.a** tem como característica a presença de uma superfície com poros maiores (**Figura 19.b**). Essa diferença na porosidade nas esferas biopoliméricas pode ser atribuída à taxa de crescimento dos cristais de gelo. No primeiro caso, a temperatura do N_2 líquido ($-196.1 \text{ }^\circ\text{C}$) é suficientemente baixa para permitir o congelamento rápido das moléculas de água, não

permitindo o crescimento indiscriminado de gelo. Por outro lado, o congelamento convencional permite que o gelo cresça lentamente, gerando cristais maiores e, conseqüentemente, uma maior estrutura porosa após a remoção da fase sólida (gelo) por liofilização. Este efeito parece ser uma tendência nas esferas bionanocompósitos, no qual a estrutura celular resultante da eliminação de cristais de gelo é mais evidente nos materiais preparados a partir do congelamento convencional (**Figura 19.e e f**) do que aqueles preparados com N₂ líquido (**Figura 19.c e d**).

Figura 19. Imagens das esferas: i-CARR: GEL/CFX (a), i-CARR: GEL/MMT-CFX (b), i-CARR: GEL: HDL-CFX (c) em N₂, i-CARR: GEL/CFX (d), i-CARR: GEL/MMT-CFX (e), i-CARR: GEL: HDL-CFX (f) em congelamento convencional.



A comparação entre as densidades aparentes dos sistemas submetidas a diferentes formas de congelamento pode ser observada na **Tabela 3**, no qual é possível notar uma significativa diferença da densidade dos sistemas encapsulando o fármaco diretamente na matriz biopolimérica, os valores de i-CARR:GEL/CFX são relativamente menores que os

sistemas i-CARR:GEL/MMT-CFX e i-CARR:GEL/HDL-CFX, chegando a ter valores de densidade aparente duas vezes maiores que as esferas que encapsulam o fármaco diretamente. Esses resultados podem indicar que a presença do híbrido na blenda biopolimérica contribui para o aumento da massa específica do sistema, esse aumento é característico desses sistemas bionanocompósitos formados.

Outra mudança perceptível nos valores de densidade aparente é notada nas esferas contendo MMT-CFX e obtidas por diferentes métodos de congelamento, essa diferença equivale a 0,015 g/cm³, a mesma característica é observada nas esferas contendo o híbrido HDL-CFX, sendo assim, esses resultados podem indicar diferentes interações entre are de biopolimérica e os híbridos, principalmente quando relaciona-se os valores de densidade aparente à quantidade de híbrido encapsulado no sistema biopolimérico.

Essa característica em particular foi reportada na literatura por Gómez- Mascaraque (2018), ao desenvolver blendas de i-carrageenana: gelatina, nesse estudo foi observado que nesse tipo de sistema biopolimérico, um extrato encapsulado pode se agregar no interior da blenda de diferentes formas, alterando significativamente algumas de suas propriedades. Logo é possível que fenômeno parecido também ocorra com sistemas bionanocompósitos.

Tabela 3. Valores de Densidade Aparente das esferas encapsulados como fármaco puro ou como MMT-CFX e HDL-CFX no sistema biopolimérico i-CARR: GEL. (Os dados são médios ± DP, n = 3).

