



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOÃO GOMES PONTES NETO

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE OLANZAPINA À BASE DE HIDRÓXIDOS DUPLO
LAMELARES**

RECIFE

2016

JOÃO GOMES PONTES NETO

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE OLANZAPINA À BASE DE HIDRÓXIDOS DUPLO
LAMELARES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Co-orientadora: Dr^a Magaly Andreza Marques de Lyra

Recife

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

P814e	Pontes Neto, João Gomes. Sistemas de liberação de olanzapina à base de hidróxidos duplo lamelares / João Gomes Pontes Neto. – 2016. 156 folhas: il. ; 30 cm. Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016. Inclui referências e apêndices. 1. Esquizofrenia. 2. Transtorno Bipolar. 3. Estresse Oxidativo. I. Soares Sobrinho, José Lamartine. (Orientador). II. Título. 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-145)
-------	---

JOÃO GOMES PONTES NETO

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE OLANZAPINA À BASE DE HIDRÓXIDOS DUPLO
LAMELARES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: **26/02/2016**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Adley Antonini Neves de Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

*Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (in memoriam),
como forma de agradecimento pelas suas
contribuições para o avanço da ciência.*

AGRADECIMENTOS

PONTES-NETO, J. G. Sistemas de Liberação de Olanzapina À Base de Hidróxidos Duplo Lamelares. 2016. 158f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Primeiramente, agradeço à **Deus** pelo dom da vida, por poder enxergar, ouvir, andar, sentir, ser. Um homem sem Deus, é um homem sem propósito.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho**, que me acolheu em seu ambiente e apontou o caminho para o crescimento acadêmico. Obrigado também por ter confiado à mim turmas da graduação, experiência engrandecedora que espero repetir no Doutorado.

À minha co-orientadora, **Dr^a. Magaly Andreza Marques de Lyra**, pelo apoio e atenção durante todo meu mestrado. Obrigado, “Maga”, nos vemos no Doutorado de novo.

À **Prof^a Dr^a Mônica Felts De La Roca Soares**, por coordenar o laboratório com esmero, trazendo os subsídios que tornaram possível o desenvolvimento do meu projeto e de todos os outros.

Aos meus familiares, **Severino José de Mello** (pai), **Ilma Pontes de Mello** (mãe), **Rodrigo Pontes de Mello** (irmão), **Rafael Pontes de Mello** (irmão), **Juliana Pontes de Mello** (irmã) e **Severino José de Mello Júnior** (irmão) pelo apoio nesta caminhada.

À **Jeynife Rafaella**, pela extrema paciência, compreensão, dedicação e companheirismo nessa reta final. Sem você o peso seria maior. Obrigado!

À **Amanda Quintas**, que, mesmo muito longe, partilhou comigo seus conhecimentos acadêmicos e também sobre a vida. Amizades como a sua é que tornam a vida rica de verdade.

A todos que compõem o **Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos** (NCQMC) pela ajuda, conversas descontraídas, pelo apoio e companheirismo. Em especial: **Amanda Damasceno**, **Dayanne Casimiro**, **Hannah Lyra** e **Janira Alves** pelas risadas, pelo apoio moral, por compartilhar a tensão da reta final.

A todos que compõem o **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** (PPGCF). Em especial: **Nerilin, Júlia, Bárbara e Jane**, as melhores secretárias que eu tive o prazer de conhecer.

Aos **professores participantes da banca**, por terem aceitado partilhar seus conhecimentos e experiências acadêmicas visando o enriquecimento este trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste projeto em forma de bolsa de estudos.

A todos os **técnicos** da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF – UFPE) e do Centro de Ciências Estratégicas do Nordeste (CETENE), que realizaram as análises de caracterização de minhas amostras.

Aos membros **Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos** (LTM – UFPE), por abrirem suas portas para mim, permitindo a realização de análises em suas instalações.

Aos alunos da Universidade Federal do Piauí: **Maria, Amanda, Rusbene, Guilherme e George** por toda a ajuda na realização dos experimentos. Em especial: obrigado, **Laisa Fontinele**, por ter me acolhido em sua casa durante todo o período que passei em Teresina.

Por fim, gostaria de finalizar agradecendo ao **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** (*in memoriam*), como forma de respeito e admiração. Crendo na imortalidade da alma, na vida pós matéria, espero que este trabalho lhe traga satisfação. Foi uma honra ter sua contribuição em meu Mestrado. Que estejas recoberto com o manto da paz e da alegria, pois cada fruto gerado pelos seus orientandos é resultado da semente que o senhor plantou. Foi-se embora sua carne, liberto está seu espírito, imortal é seu legado no universo científico.

O pensar é para o homem, o que voar é para os pássaros.

(Albert Einstein)

RESUMO

PONTES-NETO, J. G. Sistemas de Liberação de Olanzapina À Base de Hidróxidos Duplo Lamelares. 2016. 157p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A indústria farmacêutica ainda tem enfrentado o desafio da baixa biodisponibilidade de fármacos nas últimas décadas, onde os Hidróxidos Duplo Lamelares (HDLs) apresentam-se como alternativa para o incremento de solubilidade. A olanzapina (OLZ), pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresenta baixa solubilidade aquosa, dificultando sua absorção após administração. É utilizada no tratamento agudo e manutenção do transtorno bipolar e esquizofrenia, doenças que apresentam o Estresse Oxidativo na sua fisiopatologia. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção, caracterização e avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de sistemas binários entre OLZ e diferentes HDLs, visando incremento de solubilidade do fármaco. Os resultados das caracterizações por difração de raios X, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e análise térmica mostraram diferenças favoráveis nos resultados apresentados pelos sistemas binários, quando comparados ao fármaco isolado, indicando redução da cristalinidade do fármaco. Tal fato culminou num incremento acima de 1734% na solubilização do fármaco no estudo de dissolução *in vitro*. Os experimentos antioxidantes *in vitro* demonstraram que tanto os sistemas binários quanto a OLZ isolada apresentam capacidade antioxidante e, em certos casos, a interação entre HDL e OLZ promoveu melhorias no desempenho do fármaco. No teste em *Artemia salina*, os HDLs isolados não mostraram toxicidade e os sistemas binários diminuíram a toxicidade da OLZ, quando comparada ao fármaco isolado. Tais resultados fornecem boas expectativas para futuros testes *in vivo* e favorecem a proposta de utilização dos HDLs como um excipiente funcional na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Olanzapina. Hidróxido duplo lamelar. Esquizofrenia. Transtorno bipolar. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

PONTES-NETO, J. G. Olanzapine Delivery Systems Based on Layered Double hydroxides 2016. 157p. Dissertation (Master's degree). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The pharmaceutical industry yet faces the low bioavailability challenge of drugs in the last decades, in this matter, Layered Double Hydroxides (LDH) present themselves as an alternative to solubility enhancement. Olanzapine (OLZ), belonging to class II in the Biopharmaceutical Classification System, has low aqueous solubility, hindering its absorption after administration. It is used in the treatment of bipolar disorder and schizophrenia, diseases that have oxidative stress in its pathophysiology. This dissertation aimed at obtaining, characterization and *in vitro* evaluation of the antioxidant potential of binary systems of OLZ and LDHs, aiming to increase aqueous solubility of the drug. The characterization by X-ray diffraction, vibrational spectroscopy in the infrared region and thermal analysis showed favorable differences in the results presented by binary systems when compared to the drug alone, indicating a reduction of Olanzapine's crystallinity. This fact resulted in an increase above 1734% on drug solubilization in the *in vitro* dissolution. The antioxidants *in vitro* experiments demonstrated that binary systems and isolated OLZ exhibited antioxidant capability and, in certain cases, the interaction between LDH and OLZ promoted improvement in the drug's performance. In the tests on *Artemia salina*, the LDHs alone showed no toxicity and the binary systems decreased the toxicity of OLZ compared to drug alone. These results provide good expectations for future *in vivo* testing and favor the proposed use of LDHs as a functional excipient in the pharmaceutical industry.

Key words: Olanzapine. Layered double hydroxide. Schizophrenia. Bipolar disorder. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema geral da estrutura dos compostos do tipo Hidrotalcita.	30
Figura 02: Esquema simplificado do processo de reconstituição dos HDLs através do processo de reidratação.	42
Figura 03: Equação modificada de Noyes-Whitney	46
Figura 04: Sistema de Classificação Biofarmacêutica.	47
Figura 05: Classificação dos diferentes tipos de dispersões sólidas.	50
Figura 06: Estrutura química da Olanzapina.	52
Figura 07: As principais EROs e ERNs celulares e suas inter-relações bioquímicas.	57
Figura 08: Cinco estados hipotéticos do equilíbrio pró-/antioxidante resultante da relação mútua entre os níveis de EROs e ERNs e a capacidade de inibição pela barreira antioxidante.	59
Figura 09: Difratoograma de raios X da Olanzapina.	81
Figura 10: Difratoogramas de raios X do HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados.	82
Figura 11: Arranjo interlamelar do HDL-CaAl com os ânions nitrato, moléculas de água e da Olanzapina.	84
Figura 12: Sobreposição dos difratogramas de raios X dos sistemas binários compostos por HDL-CaAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.	86
Figura 13: Sobreposição dos difratogramas de raios X dos sistemas binários compostos por HDL-NiAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.	87
Figura 14: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos HDL-CaAl e HDL-NiAl.	89
Figura 15: Espectro vibracional na região do infravermelho da Olanzapina isolada.	89
Figura 16: Espectro vibracional na região do infravermelho da Olanzapina aproximado para melhor visualização das bandas.	90
Figura 17: Sobreposição dos espectros vibracionais dos sistemas binários compostos por HDL-CaAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.	91
Figura 18: Sobreposição dos espectros vibracionais dos sistemas binários compostos por HDL-NiAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.	93

Figura 19: Curvas TGA, DrTGA e DSC da Olanzapina isolada obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	95
Figura 20: Curvas TGA, DrTGA e DSC do HDL-CaAl obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	96
Figura 21: Curvas TGA, DrTGA e DSC do HDL-NiAl obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	96
Figura 22: Sobreposição das curvas de DSC dos sistemas binários entre HDL-CaAl e OLZ, assim como suas misturas físicas e componentes isolados, obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	98
Figura 23: Sobreposição das curvas DSC dos sistemas binários entre HDL-NiAl e OLZ, assim como suas misturas físicas e componentes isolados, obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	99
Figura 24: Perfis de dissolução da OLZ isolada, dos sistemas binários com HDL-CaAl e das misturas físicas em 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, temperatura 37 °C e 50 rpm.....	101
Figura 25: Perfis de dissolução da OLZ isolada, dos sistemas binários com HDL-NiAl e das misturas físicas em 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, temperatura 37 °C e 50 rpm.....	102
Figura 26: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o radical DPPH•. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição in vitro, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. * <i>p</i> < 0.05 vs. Controle (100% de produção de radical DPPH•) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).	105
Figura 27: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o radical ABTS ^{•+} . Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição in vitro, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. * <i>p</i> < 0.05 vs. Controle (100% de produção de radical ABTS ^{•+}) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).	107

Figura 28: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o íon nitrito. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (100% de produção de radical nitrito) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc). 109

Figura 29: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra a peroxidação lipídica. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (100% de produção de TBARS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc). 112

Figura 30: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (sem as amostras de HDL:OLZ e seus componentes isolados) (ANOVA e Neuman-Keuls como teste post hoc). 114

Figura 31: Capacidade de inibição da hemólise de eritrócitos pelos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (100% de hemólise induzida por AAPH) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc). 115

Figura 32: Toxicidade em *Artemia salina* dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes nos sistemas. Os resultados representam a média ± SD dos valores da taxa de mortalidade *in vitro*, n = 10. Dicromato de Potássio (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como agente tóxico padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (tampão PBS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc). 117

Figura 33: Toxicidade em *Artemia salina* dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às

presentes nos sistemas. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da taxa de mortalidade *in vitro*, n = 10. Dicromato de Potássio (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como agente tóxico padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (tampão PBS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc). 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Combinação de cátions que podem ser utilizados na síntese de diferentes tipos de HDL. *Monovalente, **Tetravalente.....	31
Tabela 02: Sistemas binários e misturas físicas obtidas.....	80
Tabela 03: Valores dos ângulos 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) dos sistemas binários à base de HDL-CaAl e Olanzapina obtidos a partir da difração de raios X.....	82
Tabela 04: Valores dos ângulos 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) dos sistemas binários à base de HDL-NiAl e Olanzapina obtidos a partir da difração de raios X.	83
Tabela 05: Temperaturas e entalpia do evento endotérmico de fusão da Olanzapina isolada, nos sistemas binários e misturas físicas com HDL-CaAl.....	97
Tabela 06: Temperaturas e entalpia do evento endotérmico de fusão da Olanzapina isolada e nos sistemas binários e misturas físicas com HDL-NiAl.	98
Tabela 07: Percentual de Olanzapina solubilizada proveniente dos sistemas binários com HDL-CaAl, assim como as misturas físicas em intervalo de tempo de 0 a 180 minutos.	100
Tabela 08: Porcentagem de Olanzapina solubilizada proveniente dos sistemas binários com HDL-NiAl, assim como as misturas físicas em intervalo de tempo de 0 a 180 minutos.	101
Tabela 09: Correlação do coeficiente de Pearson (r) entre os diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidante das amostras testadas.....	119

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ATP	Adenosina Trifosfato
CaAl:OLZ 05%	Sistema binário com 95% de hidróxido duplo lamelar à base de cálcio e alumínio e 05% de Olanzapina
CaAl:OLZ 20%	Sistema binário com 80% de hidróxido duplo lamelar à base de cálcio e alumínio e 20% de Olanzapina
CaAl:OLZ 30%	Sistema binário com 70% de hidróxido duplo lamelar à base de cálcio e alumínio e 30% de Olanzapina
CETENE	Centro de Ciências Estratégias do Nordeste
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
DrTGA	Primeira derivada da curva termogravimétrica
DR-X	Difratometria de Raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EC ₅₀	Concentração efetiva mínima para 50% de inibição
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécie Reativa do Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa do Oxigênio
GLR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
GSSH	Dissulfeto de glutathione
HDL	Hidróxido Duplo Lamelar
HDL-CaAl	Hidróxido Duplo Lamelar à base de Cálcio e Alumínio
HDL-NiAl	Hidróxido Duplo Lamelar à base de Níquel e Alumínio
Min	Minutos
MF	Mistura Física
MF CaAl:OLZ 05%	Mistura física com 95% de hidróxido duplo lamelar à base de cálcio e alumínio e 05% de Olanzapina
MF CaAl:OLZ 30%	Mistura física com 70% de hidróxido duplo lamelar à base de cálcio e alumínio e 30% de Olanzapina
MF NiAl:OLZ 05%	Mistura física com 95% de hidróxido duplo lamelar à base de níquel e alumínio e 05% de Olanzapina
MF NiAl:OLZ 30%	Mistura física com 70% de hidróxido duplo lamelar à base de níquel e alumínio e 30% de Olanzapina
NEQ	Nova Entidade Química
NiAl:OLZ 05%	Sistema binário com 95% de hidróxido duplo lamelar à base de níquel e alumínio e 05% de Olanzapina
NiAl:OLZ 20%	Sistema binário com 80% de hidróxido duplo lamelar à base de níquel e alumínio e 20% de Olanzapina

NiAl:OLZ 30%	Sistema binário com 70% de hidróxido duplo lamelar à base de níquel e alumínio e 30% de Olanzapina
NPS	Nitroprussiato de sódio
OLZ	Olanzapina
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
SCB	Sistema de classificação Biofarmacêutica
SD	Standard Deviation (Desvio Padrão)
SOD	Superóxido dismutase
TB	Transtorno bipolar
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
T _{endset}	Temperatura de término do evento térmico
TGI	Trato Gastrointestinal
TGA	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
T _{onset}	Temperatura de início do evento térmico
T _{pico}	Pico de temperatura do evento térmico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV-Vis	Espectroscopia eletrônica no ultravioleta e visível

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
+	Mais
/	Dividido por
=	Igual
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
™	Trademark
°C	Graus Celsius
Å	Angstrom
θ	Teta
J	Joule
λ	Lambda
Δ	Delta
μL	Microlitro
μg	Micrograma
Al ³⁺	Cátion de Alumínio
Cl ⁻	Ânion de Cloro
cm	Centímetro
CO ₃ ²⁻	Ânion carbonato
Co ²⁺	Cátion de Cobalto divalente
Cr ³⁺	Cátion de Cromo trivalente
Cu ²⁺	Cátion de Cobre divalente
Fe ²⁺	Cátion de Ferro divalente
Fe ³⁺	Cátion de Ferro trivalente
HO ₂ •	Hidroperoxila (radical livre)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Água
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
M ²⁺	Cátion metálico divalente
M ³⁺	Cátion metálico trivalente
Mg ²⁺	Cátion de Magnésio divalente
Mn ²⁺	Cátion de Manganês divalente
Ni ²⁺	Cátion de Níquel divalente
NO•	Óxido nítrico (radical livre)
NO ₂ ⁻	Ânion nitrito
NO ₃ ⁻	Ânion nitrato
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido (radical livre)
SO ₄ ²⁻	Ânion sulfato
Zn ²⁺	Cátion de Zinco divalente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
3.1 PARTE I: Hidróxido Duplo Lamelar.....	29
3.1.1 Estrutura e Propriedades.....	30
3.1.1.1 Estabilidade Química.....	31
3.1.1.2 Estabilidade Térmica	32
3.1.1.3 Propriedades Coloidais e de Superfície	32
3.1.2 Métodos de Síntese.....	33
3.1.3 Aplicações	33
3.1.3.1 Agricultura.....	33
3.1.3.2 Catálises heterogêneas	35
3.1.3.3 Nanocompósitos de HDL-polímero.....	36
3.1.3.4 Retenção de chamas.....	36
3.1.3.5 Fotofísica e fotoquímica	37
3.1.3.6 Biotecnologia.....	37
3.1.3.7 Tecnologia farmacêutica e cosméticos	38
3.1.4 Intercalação	41
3.1.4.1 Troca Aniônica	41
3.1.4.2 Processo de calcinação/reconstituição	42
3.1.5 Adsorção.....	43
3.1.6 Toxicidade.....	43
3.2 PARTE II: Incremento de Solubilidade.....	45
3.2.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	46
3.2.2 Estratégias para o incremento de solubilidade	48
3.2.3 Dispersões Sólidas.....	49
3.2.3.1 Dispersões sólidas de primeira geração.....	50
3.2.3.2 Dispersões sólidas de segunda geração	51
3.2.3.3 Dispersões sólidas de terceira geração	51
3.3 PARTE III: Olanzapina.....	51
3.4 PARTE IV: Estresse Oxidativo Vs. Esquizofrenia e Transtorno Bipolar	54

3.4.1 Radicais Livres.....	55
3.4.1.1 Fonte Celular Das EROs e ERNs	57
3.4.1.2 Química Das EROs e ERNs No Cérebro	57
3.4.1.3 Balanço Celular Pró-/Antioxidante	59
3.4.2 Estresse Oxidativo.....	61
3.4.2.1 Desordens Psiquiátricas Derivadas Do Estresse Oxidativo.....	62
3.4.3 Esquizofrenia.....	64
3.4.3.1 Esquizofrenia Vs. Estresse Oxidativo	65
3.4.4 Transtorno Bipolar	67
3.4.4.1 Transtorno Bipolar Vs. Estresse Oxidativo	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 PARTE I: Caracterização Físico-Química Dos Sistemas Binários Obtidos E De Seus Componentes Isolados	70
4.1.1 Material e Solventes	70
4.1.2 Síntese dos Hidróxidos Duplo Lamelares à Base de Cálcio e Alumínio (HDL-CaAl) e à Base de Níquel e Alumínio (HDL-NiAl).....	70
4.1.3 Obtenção dos Sistemas Binários Entre HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ	71
4.1.4 Caracterização Térmica.....	71
4.1.4.1 Análise Termogravimétrica	71
4.1.4.2 Análise por Calorimetria Diferencial de Varredura	71
4.1.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	72
4.1.6 Difração de Raios X	72
4.1.7 Avaliação do Perfil de Dissolução in vitro Dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados.....	72
4.2 PARTE II: Estudos de Toxicidade <i>in vitro</i> dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados	73
4.2.1 Material e Solventes	73
4.2.2 Avaliação do Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical DPPH*	73
4.2.3 Avaliação do Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical ABTS ^{•+} ...	74
4.2.4 Avaliação do Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção do íon nitrito (NO ₂ ⁻).	74
4.2.5 Avaliação do Potencial in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	75

4.2.6 Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Pelo Potencial Redutor	76
4.2.7 Inibição da Hemólise Induzida Por AAPH em Eritrócitos de Ratos.....	76
4.2.8 Teste da Artemia salina	77
4.2.9 Análise Estatística	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 PARTE I: Caracterização Físico-Química dos Sistemas Binários Obtidos e de Seus Componentes Isolados	80
5.1.1 Obtenção dos Sistemas Binários Entre HDL-CaAl / HDL-NiAl e Olanzapina.....	80
5.1.2 Difração de Raios-X.....	80
5.1.3 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho	88
5.1.4 Análise Térmica	94
5.1.5 Perfil de Dissolução <i>in vitro</i> dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados.....	99
5.2 PARTE II: Estudos de Toxicidade <i>in vitro</i> dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados	103
5.2.1. Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical DPPH*	104
5.2.2 Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical ABTS ^{•+}	106
5.2.3 Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção do Íon Nitrito (NO ₂ ⁻).....	108
5.2.4 Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	110
5.2.5 Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Pelo Potencial Redutor	113
5.2.6 Inibição da Hemólise Induzida por AAPH em Eritrócitos de Ratos:.....	115
5.2.7 Teste de Toxicidade <i>in vitro</i> em Artemia salina	116
5.2.8 Correlações Entre os Testes Antioxidantes <i>in vitro</i>	119
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	121
REFERÊNCIAS	124
APÊNDICE	156

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica tem enfrentado o desafio da baixa biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral, nas últimas décadas, devido ao crescente número de Novas Entidades Químicas (NEQs), onde mais de 40% delas são lipofílicas e apresentam baixa solubilidade em água. Tais características se fazem presentes como consequência de sua natureza hidrofóbica, baixa molhabilidade e estrutura cristalina altamente organizada. Estes fármacos, geralmente pertencentes a Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, têm o processo de dissolução no trato gastrointestinal (TGI) atuando como etapa limitante, determinando a taxa e o grau de absorção, resultando na baixa biodisponibilidade (ZHANG et al., 2013; SARODE et al., 2014).