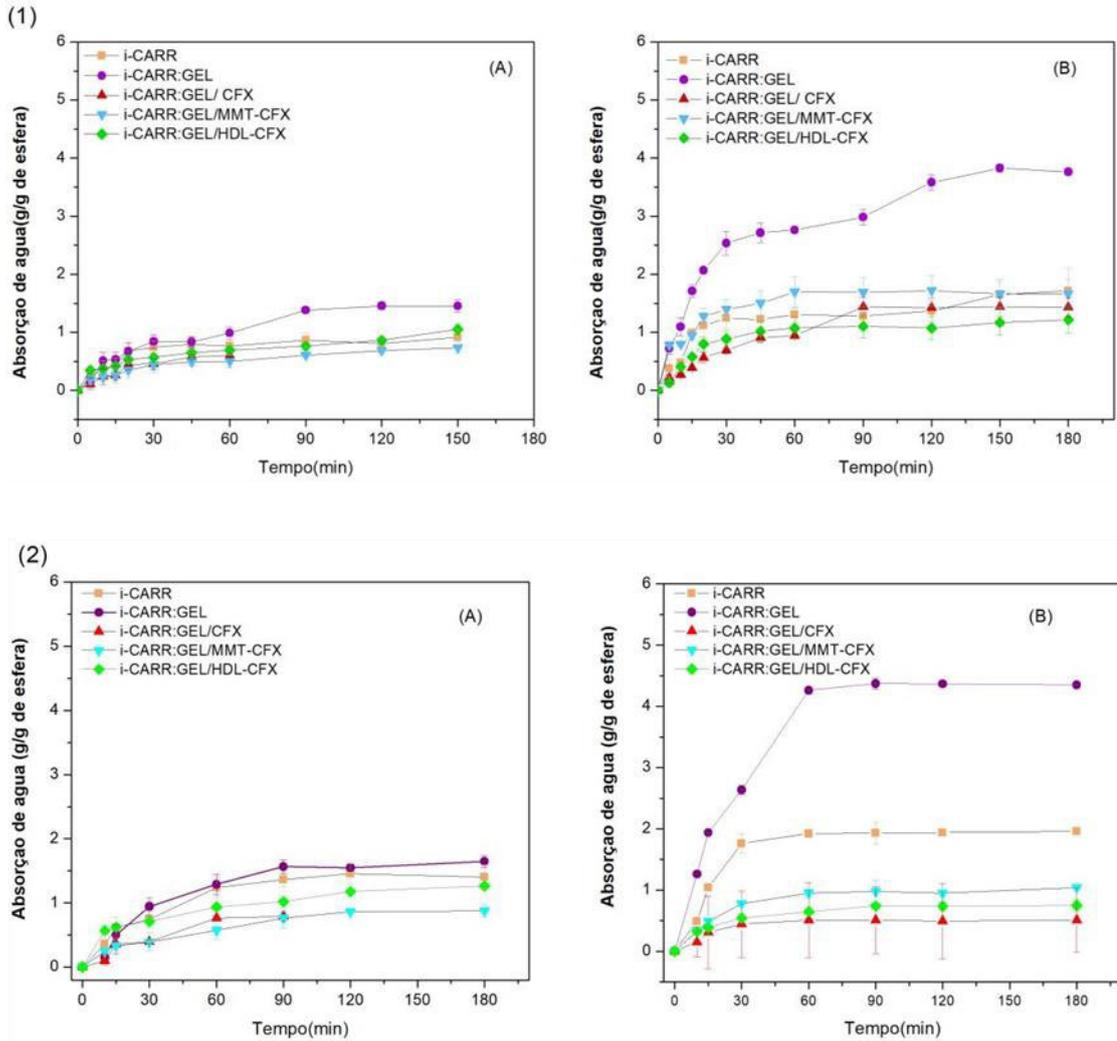
Método de Congelamento	Formulação	Densidade Aparente (DA) (g/cm ³)
Nitrogênio líquido (N ₂)	i-CARR: GEL/CFX	0,0269±0,002
	i-CARR: GEL/MMT-CFX	0,0544±0,003
	i-CARR: GEL/HDL-CFX	0,0414±0,002
Congelador Convencional	i-CARR: GEL/CFX	0,0295±0,005
	i-CARR: GEL/MMT-CFX	0,0702±0,010
	i-CARR: GEL/HDL-CFX	0,0584±0,009

A absorção de água pode desempenhar um papel importante na liberação de fármacos em sistemas bionanocompósitos porosos, uma vez que pode indicar quais sistemas são mais estáveis, bem como sua resposta a meios aquosos. Esta propriedade foi avaliada expondo as esferas obtidas a fluídos de diferentes pH, retirando-as em tempos pré-determinados. Os fluidos utilizados para observar a absorção de água pelas esferas foram água deionizada a pH 5,9 (**Figura 20-1**) e tampão fosfato a um pH de 6,8 (**Figura 20-2**).

Todas as esferas sintetizadas mostraram um aumento progressivo na capacidade da absorção de água que alcançaram valores máximos da absorção independentes da composição, meio de ensaio ou método de congelamento. Observando-se os gráficos de absorção de água dos sistemas em contato com água a pH 5,9, nota-se que o sistema i-CARR: GEL, tanto para as esferas congeladas por N₂ líquido e congelador convencional apresentaram os maiores valores de absorção de água, apresentando valores equivalentes a 1,41 g/g e 3,76 g/g respectivamente. Quando comparamos os dois sistemas entre si, observa-se que as esferas submetidas ao congelamento convencional apresentam duas vezes mais absorção de água que aquelas submetidas ao congelamento por N₂ líquido. Este comportamento pode ser associado com a alta porosidade da superfície dos materiais congelados convencionalmente em comparação com as esferas análogas preparadas a partir de N₂ líquido, como apontado nas imagens de MEV que sugeriram que a presença destes poros favorece a aceleração do processo de difusão, refletindo nas propriedades de absorção de água. Outra evidência apresentada é observada pela presença de gelatina, sendo este um polímero altamente hidrofílico, é possível associar a presença desse biopolímero o aumento significativo da absorção de água.

Quando se avalia a absorção de água no tampão fosfato pH 6,8, nota-se ainda que novamente que o sistema i-CARR: GEL continua obtendo os maiores valores de absorção de água, independente da forma de congelamento. Quando se compara os valores de absorção nesse fluido com o sistema i-CARR: GEL absorve respectivamente 1,67 g/g e 4,36 g/g (Figura 20.A e Figura 20.B), observa-se que em tampão fosfato há um relativo aumento nos valores de absorção. Esses valores corroboram com demais resultados encontrados na literatura, quando se compara esses dois fluidos (ALCÂNTARA, 2010; REBTSKI, 2019), que associam a presença de sais presentes no tampão fosfato ao aumento desse valor. Uma vez que a estrutura majoritária da blenda biopolimérica é composta de i-carrageenana, esse biopolímero possui em sua estrutura grupos (SOO⁻), que são capazes de interagir fortemente com os íons presentes na solução.

Figura 20. Absorção de água de esferas de bionanocompósitos a base de i-carrageenana-gelatina com diferentes processos de congelamento: N₂ líquido (A) e congelador convencional (B) em esfera com água deionizada pH 5,9 (1) e tampão fosfato pH 6,8 (2).



A adição do ciprofloxacino aos sistemas contribui na diminuição dos valores de absorção de água, em ambos os sistemas de congelamento (N_2 e Congelamento Convencional), e este efeito pode ser atribuída a baixa solubilidade do fármaco perto da sua região isoeletrônica ($pH \approx 7$), que pode alterar significativamente a forma como o processo de difusão dos sistemas pode ocorrer. Os sistemas bionanocompósitos i-CARR: GEL/MMT-CFX e i-CARR: GEL/HDL-CFX apresentaram comportamentos diferentes em relação ao meio de ensaio e método de congelamento empregado na preparação das esferas bionanocompósitos. Neste caso, a quantidade de absorção de água obtido pelas esferas que incorporam CFX intercalados em HDL ou MMT são significativamente inferiores em comparação com materiais análogos preparados pelos sistemas biopoliméricos i-CARR ou i-CARR: GEL, principalmente em tampão fosfato (Figura 15-2). Esse fato indica que a presença dos compostos de intercalação confere às esferas de bionanocompósitos uma melhor estabilidade química na presença de sais, e esse comportamento pode sugerir que esses sistemas biohíbridos apresentam características diferentes como sistemas de liberação de

fármacos controlados, quando comparados com sistemas semelhantes, porém apenas biopolímeros.

Quando se compara esses mesmos sistemas bionanocompósitos e suas formas diferentes formas de congelamento, observa-se que aqueles submetidos ao congelamento convencional apresentam um aumento médio de 15% nos valores de absorção de água para todos os sistemas bionanocompósitos, demonstrando novamente a influência direta que o processo de congelamento tem nas características desses dispositivos de liberação controlada.

5.1.3. Avaliação dos materiais bionanocompósitos como dispositivos de liberação controlada de fármaco

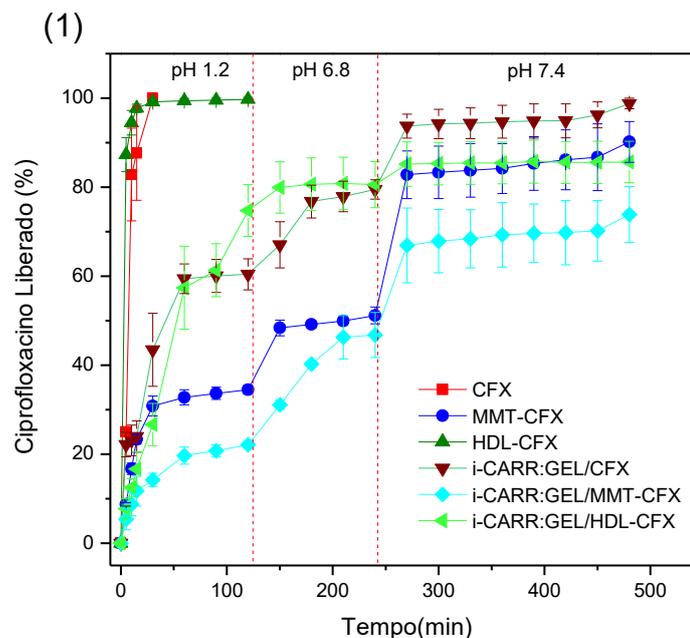
Sistemas de liberação oral baseados em i-carrageenana e gelatina foram preparados por diferentes métodos de congelamento, e os perfis de liberação de ciprofloxacino dos híbridos HDL-CFX e MMT-CFX e sistemas bionanocompósitos a base de i-CARR:GEL em diferentes pH que simulam o trato gastrointestinal a 37 ° C mais de 8h de ensaio são mostrados na **Figura 21**.