Foi reportado que 70% dos potenciais candidatos a fármaco foram descartados antes mesmo de chegarem aos laboratórios de tecnologia farmacêutica, devido à baixa solubilidade. Este abandono se dá, pois tais fármacos hidrofóbicos são propícios a apresentarem absorção incompleta quando não são totalmente solubilizados no TGI. Portanto, um dos maiores desafios atuais da indústria farmacêutica está relacionado a estratégias para o incremento da solubilidade aquosa de fármacos (VASCOCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007; ZHANG et al., 2014).

Procurando driblar tais empecilhos, pesquisadores apresentam diversas abordagens, como a redução do tamanho de partículas, modificação da estrutura cristalina do fármaco, polimorfismo, complexação, dispersões sólidas, pró-fármacos, formação de sais, entre outras, com objetivo de aumentar a velocidade de solubilização destes fármacos. Porém, na maioria dos métodos utilizados atualmente, altos níveis de energia mecânica são aplicados e sabe-se que determinados materiais não resistem a tais intensidades de energia. Além disso, é possível observar, na maioria das estratégias convencionais de incremento de solubilidade aquosa, que o grande acréscimo na taxa de dissolução é logo seguido de uma rápida recristalização do fármaco para uma forma mais estável, porém menos solúvel, que limita sua absorção (GUZMÁN et al., 2007; SHARMA, DENNY, GARG, 2009; WARREN et al., 2010; ZHANG et al., 2013; MANSOURI et al., 2014).

Uma nova tecnologia que vem ganhando popularidade em termos de estabilização da forma amorfa dos fármacos é a sua adsorção no interior e/ou na superfície de materiais mesoporosos. Uma grande variedade destes materiais têm sido descrita, onde os argilominerais são largamente investigados como sistemas de liberação de fármacos. Neste contexto, encontra-

se a Hidrotalcita, mineral também conhecido como Hidróxido Duplo Lamelar (HDL). (SLOWING et al., 2007; VALLET-REGI, BALAS, ARCOS, 2007; SIMOVIC et al., 2010; KIM et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

A Hidrotalcita trata-se de um hidroxicarbonato de Magnésio e Alumínio dispondo-se na forma de lamelas sobrepostas, com estrutura bidimensional organizada e poros flexíveis, apresentando entidades aniônicas (carbonatos) nos seus domínios interlamelares, podendo ser obtidos por síntese laboratorial com rota simples e de baixo custo ou serem de origem natural. Quando os metais que constituem sua estrutura básica diferem dos mencionados anteriormente, estes materiais passam a ser chamados de compostos do tipo Hidrotalcita, tendo o composto à base de Cálcio e Alumínio como exemplo (BOTAN, NOGUEIRA, LONA, 2011; SHAFIEI et al., 2012).

Os HDLs vêm apresentando uma grande variedade de aplicações. Além de promotores de solubilidade, por exemplo, também são utilizados em sistemas de liberação sustentada de fármacos, mostrando-se promissor para o armazenamento e liberação controlada de substâncias intercaladas em seus espaços interlamelares ou adsorvidas em sua superfície. Como suas lamelas apresentam caráter positivo, para serem estabilizadas necessitam da presença de ânions interlamelares de compensação, que podem ser moléculas orgânicas como fármacos, aminoácidos, entre outros, para manter a eletroneutralidade do material. Nesse caso, além das pontes de hidrogênio, existem principalmente atrações eletrostáticas entre as lamelas e os ânions interlamelares. Outras interações, a nível de superfície, podem ocorrer entre o HDL e diferentes fármacos, já que uma das propriedades deste material é a capacidade de adsorção de moléculas independente de sua carga. Devido à tais possibilidades, este material apresenta-se como alternativa viável no desenvolvimento de sistemas com fármacos de baixa solubilidade (TAKAHASHI, YAMAGUCHI, 1991; ZHU et. al., 2008; ILLAIK et. al., 2008; BOTAN, NOGUEIRA, LONA, 2011).

A Olanzapina (OLZ) é um antipsicótico atípico, ou de segunda geração, que antagoniza, de forma seletiva, os receptores centrais de dopamina, serotonina, catecolaminas, histamina e acetilcolina. É utilizada no tratamento do transtorno bipolar e dos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, não apresentando, devido sua alta afinidade pelos receptores previamente mencionados, os efeitos colaterais extrapiramidais e de sedação, comumente observados nos antipsicóticos de primeira geração. Ainda no âmbito desta comparação, há relatos de que a OLZ apresenta propriedades protetoras contra o estresse oxidativo no cérebro e no fígado, condições estas que são principais colaboradoras na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos como a

depressão, esquizofrenia e transtorno bipolar. (NIMURA et al., 2015; FONTE, FATIGONI, ROILA, 2015; TODOROVIC et al., 2016).

Este fármaco, quimicamente conhecido como 2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-tieno[2,3-b][1,5]-benzodiazepina, ou $C_{17}H_{20}N_4S$, da classe dos tienobenzodiazepínicos, consiste de um pó amarelo praticamente insolúvel em água (43 mg/L), ligeiramente solúvel em acetonitrila e acetato de etila, e livremente solúvel em clorofórmio. De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a OLZ pertence a Classe II, apresentando baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade, e está entre as 20 prescrições mais frequentes nos EUA na última década (LINDSLEY, 2010; THAKURIA, NANGIA, 2011).

Tendo em mente o exposto acima, a presente dissertação de mestrado teve como objetivo principal o desenvolvimento de uma nova formulação, utilizando os artifícios da tecnologia farmacêutica, que estabilize a forma amorfa da Olanzapina na superfície de dois diferentes tipos de Hidróxidos Duplo Lamelares, aumentando, assim, sua velocidade de dissolução. Com isto, é provável que uma maior quantidade do fármaco, num menor intervalo de tempo, consiga ultrapassar as barreiras biológicas e estar disponível na corrente sanguínea.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obtenção e aplicação de um novo excipiente farmacêutico à base de Hidróxido Duplo Lamelar visando o incremento da taxa de dissolução da olanzapina.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese dos hidróxidos duplo lamelares a base de Cálcio/Alumínio e Níquel/Alumínio;
- Obtenção de sistemas binários à base de hidróxido duplo lamelar e olanzapina;
- Caracterização físico-química dos sistemas binários obtidos e seus componentes isolados;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da olanzapina;
- Avaliação da capacidade antioxidante e toxicidade *in vitro* dos sistemas binários e seus componentes isolados.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PARTE I: Hidróxido Duplo Lamelar

A história dos Hidróxidos Duplo Lamelares (HDL) começou a ser escrita há mais de 170 anos, com a descoberta da Hidrotalcita, primeiro representante desta classe, em 1842, na Suécia, e até hoje tem atraído considerável atenção da comunidade científica devido às suas diversas aplicações. A Hidrotalcita trata-se de um hidroxicarbonato natural de Magnésio e Alumínio, de fórmula geral $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}]\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e com estrutura similar à da Brucita, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, que tem forma hexagonal preenchida por grupos hidroxila, onde cátions de magnésio preenchem todos os espaços octaédricos a cada duas lamelas. A substituição parcial dos íons Mg^{2+} , presentes na Brucita, por íons Al^{3+} resulta na composição da Hidrotalcita, levando à formação de lamelas de carga resultante positiva. A sobreposição destas lamelas cria uma carga não balanceada que pode ser compensada por ânions no espaço entre uma lamela e outra (espaço interlamelar) (TAMMARO et al., 2014; OMWOMA et al., 2013; RIVES et al., 2014).

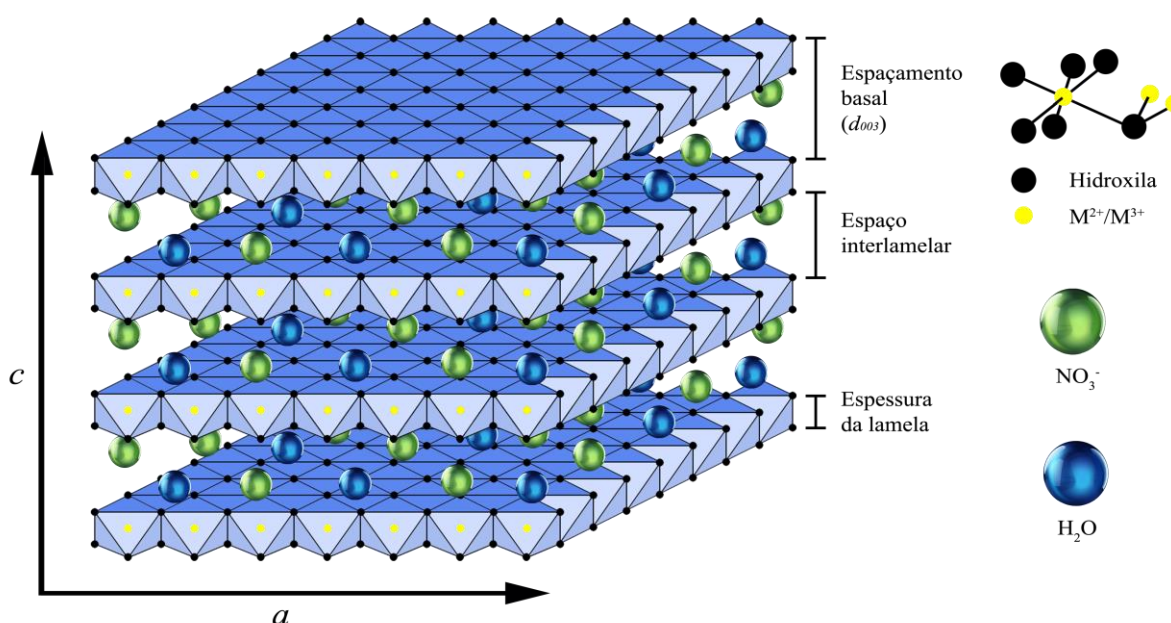
Embora a estequiometria da Hidrotalcita só tenha sido corretamente estabelecida por Manasse em 1915, as principais características estruturais dos HDLs só puderam ser entendidas a partir do uso pioneiro da difração de Raios-X em estudos desenvolvidos por Allmann e Taylor na década de 1960. Hoje, pouco mais de 50 anos depois, pequenos detalhes de sua estrutura, como as possíveis composições e estequiometrias, o grau de ordenação dos cátions metálicos nas lamelas, o arranjo empilhado das camadas e o arranjo dos ânions, juntamente com moléculas de água no espaço interlamelar, ainda não são totalmente compreendidos e tem sido motivo de controvérsias na literatura (DUAN, EVANS, 2006).

Os HDLs podem, então, ser definidos como um grande grupo de materiais que se dispõem na forma de lamelas sobrepostas, positivamente carregadas, com estrutura bidimensional organizada e poros flexíveis, apresentando entidades aniônicas nos seus domínios interlamelares, podendo ser obtidos por via sintética ou natural. Estes compostos, também conhecidos como “argilas aniônicas” ou “compostos do tipo Hidrotalcita”, têm fórmula geral $[\text{M}_{1-x}^{2+}\text{M}_x^{3+}(\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$, onde M^{2+} e M^{3+} são cátions metálicos divalentes e trivalentes, respectivamente; o valor de x é igual a proporção molar de $\text{M}^{3+}/(\text{M}^{2+} + \text{M}^{3+})$; A é o ânion interlamelar de valência n , e m representa o número de moléculas de água contida no espaço interlamelar (BOTAN et al., 2011; LIANG et al., 2013).

3.1.1 Estrutura e Propriedades

A estrutura básica dos HDLs é baseada na Brucita [$\text{Mg}(\text{OH})_2$], que consiste de íons de magnésio rodeados, com organização octaédrica, por íons hidróxidos. Essas unidades octaédricas formam camadas compartilhando suas extremidades, com os íons hidróxidos perpendiculares ao plano. As lamelas se empilham umas sob as outras, formando a estrutura tridimensional. A estrutura geral dos HDLs (Figura 01) pode ser originada por substituição parcial dos cátions divalentes por cátions trivalentes, fazendo com que as lamelas adquiram carga positiva, que é balanceada pela intercalação de ânions e, geralmente, moléculas de água entre as lamelas (DUAN, EVANS, 2006).

Figura 01: Esquema geral da estrutura dos compostos do tipo Hidrotalcita.



Fonte: autoria própria.

A substituição dos cátions das lamelas é bastante flexível, podendo-se fazer uso de cátions como Zn, Co, Cu, Ni, Mg, Fe (divalentes) e Cr, Co, Fe, Al, Mn, Ga, lantanídeos (trivalentes) (Tabela 01). A mesma flexibilidade se aplica ao ânion presente no espaço interlamelar, com objetivo de balancear a carga positiva das lamelas, podendo ser substituído por diversos ânions como $(\text{CO}_3)^{2-}$, Cl^- , NO_3^- , ou polioxametalatos, biomoléculas, fármacos ou até DNA. Esta possibilidade de variação na composição do HDL proporciona a grande gama de materiais que apresentam a fórmula geral pertencente a esta classe, apresentando diferentes aplicações (LIANG et al., 2013; RIVES et al., 2014).

Tabela 01: Combinação de cátions que podem ser utilizados na síntese de diferentes tipos de HDL. *Monovalente, **Tetravalente.

Cátions	Trivalente														
Divalente	Al	Fe	Cr	Co	Mn	Ni	Se	Ga	La	V	Sb	Y	In	Zr**	Ti**
Mg	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
Ni	X	X	X	X	X	X			X						
Zn	X		X												
Cu	X		X												
Co	X	X	X	X					X						X
Mn	X		X		X			X							
Fe	X	X													
Ca	X														
Cd	X														
Li*	X														

Fonte: VIEIRA, 2009.

O atual interesse nestes materiais é fundamentado em diversas propriedades (RIVES et al., 2014):

- Além de serem compostos básicos, a mistura de óxidos resultante de sua decomposição térmica (calcinação) mostra, ainda, uma maior basicidade relacionada com os ânions de óxido;
- A intercalação de ânions ácidos promove sistemas com propriedades ácido-base únicas.
- Possuem o chamado “efeito memória”, que é a habilidade de reaver sua estrutura lamelar original quando a mistura de óxidos (previamente preparada por calcinação de HDLs em temperaturas moderadas) é colocada em contato com soluções contendo ânions.
- Eles também apresentam capacidade de troca iônica, geralmente maior que a apresentada por argilas catiônicas.

3.1.1.1 Estabilidade Química

A estabilidade química é de grande importância em grande parte das aplicações dos HDLs. Tal parâmetro mostra sua importância quando o HDL é utilizado para o tratamento de íons metálicos em depósitos de lixo nuclear ou em avaliações geoquímicas. Avanços nas aplicações dos HDLs como carreadores de fármacos tem revelado que a estabilidade química deste material é um parâmetro chave nos passos sucessivos de transporte, transferência e entrega da moléculas bioativas. Tal estabilidade, relacionada com a sua constituição, cresce de

acordo com a seguinte ordem: $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Co^{2+} \sim Ni^{2+} < Zn^{2+}$ e $Al^{3+} < Fe^{3+}$ (SCHECKEL et al., 2000; ALLADA et al., 2002; OH et al., 2011; FORANO et al., 2013).

3.1.1.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos HDLs foi intensamente investigada devido seus produtos de decomposição termal serem promissores como catalizadores. Mesmo com a diversidade em sua composição, a maioria dos HDLs apresentam comportamentos de decomposição termal semelhantes. Quando aquecidos, estes liberam as moléculas de água intercaladas em até 250 °C, seguido de desidroxilação das lamelas hidroxiladas e decomposição dos ânions interlamelares em altas temperaturas, restando apenas uma mistura de óxidos derivados, como reportado em estudo pioneiro realizado por Miyata (1980). Valente et al. (2000) estudaram as temperaturas de decomposição de HDLs intercalados com carbonato, contendo diferentes cátions metálicos na sua estrutura lamelar, onde foi observado que a estabilidade térmica cresceu na seguinte ordem de combinação de cátions: $CoAl < ZnAl \sim CuAl < MgFe \sim NiAl < MgAl \sim MgCr$. A maior temperatura de decomposição foi a 400 °C para o HDL-MgAl e HDL-MgCr, e a menor temperatura foi de 220 °C para o HDL-CoAl.

3.1.1.3 Propriedades Coloidais e de Superfície

Compostos do tipo Hidrotalcita apresentam uma estrutura com superfície de carga positiva devido a substituição isomórfica dos cátions metálicos M^{2+} por M^{3+} . Esta carga superficial afeta os processos de dispersão e agregação. Os valores do potencial zeta (ζ) para partículas de HDL mostram valores como 45 mV no caso do HDL-MgAl intercalado com $(CO_3)^{2-}$. O ponto isoelétrico (valor de pH onde o potencial $\zeta = 0$) e o ponto de carga líquida zero (valor de pH onde a carga da estrutura total $\sigma_{st} + \sigma_H = 0$) também foram medidos num série de diferentes HDLs. A diferença entre estes dois parâmetros surgida da existência da carga positiva da estrutura e do tipo de ânion intercalado mostrou influência na carga de superfície para o HDL-MgAl intercalado com CO_3^- , NO_3^- e $S_2O_8^-$ (DUAN, EVANS, 2006).

O termo “solução coloidal de HDL” é utilizado de forma incorreta em determinados casos, apresentando ambiguidade. Dependendo das condições de preparação, uma dispersão coloidal de HDL pode conter mais, ou menos, partículas de HDL intactas ou esfoliadas (partículas muito finas ou até apresentando lamelas simples). O sobrenadante turvo, após intensa lavagem com água e ou tratamento com ultrassom, consiste na dispersão das partículas

de HDL. Tais dispersões foram utilizadas para avaliar a mobilidade eletroforética e propriedades reológicas, e como estabilizadores sólidos de emulsões óleo-água, estabilizadas por heterocoagulantes de Bentonita e diferentes HDLs, sendo úteis para formulações farmacêuticas e cosméticas (LAGALY et al., 2001a,b).