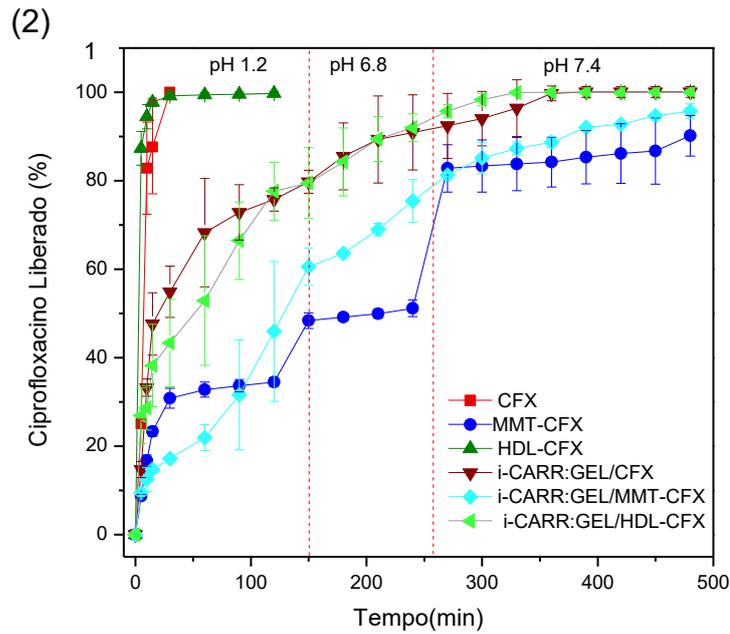
Inicialmente para avaliar a possibilidade de utilizar os híbridos HDL-CFX e MMT-CFX como sistemas de liberação controlada, utilizou-se de uma pastilha prensada de ciprofloxacino puro para simular um sistema de liberação oral. Como pode ser observado na **Figura 21**, a pastilha submetida a um tampão pH 1,2 foi completamente dissolvida no meio, apresentando 100% de liberação do fármaco para o meio nos primeiros 30 minutos da cinética de liberação, e por isso foi inviável continuar a liberação nos demais fluidos. Esse sistema se assemelha aos comprimidos de uso oral desse fármaco, e como já descrito anteriormente neste trabalho, o método convencional de liberação pode levar a perda de atividade do fármaco, devido à alta solubilidade nesse meio, a altos níveis de intoxicação, pela grande quantidade do medicamento que pode ser ingerido em curtos períodos de tempo.

O mesmo procedimento foi realizado com os híbridos HDL-CFX e MMT-CFX que também podem ser observados **na Figura 21**. A liberação do fármaco no HDL foi semelhante ao resultado obtido para a pastilha de CFX puro, alcançando valores próximos a 100% da quantidade de CFX também em torno de 30 min, apesar de não ser avaliada a perda de atividade do fármaco, é possível que esses dois sistemas tenham sua eficiência de ação reduzida até chegarem na última região gastrointestinal. Essa resposta do híbrido HDL-CFX a primeira zona gastrointestinal (pH 1.2) é explicada da seguinte maneira: hidróxidos duplos lamelares sofrem uma rápida dissolução em pHs ácidos, liberando assim o fármaco de uma

forma rápida e não controlada no organismo, dessa forma, as lamelas do HDL não são suficientes para proteger o fármaco e controlar a sua liberação, essa é uma das principais características que impedem o uso direto de híbridos de hidróxidos duplos lamelares de serem usados diretamente como sistemas de liberação oral (ROJAS, et al., 2015; ALCÂNTARA et al, 2010; REBITSKI et al, 2019). Em contrapartida, o híbrido MMT-CFX mostrou uma liberação muito mais controlada comparada ao composto HDL-CFX e o CFX pastilhados, permitindo que o fármaco fosse liberado gradativamente nos diferentes pHs que foram utilizados para simular a passagem do fármaco na zona gastrointestinal. Este comportamento está relacionado à estrutura química mais resistente das argilas, frente a fluidos gastrointestinais, não sofrendo desagregação de suas lamelas e por isso é possível observar uma lenta liberação do fármaco na primeira zona possibilitando um processo de liberação mais longo e controlado (KEVADIYA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Essa espécie híbrida formada por ciprofloxacino e montmorillonita também foi sintetizada por Kevadiya et al (2011), que apresentou resultados promissores para a utilização desse híbrido para uso tópico, com longo perfil de liberação em torno de 160 horas), o que dá ainda mais crédito ao uso desse híbrido como matriz de liberação controlada.

Figura 21. Perfis da liberação de CFX de i-CARR: GEL CFX encapsulado, MMT-CFX e HDL-CFX obtidos de diferentes métodos de congelamento: líquido N2 (1) e congelador convencional (2) em condições que simulam a passagem do trato gastrointestinal (pH e tempo) a 37 ° C





A fim de melhorar liberação dos híbridos, o recobrimento do composto de intercalação com uma matriz biopolimérica pode trazer resultados interessantes, permitindo um melhor controle de liberação do fármaco. Dessa forma preparou-se os sistemas de liberação oral baseados em esferas de i-carrageenana e gelatina encapsulando o fármaco ciprofloxacino. Essas esferas foram utilizadas para simular a passagem do fármaco pela região gastrointestinal, sendo submetida a diferentes pH a uma temperatura de 37 °C em 8h (**Figura 21**).

O sistema bionanocompósito i-CARR: GEL/HDL-CFX demonstrou ser um material apropriado para a proteção do fármaco ciprofloxacino, como pode ser observado na **Figura 21.1 e 21.2**, o híbrido HDL-CFX(sólido não encapsulado) libera 100% de moléculas de ciprofloxacino intercaladas nos primeiros 30 min de ensaio, indicando que esse tipo de matriz inorgânica não é adequada para fins orais. Quando o híbrido é encapsulado em um sistema biopolimérico como a blenda i-CARR: GEL, é notável como a formação do sistema bionanocompósito é capaz de proteger o fármaco do meio ao qual é submetido, independente da forma como as esferas foram congeladas, principalmente quando observa-se que os valores máximos de liberação de aproximadamente 100% do fármaco são alcançados apenas a o fim das oito horas de simulação, no fluido de pH 7,4, sendo esta a última etapa da simulação. Sendo este, um sistema bionanocompósito com um nível de melhora considerável em todos os fluidos simulados.

Quanto passamos a considerar as diferentes formas de congelamento, uma mudança nos perfis de liberação dos bionanocompósitos são nitidamente notados. Neste caso, é

importante observar que para os sistemas i-CARR: GEL/CFX e i-CARR: GEL/HDL-CFX preparados através de congelamento convencional (**Figura. 16.1**) a liberação do fármaco ocorre mais rápido do que aqueles materiais análogos preparados por N₂ líquido. Como discutido anteriormente, este método de congelamento promove a absorção de água devido à maior porosidade, conseqüentemente, facilita o processo de difusão do fármaco do interior da esfera para o meio. Estes resultados são interessantes e demonstram a utilidade destes sistemas bionanocompósitos aqui processados como matrizes capazes para proteger, estabilizar e controlar a liberação de fármacos de sólidos inorgânicos, especialmente aqueles baseados em HDL para administração oral.

Os sistemas bionanocompósitos i-CARR: GEL/MMT se mantiveram estáveis, porém apresentaram diferentes perfis de liberação em seus sistemas bionanocompósitos, como pode ser observado nas **Figura 21.1e figura 21.2**. A diferença no processo de congelamento interferiu mais significativamente para esses bionanocompósitos. Os sistemas i-CARR: GEL/MMT-CFX submetidos ao congelamento por N₂ líquido obteve valores de liberação na primeira zona de no máximo 20%, quando comparado ao sólido MMT-CFX, houve uma diminuição de 15% na quantidade de fármaco liberado. Ao avaliar a quantidade máxima liberada na última zona gastrointestinal, o sistema bionanocompósito liberou 20% a menos de ciprofloxacino que o híbrido puro. Os mesmos resultados não foram observados para i-CARR: GEL/MMT-CFX congelado de forma convencional, o sistema apresentou ao fim dos 120 min uma quantidade de fármaco liberado maior que o do híbrido, e esse fenômeno foi acompanhado ao longo das 8 horas de liberação. Para esse sistema bionanocompósito em particular pode ter ocorrido a intercalação do polímero nas regiões interlamelares da argila (semelhante à Figura 2.b), facilitando a saída do fármaco para o meio e acelerando o processo de liberação do fármaco. Apesar desse resultado improvável, observa-se que a mudança de congelamento do modo convencional para o N₂ apresenta-se como uma forma interessante de mudar propriedades dos sistemas bionanocompósitos, a ponto de melhorar sua resposta como sistema de liberação controlada.