3.1.2 Métodos de Síntese

HDLs podem ser encontrados em minerais na natureza, como a Hidrotalcita, Piroaurita (HDL-MgFe) e Tacovita (HDL-NiAl), onde os ânions interlamelares consistem, na maioria das vezes, de carbonato, embora cloreto e sulfato estejam, as vezes, presentes. Dentre as diversas vias sintéticas propostas para o preparo destes materiais, as principais rotas são (LIANG et al., 2013; FORANO et al., 2013; RIVES et al 2014):

- Co-precipitação: consiste de adição lenta de uma solução de cátions metálicos num meio reacional contendo o ânion a ser intercalado, aumentando o pH por adição de base que leva à precipitação do HDL.
- Troca iônica: troca de ânions originalmente presentes no espaço interlamelar do HDL preparado, geralmente, por co-precipitação. Cloreto ou nitrato são preferíveis como ânions originais, pois a troca é mais fácil que por ânions multicarregados. A reação ocorre, geralmente, sob agitação do HDL numa solução contendo excesso do ânion a ser intercalado. Aplicação de ultrassom acelera o processo de troca.
- Reconstituição: este método é baseado no “efeito memória” apresentado pelo produto formado por calcinação moderada (abaixo de 500 °C sob atmosfera de gás inerte) do HDL, que consiste na capacidade de recuperação de sua estrutura lamelar quando a mistura de óxidos é imersa numa solução contendo os ânions que serão intercalados para estabilizar as lamelas.
- Tratamento hidrotermal e por micro-ondas: são frequentemente aplicados para melhorar, principalmente, as propriedades cristalinas do HDL.

3.1.3 Aplicações

3.1.3.1 Agricultura

Embora grandes depósitos de Bentonita estejam disponíveis, a Hidrotalcita é rara e compostos do tipo Hidrotalcita devem ser produzidos em larga escala utilizando matérias

primas baratas. Esta é uma limitação considerável, porém existem vários trabalhos publicados que tratam do uso de HDL-MgAl sintético para remover vários contaminantes do solo e da água utilizada na agricultura. De fato, este material é um excelente candidato pois apresenta características interessantes: é um produto verde; o mecanismo de adsorção envolve tanto a intercalação com a troca iônica quanto a captação pela superfície do material; a estrutura lamelar pode ser reconstruída com a incorporação de espécies aniônicas quando a mistura de óxidos obtida pela decomposição do material é deixada em contato com soluções de dejetos (OH, BISWICK, CHOY, 2009; FORANO et al., 2013).

Em adição, esses absorventes hidrofílicos pode ser convertidos num material hidrofóbico pela intercalação de ânions volumosos alquil e aromáticos, com um consequente aumento do espaço interlamelar e adsorção de contaminantes hidrofóbicos sem carga como corantes, surfactantes e pesticidas. Planejando a adsorção de ânions contaminantes, uma escala de afinidade pelo material deve considerada. A escala dos ânions mais comuns segue a seguinte ordem (CONSTANTINO et al., 2013):



O HDL-MgAl com carbonato intercalado é estável em $\text{pH} > 5$, até o $\text{pH} 12$, e apenas sua superfície está disponível para adsorção de contaminantes, pois o carbonato é um forte ânion competidor, como pode ser observado na escala acima. O uso de HDLs para adsorção de contaminantes requer que seu ânion originalmente intercalado seja o Cloreto ou Nitrato, pois estes são fracamente ligados. A troca iônica e as reações de reconstituição permitem a captação de contaminantes orgânicos contendo, pelo menos, um grupo aniônico como carboxilato, sulfonato ou fosfonato (CONSTANTINO et al., 2013).

De fato, muitos contaminantes orgânicos (fenóis, ácidos carboxílicos aromáticos, surfactantes, corantes, herbicidas e pesticidas) tem características aniônicas e são eficientemente adsorvidos. Os HDLs também foram sugeridos como alternativa para adsorventes de poluentes do ar, como o CO_2 emitido pelo homem, para evitar que plantas recebam excesso de fertilizante e outros aditivos, e para remoção do excesso de Arsênio presente na água potável vinda de poços em estratos geológicos (ULIBARRI, HERMOSIN, 2001; GILLMAN, 2006; VREYSEN, MAES, 2008; GROVER et al., 2009; CHOI et al., 2009).

3.1.3.2 Catálises heterogêneas

Os HDLs também são sugeridos como catalizadores heterogêneos, devido a ampla variedade de sua composição, a grande possibilidade de manipulação pela troca iônica e processos de reconstituição, e a possibilidade de modificar sua morfologia com diferentes rotas sintéticas. Tais características fazem deste material um excelente catalizador e suporte para catalizadores. É possível produzir compostos do tipo Hidrotalcita contendo muitos íons metálicos de transição como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} e V^{3+} , que podem agir como centros catalizadores para inserir no espaço interlamelar ânions complexos como ferro e ferricianetos, porfirinas, ftalocianinas e, até mesmo, iso e heteropolioxometalatos (CONSTANTINO et al., 2013).

Óxidos e Hidróxidos de íons metálicos tetravalentes como Ti, Zr, Sn e Ce podem ser co-precipitados com o HDL para obter catalizadores polifuncionais. Além disso, a variada estrutura dos HDLs pode ser transformada numa mistura de óxidos após serem aquecidos em temperatura apropriada para desidratação, desidroxilação e decomposição aniônica. A maioria das aplicações catalíticas pertencem à mistura de óxidos devido suas importantes características: área de superfície específica (100 – 300 m^2/g), dispersão homogênea dos elementos constituintes, possibilidade de obter pequenos aglomerados metálicos na superfície após redução apropriada e efeito memória com parcial reconstituição da estrutura lamelar (CONSTANTINO et al., 2013).

Uma das mais importantes aplicações da mistura de óxidos derivada dos HDLs, tendo cátions Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Cr^{3+} dispersos, é a seletiva hidrogenação do acetileno e de grupos funcionais presente em espécies orgânicas para obter produtos finais e intermediários usados na indústria farmacêutica, como monômeros para produção de polímeros, gorduras e óleos (MONZON et al., 2001; TICHIT et al., 2006). Outras aplicações catalíticas da mistura de óxidos obtidas da decomposição termal controlada dos HDLs, seguida, em alguns casos, de redução metálica, são: polimerização de óxidos de alqueno, condensação aldol de aldeídos e cetonas, conversão sob vapor de hidrocarbonetos e álcoois, oxidação de CO preferencial, síntese de metanol, entre outras (BASILE, VACCARI, 2001; KOVANDA et al., 2006; CENTI, PERATHONER, 2008; XU et al., 2011).

3.1.3.3 Nanocompósitos de HDL-polímero

A versatilidade dos HDLs permite a produção de nanocompósitos com polímeros devido sua composição multilamelar e capacidade de intercalação, atraindo considerável atenção de pesquisadores tanto da área de materiais quanto de polímeros. Este interesse é ilustrado pelo crescimento de artigos e patentes relacionados ao assunto na literatura. Isto se dá pelas seguintes razões: proporções aparentes entre 100 e 2000, o que é importante pelo incremento da permeabilidade e pelo reforço mecânico nos polímeros; a presença de grupos hidroxilas na superfície, grande versatilidade na sua composição e a intercalação por troca iônica de ânions orgânicos seletos; possível esfoliação, apesar da elevada densidade de carga das partículas de HDL (LEROUX, 2006; LEROUX, PREVOT, 2008; COSTA et al., 2008; COSTANTINO et al., 2009; LEROUX et al., 2011). Tais nanocompósitos podem ser produzidos através de diferentes processos (QIU, QU, 2011):

- Incorporação direta de água ou polímeros solúveis em solvente, acompanhada ou não por um processo de emulsão. Este processo é geralmente seguido por evaporação do solvente.
- Polimerização em massa onde o preenchimento da suspensão ocorre durante a polimerização do monômero. Cuidado especial deve ser tomado quando utiliza-se extrusão para evitar a quebra da estrutura do nanocompósitos.
- Processo de fusão polimérica.

3.1.3.4 Retenção de chamas

Uma das aplicações interessantes dos HDLs consiste na capacidade de retenção de chamas. A estabilidade térmica avaliada diretamente pelo início da temperatura decomposição (T_{onset}) é, geralmente, atrasada com a adição do HDL à polímeros. De fato, uma grande variedade de polímeros está sujeita a avaliação do retardo de chamas. Porém, a melhora desta capacidade utilizando HDL como preenchedor de uma grande variedade polímeros foi observada por diversos autores (CONSTANTINO et al., 2005; WANG et al., 2006; YE, QU, 2008; COSTA et al., 2008; MANZI-NSHUTI et al., 2008; MATUSINOVIC et al., 2009; ZHANG et al., 2011).

O retardo é ainda mais presente quando as partículas de HDL são dispersas em escala nanométrica ou intercaladas com fosfato, fósforo vermelho ou polifosfato de amônio, que promovem a formação lamelas carbonizadas. HDLs modificados com derivados de

carboxiadamantano dispersos protegem, em parte, o polímero da oxidação térmica, aumentando a temperatura de degradação em torno de 160 °C e produzindo um resíduo carbonizado maior que no polímero puro (CONSTANTINO et al., 2007; YE, QU, 2008; NYAMBO et al., 2008; KUMAR, DAS, 2010; ZHANG et al., 2011).

3.1.3.5 *Fotofísica e fotoquímica*

Existe uma necessidade de se criar novos materiais fotossensíveis que podem apresentar aplicações industriais em dispositivos optoeletrônicos e fotovoltaivos. Para gerar propriedades ópticas mais sustentáveis, evitando a difusão de corantes e cromóforos, os HDLs apresentam-se como bons candidatos para novas aplicações como sensores, revestimentos resistentes à corrosão ou componentes em dispositivos eletro-ópticos. Avanços recentes em preenchimento fotofuncional com HDL e suas prospectivas aplicações tem sido revisados (LATTERINI et al., 2007; YAN et al., 2011).

Materiais nanoestruturados preparados pelas técnicas de Langmuir-Blodgett ou LbL representam filmes inorgânicos sólidos ultra finos ou filmes finos híbridos. O processo de LbL permite a formação de estruturas lamelares ordenadas com uma espessura de poucos nanômetros por bicamada. Considerando que as partículas do HDL podem ser incorporadas por LbL com diferentes polímeros como álcool polivinílico ou quitosana, isso abre novos atrativos e rotas factíveis para o design de dispositivos ópticos. (YAO et al., 2010; YAN et al., 2009, 2011; ZHU et al., 2011; HAN et al., 2011).

3.1.3.6 *Biotecnologia*

HDLs podem armazenar muitas biomoléculas complexas como aminoácidos, nucleosídeos, oligonucleotídeos, DNA de cadeia simples ou dupla, proteínas, enzimas e células inteiras, o que cria interesse na área da biotecnologia. Como reportado em revisões recentes, esses materiais biohíbridos à base de HDL tem funcionalidades o para carregamento fármacos e gene em aplicações terapêuticas e para o desenvolvimento de biosensores (CHOY et al., 2006; FORANO et al., 2006; REN et al., 2006; EVANS, DUAN, 2006; DEL HOYO, 2007; CHOY et al., 2007, 2008; FORANO, PRÉVOT, 2008; MOUSTY, 2010).

Desde 2007, alguns autores têm reportado o uso de HDL em combinação com o DNA. A intercalação do DNA no espaço interlamelar do HDL-MgAl pode proceder por diferentes

vias, como a intercalação reversível do DNA em HDLs por troca iônica com cloreto no espaço interlamelar. Neste âmbito, o HDL-MgAl foi utilizado como vacina para carreamento de genes com objetivo de aumentar a eficácia da imunização *in vivo*. A viabilidade das células em testes de liberação de gene *in vitro* é um ponto crucial. 50% de viabilidade celular em 500 µg/mL de nanopartículas de HDL foi obtida para HEK 293 T, representando um valor muito maior que os 50 a 100 µg/mL geralmente obtidos em testes deste tipo (XU et al., 2007; THYVEETIL et al., 2008; LI et al., 2011).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos compostos por HDL é vista como uma estratégia para permitir a reutilização das enzimas em determinados processos, aumentando sua estabilidade em pH específico a longo prazo. Uma grande quantidade de enzimas com baixo ponto isoelétrico e carga resultante negativa em seu pH ótimo foram estabilizadas em matrizes de HDL, assim como proteínas do sangue também foram imobilizadas. Ao final, formam-se materiais biohíbridos com propriedades controladas (composição química, troca iônica e propriedades de adsorção, propriedades ácido-base, eletroatividade, morfologia e porosidade) para obter uma performance catalítica máxima (FORANO, PRÉVOT, 2008; MOUSTY, 2010).

3.1.3.7 Tecnologia farmacêutica e cosméticos

HDLs à base de MgAl e ZnAl tem sido reportados em diferentes farmacopeias e já são utilizados na medicina como antiácidos e agentes antipepsínicos e em muitas pomadas e cataplasmas para proteção da pele danificada. Estes materiais podem ser considerados excelentes para a criação de sistemas de liberação de fármacos devido sua biocompatibilidade, estabilidade pH-dependente, habilidade para intercalar uma extensa gama de biomoléculas aniônicas e sua baixa toxicidade (LINARES et al., 2004; KONTUREK et al., 2007; CHOI & CHOY, 2011; POSATI et al., 2012).

A associação entre HDL e ânions moleculares com atividade biológica produzem materiais híbridos, inorgânico-orgânicos, nos quais espécies bioativas são armazenadas no espaço interlamelar, geralmente protegidas contra luz e oxigênio, e são potencialmente liberadas após sinal químico onde diversos autores publicaram diversas revisões neste tópico (COSTANTINO, NOCCHETTI, 2001; DEL HOYO, 2007; RUIZ-HITZKY et al., 2010).

A natureza química e reatividade dos HDLs permite a obtenção de materiais lamelares intercalados com fármacos para liberação sustentada ou incremento de solubilidade e biodisponibilidade de moléculas com baixa solubilidade aquosa. Estes híbridos dispersos em

fluidos biológicos com pH ~ 7 podem liberar as moléculas por reações de troca iônica. Esta taxa de liberação é afetada por diversos fatores como o tamanho e a conformação espacial do fármaco, disposição dos ânions do fármaco na região interlamelar, seletividade do HDL em relação aos ânions presentes no meio de liberação e dimensão das partículas de HDL (WILLIAMS, O'HARE, 2006).

Diversos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais foram intercalados em HDL-MgAl. Híbridos contendo ibuprofeno, diclofenaco, fenbufeno e sulindaco foram submetidos a estudos de liberação do fármaco *in vitro* simulando os fluidos intestinais. Os compostos intercalados mostraram uma liberação sustentada devido a troca dos íons do fármaco com íons fosfatos, hidróxidos e carbonatos presentes no meio intestinal. A composição da lamela e o tamanho da partícula do HDL afetou o perfil de liberação de alguns fármacos desta classe. Ácidos mefenâmico e meclofenâmico e naproxeno intercalados em HDL-MgAlFe foram liberados de forma muito mais lenta que quando intercalados em HDL-MgAl (AMBROGI et al., 2001; LI et al., 2004; DUPIN et al., 2004; DEL ARCO et al., 2004, 2009; CARRIAZO et al., 2010; MINAGAWA et al., 2012).

Fármacos anti-hipertensivos, como captopril, lisinopril, enalapril, ramipril e perindopril erbumina também foram estudados em associação com HDLs em formulações de liberação controlada. Também com fármacos cardiovasculares como pravastatina e fluvastatina. O arranjo da pravastatina no espaço interlamelar do HDL foi estudado associando dados experimentais com a teoria da densidade funcional. Este estudo demonstrou que o sistema híbrido contém ânions cloreto e pravastatina organizados como bicamada (XIA et al., 2008; PANDA et al., 2009; AL ALI et al., 2012; CUNHA et al., 2012).

Além disso, o HDL também foi utilizado como sistema de liberação para heparina de baixo peso molecular. Este híbrido mostrou uma liberação sustentada em pH 7,4, uma funcionalidade farmacológica aumentada, e uma maior captação celular em células vascularizadas de músculo liso de ratos *in vitro*. Fármacos reguladores de lipídeo, como benzaifibrato e ácido clofíbrico, intercalados em HDL foram propostos como sistemas de liberação controlada no intestino delgado. A formação destes nanocompósitos resultantes da combinação entre o HDL, capaz de promover liberação sustentada no trato gastrintestinal inferior, e um polímero, capaz de evitar a liberação do fármaco no trato gastrintestinal superior, é uma estratégia que foi desenvolvida para obter sistemas para liberação direcionados ao cólon. Nanocompósitos à base de HDL para liberação de diclofenaco, fenbufeno ou ácido ursodesoxicólico foram desenvolvidos por microencapsulação do híbrido de HDL e fármaco

em Eudragit® S e Eudragit® L (CHOI et al., 2010; DEL ARCO et al., 2010; BERBER et al., 2010; GU et al., 2011).

Os HDLs não agem apenas como simples sistemas de liberação, mas também podem aumentar a solubilidade aparente de fármacos. Este material em meio ácido, $\text{pH} < 4$, dissolve-se lentamente e o fármaco é liberado, ânion por ânion, no meio. Compostos contendo fármacos de baixa solubilidade aquosa intercalados, como indometacina, cetoprofeno, ibuprofeno e flurbiprofeno mostraram grande acréscimo na solubilidade do fármaco em suco gástrico com $\text{pH} 1,2$. Os HDLs mostraram propriedades de barreira, similar àquelas do muco gástrico, e podem promover proteção da mucosa evitando efeitos colaterais dos fármacos. Devido a interação entre a molécula ativa com a rede de muco, sua administração associada ao HDL pode assegurar não só o efeito protetor, mas também o aumento da permeabilidade pelo muco gástrico. Resultados promissores também foram obtidos com gliclazida e furosemida. A taxa de dissolução destes fármacos em meio gástrico e a permeabilidade pelo muco gástrico foram incrementadas (AMBROGI et al., 2003; DEL ARCO et al., 2004; AMBROGI et al., 2009; PARELLO et al., 2010; PERIOLI et al., 2011).

O planejamento de formulações capazes de manter os níveis terapêuticos de fármacos por um longo período foi estendido para algumas moléculas da classe dos antibióticos. Fármacos bactericidas pertencentes às quinolonas (ácido nalidíxico), fluoro-quinolonas (ciprofloxacino), β -lactâmicos (amoxicilina) e cefalosporinas (cefazolin) e os bacteriostáticos (hemissuccinato de cloranfenicol) foram utilizados em associação com HDLs. Drogas antitumorais como metotrexato e podofilotoxina também já formaram tais híbridos com compostos do tipo Hidrotalcita. A associação mostrou um melhor efeito antitumoral e toxicidade reduzida quando comparadas aos fármacos isolados, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (XUE et al., 2007; TAMMARO et al., 2007; CONSTANTINO et al. 2009; RYU et al., 2010; CHAKRABORTY et al., 2011).

Para obter-se uma liberação sítio-específica destes agentes antitumorais, a superfície do híbrido HDL-Metotrexato foi modificada com alvos para células cancerígenas como o ácido fólico. O nanoveículo obtido foi altamente efetivo em termos de permeação celular e inibição da proliferação da célula cancerígena, em células que apresentavam excesso de receptores para ácido fólico. O uso de HDL como carreador de fármacos com alvos magnéticos também tem sido investigada. Um híbrido HDL-diclofenaco foi coberto com partículas de ferrita de magnésio para produzir um nanohíbrido magnético. A liberação da droga a partir do nanohíbrido magnético decresce na presença de campo magnético devido à agregação das

partículas magnéticas, deixando a liberação mais lenta. Nanocompósitos bioinorgânicos de centro magnético também foram propostos para uma potencial aplicação na terapia contra artrite. Partículas magnéticas foram recobertas com HDL-MgAl intercalado com ibuprofeno e glucoronato para obter sistemas destinados à liberação específica em sítio magnético. Sistemas similares foram preparados usando naproxeno e o agente anticâncer doxifluridina (OH et al., 2009; ZHANG et al., 2009; REZVANI, SARKARAT, 2012).

A incorporação de íons naturais raros no espaço interlamelar dos HDLs pode oferecer novas possibilidades no rastreamento da quantidade de fármaco intercalado através do monitoramento de suas propriedades luminescentes. A intercalação de ânions moleculares utilizados em cuidados farmacêuticos (emolientes, surfactantes, nutrientes para pele, vitaminas, protetores solares) produz novos materiais que podem ser utilizados na indústria dos cosméticos (ROSSI et al., 2005; SUN et al., 2008; WANG et al., 2010a,b; KHAN et al., 2011).