Capítulo VI

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- ✓ Foi possível obter híbridos a partir da intercalação do antibiótico ciprofloxacino em hidróxidos duplos lamelares de Zn e Al, empregando diferentes métodos de síntese. Tal intercalação foi comprovada por análise de DRX, onde fases mistas foram obtidas dependendo do método utilizado. A interação desses íons do fármaco se dá através de atração eletrostática entre as lamelas carregadas positivamente, como pode ser comprovado por IV-ATR e RMN ¹³C.
- ✓ O híbrido formado pelo fármaco ciprofloxacino e a argila montmorillonita foi sintetizado com base nas propriedades de troca catiônica deste argilomineral, no qual foi possível observar o aumento das distâncias basais após intercalação do fármaco. As possíveis interações entre o fármaco e a argila foram comprovadas através de análises de IV-ATR.
- ✓ Conforme o esperado, os sistemas bionanocompósitos submetidos a congelamento convencional apresentaram maior absorção de água e densidade aparente, corroborando com os resultados de MEV, que demonstraram que esses sistemas possuíam poros significativamente mais aparentes que os mesmos sistemas submetidos ao congelamento por N₂ líquido;
- ✓ Os híbridos HDL-CFX e MMT-CFX puros foram avaliados como sistemas carreadores de fármacos, onde observou-se uma liberação rápida do ciprofloxacino a partir do híbrido HDL-CFX, devido a sensibilidade do híbrido HDL em fluidos ácidos que simulam a primeira zona gastrointestinal. Por outro lado, o sistema a base de MMT-CFX, mostrou-se mais estável a mudanças de pH que ocorre no trato gastrointestinal.
- ✓ Os híbridos MMT-CFX e HDL-CFX foram encapsulados em sistemas biopoliméricos a base de i-carrageenana e gelatina formando esferas para liberação oral. Houve um aparente retardo no processo de liberação do fármaco nos sistemas bionanocompósitos onde o fármaco é previamente imobilizado em uma matriz lamelar, sendo possível diminuir ainda mais o processo de difusão do fármaco para o meio, tornando o processo de liberação ainda mais controlado.
- ✓ A mudança na forma de congelamento das matrizes biopoliméricas mostrou-se uma interessante ferramenta para melhorar a resposta dos sistemas de liberação, demonstrando que

aquelas amostras submetidas ao congelamento rápido por N₂ líquido se mostraram mais eficientes que as mesmas amostras submetidas ao congelamento convencional.

Capítulo VII

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABDUL LATIP, A. F. et al. Release behaviour and toxicity profiles towards A549 cell lines of ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide intercalation compound. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2013.
- ALCÂNTARA, A. C. S. et al. Bionanocomposites based on alginate-zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 9465–9504, 2010.
- ALCÂNTARA, A. C. S. et al. Effective intercalation of zein into Namontmorillonite: Role of the protein components and use of the developed biointerfaces. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v.7, p.1772-1782,2016.
- ALLEN JR., L. V; POPOVICH, N. G; ANSEL, R.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2013.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterial: Past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000.
- ARISTILDE, L. et al. Enhanced interlayer trapping of a tetracycline antibiotic within montmorillonite layers in the presence of Ca and Mg. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 464, p. 153–159, 2016.
- BAJAJ, H. et al. Montmorillonite-alginate composites as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of diclofenac sodium. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n 72, v.6: 732-737, 2010.
- BARIK, S.; BADAMALI, S. K. Layer Double Hydroxide Reinforced Polymer Bionanocomposites for Packaging Applications. **Bionanocomposites for Packaging Applications**. p.269-290, 2017.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**. v. 3, n. 2, p. 112, 2016.
- BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6, p. 127-139, 2011.
- BRUSCHI, M. L. et al. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 29–47, 2006.
- CHENG, C. J.; JONES, O. G. Stabilizing zein nanoparticle dispersions with icarrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 28–35, 2017.
- CHOI, S. CHOY, J. Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p.803-814, 2011.

COLLAGEN STRUCTURE. Disponível em:
<https://www.shutterstock.com/pt/search/structure+collagen>. Acesso em 12 de junho de 2019

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: Síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**, vol.21, n.3, pp.300-311, 1998.

CUNHA, V. R. R., FERREIRA, A. M. a C. CONSTANTINO, V., R. L. Hidróxidos Duplos Lamelares: Nanopartículas Inorgânicas Para Armazenamento E Liberação De Espécies De Interesse Biológico E Terapêutico. **Quim. Nova**, Vol. 33, No.1, 159-171, 2010.

DARDER, M. et al. Bio-Nanocomposites Based on Layered Double Hydroxides. **Chemistry Materials**, n. 3, p. 1969–1977, 2005.

DARDER, M. et al. Progress in Bionanocomposite and Bioinspired Foams. **Advanced Materials**, v.23, p. 5262–5267, 2011.

DUCONSEILLE, Anne et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, [s.l.], v. 43, p.360-376, Jan. 2015.

EL-GAMEL, N. E. A.; HAWASH, M. F.; FAHMEY, M. A. Structure characterization and spectroscopic investigation of ciprofloxacin drug. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 253–262, 2012.

FRUNZA, M. S. et al. New Hybrid Compounds Containing Intercalated Ciprofloxacin into Layered Double Hydroxides: **Chemical Engineering**, v. 53, n. 3, p. 827–831, 2008.

GE, L. et al. Development and characterization of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 129–135, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, Laura G. et al. Self-assembled gelatin- ι -carrageenan encapsulation structures for intestinal-targeted release applications. *Journal Of Colloid And Interface Science*, v. 517, p.113-123, 2018.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HAFIDZ, R. M., YAAKOB; C. M.; AMIN, I. and NOORFAIZAN, A. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 813-817, 2011.

JAIN, S.; DATTA, M. Montmorillonite-alginate microspheres as a delivery vehicle for oral extended release of Venlafaxine hydrochloride. **Journal of Drug**

Delivery Science and Technology, v. 33, p.149-156, 2016. JENSEN, N.D.; BJERRING, M.; NIELSEN, U. G. A solid state NMR study of layered double hydroxides intercalated with

para-amino salicylate, a tuberculosis drug. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 78, p.9-15, set. 2016.

KANG, Z. et al. Themed issue: Nanomaterials for Energy Conversion and J. **Mater. Chem.**, v. 22, n. 46, 2012.

KEPPELER, S.; ELLIS, A.; JACQUIER, J.c. Cross-linked carrageenan beads for controlled release delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p.973-977, 2009. KEVADIYA,

B. D. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Biodegradable gelatin – ciprofloxacin – montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 175–183, 2014.

KHAN, A. K. et al. Carrageenan based bionanocomposites as drug delivery tool with special emphasis on the influence of ferromagnetic nanoparticles. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-13, 2017.

LANZILLOTTI, Paula Floriano. **Sistemas para liberação modificada de fármacos**. 2012. 117 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

LI, B. et al. Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system—intercalation and in vitro release of fenbufen. **Applied Clay Science**, v. 27, p.199-207, 2004.

LI, T.; MIRAS, H.; SONG, Y. Polyoxometalate (POM)-Layered Double Hydroxides (LDH) **Composite Materials: Design and Catalytic Applications**. **Catalysts**, v. 7, n. 9, p.260-277, 2017.

LYNDON, J. A.; BOYD, B. J.; BIRBILIS, N. Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopedic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p.63-75, 2014.

MOHAMED, A.-O. Ciprofloxacin: Analytical Profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients And Related Methodology**, v. 330, n. 8, p. 179–207, 2005.

MU, S.; LIU, W.; ZHAO, L. Antimicrobial AgNPs composites of gelatin hydrogels crosslinked by ferrocene-containing tetra block terpolymer. **Polymer**, v. 169, p.80-94, 2019.

MUSUMECI, R. et al. Berberis aetnensis C. Presl. extracts: Antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 1, p. 48–53, 2003.

NALAWADE, P. et al. Layered Double Hydroxides: **A review**. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 68, n. March 2014, p. 267–272, 2009.

New Methods of Drug Delivery. *Science*; Sep 28, 1990; 249, 4976; ProQuest Medical Library pg. 1527.

NUSSINOVITCH, A. Polymer Macro- and Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications. Capítulo 2, New York, NY: Springer New York, 2010. OLIVEIRA, Artur S.; ALCÂNTARA, Ana C.s.; PERGHER, Sibebe B.c..

Bionanocomposite systems based on montmorillonite and biopolymers for the controlled release of olanzapine. *Materials Science And Engineering: C*, v. 75, p.1250-1258, jun.

2017.

OTA, A. et al. Encapsulation of pantothenic acid into liposomes and into alginate or alginate-pectin microparticles loaded with liposomes. *Journal of Food Engineering*, v. 229, p. 21–31, 2018.