3.1.4 Intercalação

O espaço interlamelar acomoda ânions de compensação e moléculas de água, assegurando a estabilidade da estrutura lamelar dos HDLs. Os ânions de compensação mais comuns são NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} . A troca iônica pode ser facilmente realizada e diversas espécies orgânicas aniônicas, complexadas e heteropoliácidas podem ser introduzidas no espaço interlamelar, substituindo os ânions originalmente presentes. Tal habilidade é de grande interesse para diversas aplicações citadas anteriormente. Consequentemente, uma atenção especial tem sido direcionada à este método de modificação dos HDLs (SEFTEL et al., 2013).

3.1.4.1 Troca Aniônica

A capacidade de troca aniônica depende do valor de x , presente na fórmula geral $[\text{M}_{1-x}^{2+}\text{M}_x^{3+}(\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$. Experimentalmente, foi possível observar que esta troca é constante para alguns HDLs, como os que são constituídos por LiAl_2 , Zn_2Cr e Cu_2Cr , e altamente controlável para outros, como Zn_xAl ou Mg_xGa . Diversos mecanismos de troca iônica tem sido reportados, onde, geralmente, os ânions que entram no espaço interlamelar são adsorvidos rapidamente na superfície da partícula e, então, se difundem para o espaço interlamelar. De um ponto de vista termodinâmico, esta troca depende principalmente de interações eletrostáticas entre as lamelas hidroxiladas positivamente carregadas e os ânions de troca, e da variação da energia livre e entropia envolvidas nas mudanças de hidratação. Outra

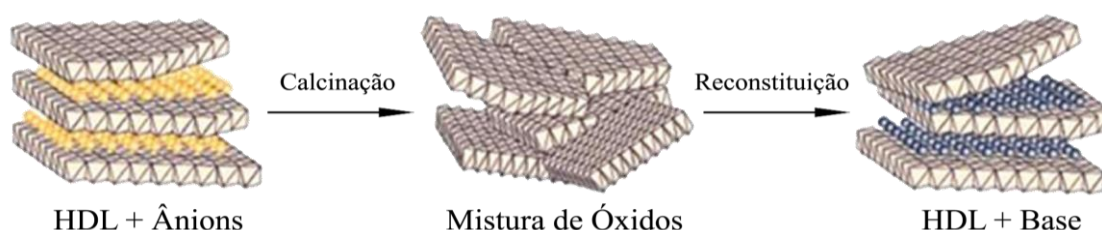
característica importante é que a constante de equilíbrio aumenta quando o raio do ânion original decresce. A troca é, então, favorecida para ânions com alta densidade de carga (LOPEZ-SALINAS et al., 1997; ISRAELI et al., 2000; CONSTANTINO et al., 2009).

Em pesquisa publicada por Inácio et al. (2001) e Ulibarri et al. (2001), foi mostrado que tanto o ânion originalmente intercalado quanto a cristalinidade do HDL afetam drasticamente sua capacidade de troca aniônica. Estudos de dinâmica molecular e difusão de íons em superfícies e interfaces revelaram que a estrutura e a composição da superfície dos HDLs controlaram a fluidez da troca aniônica no espaço interlamelar, assim como os coeficientes de difusão de espécies adsorvidas na superfície, seu tempo viável na superfície, e sua dinâmica rotacional e translacional (LOMBARDO et al., 2008; KALINICHEV et al., 2010).

Baseados neste processo de troca iônica, muitos ânions orgânicos e inorgânicos tem sido intercalados, como polioxametalatos, surfactantes, corantes, amino ácidos e DNA. A intercalação de diversos complexos metálicos aniônicos foi realizada para introduzir íons metálicos nobres e de transição (FUDALA et al., 1999; GÉRARDIN et al., 2005; CHOY et al., 2007; LATTERINI et al., 2007).

3.1.4.2 Processo de calcinação/reconstituição

Figura 02: Esquema simplificado do processo de reconstituição dos HDLs através do processo de reidratação.



Fonte: VIEIRA, 2009.

A reconstituição da estrutura através da reidratação do HDL calcinado (Figura 02) foi descrita primeiramente por Miyata (1980). Esta propriedade única, chamada de “efeito memória”, pode ser utilizada como um método geral para modificar o espaço interlamelar destes compostos. Primeiramente, um HDL contendo um ânion volátil foi calcinado, gerando uma mistura de óxidos resultantes, e depois esta mistura foi reidratada em solução aquosa contendo o ânion a ser intercalado. Este método foi utilizado para produção de HDL-MgAl

intercalados com diversos ânions (CrO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , HVO_4^{2-} , SiO_3^{2-} , HGao_3^{2-} e SO_4^{2-}), onde as condições de calcinação (temperatura, taxa de aquecimento e duração) são parâmetros importantes para a recuperação da estrutura do HDL (MILLANGE et al., 2000; LAGUNA, 2007).

3.1.5 Adsorção

As reações de adsorção são, normalmente, consideradas como interações intermoleculares entre solutos e fase sólida, que podem ser descritas como uma complexação de superfície composta por duas faces de reação. A quantidade de espécies químicas adsorvida é afetada por diversos fatores como pH, temperatura, força iônica, dosagem e concentração inicial. Nos últimos anos, muitos relatos sobre adsorção de contaminantes em HDLs tem sido publicados. Tais contaminantes incluem oxiânions, ânions monoatômicos, orgânicos e gasosos. Poucos estudos focam adsorção de cátions em HDLs, onde as pesquisas atuais não são tão compreensivas e bem consolidadas como na adsorção de ânions. Investigar esse tipo de mecanismo e desenvolver novas técnicas terá grande importância para o tratamento de água (SPARKS, 2003; LIANG et al., 2013).

Isotermas de adsorção indicando como os adsorvatos interagem com os adsorventes são essenciais para o desenvolvimento de sistemas de adsorção. As isotermas de Langmuir e Freundlich são as mais comumente aplicadas para representar os dados de adsorção. A isoterma de Langmuir é frequentemente aplicada para superfícies homogêneas com toda a superfície de adsorção de igual afinidade, já a isoterma de Freundlich se aplica às superfícies heterogêneas. Por exemplo, a isoterma de Langmuir pode se adequar às isotermas de adsorção para Pb^{2+} em HDL-MgAl intercalados com Cl^- melhor que a de Freundlich em diferentes temperaturas. Deve-se perceber que as isotermas de Langmuir e Freundlich são puramente descrições de dados macroscópicos e não são prova definitiva de mecanismos de adsorção. Os mecanismos devem ser investigados a nível molecular, pois tais isotermas não conseguem identificar diferenças entre mecanismos de adsorção e precipitação em superfície (SPARKS, 2003; KAMEDA, SAITO, UMETSU, 2005; PÉREZ, et al., 2006; LIMOUSIN, GAUDET, CHARLET, 2007).

3.1.6 Toxicidade

A presença de cátions de baixa toxicidade e biocompatíveis como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e até Al^{3+} nas lamelas catiônicas gerou a ideia de utilizar esses sólidos como carreadores de espécies

aniônicas bioativas. Estudos mostram que fatores como a natureza dos cátions metálicos que constituem a lamela dos HDLs, seus ânions de compensação intercalados no espaço interlamelar, a morfologia, o tamanho de suas partículas, a carga elétrica e a área superficial influenciam na toxicidade destes materiais em meio biológico (CHOI, CHOY, 2011; SEFTTEL, COOL, LUTIC, 2013).

Uma simples comparação da citotoxicidade do HDL-MgAl e do HDL-ZnAl através do teste de hemólise, mostra uma menor toxicidade causada pelo HDL à base de Magnésio e Alumínio. Neste estudo, como ambos possuíam tamanhos de partícula e solubilidades semelhantes, os autores afirmam que a maior toxicidade apresentada pelo HDL à base de Zinco e Alumínio se deu pela presença dos íons Zn^{2+} , tendo em vista que os níveis de Al^{3+} foram os mesmos para ambos os materiais (CHOI et al., 2007).

Outro estudo de citotoxicidade com células A594 (carcinoma pulmonar) e dois tipos diferentes de HDL-MgAl, um intercalando o ânion CO_3^{2-} e o outro Cl^- , indicaram que o material composto pelo ânion carbonato se mostrou mais tóxico, quando comparado ao cloreto. Os autores atribuem tal fato à estabilidade termodinâmica do HDL-MgAl- CO_3^{2-} . A menor dissolução do HDL-MgAl- CO_3^{2-} nos fluidos corporais, pH = 7,4, aumenta a retenção celular, influenciando no andamento das funções celulares essenciais. Foi também avaliada a toxicidade do HDL-MgAl- CO_3^- de diferentes tamanhos de partícula, onde partículas de 50 e 350 nm apresentaram maior toxicidade quando comparadas às partículas de 100 e 200 nm. Os pesquisadores afirmam que o aumento da área superficial das partículas menores (50 nm) culmina numa maior reatividade do material devido à indução de processos inflamatórios e danos à membrana celular. As partículas maiores (350 nm) causam um pequeno distúrbio no crescimento celular. Portanto, HDLs produzidos numa faixa de tamanho de partículas entre 100 e 200 nm exibiram baixa toxicidade em relação a proliferação celular, danos de membrana e resposta inflamatória (ZHU et al., 2008; CHOI et al., 2008; LANONE et al., 2009; BAEK et al., 2011).

Embora os HDLs apresentem efeito citotóxico, quando comparados a outros materiais orgânicos seus efeitos nocivos mostram-se moderados. Linhagens celulares A594 e L132 se mostraram mais sensíveis às sílicas quando comparadas com os HDLs. É importante ressaltar que, geralmente, as doses de HDL utilizadas nestes testes são em torno de 100 $\mu g/mL$, o que permite considerar que os HDLs como agentes não tóxicos considerando os resultados apresentados (CHOI, OH, CHOY, 2011).

3.2 PARTE II: Incremento de Solubilidade

O crescente interesse pelo incremento de solubilidade se dá devido ao progresso da química medicinal e a química combinatória, que vêm, cada vez mais, identificando novas entidades químicas candidatas a fármacos. Porém, a solubilidade destas moléculas tem decrescido drasticamente. Enquanto valores de solubilidade menores que 20 µg/mL de uma NEQ eram praticamente desconhecidos até a década de 80, a situação tem mudado tanto que, já na década passada, candidatos a fármacos com solubilidades intrínsecas menores que 1 µg/mL já eram muito comuns. Estas entidades, com frequência apresentam absorção baixa ou instável quando administrados por via oral devido às barreiras impostas pela taxa de dissolução, que limita a absorção no TGI. Segundo autores, 70% dos potenciais candidatos a fármacos são descartados devido sua baixa solubilidade aquosa, que está diretamente relacionada com a biodisponibilidade, antes mesmo de chegarem aos laboratórios de tecnologia farmacêutica. Consequentemente, aumentar a solubilidade aquosa aparente e a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água é um grande desafio para os pesquisadores (SERAJUDDIN, 2007; COOPER, 2010; KAWABATA et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

Em artigo publicado por Serajudin (2007), o autor afirma que a solubilidade das NEQs está, de forma geral, dividida em três grupos, onde aproximadamente um terço de novos compostos sintetizados em laboratórios de química medicinal apresentam uma solubilidade aquosa menor que 10 µg/mL, outro um terço com solubilidade entre 10 e 100 µg/mL e o terço final com solubilidade maior que 100 µg/mL. Com tal predominância de entidades com baixa solubilidade aquosa, deve-se empregar uma atenção especial para identificar e selecionar bons candidatos para o incremento de solubilidade.

Junto com a permeabilidade, a solubilidade de um fármaco é a chave que determina sua biodisponibilidade oral. Dessa forma, o processo de dissolução dos fármacos é crítico na eficácia terapêutica de um produto medicinal, independentemente de sua via de administração. A dissolução envolve a transformação do fármaco do estado sólido para solução no fluido do TGI. Este processo é afetado por diversos fatores presentes na equação de Noyes-Whitney, a medida em que a dissolução do fármaco, sob condições fisiológicas, é regulada pela sua solubilidade aquosa. Considerando a equação modificada de Noyes-Whitney (figura 03), ela nos traz algumas dicas de como a taxa de dissolução dos fármacos com baixa solubilidade aquosa pode ser melhorada, visando minimizar as limitações da biodisponibilidade oral. Nesta equação: dC/dt é a velocidade de dissolução, A é a área de superfície de contato entre a partícula do fármaco e o meio de dissolução, D corresponde ao coeficiente de difusão do fármaco, C_s é

a concentração do fármaco no campo de difusão, C é a concentração do fármaco no meio num determinado tempo, e h representa a espessura da camada limite de difusão adjacente à superfície do composto a ser dissolvido (NOYES, WHITNEY, 1987; LEUNER, DRESSMAN, 2000; LOH, SAMANTA, HENG, 2015).

Figura 03: Equação modificada de Noyes-Whitney

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h}$$

Fonte: autoria própria.

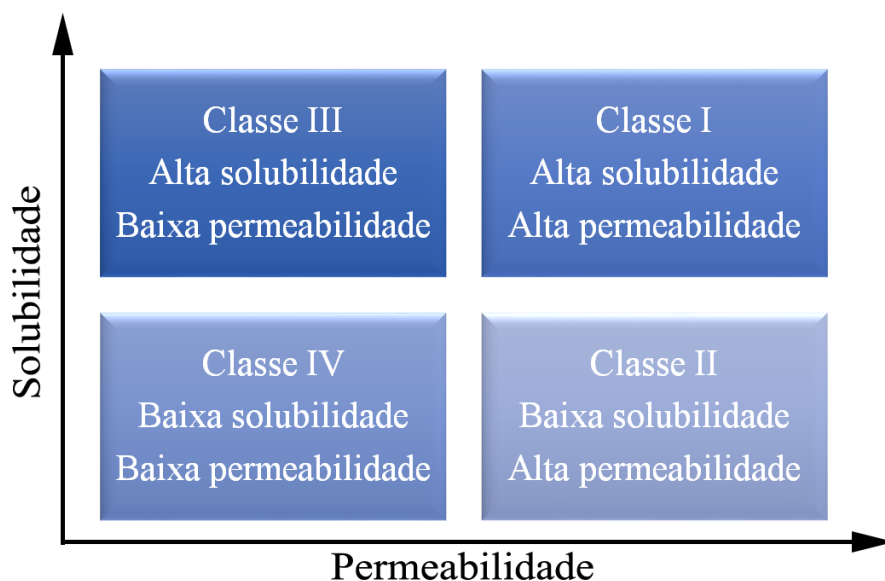
As principais possibilidades para melhorar a dissolução de fármacos analisando a equação acima são: aumentar a área superficial disponível para dissolução através da diminuição do tamanho da partícula do fármaco sólido e/ou otimizando as características de molhabilidade de sua superfície, diminuir a espessura da camada limite de difusão, assegurar as condições *sink* para dissolução e, por último, mas não menos importante, aumentar a solubilidade aparente do fármaco sob condições fisiologicamente relevantes. Dentre estas possibilidades, mudanças na hidrodinâmica *in vivo* são difíceis de serem controladas e a manutenção das condições *sink* dependerá do quão permeável é a mucosa gastrintestinal em relação ao fármaco, assim como a composição e quantidade de volume dos fluidos do TGI. Embora alguns pesquisadores se direcionam ao aumento da permeabilidade utilizando excipientes apropriados, os resultados obtidos não são encorajadores. Portanto, a opção mais atrativa para o aumento da taxa de dissolução dos fármacos é o aumento da solubilidade aparente fazendo uso de excipientes funcionais (LEUNER, DRESSMAN, 2000; LOH, SAMANTA, HENG, 2015).

3.2.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (figura 04) é uma classificação científica de fármacos baseada na solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal que se correlacionam com a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de produtos farmacêuticos. Quando combinada com as características da dissolução *in vitro*, o SCB leva em consideração dois fatores principais, mencionados acima, que comandam a taxa e a extensão

da absorção de fármacos administrados pela via oral em formas farmacêuticas sólidas e, por fim, sua biodisponibilidade. Portanto, o SCB é uma ferramenta fundamental no desenvolvimento de formulações, especialmente no caso de produtos farmacêuticos orais (WAGH, PATEL, 2010; YU et al., 2002; KHADKA et al., 2014).

Figura 04: Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



Fonte: autoria própria.

Com o crescente aumento do número de fármacos que apresentam baixa solubilidade aquosa, atualmente, a indústria farmacêutica enfrenta consideráveis desafios na tentativa de melhorar a solubilidade destas moléculas. Apesar das promissoras atividades farmacológicas, muitas das NEQs se encontram na classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), caracterizados por uma alta permeabilidade em membranas biológicas, mas com baixa solubilidade aquosa (Figura 04). Esses fármacos apresentam absorção instável ou incompleta, levando a uma exposição insatisfatória do fármaco *in vivo* e uma baixa biodisponibilidade. Para entidades pertencentes a classe II do SCB, a dissolução é o passo determinante em sua absorção (LIPINSKI, 2000; MULLER, KECK, 2004; LOH, SAMANTA, HENG, 2015).

Pesquisadores constantemente buscam meios de facilitar e aumentar a solubilidade e, portanto, a taxa de dissolução de fármacos pertencentes a esta classe. Como mencionado anteriormente, a biodisponibilidade de fármacos pertencentes a classe II do SCB é susceptível a ter sua taxa de dissolução como etapa limitante no processo de absorção. Porém, devido à alta permeabilidade desta classe, tais fármacos têm sido o foco de pesquisas visando o incremento

de solubilidade nos últimos anos, e diversos tipos de formulações já foram desenvolvidas (KUMAR et al., 2013; ONOUE et al., 2012).

3.2.2 Estratégias para o incremento de solubilidade

A maioria das NEQs em desenvolvimento tem como objetivo final serem administradas numa forma farmacêutica sólida que apresente eficácia e reprodutibilidade nas concentrações plasmáticas *in vivo* após administração oral. As NEQs mais promissoras, apesar da sua alta permeabilidade, são geralmente absorvidas apenas na porção superior do intestino delgado, tendo sua absorção reduzida no ílio de forma significativa, mostrando que existe uma estreita janela de absorção. Consequentemente, se o fármaco não for completamente solubilizado no TGI, este apresentará uma baixa biodisponibilidade (VAN-DROOGE et al., 2006; VIPPAGUNTA et al., 2006; VASCONCELOS, SARAMENTO, COSTA, 2007).

O desenvolvimento de formulações efetivas aborda meios de facilitar esta absorção de fármacos administrados pela via oral. No caso de fármacos com baixa solubilidade aquosa, este ponto pode ser um grande desafio. Enquanto avanços são alcançados no desenvolvimento de novas tecnologias para carregamento de fármacos, como as dispersões sólidas, outros meios como as formulações à base de lipídeos, micro e nanosuspensões, têm o desenvolvimento de sua formulação apresentado de forma empírica e incerta. Desta forma, os esforços para desenvolver novos mecanismos que promovam uma maior solubilidade dos fármacos no TGI são ainda necessários e deveras importantes (WARREN et al., 2010).

Com os avanços da ciência, várias estratégias estão sendo desenvolvidas e aplicadas para sobrepor este obstáculo. Os métodos mais comuns empregados para o incremento da solubilidade e taxa de dissolução incluem a redução do tamanho de partícula (partículas micro e nanométricas) para aumentar a área de superfície, solubilização em sistemas surfactantes, aumentar a porosidade das partículas, polimorfismo, modificação da estrutura cristalina, complexação, pro-fármacos, formação de sais de fármacos e formação de dispersões sólidas. Outra alternativa para tal é a estabilização da forma amorfa dos fármacos. Tal forma consiste de um estado de alta energia que apresenta maior solubilidade e taxa de dissolução e, portanto, maior biodisponibilidade (SHARMA et al., 2009; MERISKO-LIVERSIDGE, LIVERSIDGE, 2011; GAO et al., 2013; NKANSAH et al., 2013; ZHANG et al., 2012, 2013, 2014).

Contudo, a precipitação do fármaco é uma ameaça comum enfrentada por algumas destas formulações. Tal precipitação pode surgir de um excesso de fármaco sendo solubilizado

rapidamente e que, logo em seguida, provoca sua recristalização nos fluidos do TGI, impedindo sua absorção e diminuindo sua biodisponibilidade. Para formulações orais, a precipitação de fármacos também pode ser iniciada devido às mudanças de pH no TGI (JOHNSON, HE, YALKOWSKY, 2003; LOH, SAMANTA, HENG, 2015).