PADHI, J. R. et al. Development of highly biocompatible Gelatin & iCarrageenanbased composite hydrogels: In depth physiochemical analysis for biomedical applications. *Carbohydrate Polymer*, v. 153, p. 292–301, 2016.

PEREIRA, F. V.; DE PAULA, E. L.; MESQUITA, J.P; DE ALMEIDA LUCAS,A.; MANO, V. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofição. *Química Nova*, Vol. 37, No. 7, 1209-1219, 2014.

PEREIRA, R.; TOJEIRA, A.; VAZ, D. C. Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera. *International Journal Of Polymer Analysis And Characterization*, v. 16, n. 7, p.449-464, 2011.

RAGA, A. N.; WILLIAMS, R. J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer*, v. 26, n. 1, p.113-118, 1985.

RAPACZ-KMITA, A. et al. Characterisation, in vitro release study, and antibacterial activity of montmorillonite-gentamicin complex material. *Materials Science And Engineering: C*, [s.l.], v. 70, p.471-478, jan. 2017.

RAPACZ-KMITA, A. et al. Characterization, in vitro release study, and antibacterial activity of montmorillonite-gentamicin complex material. *Materials Science and Engineering C*, v. 70, p. 471–478, 2017.

REBITSKI, E. P. **Materiais Bionanocompósitos A Base De Argilominerais E Hidróxidos Duplos Lamelares Como Sistemas Dispensadores De Fármaco**. 2015, p.136, Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2015.

REBITSKI, E. P. et al. Bionanocomposites based on cationic and anionic layered clays as controlled release devices of amoxicillin. *Applied Clay Science*, [s.l.], v. 173, p.35-45, jun. 2019.

REDDY, M. M. et al. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, v. 38, n. 10–11, p. 1653–1689, 2013.

REZVANI, Z.; SHAHBAEI, M. Bionanocomposites based on alginate and chitosan/layered double hydroxide with ciprofloxacin drug: Investigation of structure and controlled release properties. **Polymer Composites**, v. 36, n. 10, p.1819-1825, 30 maio 2014.

RIBEIRO, L. N. M, ALCÂNTARA, A. C.S, DARDER, M. ARANDA, P. et al. Bionanocomposites containing magnetic graphite as potential systems for drug delivery.

International Journal of Pharmaceutics, v. 477, p.553–563, 2014. RIVERA, A. et al. Smectite as ciprofloxacin delivery system: Intercalation and

temperature-controlled release properties. **Applied Clay Science**, v. 124–125, p. 150–156, 2016.

RIVES, V.; DEL ARCO, M.; MARTÍN, C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: **A review Applied Clay Science**, v.8889, p.239-369, 2014.

RODRIGUES, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. Dissertação (Mestrado). Universidade de Campinas. Campinas-SP, p. 173, 2008.

ROJAS, R. et al. Structural and physicochemical aspects of drug release from layered double hydroxides and layered hydroxide salts. **Applied Clay Science**, v. 109– 110, p. 119–126, 2015.

RUIZ-HITZKY, E. et al. Advances in biomimetic and nanostructured biohybrid materials. *Advanced Materials*, 2010.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M., SUTARIYA V. Y B. Physicochemical Characterization of Papain Entrapped in Ionotropically Cross-Linked Kappa-Carrageenan Gel Beads for Stability Improvement Using Doehlert Shell Design. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, No. 9, p.1994-2013, 2006.

SELVAKUMARAN, S. et al. Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of pore forming agents. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 207–214, 2016.

SEPEHR, M. N. et al. Adsorption performance of magnesium/aluminum layered double hydroxide nanoparticles for metronidazole from aqueous solution. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 611–623, 2017.

SHARMA, A. et al. Three-Dimensional Supermacroporous Carrageenan-Gelatin Cryogel Matrix Cryogel Matrix for Tissue Engineering Applications. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-15, 2013.

SIPAHIGIL, O.; DORTUNÇ, B. Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 119–128, 2001.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p.1-20, 2001.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030–2075, 2014.

THRIMAWITHANA, T. R. et al. Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n. 1, p. 69–77, 2010.

WHATELEY, T. L. Drug Delivery and Targeting; for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 8, p. 637–637, 2002.

WU, M. J. et al. A review on fabricating heterostructures from layered double hydroxides for enhanced photocatalytic activities. **Catalysis Science & Technology**, 2018.

XU, T. et al. Multifunctional properties of organic-inorganic hybrid nanocomposites based on chitosan derivatives and layered double hydroxides for ocular drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 36, p.152-163, 2016.

ZAFAR, R. et al. Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

ZIA, K. M. et al. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer-based carrageenan blends and composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 282–301, 2016.