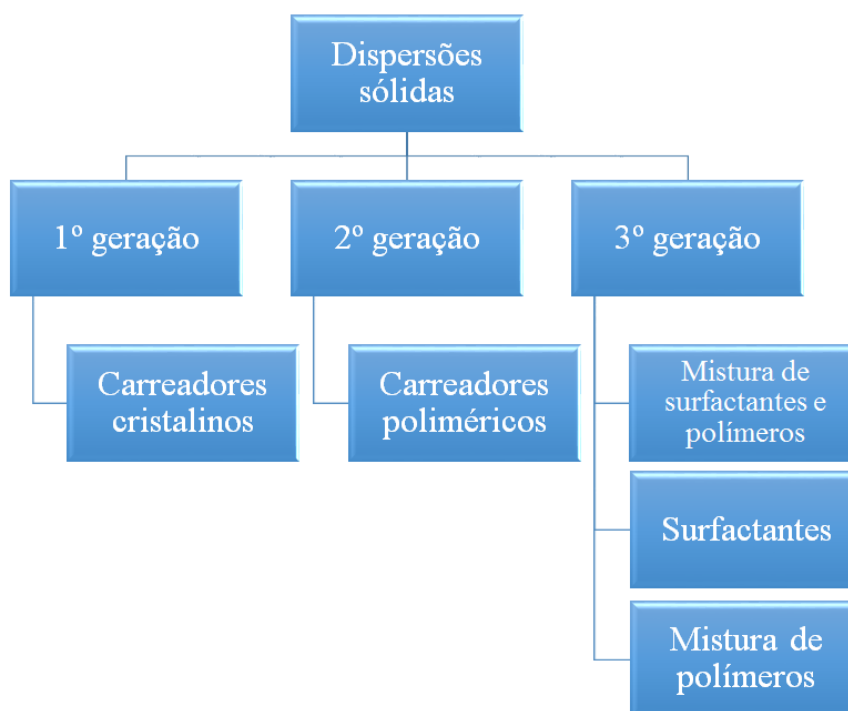
A conversão da forma cristalina para a forma amorfa após a aplicação de energia tem sido descrita por mecanismos de desestabilização mecânicos e termodinâmicos. O mecânico descreve uma desestabilização da unidade cristalina resultante de vibrações, como função da pressão aplicada. Já de acordo com a mecanismo termodinâmico, o número de imperfeições aumenta com o aumento da pressão e a transformação ocorre a partir de um ponto crítico, onde a fase amorfa é mais estável que o cristal desordenado (CROWLEY, ZOGRIFI, 2002; SHARMA, DENNY, GARG, 2009).

Historicamente, as abordagens para aumentar a absorções de fármacos pouco solúveis em água tem estado em torno de meios para incrementar a solubilidade aparente do fármaco no TGI ou aumentar sua taxa de dissolução. Contudo, na última década, a atenção foi desviada com a constatação de que o aumento da solubilização intestinal pode ser apenas passageiro, especialmente para moléculas altamente permeáveis, e que a manutenção de um estado de supersaturação temporária (quando a concentração do soluto na solução é maior que o equilíbrio termodinâmico de solubilidade) pode ser suficiente para promover a absorção. De fato, a supersaturação como meio de promover maior atividade termodinâmica pode aumentar a absorção de fármacos de forma mais eficaz que numa simples solução (WARREN et al., 2010).

3.2.3 Dispersões Sólidas

Como têm sido exposto pelos autores, a liberação do fármaco é um passo crucial e limitante para sua biodisponibilidade oral, particularmente para fármacos com baixa solubilidade no TGI e alta permeabilidade. Melhorando o perfil de liberação do fármaco, é possível aumentar sua biodisponibilidade e reduzir seus efeitos colaterais. Para tal, as dispersões sólidas constituem uma das alternativas de maior sucesso no incremento da solubilidade aquosa de fármacos (STREUBEL, SEIPMANN, BODMEIER, 2006; TANAKA et al., 2006; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

Vasconcelos, Sarmento e Costa (2007) classificaram as dispersões sólidas em três grandes grupos: dispersões sólidas de primeira, segunda e terceira geração, como mostrado na figura 05.

Figura 05: Classificação dos diferentes tipos de dispersões sólidas.

Fonte: adaptado de Vasconcelos, Saramento, Costa (2007).

3.2.3.1 Dispersões sólidas de primeira geração

A primeira descrição de dispersões sólidas foi feita por Sekiguchi e Obi (1961). Eles notaram que a formulação de misturas eutéticas melhorava a taxa de dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade aquosa. Na mesma década, diversas dispersões sólidas foram reportadas utilizando fármacos como sulfatiazol e cloranfenicol. Estas dispersões produziram uma liberação mais rápida dos fármacos e uma maior biodisponibilidade quando comparadas às formulações convencionais dos mesmos fármacos. O tamanho reduzido das partículas e a melhor molhabilidade foram as principais razões para as melhorias observadas (VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

Anos depois, Levy (1963) e Kaning (1964) também desenvolveram dispersões sólidas contendo manitol como carreador, preparando soluções sólidas através de dispersões moleculares ao invés de misturas eutéticas. As melhorias observadas foram atribuídas à rápida dissolução do carreador, liberando microcristais do fármaco. Essas dispersões sólidas, designadas como dispersões sólidas de primeira geração, foram preparadas utilizando carreadores cristalinos, como a ureia e açúcares, que foram os primeiros carreadores a serem empregados em dispersões sólidas. Eles tem a desvantagem de formar dispersões cristalinas,

que são mais termodinamicamente estáveis e não liberam o fármaco tão rápido quanto as dispersões amorfas (LEUNER, DRESSMAN, 2000; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

3.2.2.2 Dispersões sólidas de segunda geração

No final da década de 60, Simonelli, Mehta, Higuchi (1969) e Chiou e Riegelman (1969) observaram que dispersões sólidas, onde o fármaco era mantido em seu estado cristalino, poderiam não ser tão efetivas quanto em seu estado amorfo, devido a maior estabilidade termodinâmica dos cristais. Dessa forma, surgiram as dispersões sólidas de segunda geração, que apresentavam carreadores amorfos ao invés dos cristalinos. Neste caso, o fármaco é disperso de forma irregular, a nível molecular, por todo o carreador que, geralmente, são polímeros (VILHELMSSEN et al., 2005; URBANETZ, 2006; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

3.2.2.3 Dispersões sólidas de terceira geração

Os avanços da ciência mostraram que o perfil de dissolução de fármacos pode ser melhorado se os carreadores possuírem superfície ativa ou propriedades auto-emulsificantes, surgindo, então, as dispersões sólidas de terceira geração. Estas dispersões são destinadas a alcançarem os mais altos níveis de biodisponibilidade para fármacos de baixa solubilidade aquosa e estabilizarem as dispersões sólidas, evitando a recristalização dos fármacos (VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

3.3 PARTE III: Olanzapina

Antipsicóticos são fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia, transtorno bipolar e outras desordens psicóticas, afetivas e de comportamento. Esta classe pode ser dividida em antipsicóticos típicos ou de primeira geração, e atípicos ou de segunda geração, que diferem consideravelmente quando se trata do perfil dos efeitos colaterais. Apesar dos antipsicóticos atípicos ainda apresentarem efeitos colaterais neurotóxicos, eles apresentam um perfil de efeitos colaterais extrapiramidais agudos (parkinsonismo, distonia aguda, acatisia) e crônicos (discinesia tardia) praticamente nulos, o que é bastante favorável ao tratamento. Além disso, os antipsicóticos de segunda geração parecem ser mais efetivos, pois suprimem tanto

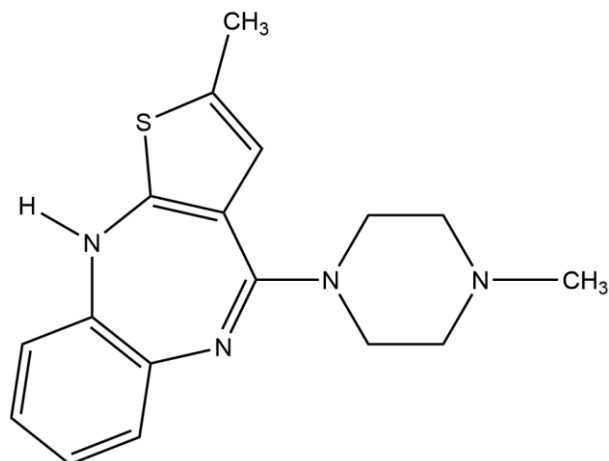
sintomas negativos quanto positivos da esquizofrenia (ALMEIDA et al., 2006; HEISER et al. 2007; KLUGE et al., 2014).

Dentre os antipsicóticos atípicos, como risperidona, ziprasidona, aripiprazol, quetiapina, haloperidol e outros, destaca-se a Olanzapina. Este fármaco está no top 20 dos medicamentos (Zyprexa®) mais prescritos nos EUA na última década, sendo o antipsicótico mais comumente utilizado, e está no top 10 dos mais vendidos pela indústria Eli Lilly & Co, principalmente por sua alta eficácia terapêutica no tratamento da esquizofrenia e transtorno bipolar, sendo comercializado em mais de 84 países, desde 1996. Além desta forma farmacêutica sólida, a Olanzapina também é comercializada em formulação parenteral, como nanocristais de Palmoato de Olanzapina, na forma de suspensão injetável intramuscular (Zyprexa® Relprevv™ e Zypadhera®) que libera o fármaco de forma controlada por até um mês, com as mesmas concentrações atingidas na formulação oral (LINDSLEY, 2010; REGULSKA, KARPINSKA, 2012; TOHEN et al., 2015; DETK et al., 2015; JOHNSON, 2015).

Além das indicações terapêuticas clássicas mencionadas anteriormente, o uso da Olanzapina já foi observado em outras patologias, discutidas detalhadamente em revisão bibliográfica feita por Fonte, Fatigoni e Roila (2015). Como exemplo, a OLZ se mostrou eficaz no combate da êmese refratária em pacientes com câncer terminal, onde reduziu a náusea e o vômito provocados pelos opióides administrados nos pacientes. Há relatos também da associação da OLZ com fluoxetina, onde o antipsicótico estabiliza bem o humor dos pacientes e, aparentemente, aumenta o efeito do antidepressivo.

Olanzapina (OLZ) (Figura 06), 2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-tieno[2,3-b][1,5]-benzodiazepina, com fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e peso molecular 312,43, é membro de uma nova classe de fármacos benzodiazepínicos antipsicóticos. Foi obtido pela primeira vez por Chakrabarti, Holter e Tupper, na Grã-Bretanha, em 1982, utilizando a clozapina como precursor. Consiste num sólido amarelo, cristalino, de caráter lipofílico, com grande volume de distribuição (22 L/kg), praticamente insolúvel em água (43 mg/L), solubilidade pH-dependente, ligeiramente solúvel em acetonitrila e acetato etílico, e altamente solúvel em clorofórmio. De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a Olanzapina pertence a Classe II, apresentando baixa solubilidade em água e alta permeabilidade (THAKURIA, NANGIA, 2011; PAISANA, 2016).

Figura 06: Estrutura química da Olanzapina.



Fonte: autoria própria.

Foi reportado que a OLZ se apresenta em, pelo menos, 25 diferentes formas sólidas, incluindo 3 diferentes formas de anidratos (I, II e III), 3 dihidratos (B, D e E) e solvatos. Para evitar a confusão na designação das diferentes formas do fármaco, os autores decidiram seguir a nomenclatura proposta por Reutzel-Edens. Foi também afirmado que, em suspensão aquosa, a conformação mais estável da OLZ, chamada de Forma I, rapidamente se converte para sua forma menos solúvel, o dihidrato B (PAISANA et al., 2016; REUTZEL-EDENS et al., 2003).

A Forma I da OLZ apresentou-se como o cristal mais estável, diretamente cristalizada pela evaporação de solventes orgânicos, incluindo o acetato de etila, THF, acetona e tolueno. Os polimorfos metaestáveis na Forma II e III, assim como os dihidratos, se convertem para Forma I em poucas horas a temperatura ambiente. Na presença de água, a ordem de estabilidade se mostrou reversa, tendo a Forma I como a menos estável, ou seja, mais solúvel, quando comparada aos dihidratos em temperatura ambiente (REUTZEL-EDENS et al., 2003).

Este antipsicótico atípico se liga aos receptores centrais dopaminérgicos (D1, D2, D3 e D4), serotoninérgicos (5-HT_{2a}, 5-HT_{2c}, 5-HT₃ e 5-HT₆), histaminérgicos (H₁), adrenérgicos (α ₁) e muscarínicos (M₁, M₂, M₃ e M₄), apresentando efeitos indesejados como o aumento do apetite e ganho de peso. Tomando vantagem disso, a OLZ tem sido utilizada também para o tratamento da anorexia nervosa e câncer avançado, por promover maior ingestão de comida. Contudo, o mecanismo preciso pelo qual a OLZ aumenta o apetite e o ganho de peso ainda não está totalmente elucidado. Estudos sugerem que o efeito orexígeno deste fármaco esteja associado com a ghrelina e receptores secretagogo do hormônio de crescimento. Da mesma forma, o mecanismo pelo qual a OLZ reduz a náusea e o vômito de pacientes com câncer não foi elucidado, mas acredita-se que esteja relacionado com os receptores de dopamina e

serotonina, conhecidos por mediar êmese induzida por quimioterapia (ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014; FONTE, FATIGONI, ROILA, 2015; DOMECCQ, et al., 2015; PAISANA et al., 2016).

Outros efeitos colaterais deste fármaco, apresentados por pacientes em quimioterapia, é a fadiga e sonolência. Já os pacientes com transtornos psicóticos apresentam, com mais frequência, ganho de peso, sedação, aumento dos níveis de glicose, colesterol, triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade e prolactina no sangue, e efeitos extrapiramidais como acatisia, mas com intensidade consideravelmente menor quando comparados a outros antipsicóticos atípicos. Também são observados efeitos colaterais cardiovasculares (hipotensão postural, fibrilação atrial, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva), respiratórios (pneumonia, dispneia), oculares (ambliopia, visão abnormal, conjuntivite) e dermatológicos. Os efeitos colaterais psiquiátricos incluem, frequentemente, depressão, euforia, delírios, reações maníacas e esquizofrênicas e sensibilidade comportamental. Sintomas de compulsão obsessiva e tentativas suicidas, além de hepatotoxicidade, relacionada com a enzima aminotransferase, também já foram reportados (ALLISON, CASEY, 2001; MAHENDRAN et al., 2007; TAN et al., 2009; FONTE, FATIGONI, ROILA, 2015; DETKE, et al., 2015; CHOU et al., 2015; NIMURA et al., 2015).

Comparada aos antipsicóticos típicos, que causam estresse oxidativo no cérebro e no fígado, a OLZ parece apresentar propriedades protetoras que evitam tais efeitos colaterais. Este fato representa uma vantagem para este fármaco, pois sabe-se que o estresse oxidativo é um dos principais contribuidores da fisiopatologia das desordens psiquiátricas como depressão, esquizofrenia e transtorno bipolar (MARTINS et al., 2008; MAES et al., 2011; ZLATKOVIC et al., 2014; TODOROVIC, et al., 2016).

3.4 PARTE IV: Estresse Oxidativo Vs. Esquizofrenia e Transtorno Bipolar

A mitocôndria é responsável por muitos processos essenciais, como a produção de energia na forma de ATP, obtida principalmente através de fosforilação oxidativa, processo de apoptose, equilíbrio intracelular de cálcio e produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) através da CTE, como produto da respiração celular, tendo em vista que o Oxigênio é o principal aceptor de elétrons da cadeia (PÉREZ, AGUILAR, 2013; BENGESESSER, 2015).

O ATP gerado na mitocôndria é produzido com o fluxo de elétrons do complexo I ao IV, da CTE, localizados na membrana interna da mitocôndria. A energia resultante, na forma de prótons, entra novamente na matriz mitocondrial através da ATP sintetase (complexo V), produzindo ATP. EROs e ERNs da mitocôndria ou do citosol são formados como consequência desta atividade da cadeia transportadora de elétrons (BLANCHET et al., 2011; MONICZEWSKI et al., 2015).

Com o passar do tempo, as funções da mitocôndria vão se tornando menos efetivas, o que inclui o desemparelhamento do complexo I e, com menor frequência, a diminuição da atividade do complexo III. A atividade prejudicada dos complexos da cadeia transportadora de elétrons leva à produção exacerbada de EROs e ERNs, ao comprometimento do equilíbrio de cálcio intracelular e à mutações no DNA. Durante a transferência de elétrons ao longo dos complexos da CTE, elétrons desemparelhados podem escapar e formar radicais livres, como acontece ao encontrar o Oxigênio molecular, podendo, eventualmente, reduzi-lo e formar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), especialmente no complexo I. (GUBERT et al., 2013; MONICZEWSKI et al., 2015).

3.4.1 Radicais Livres

Um radical livre, do ponto de vista químico, é qualquer espécie (átomo, molécula ou íon) contendo, pelo menos, um elétron desemparelhado e que é capaz de existir de forma independente. Apresentam alta reatividade e são gerados durante processos metabólicos em nosso organismo, contribuindo para manutenção da homeostasia. Porém, em excesso, causam danos celulares em diferentes níveis, pois reagem com moléculas biológicas estáveis, roubando elétrons em busca de sua estabilidade eletroquímica. Atacam lipídeos e proteínas que compõem as membranas celulares, impedindo a célula de desempenhar suas funções vitais (transporte de nutrientes, excreção de metabólitos, divisão celular, etc.). O radical $O_2^{\bullet-}$, que está, normalmente, em nosso metabolismo, causa uma reação em cadeia de peroxidação lipídica de ácidos graxos e fosfolipídios de membrana. Atacam também o DNA, impedindo a replicação e contribuindo, junto com os outros fatores além dos mencionados anteriormente, com o envelhecimento e até a morte celular. Contudo, radicais livres produzidos em quantidades moderadas, apresentam muitas funções úteis no organismo, como no combate de infecções (MAYOR-OXILIA, 2010; PÉREZ, AGUILAR, 2013; ROMERO et al., 2013; COPOGLU et al., 2015; ZHANG, 2015).

Espécies Reativas do Oxigênio e do Nitrogênio são termos coletivos, amplamente utilizado, que contemplam todas as espécies reativas, sendo ou não radicais livres, que focam sua atividade no átomo de Oxigênio e Nitrogênio, respectivamente. Contudo, frequentemente este termo inclui outras espécies químicas que têm sua atividade focada em outro átomo além dos mencionados. Além de serem altamente reativos, estão indiretamente envolvidos numa série de condições patológicas. A geração em excesso de EROs é suficiente para oprimir mecanismos de defesa em níveis normais do nosso corpo, resultando, assim, em danos severos em células e tecidos (QURESHI et al., 2007; CAMACHO, PÉREZ, 2009; PÉREZ, AGUILAR, 2013).

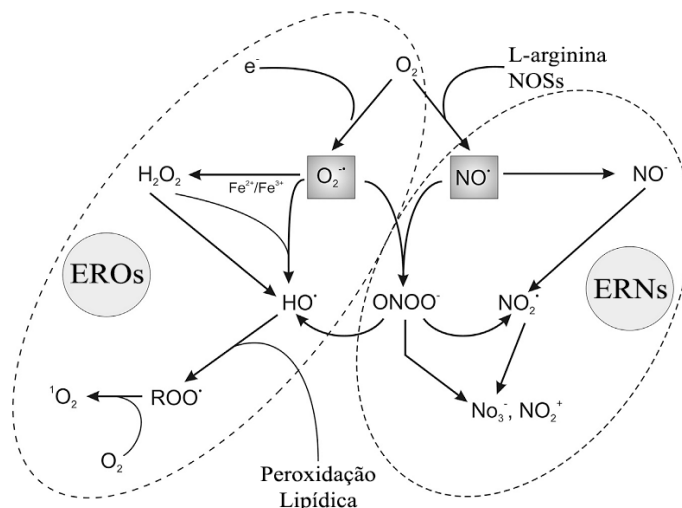
A maioria das principais classes de moléculas biológicas podem apresentar falhas na sua atividade, especialmente lipídeos de membrana, que são mais susceptíveis. Dentre as EROs e ERNs, o ânion superóxido e o óxido nítrico (NO^*) são os radicais livres mais estudados e o cérebro dos mamíferos se mostra excepcionalmente vulnerável ao estresse oxidativo causado pelo ataque destes radicais. O NO^* está presente na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas. Embora seja propriamente dito um radical livre devido ao seu elétron desemparelhado, ele não participa de reações químicas com dano significativo. Contudo, quando reage com o ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$, forma-se o potente oxidante, extremamente reativo, chamado peroxinitrito (ONOO^-) (figura 08). Esta reação é aproximadamente três vezes mais rápida que a reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) para formação peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no combate ao ânion superóxido (QURESHI et al., 2007).

Enquanto nosso corpo produz radicais livres em quantidades moderadas, que decrescem à medida que envelhecemos, nós também precisamos ter em mente que EROs e ERNs podem ser geradas em nosso organismo partindo de fontes exógenas, como antibióticos, drogas, álcool, tabaco, estresse, contaminantes, quimioterapia e exposição à radiação ultravioleta e ionizante (ROMERO et al., 2013; MONICZEWSKI et al, 2015).

As EROs produzidas nas células incluem H_2O_2 , ácido hipocloroso (HClO) e radicais livres como o OH^* e o ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$. O radical OH^* é, particularmente, instável e reage rapidamente e sem especificidade com a maioria das moléculas biológicas. Esta espécie reativa produz reações redox do H_2O_2 catalisadas por metais, como a reação de Fenton. Estes oxidantes podem danificar células, dando início a reações em cadeia como a peroxidação lipídica, a oxidação do DNA ou de proteínas. Esses efeitos podem causar mutações e, possivelmente, diferentes tipos de câncer, caso não sejam revertidos pelos sistemas de reparo do DNA, enquanto as proteínas

danificadas causarão inibição enzimática, desnaturação e degradação de outras proteínas (PÉREZ, AGUILAR, 2013).

Figura 07: As principais EROs e ERNs celulares e suas inter-relações bioquímicas.



Fonte: MONICZEWSKI et al., 2015.

3.4.1.1 Fonte Celular Das EROs e ERNs

EROs e ERNs são formadas como produtos de processos fisiológicos celulares, mas também podem depender de fatores relacionados ao estilo de vida do indivíduo. Desta forma, tais espécies químicas podem ser formadas por fatores endógenos ou exógenos. Existem diversos sítios internos de produção de EROs e ERNs. O principal local de formação, incluindo os radicais livres, são todas as células de órgãos e tecidos do organismo que apresentam mitocôndrias e peroxissomos. Radicais livres são produzidos normalmente pelo metabolismo da mitocôndria, citocromo P-450, pela β -oxidação nos peroxissomos, fagocitose, ativação da fosfolipase A2 que leva à cascata do ácido araquidônico, ativação de proteases que causam a conversão da xantina desidrogenase para xantina oxidase, ativação das NADPH oxidases por hipóxia, isquemia e exercício físico (DIKALOV et al., 2011; MONICZEWSKI et al., 2015).

3.4.1.2 Química Das EROs e ERNs No Cérebro

Devido à alta demanda de oxigênio e a alta concentração de lipídeos, o tecido nervoso é, particularmente, sensível ao dano oxidativo causado pelas EROs e ERNs. A respiração aeróbica das células nervosas e a grave peroxidação dos principais componentes estruturais dos

tecidos parecem ser as razões para a causa destes danos. Na respiração celular, a principal fonte endógena do ânion $O_2^{\cdot-}$ é o processo de redução de um elétron das moléculas de oxigênio. Tal reação acontece em paralelo com reduções de elétrons envolvendo a citocromo c oxidase, onde não há formação de EROs (REPETTO, SEMPRINE, BOVERIS, 2012; MONICZEWSKI et al., 2015).

Embora os radicais hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), forma protonada do ânion $O_2^{\cdot-}$, presentes no citosol, apresentem apenas 0,3% de forma iônica, muitas funções os tornam preferíveis em reações com moléculas de importância biológica. Num estudo de simulação de dinâmica molecular publicado por Cordeiro et al., (2014), foi mostrado que o radical $HO_2^{\cdot}$ tem em torno de 5 vezes mais disponibilidade para a região de ligações duplas na bicamada fosfolipídica da membrana celular do que o ânion $O_2^{\cdot-}$, embasando e confirmando a importância das EROs no processo de peroxidação lipídica (MONICZEWSKI et al., 2015).

O nível de radical $OH^{\cdot}$ formado é o fator determinante do risco de peroxidação lipídica. Impactos deste nível são dependentes da presença de íons Ferro e Cobre, além da quantidade disponível de oxigênio e da extensão da fonte de $NO^{\cdot}$. A presença dos metais catalisa uma reação onde o substrato H_2O_2 gera uma quantidade equimolar de radical $OH^{\cdot}$. Uma das grandes fontes de íons de Ferro para tal reação no sistema nervosa são os conjuntos de ferro-enxofre oxidados em proteínas da família ferredoxina, dentre outras presentes na cadeia transportadora de elétrons (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; D'AUTRÉAUX, TOLEDANO, 2007).

O fornecimento de H_2O_2 nas células depende, dentre outras fontes, da quantidade de ânion $O_2^{\cdot-}$ produzido na cadeia respiratória da mitocôndria, que pode ser reduzido num processo com um elétron ou pode sofrer processo enzimático envolvendo a Superóxido Dismutase (SOD). A decomposição deste peróxido de hidrogênio acontece, posteriormente, com a ação da enzima catalase (CAT). Dentre as transformações do ânion superóxido, a reação com o $NO^{\cdot}$ é cineticamente favorável. O produto desta reação, o ânion $ONOO^-$, decompõe o radical $OH^{\cdot}$ e o dióxido de nitrogênio. O dióxido de nitrogênio reage com ácidos graxos insaturados de forma mais lenta que a reação com o radical hidroxila (quase metade da velocidade), mas, como outras ERNs, é um fácil agente para nitração de resíduos de aminoácidos, em particular com resíduos tirosil (PRYOR, SQUADRITO, 1995).

$NO^{\cdot}$ é o único dos radicais livres que não promove reação em cadeia de peroxidação lipídica. Tal fato acontece pois este radical reage rapidamente com radicais peroxil. No tecido nervoso, esta situação é bastante rara porque reações competitivas incluem reações do $NO^{\cdot}$ com

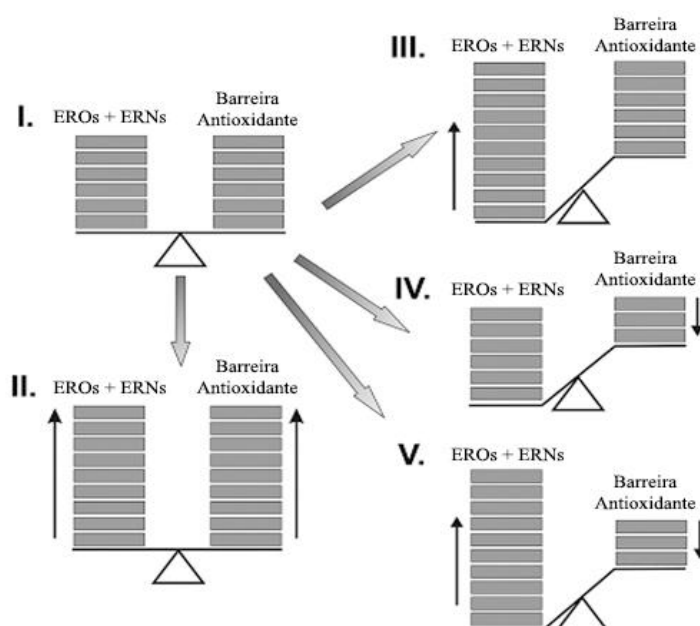
o ânion $O_2^{\bullet-}$ e o Oxigênio molecular, que são considerados em excesso neste ambiente (OHARA, SAYURY, 2012).

A reação em cadeia da peroxidação lipídica é um gerador de radicais de hidrocarbonetos ($R^{\bullet}$), lipídeos ($L^{\bullet}$), peroxil ($ROO^{\bullet}$) e peróxido lipídico ($LOO^{\bullet}$). A maioria deles são capazes de induzir o estado singlete da molécula de Oxigênio (1O_2). Tal forma de oxigênio penetra facilmente na bicamada lipídica e pode iniciar posteriores reações de peroxidação em cadeia (MIYAMOTO et al., 2003; CORDEIRO et al., 2014).

3.4.1.3 Balanço Celular Pró-/Antioxidante

Uma das características pertencentes às células presentes em organismos aeróbicos é a existência de um equilíbrio dinâmico pró-/antioxidante. Este equilíbrio é derivado da presença de agentes oxidativos e agentes que previnem sua ação, que constituem a chamada barreira antioxidante. Uma alteração neste balanço resulta num acréscimo gradual de pró-oxidantes, quando comparados aos antioxidantes, resultando no chamado Estresse Oxidativo (EO). (LANGLEY, RATAN, 2004; SAEIDNIA, ABDOLLAHI, 2013; ZHANG, YAO, 2013; MONICZEWSKI et al., 2015). As possibilidades pelas quais este desequilíbrio pode ocorrer estão representadas na figura 08.

Figura 08: Cinco estados hipotéticos do equilíbrio pró-/antioxidante resultante da relação mútua entre os níveis de EROs e ERNs e a capacidade de inibição pela barreira antioxidante.



Fonte: MONICZEWSKI et al., 2015.

Antioxidantes podem ser definidos, de forma geral, como qualquer molécula, natural ou sintética, de origem endógena (glutathione, co-enzima Q, etc.) ou exógena (vitaminas presente em alimentos), capaz de prevenir ou atrasar uma reação de oxidação de outras moléculas, geralmente substratos biológicos como lipídeos, proteínas, ou ácidos nucleicos. A oxidação de tais substratos pode ser iniciada por dois tipos de espécies reativas: radicais livres e aquelas espécies sem radical livre, mas com reatividade suficiente para induzir a oxidação de biomoléculas (ex.: EROs e ERNs), como as mencionadas anteriormente. Antioxidantes são importantes em organismos vivos, assim como nos alimentos, por fornecerem átomos de hidrogênio ou capturaram os radicais livres e outras espécies reativas. Suas fontes exógenas podem aumentar a proteção do organismo e ajudar os antioxidantes endógenos no combate às doenças (ROMERO et al., 2013; PÉREEZ, AGUILAR, 2013).

Diversos estudos epidemiológicos sugerem que mais pessoas poderiam evitar processos patológicos se consumissem alimentos ricos em antioxidantes (frutas e vegetais). Dessa forma, seria possível proteger o organismo de forma mais eficiente contra o EO, com menos riscos de desenvolvimento de doenças degenerativas. Tais resultados levaram à mais estudos para identificar os componentes específicos responsáveis por tais efeitos positivos na saúde humana. Um explicação que teve bastante aceitação no universo acadêmico é que tal fato acontece devido à presença de nutrientes antioxidantes nos alimentos, como Vitamina C e E, carotenoides, flavonoides, selênio e etc., que poderiam evitar os danos do estresse oxidativo no DNA, proteínas e lipídeos (MAYOR-OXILIA et al., 2015; ROMERO et al., 2013).

A classificação dos antioxidantes pode se dar de acordo com suas atividades e características bioquímicas. Podemos, então, classifica-los em dois grandes grupos, os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, dependendo se são solúveis em água ou em lipídeos, respectivamente. No geral, antioxidantes hidrofílicos reagem com oxidantes no citoplasma das células e no plasma sanguíneo, enquanto os antioxidantes lipofílicos protegem as membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Classificando-os de acordo com seu mecanismo de ação, existem três tipos principais de antioxidantes (PÉREEZ, AGUILAR, 2013):

- Primários: previnem a formação de novos radicais livres, convertendo-os em moléculas menos nocivas antes que estas possam reagir, ou evitam a formação de radicais livres através de moléculas secundárias. Por exemplo: a enzima SOD (converte o ânion $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2), a Glutathione Peroxidase (GPx) (converte o H_2O_2 e peróxidos de lipídeos em moléculas inofensivas ao organismo antes que estes substratos formem radicais livres),

Catalase (CAT), Glutathione Redutase, Glutathione S-Transferase e, por fim, proteínas que se ligam aos metais (ferritina, transferrina e ceruloplasmina), que limitam a disponibilidade do ferro necessário para formação do radical $\text{OH}^\bullet$;

- Secundários: capturam dos radicais livres, prevenindo que a reação em cadeia;
- Terciários: reparam biomoléculas danificadas pelos radicais livres.

Os peroxissomos são organelas celulares que participam da geração de EROs, como H_2O_2 , mas também atuam no resgate da célula, através da atividade da enzima CAT, quando esta organela se apresenta em estado de estresse oxidativo. Em diversos modelos biológicos para processos patológicos envolvendo metabólitos do Oxigênio, o papel dos peroxissomos na prevenção do EO se apresenta de forma extremamente sugestiva, devido a co-localização da CAT e do H_2O_2 e a indução da proliferação de peroxissomos (SCHRADER, FAHIMI, 2006; MORALES-GONZÁLEZ et al., 2013).

Com o objetivo de neutralizar o EO, células utilizam um sistema de defesa dependente da Glutathione (GSH), tiol não-proteico mais abundante nas células, da GPx que catalisa a redução de peróxido endógeno com uma concomitante oxidação da GSH para Dissulfeto de Glutathione (GSSH), e da glutathione redutase (GLR), que catalisa a redução do GSSH de volta para GSH. Este sistema protetor também inclui a glutathione S-transferase, que participa na conjugação de eletrófilos tóxicos com a GSH. O ciclo redox GPx/GLR é responsável pela manutenção das concentrações apropriadas de GSH. Além disso, a CAT desempenha papel importante na proteção contra o EO através da decomposição do H_2O_2 em moléculas de água (STRANGE et al., 2000; SINGHAL et al., 2013; TODOROVIC et al., 2016).

Portanto, os organismos possuem uma complexa rede de metabólitos antioxidantes e enzimas que trabalham em conjunto para prevenir danos oxidativos aos componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos. Geralmente, sistemas antioxidantes evitam a formação destas espécies reativas ou as removem antes que possam causar danos vitais aos componentes celulares, impedindo o desenvolvimento de patologias consequentes (PÉREEZ, AGUILAR, 2013).

3.4.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é um estado em que EROs e ERNs são produzidas em excesso ou o organismo não dispõe de mecanismos eficientes o suficiente para neutraliza-las. Estes

compostos, que incluem os radicais livres, possuem papéis importantes na sinalização redox das células. Contudo, distúrbios no balanço entre a produção EROs e ERNs e o sistema biológico podem ser destrutivos. Por exemplo, a atividades da óxido redutase podem produzir H_2O_2 como metabólito. Esta família de enzimas está presente nas membranas da mitocôndria e do Retículo Endoplasmático Liso (REL), catalisando diversas reações nos processos de síntese de hormônios esteroides ou de desintoxicação, ou até no primeiro estágio da hidrólise de fármacos ou compostos xenobióticos. Dessa forma, são convertidos no REL em compostos solúveis em água para serem excretados na urina (REPETTO, 2005; SEGURA-VALDEZ, 2013).

O mecanismo responsável pelo crescimento do EO envolve o catabolismo da Dopamina, metabolismo do óxido nítrico, anormalidades na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e fatores genéticos. O DNA contém um grande número de grupos fosfatos negativamente carregados que possuem uma habilidade de se ligar à vários cátions. Íons de $Fe^{2+}/3+$ e $Cu^{1+}/2+$ são ligados ao DNA negativamente carregados sob condições de estresse oxidativo. Com esta ligação, o DNA se torna alvo fácil para o H_2O_2 (SHARPE et al., 2003; BOŠKOVIĆ et al., 2013; COPOGLU et al., 2015).

3.4.2.1 Desordens Psiquiátricas Derivadas Do Estresse Oxidativo

O funcionamento normal do Sistema Nervoso Central (SNC) pressupõe uma interação balanceada entre entidades com diferenças estruturas e bioquímicas ligadas aos neurônios. Quando um membro de um circuito neuronal tem sua estrutura ou atividade bioquímica alteradas, acontece um desequilíbrio neste sistema que, de forma compensatória, ativa mecanismos para reaver o equilíbrio fisiológico. O aumento do EO pode ter papel importante no desenvolvimento de desordens psiquiátricas afetando a plasticidade neuronal, transdução de sinal e a captação de neurotransmissores (GÖTZ et al., 1996; MAHADIK et al., 2001; HALLIWELL, 2007; TUNÇEL et al., 2015).

Diversos fatores, como a inibição da respiração mitocondrial, geração de radicais hidroxila e óxido nítrico, e a redução dos mecanismos de defesa contra radicais livres, que causam o EO, têm sido apresentados como contribuidores para degeneração de neurônios dopaminérgicos. Nas últimas décadas, tem-se criado um link, bem aceito pelos pesquisadores, entre o EO e condições degenerativas, tendo em mente que as mudanças oxidativas podem dar início à degradação das funções celulares (QURESHI, 2007).

O EO em diversos estágios patológicos afetam uma grande variedade de funções fisiológicas, contribuindo ou promovendo feedback no desenvolvimento de um grande número de doenças degenerativas e psiquiátricas, como arteriosclerose, diabetes, cardiomiopatias, doenças com inflamação crônica (artrite reumatoide, doenças intestinais e pancreatite), alta pressão sanguínea, doenças oculares e pulmonares, doenças hematológicas, câncer, imunodepressão, asma, doenças neurológicas como Parkinson e distúrbios do comportamento, dentre outras (MAHADIK et al., 2001; TUNÇEL et al., 2015; ROMERO, et al., 2013; PÉREZ, AGUILAR, 2013).

Isto não implica que espécies reativas sempre tenham influência direta no desenvolvimento de doenças. Na verdade, elas predispõem o organismo às doenças causadas por outros agentes. Em muitos casos, o dano oxidativo nos tecidos é maior que os danos causados pela própria doença e, por tanto, contribuem piorando as condições do organismo, dificultando sua recuperação (MAYOR-OXILIA, 2010; ROMERO, et al., 2013).

O cérebro é considerado extremamente sensível ao EO e, de fato, estudos demonstram a facilidade com que ocorre a peroxidação nas membranas dos neurônios. Radicais livres que possuem o Oxigênio como principal átomo reativo são os principais tipos formados nos neurônios, de forma accidental, pelo metabolismo ou pela geração seletiva de EROs e ERNs. Há tempos, evidências já mostram radicais livres como o NO^* , entre outros, apresentando papéis importantes na fisiopatologia de várias doenças do SNC (QURESHI, 2007; TUNÇEL et al., 2015; TODOROVIC et al., 2016).

Recentemente, o número de estudos investigando a associação entre o EO e desordens psiquiátricas tem aumentado, contudo, não existe, ainda, um consenso nesta associação. Estudos nesta área, geralmente, avaliam parâmetros numa simples fase da doença. As pesquisas com diferentes fases das doenças (transtorno bipolar, episódios depressivos e eutímicos, ataques psicóticos de esquizofrenia aguda e fases de remissão) tem utilizado diferentes pacientes em fases distintas, fato que pode tornar falha as comparações entre as fases (SAVAS et al., 2006; ANDREAZZA et al., 2007; KUNZ et al., 2008; MICÓ et al., 2011; RAFFA et al., 2012).

O número de estudos avaliando os parâmetros do EO dos mesmos pacientes em diferentes fases da doença é relativamente limitado. Estudos longitudinais são necessários para revelarem as causas do transtorno bipolar e esquizofrenia, por exemplo. O efeito das particularidades (estilo de vida, nutrição, status socioeconômico, etc.) de cada paciente, que podem causar estresse oxidativo podem ser amenizadas, resultando em dados mais definidos.

Em alguns trabalhos publicados, os pacientes apresentam sobrepeso e o hábito de fumar, fatores que aumentam significativamente o EO. Portanto, para estudar a relação entre EO e desordens psiquiátricas, se faz necessário um maior cuidado ao escolher os pacientes utilizados na pesquisa (KAPCZINSKI et al., 2011; RAFFA et al., 2012; McINTYRE et al., 2010; TUNÇEL et al., 2015).

O fato dos radicais livres desestabilizarem os fosfolipídios da membrana dos neurônios altera sua fluidez e permeabilidade. Isto impede a transmissão do sinal, a liberação e captação dos neurotransmissores como a dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina e glutamato. O conhecimento de que o EO, em especial a peroxidação lipídica, provocado pelas espécies reativas pode estar intimamente ligado com a etiologia de desordens como o Transtorno Bipolar e a Esquizofrenia, apresenta boa aceitação dos pesquisadores da área (MAHADIK et al., 2001; GUBERT et al., 2013; BOŠKOVIĆ et al., 2013; FLATOW, BUCKLEY, MILLER, 2013; TUNÇEL et al., 2014; COPOGLU, 2015; SMAGA et al., 2015).

3.4.3 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma desordem mental caracterizada por apresentar sintomatologia heterogênea. O decorrer da doença e a conduta clínica do tratamento são, geralmente, caracterizadas por relapsos recorrentes. Embora existam extensivas pesquisas, a comunidade psiquiátrica internacional ainda tem dificuldades em obter um diagnóstico preciso devido aos sintomas variados que, por diversas vezes, se assemelham aos apresentados por diversas desordens neurológicas, dificultando, também, o início do tratamento (TAMMINGA, HOLCOMB, 2005; MÜLLER, JACOBS, 2010; FLATOW, BUCKLEY, MILLER, 2013). Os sintomas da esquizofrenia podem ser divididos em dois grandes grupos (BOŠKOVIĆ et al., 2013):

- Sintomas positivos: alucinações, distúrbios de percepção, fenômenos delirantes e desordens de pensamento (fala);
- Sintomas negativos: emoções monótonas, baixa frequência de conversação, respostas emocionais inapropriadas e disfunções cognitivas, como déficits de funções motivacionais e de execução.

O risco mais alto de desenvolver esquizofrenia é durante a vida jovem e adulta, entre 15 e 30 anos. Ambos os sexos são igualmente afetados pela desordem, embora a idade de início dos sintomas seja, tipicamente, mais jovem para os homens. Embora a incidência dessa

patologia seja variável, devido ao difícil diagnóstico, a esquizofrenia atinge cerca de 1% da população em geral. Indivíduos com irmãos ou parentes esquizofrênicos apresenta maior risco, entre 8 a 12%, de serem acometidos pela doença. Para gêmeos homozigotos, a taxa de concordância é de aproximadamente 50% (QUEDNOW; GEYER; HALBERSTADT, 2010; ALBAYRAK et al., 2013).

A alta incidência familiar indica que existe contribuição genética na etiologia desta desordem, juntamente com os fatores ambientais envolvidos. A etiologia da esquizofrenia ainda é desconhecida, mas significantes evidências sugerem que, além dos fatores genéticos e ambientais, o EO, através das EROs e ERNs como base molecular da patologia, está envolvido neste processo (SMAGA et al., 2015).

3.4.3.1 Esquizofrenia Vs. Estresse Oxidativo

O EO está envolvido na etiologia da esquizofrenia através de diferentes mecanismos. Anormalidades envolvendo defesas antioxidantes têm sido constantemente reportadas, mesmo em experimentos com diferentes pacientes, de diferentes idades, com diferentes metodologias de estudo e diferentes aparatos tecnológicos. Embora exista uma inerente complexidade nesta área de pesquisa, diversas descobertas suportam uma associação entre o EO e a fisiopatologia da esquizofrenia. Por exemplo, genes envolvendo defesas antioxidantes e altos níveis de produtos da peroxidação lipídica têm sido reportados no plasma de pacientes com esquizofrenia. É, então, segundo os autores, possível assumir que o EO afeta a sobrevivência e a funcionalidade celular por provocar danos aos lipídeos de membrana, proteínas e estruturas do DNA, causando a progressão da patologia (MESSIAS, CHEN, EATON, 2007; CHOWDARI, BAMME, NIMGAONKAR, 2011).

Parâmetros anormais de EO têm sido identificados no sangue periférico, células vermelhas do sangue, neutrófilos, plaquetas, fluido cerebrospinal e cérebro post-mortem de pacientes com esquizofrenia. Além disso, enzimas antioxidantes e/ou peroxidação lipídica estão correlacionados com a psicopatologia, incluindo os sintomas negativos e positivos. Com a espectroscopia de prótons por ressonância magnética, estudos prévios encontraram correlações do metabolismo dos fosfolipídios de membrana do lobo frontal com a morfologia cerebral e o decréscimo dos níveis de glutathione no córtex pré-frontal medial de pacientes esquizofrênicos. Tais descobertas trazem evidências de que os radicais livres podem estar envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (SIROTA, GAVRIELI, WOLACH, 2003; DIETRICH-

MUSZALSKA, OLAS, YAO, LEONARD, REDDY, 2006; XUAN et al., 2011; FLATOW, BUCKLEY, MILLER, 2013; ZHANG et al., 2015).

Em contrapartida aos estudos que afirmam que pacientes com esquizofrenia apresentam baixos níveis de antioxidantes, alguns estudos reportam pacientes com maiores níveis de antioxidante no plasma. Porém, autores atribuem tal fato como um mecanismo reflexo ou compensatório do organismo que busca o balanço oxidativo. Embora diversos estudos, mencionados anteriormente, explorem níveis antioxidantes específicos em pacientes com esquizofrenia, poucos estudos investigam os níveis antioxidantes totais plasmáticos em tais pacientes. Em pesquisa realizada por Albayrak et al., (2013) foi demonstrada uma redução na concentração dos antioxidantes plasmáticos totais e um aumento do EO em pacientes com esquizofrenia, quando comparados com pacientes saudáveis. Resultados, estes, que estão em concordância com outra pesquisa, publicada por Bošković et al., (2013), que evidenciou uma diminuição das defesas antioxidantes associadas a severos sintomas desta patologia (KUNZ et al., 2008; ALBAYRAK et al., 2013).

Estudos com pacientes que nunca haviam ingerido nenhum antipsicótico, indicam um importante papel das espécies reativas e do metabolismo anormal dos ácidos graxos poli-insaturados. Um aumento do EO, em conjunto com o metabolismo deficiente de tais ácidos graxos, leva ao aumento da peroxidação lipídica. Esse EO parece ser mais pronunciado em pacientes em tratamento com antipsicóticos clássicos, quando comparados aos antipsicóticos atípicos, sugerindo que o tratamento realizado com medicamentos ultrapassados podem contribuir para o desequilíbrio oxidativo (LI et al., 2011; WU et al., 2012; BOŠKOVIĆ et al., 2013).

Estudos clínicos demonstraram um aumento dos níveis totais plasmáticos de H_2O_2 e NO^* em pacientes esquizofrênicos. Altos níveis de biomarcadores oxidativos como as Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), 3-nitrotirosina, isoprostaninas na urina, assim como danos ao DNA e RNA, foram observados. Outros estudos em cérebros de indivíduos esquizofrênicos também mostraram danos oxidativos ao DNA e RNA nos neurônios do hipocampo, um aumento dos níveis de NO^* na região caudada do cérebro ou decréscimo na atividade da xantina oxidase no córtex occipital e no tálamo (DIETRICH-MUSZALSKA, OLAS, 2009; CATTS et al., 2012; JORGENSEN et al., 2013; SMAGA et al., 2015).

3.4.4 Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar (TB) é uma desordem cerebral severa com sintomas bastante heterogêneos. Diversas linhas de pensamentos implicam os distúrbios oxidativos causados pelas EROs e ERNs como estando relacionados com o início e progressão de várias desordens psiquiátricas como o TB, o transtorno depressivo maior, entre outras. Evidências preliminares já indicam que o estresse oxidativo proveniente das EROs e ERNs pode, também, ser mais pronunciado em casos mais severos, que beiram ao suicídio (STEFANESCU, CIOBICA, 2012; VARGAS et al., 2013; BORTOLASCI et al., 2014; BENGESSER et al., 2015)

O transtorno bipolar apresenta prevalência em 2 a 5% da população geral, mesmo possuindo difícil diagnóstico devido aos seus sintomas se confundirem com outras desordens de humor ou psicóticas, como a depressão ou esquizofrenia. Geneticistas têm trazido evidências sobre fatores de risco genéticos compartilhados entre o TB, esquizofrenia e o transtorno depressivo maior. Pode haver um grande atraso (até 10 anos) entre o início da doença até o diagnóstico do TB onde, nesse meio termo, diagnósticos errôneos levam à tratamentos inadequados, podendo até causar intoxicação e piora do quadro. Por exemplo, um diagnóstico equivocado de TB como depressão unipolar pode levar ao uso de antidepressivos sem um fármaco que estabilize o humor do paciente, que pode gerar dependência e resultados clínicos insatisfatórios ou até o aumento do EO (CRADDOCK, OWEN, 2005; PHILLIPS, KUPFER, 2013; HATCH et al., 2015).

3.4.4.1 Transtorno Bipolar Vs. Estresse Oxidativo

Danos provenientes do EO têm sido constantemente reportados em pacientes jovens e adultos que apresentam TB, com evidências vindas tanto de cérebros post-mortem como de amostras de sangue. Estes estudos demonstraram aumento de danos oxidativos em proteínas no córtex pré-frontal de pacientes com TB, e também um acréscimo dos danos induzidos por nitração em resíduos de tirosina, observados tanto no TB quanto na esquizofrenia. Além das proteínas, os lipídeos também representam um constante alvo de oxidação nestes pacientes, que apresentam peroxidação lipídica no córtex cingulado anterior e no córtex pré-frontal. Uma meta-análise revelou que os níveis plasmáticos elevados de peroxidação lipídica são as descobertas mais consistentes de EO associado com o TB. (OZCAN et al., 2004; ANDREAZZA et al., 2010; KONRADI, SILLIVAN, CLAY, 2012; ANDREAZZA et al., 2013; ANDREAZZA et al., 2015).

Além dos estudos relacionados com a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas, autores identificaram danos oxidativos no DNA e RNA de pacientes com TB, enquanto outros reportaram alterações nos níveis de algumas enzimas antioxidantes. Esses resultados são apoiados por evidências como mutações no DNA mitocondrial e um decréscimo no nível de proteínas da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (ANDREAZZA et al., 2008; FREY et al., 2013; BROWN, ANDREAZZA, YOUNG, 2014).

Foi destacado, também, que nos estágios iniciais do TB, os sistemas antioxidantes não se apresentam alterados, quando comparados com pacientes saudáveis. Contudo, nos estágios mais avançados da doença, existe um crescimento significativo nos níveis de antioxidantes. Isto pode sugerir que, nos estágios iniciais, os mecanismos compensatórios de defesa podem não ter sido ativados, ainda, para combater os altos níveis de radicais livres. A ativação destas defesas se dá de forma tardia durante o curso desta patologia, facilitando sua evolução (KAUER-SANT'ANNA et al., 2009; BERK et al., 2011; GOLDSTEIN, YOUNG, 2013; HATCH et al., 2015).

Há tempos que tem sido demonstrado que, além de apresentarem diferentes níveis de enzimas antioxidantes, oxidação proteica e peroxidação lipídica, pacientes com TB possuem maiores níveis de NO*, quando comparados com controles saudáveis. Brown et al. (2014) reportaram uma meta-análise com 971 pacientes com TB e 886 indivíduos saudáveis como controle. Os autores concluíram claramente que o estresse oxidativo possui papel importante nesta patologia, possuindo uma associação robusta com elevados níveis de peroxidação lipídica. Níveis abusivos de EO podem, portanto, contribuir na fisiopatologia do TB. Considerando esse aspecto, e devido à complexidade na identificação de biomarcadores para diagnóstico do TB, um artigo recente da Rede de Biomarcadores da International Society for Bipolar Disorder (ISBD-BIONET) incluiu marcadores de EO, entre outros, como potenciais biomarcadores para o TB (ANDREAZZA et al., 2007; ANDREAZZA et al., 2008; HATCH et al., 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARTE I: Caracterização Físico-Química Dos Sistemas Binários Obtidos E De Seus Componentes Isolados

4.1.1 Material e Solventes

Nitrato de Alumínio Monohidratado [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] (Sigma-Aldrich[®]), Nitrato de Cálcio Tetra hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Sigma-Aldrich[®]), Nitrato de Níquel Hexa hidratado ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich) e Hidróxido de Sódio P.A. (Sigma-Aldrich[®]). Em todo o processo da síntese utilizou-se água deionizada aquecida para eliminação das bolhas de ar. Todos os demais solventes utilizados foram de grau analítico. A Olanzapina utilizada foi adquirida da Sansh BioTech pvt. Ltd, (New Delhi, India), lote: 90L003.

4.1.2 Síntese dos Hidróxidos Duplo Lamelares à Base de Cálcio e Alumínio (HDL-CaAl) e à Base de Níquel e Alumínio (HDL-NiAl)

O processo de obtenção do HDL foi através da síntese por co-precipitação convencional proposto por Shafiei et al. (2012), método em que se adiciona a solução dos sais dos cátions e a solução alcalina simultaneamente sob agitação e gotejamento. Os reagentes utilizados na síntese do HDL foram: Nitrato de Alumínio Monohidratado [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] (Sigma-Aldrich[®]) e Hidróxido de Sódio P.A. (Sigma-Aldrich[®]) para ambos os tipos de HDL, Nitrato de Cálcio Tetra hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Sigma-Aldrich[®]) para o HDL-CaAl e Nitrato de Níquel (II) Hexa hidratado [$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] da (Sigma-Aldrich[®]) para o HDL-NiAl. Em todo o processo da síntese utilizou-se água deionizada.

O método da co-precipitação convencional, utilizado para preparação dos HDLs, sofreu pequenas alterações da ordem de concentração dos reagentes e tempo de obtenção. O HDL foi sintetizado a partir de soluções dos sais Nitrato de Cálcio e Nitrato de Alumínio em meio básico para o HDL-CaAl, e soluções dos sais de Nitrato de Níquel e Nitrato de Alumínio em meio básico para o HDL-NiAl. A solução contendo a mistura dos sais foi gotejada, numa razão de 1 mL/min, na solução de Hidróxido de Sódio. Este processo foi realizado sob agitação constante, temperatura ambiente, pH $10 \pm 0,5$ e atmosfera de nitrogênio. Após a formação do precipitado e término do gotejamento, o composto foi resfriado à temperatura ambiente, lavado com água, centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 2.000 rpm e levados à estufa para secagem a

temperatura 50 °C durante 3 horas. As operações de lavagem e centrifugação foram realizadas em triplicata.

4.1.3 Obtenção dos Sistemas Binários Entre HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ

O processo de obtenção dos sistemas HDL:OLZ foi realizado pela técnica do solvente, descrita por Takahashi & Yamaguchi (1991). A OLZ foi completamente dissolvida em acetona e posteriormente foi adicionado o HDL (HDL-CaAl ou HDL-NiAl). A suspensão formada foi mantida em mesa agitadora com movimento orbital (modelo 109/1TC, Ethik Technology®) por 1 hora para evaporação do solvente. O resíduo de solvente foi seco em estufa à vácuo (MOD 302, TekSet®) à 60 °C. O HDL, sem a presença de OLZ, assim como o fármaco isolado, foram similarmente tratados com acetona para serem usados como material de referência. As misturas físicas (MF) entre os diferentes tipos de HDL e a OLZ foram preparadas para comparação com os sistemas binários.

4.1.4 Caracterização Térmica

4.1.4.1 Análise Termogravimétrica

As curvas TG e a primeira derivada da curva TG (DrTG) da OLZ isolada, dos HDLs isolados (HDL-CaAl e HDL-NiAl), das MFs e dos sistemas binários CaAl:OLZ e NiAl:OLZ, em diferentes concentrações de ativo, foram obtidas a partir de termobalança Shimadzu®, modelo DTG-60H, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, numa faixa de aquecimento de 25 a 500°C. Para este método, determinadas quantidades de massa das amostras foram acondicionadas em porta amostra de alumínio. As análises foram realizadas em triplicata. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monohidratado com perdas de massa definidas. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS versão 2.20 (Shimadzu®) (FREITAS et al., 2012).

4.1.4.2 Análise por Calorimetria Diferencial de Varredura

As curvas de DSC da OLZ isolada, dos HDLs isolados (HDL-CaAl e HDL-NiAl), das MFs e dos sistemas binários CaAl:OLZ e NiAl:OLZ em diferentes concentrações de ativo, foram obtidos em Calorímetro de Varredura DSC Q200 (Shimadzu®), interligado ao software TA-60WS versão 2.20 (Shimadzu®) com atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ e razão de

aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25 a 300°C . As amostras foram colocadas em porta amostras de alumínio hermeticamente fechados com um equivalente de 5 mg (± 0.2) de OLZ. O mesmo tipo de porta amostra foi utilizado como referência em todas as verificações. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4.1.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selenato de zinco. A amostra a ser analisada foi transferida diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. As micrografias foram obtidas com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} em resolução de 4 cm^{-1} .

4.1.6 Difração de Raios X

A difração de Raios-X do pó das amostras foi realizada utilizando o Shimadzu XRD-700, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($1,54\text{ \AA}$), equipado com ânodo de cobre. Foi preparada uma camada fina do pó das amostras num suporte de vidro e analisadas no intervalo entre 0 e 60° , numa velocidade de $0,02^{\circ}/\text{s}$.

4.1.7 Avaliação do Perfil de Dissolução *in vitro* Dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados

A avaliação do incremento de solubilidade foi realizada através da técnica de dissolução *in vitro*, que tem sido utilizada rotineiramente na indústria farmacêutica para avaliar o desempenho das formulações em desenvolvimento antes de realizar testes em animais. Esse estudo foi realizado em condições *sink*, ou seja, onde as concentrações do fármaco são mantidas três a cinco vezes menores que a sua solubilidade (FDA, 1997).

Alíquotas das amostras de OLZ isolada, dos sistemas binários CaAl:OLZ e NiAl:OLZ em diferentes concentrações e de suas misturas físicas, foram adicionadas em cápsulas incolores contendo o equivalente a 5 mg de OLZ em cada. Os testes de dissolução foram realizados no dissolutor Varian® 7010 VK a 37°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), utilizando 900 mL de tampão fosfato pH 6,8, previamente areado, como meio de dissolução, aparato pá sob velocidade de agitação de 50

rpm. O ensaio de quantificação do fármaco foi realizado em espectrofotômetro UV/Vis a 260 nm em intervalos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120 e 180 min. A concentração de fármaco nos perfis de dissolução foi determinada através da curva de calibração inicial (FREITAS, et al., 2012).

4.2 PARTE II: Estudos de Toxicidade *in vitro* dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados

4.2.1 Material e Solventes

2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2' - azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), Trolox, ácido tiobarbitúrico (TBA), nitroprussiato de sódio (NPS), dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), 2-desoxirribose e ferricianeto de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. (St. Louis, MO, USA). Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico e (Sigma-Aldrich®).

4.2.2 Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical DPPH•

Para esta avaliação, foi utilizada a metodologia descrita por Jamialahmadi et al (2014) com pequenas modificações, onde a mistura reacional contendo os sistemas CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), o HDL-CaAl-HDL e HDL-NiAl isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL) com 2,7 mL de solução de DPPH• (100 µM) foi agitada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente, protegida contra luz, por 30 min. A avaliação do potencial antioxidante foi realizada em triplicata e os valores de absorbância foram expressados em porcentagem de inibição da produção do radical DPPH•, utilizando a equação a seguir:

$$\% \text{ Inibição do radical DPPH}^\bullet = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde Abs_{controle} representa a absorbância do controle negativo com 100% de produção de radical DPPH• e a Abs_{mistura reacional} é a absorbância contendo as alíquotas em diferentes concentrações das amostras em estudo. A concentração mínima efetiva (EC₅₀) requerida dos sistemas para 50% de inibição do radical DPPH• foi determinada por espectrofotômetro (λ =

517 nm). O mesmo processo foi realizado da mesma forma com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL).

4.2.3 Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical ABTS^{•+}

Para determinar a capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+}, foi utilizado o método descrito por Oliveira et al, (2014). O cátion do radical ABTS^{•+} foi inicialmente formado pela reação entre 5 mL de solução ABTS 7 mM e 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), que foi incubada à temperatura ambiente e protegida da luz por 16 h. Em seguida, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol para obter uma solução com absorvância de $0,70 \pm 0,04$ ($\lambda = 734$ nm). Protegido da luz e em temperatura ambiente, diferentes alíquotas dos sistemas CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), o CaAl-HDL e NiAl-HDL isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àsquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL) foram transferidas para tubos contendo 1960 µL de radical ABTS^{•+}. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras em espectrofotômetro ($\lambda = 734$ nm) após 6 min. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção do radical ABTS^{•+} através da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição do ABTS}^{\bullet+} = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde Abs_{controle} representa a absorvância do controle negativo com 100% de produção de radicais ABTS^{•+} e a Abs_{mistura reacional} é a absorvância contendo as alíquotas em diferentes concentrações das amostras em estudo. A EC₅₀ requerida dos sistemas para 50% de inibição do radical ABTS^{•+} foi determinada por espectrofotômetro ($\lambda = 734$ nm). O mesmo processo foi realizado com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL).

4.2.4 Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção do íon nitrito (NO₂⁻)

A partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) gerou-se o radical NO[•], que em seguida reage com o oxigênio produzindo íons nitrito (NO₂⁻). O NO₂⁻ foi quantificado pela reação de Griess (FERREIRA et al., 2008). A mistura reacional (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato 10 mM e o sistema CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), o HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados

em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àsquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL) foram incubados a 37 °C por 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL de reagente de Griess e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção de íons NO_2^- utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição do Radical Nitrito} = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ representa a absorbância do controle com 100% de produção de íons NO_2^- e a $\text{Abs}_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância contendo as alíquotas, em diferentes concentrações, das amostras em estudo. A EC_{50} requerida dos sistemas para 50% de inibição do radical $\text{NO}^\bullet$ foi determinada por espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm). O mesmo processo foi realizado com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL).

4.2.5 Avaliação do Potencial in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica, utilizando a metodologia proposta por Almeida et al (2014). Neste experimento, foi utilizada gema de ovo homogeneizada (1% p/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) como substrato rico em lipídio (GUIMARÃES et al., 2010). 1 mL de homogenato foi sonificado e, em seguida, misturado com 0,1 mL dos sistemas CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), do HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àsquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] 0,12 M.

O controle foi realizado apenas com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) usado para emulsionar o sistema avaliado. As reações foram mantidas a 37 °C durante 30 min. Após o resfriamento, alíquotas de 0,5 mL das amostras foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, as absorbâncias foram avaliadas em espectrofotômetro ($\lambda = 532$ nm). Os resultados de peroxidação lipídica foram expressos pela concentração de TBARS formadas por indução do AAPH, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição Peroxidação} = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ representa a absorbância do controle com 100% de produção de TBARS induzida por AAPH e a $\text{Abs}_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância contendo as alíquotas em diferentes concentrações das amostras em estudo. A EC_{50} requerida dos sistemas e seus componentes isolados para 50% de inibição da formação do TBARS foi determinada por espectrofotômetro ($\lambda = 532 \text{ nm}$). O mesmo processo foi realizado com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.6 Avaliação do Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Pelo Potencial Redutor

Para determinação do potencial redutor, foi realizada a metodologia descrita por Machado et al., (2015), onde foram preparadas misturas reacionais contendo os sistemas CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g/mL}$), o HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 $\mu\text{g/mL}$) equivalentes àquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), 1 mL de ferricianeto de potássio e 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 20 min e em seguida foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 10%, 1 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto de ferro 0,1%. A absorbância da mistura reacional foi avaliada em espectrofotômetro ($\lambda = 700 \text{ nm}$). A concentração dos sistemas que promove um acréscimo de 0,5 na absorbância (EC_{50}) foi calculada. O mesmo procedimento experimental foi realizado com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.7 Inibição da Hemólise Induzida Por AAPH em Eritrócitos de Ratos

A preparação dos eritrócitos foi realizada com ratos Wistar com peso corporal entre 200 e 220 g. O processo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil. Os animais foram anestesiados com cetamina e em seguida foi realizada a coleta sanguínea por rompimento do plexo retro orbital com auxílio de capilar de vidro. As amostras de sangue recolhidas foram centrifugadas (2000 rpm) durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Os eritrócitos foram armazenados a 4 °C para serem utilizado dentro de 6 horas (GIRISH et al., 2012).

No tubo reacional foi adicionado 300 µL de suspensão de eritrócitos a 10% em PBS (pH 7,4) e 100 µL do sistema CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), o HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àsquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL). Em seguida, adicionou-se 200 µL de AAPH (200 µM em PBS pH 7,4). A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 2 horas e, logo após, o volume foi completado para 3 mL e centrifugado (1500 rpm) por 5 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a hemólise por leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm) (JAMIALAHMADI et al., 2014). A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição da Hemólise} = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

$\text{Abs}_{\text{controle}}$ representa a absorbância do controle com 100% de hemólise induzida por AAPH e a $\text{Abs}_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância contendo as alíquotas, em diferentes concentrações, das amostras em estudo. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL).

4.2.8 Teste da Artemia salina

Foi utilizado o método proposto por Leite et al., (2015) para avaliar a toxicidade *in vitro* dos sistemas e seus componentes isolados em *A. salina*. Os microcrustáceos foram mantidos em água durante 48h até suas larvas eclodirem. 10 espécimes de *A. salina* (n = 10) foram introduzidos em tubos onde continham os sistemas CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5% (1000, 2000 e 4000 µg/mL), o HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados em concentrações (950, 1900 e 3800 µg/mL) equivalentes àsquelas presentes nos sistemas binários, e a OLZ isolada (50, 100 e 200 µg/mL). O controle negativo foi realizado com o veículo (1:1 água do mar e água mineral), e o controle positivo, dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL. Os espécimes mortos foram contados após 24 e 48h.

4.2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA para múltiplas comparações seguida de Student-Newman-Keuls como teste post hoc. Os resultados foram considerados

estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Coeficiente da correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação entre os resultados dos testes antioxidantes *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: Caracterização Físico-Química dos Sistemas Binários Obtidos e de Seus Componentes Isolados

5.1.1 Obtenção dos Sistemas Binários Entre HDL-CaAl / HDL-NiAl e Olanzapina

Foram obtidos sistemas binários em três concentrações (05, 20 e 30%) diferentes de Olanzapina, além da mistura física correspondente a menor e a maior concentração de fármaco nos sistemas binários. Tais combinações resultaram nas formulações apresentadas na tabela 02.

Tabela 02: Sistemas binários e misturas físicas obtidas.

Componentes da formulação	Abreviação
Sistema binário entre HDL-CaAl (95%) e OLZ (05%)	CaAl:OLZ 05%
Sistema binário entre HDL-CaAl (80%) e OLZ (20%)	CaAl:OLZ 20%
Sistema binário entre HDL-CaAl (70%) e OLZ (30%)	CaAl:OLZ 30%
Mistura física entre HDL-CaAl (95%) e OLZ (05%)	MF CaAl:OLZ 05%
Mistura física entre HDL-CaAl (70%) e OLZ (30%)	MF CaAl:OLZ 30%
Sistema binário entre HDL-NiAl (95%) e OLZ (05%)	NiAl:OLZ 05%
Sistema binário entre HDL-NiAl (80%) e OLZ (20%)	NiAl:OLZ 20%
Sistema binário entre HDL-NiAl (70%) e OLZ (30%)	NiAl:OLZ 30%
Mistura física entre HDL-NiAl (95%) e OLZ (05%)	MF NiAl:OLZ 05%
Mistura física entre HDL-NiAl (70%) e OLZ (30%)	MF NiAl:OLZ 30%

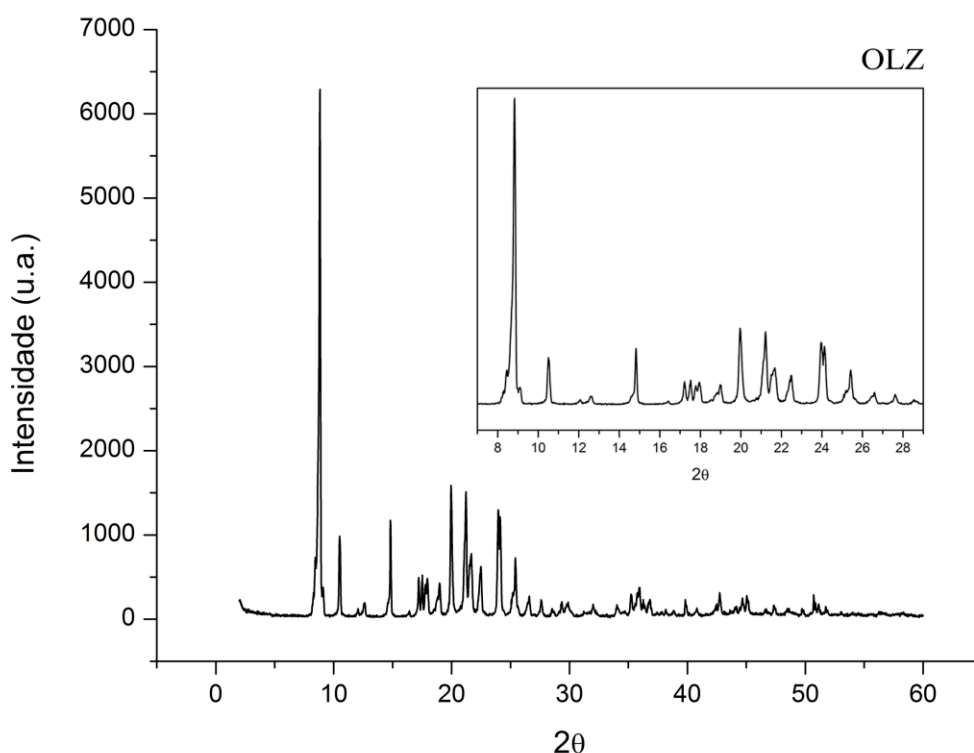
5.1.2 Difração de Raios-X

As formas cristalinas de fármacos apresentam vantagens de alta pureza e estabilizada física e química. Contudo, as barreiras energéticas características dessas estruturas representam uma grande limitação na dissolução destes fármacos cristalinos. Por outro lado, as formas amorfas possuem estrutura desorganizada, quando comparadas às cristalinas, e possuem maior energia livre que leva, como consequência, à maior solubilidade aquosa aparente, maior taxa de dissolução e absorção após administração por via oral. Tais formas amorfas são raramente utilizadas em formulações farmacêuticas, devido sua instabilidade físico-química inerente. Porém, o uso de excipientes funcionais, como o proposto nesta dissertação, representa uma

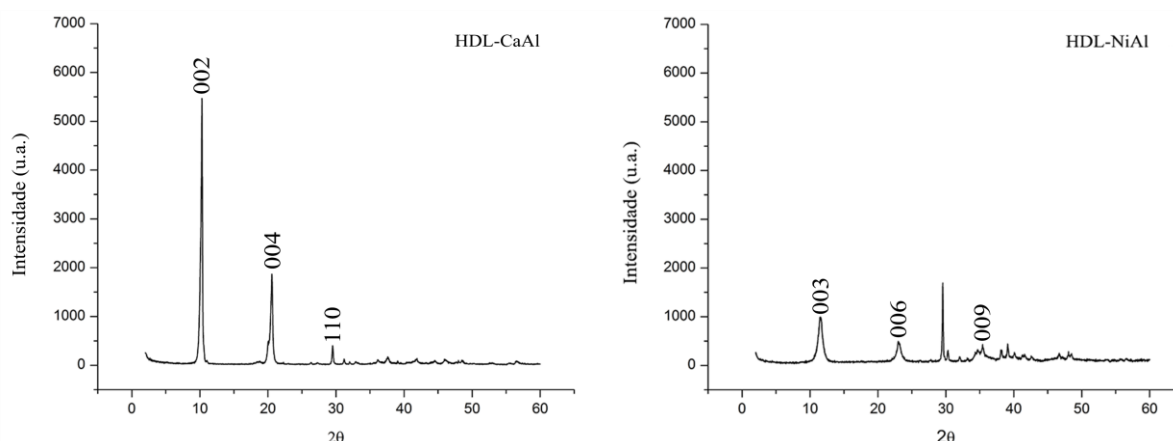
válida estratégia para promover uma maior estabilidade da forma amorfa dos fármacos e poder usufruir de suas vantagens relacionadas à dissolução, discutida mais à frente (BAGHEL, CATHCART, O'REILLY, 2016)

A natureza cristalina da OLZ pode ser verificada (figura 09) através do aparecimento de planos de difração característicos do fármaco, com um pico bem definido de maior intensidade em $2\theta = 8,84$ e picos de menor intensidade entre $2\theta = 10,5 - 23,9$ também identificados por Freitas e colaboradores (2012). Na literatura, já foram reportados mais de 25 polimorfos da Olanzapina. O padrão de cristalinidade apresentado na imagem abaixo é pertencente à forma I da OLZ, apresentando picos característicos deste polimorfo (REUTZEL-EDENS et al., 2003; PERES-FILHO et al., 2011).

Figura 09: Difratoograma de raios X da Olanzapina.



Os padrões de difração do HDL-CaAl e NiAl (Figura 10) observados abaixo de 30° (2θ) são característicos de compostos do tipo Hidrotalcita, onde foi possível evidenciar seus padrões de cristalinidade através dos picos 002 e 004 para o HDL-CaAl e 003 e 006 para o HDL-NiAl, também reportados na literatura, (RAKI, BEAUDOIN, MITCHELL, 2004; COMAS et al., 2006; ZHAO, XIAO, JIAO, 2011; KIM, KIM, OH, 2012; SHAFIEI et al., 2012).

Figura 10: Difratomogramas de raios X do HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados.

Tais picos representam as ordens sucessivas da reflexão basal, que originam-se a partir do empilhamento das lamelas dos HDLs ao longo do eixo c (Figura 01). Através da equação de Bragg, é possível calcularmos os valores de distância interplanar (d_{hkl}) utilizando, diretamente na equação, os valores de θ obtidos experimentalmente (ROCHA, 2015).

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta$$

Nesta equação acima, n é a ordem de reflexão do pico, λ é o comprimento de onda dos raios X da análise, d corresponde ao espaçamento basal do plano hkl e θ é o ângulo de Bragg determinado experimentalmente. Os valores encontrados através desta equação estão representados na tabela 02.

Tabela 03: Valores dos ângulos 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) dos sistemas binários à base de HDL-CaAl e Olanzapina obtidos a partir da difração de raios X.

d_{hkl}	HDL-CaAl		CaAl:OLZ 05%		CaAl:OLZ 20%		CaAl:OLZ 30%		MF 05%		MF 30%	
	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)
(002)	10,30	8,58	10,06	8,79	10,02	8,82	10,00	8,84	10,28	8,60	10,28	8,60
(004)	20,58	4,31	20,54	4,32	20,58	4,31	20,58	4,31	19,98	4,44	19,98	4,44
(110)	29,52	3,02	29,64	3,01	29,50	3,02	29,48	3,02	29,42	3,03	29,42	3,03
c (Å)	17,20		17,41		17,44		17,46		17,48		17,48	
a (Å)	6,04		6,02		6,04		6,04		6,06		6,06	

Com os valores de d correspondentes ao plano d_{002} , temos uma distância entre as lamelas do HDL-CaAl de 8,58 Å, que está de acordo com os valores reportados na literatura, assim como o parâmetro c que apresentou valor de 17,2 Å. O parâmetro cristalográfico c está

relacionado com a distância do plano basal (Figura 01), podendo ser calculado ($c = d_{002} + 2d_{004}$) através dos planos d_{002} e d_{004} relacionados com o eixo c (RAKI, BEAUDOIN, MITCHEL, 2004; SHAFIEI et al., 2012).

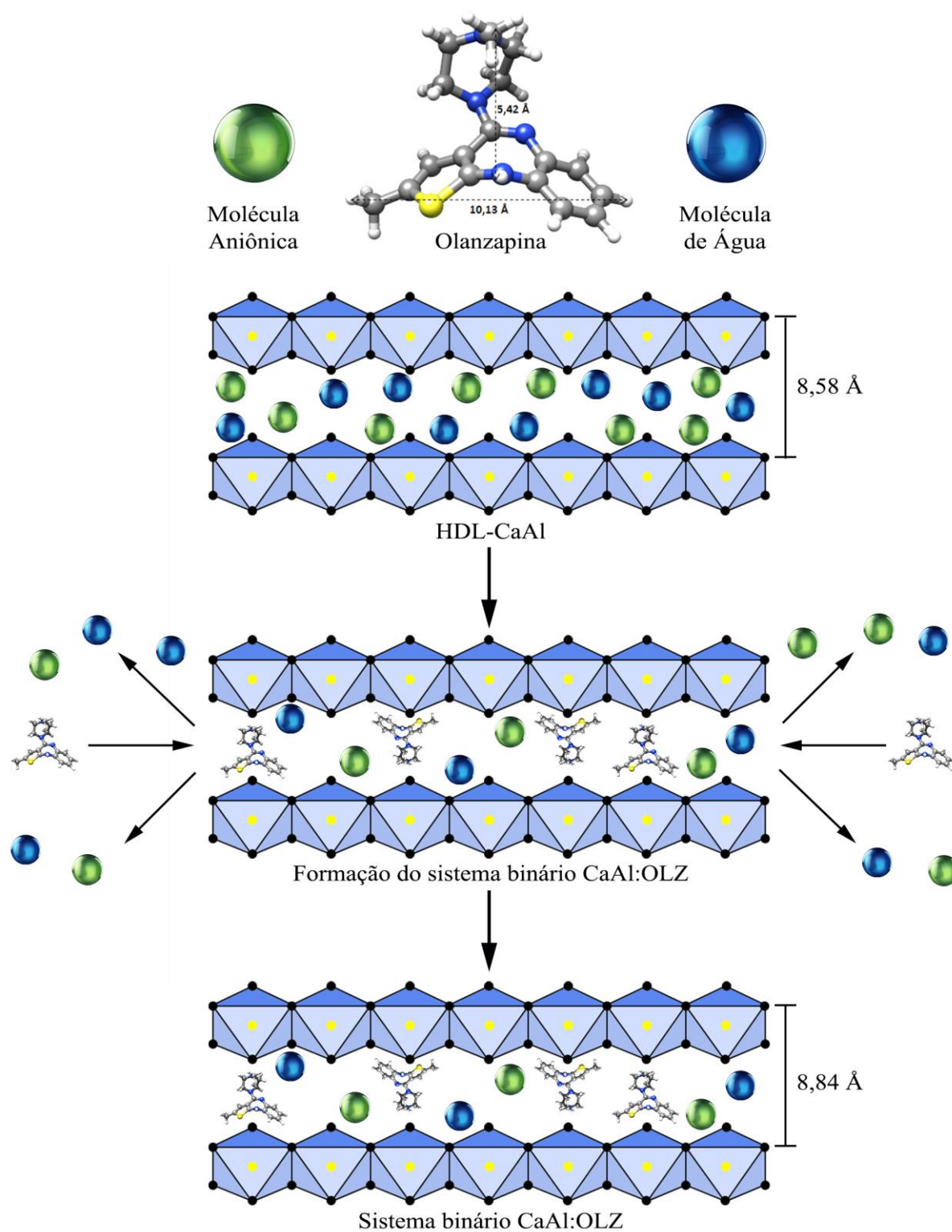
Observando os valores do espaçamento basal dos sistemas binários de HDL-CaAl e OLZ, percebe-se que houve um discreto, porém crescente, aumento na distância entre as lamelas à medida que aumenta-se a concentração do fármaco. Tal fato não foi observado nas misturas físicas, que apresentaram valores constantes e muito próximos dos valores de d apresentados pelo HDL-CaAl isolado. É possível que tenha acontecido uma intercalação do fármaco por troca iônica, onde o ânion nitrato, com tamanho aproximadamente de 3,8 Å (SHAFIEI et al., 2012), originalmente presente no espaço interlamelar, é trocado pela OLZ, que apresenta estrutura química de maior tamanho. Tal fenômeno causaria um aumento do espaço interlamelar (figura 11). Analisando o parâmetro de cristalinidade c , nota-se que com a formação dos sistemas binários, houve também um aumento crescente neste eixo, concordando com os valores de d apresentados por estes sistemas.

Para valores de 2θ em torno ou acima de 30° , temos os picos derivados das reflexões não basais, relacionadas a estrutura interna de cada lamela. O parâmetro cristalográfico a está relacionado com a distância entre dois cátions numa mesma lamela, e pode ser calculado a partir do plano d_{110} ($a = 2d_{110}$), que está relacionado com o eixo a . Tais valores dependem da natureza dos cátions da lamela e dos ânions interlamelares. No caso do HDL-CaAl, temos $d_{110} = 3,02$ Å e, conseqüentemente, $a = 6,04$ Å.

Tabela 04: Valores dos ângulos 2θ (graus) e distância interplanar (d_{hkl}) dos sistemas binários à base de HDL-NiAl e Olanzapina obtidos a partir da difração de raios X.

d_{hkl}	HDL-NiAl		NiAl:OLZ 05%		NiAl:OLZ 20%		NiAl:OLZ 30%		MF 05%		MF 30%	
	2 θ	d (Å)	2 θ	d (Å)	2 θ	d (Å)	2 θ	d (Å)	2 θ	d (Å)	2 θ	d (Å)
(003)	11,54	7,66	11,72	7,55	11,62	7,61	11,58	7,64	11,64	7,60	11,64	7,60
(006)	23,00	3,82	23,18	3,83	23,08	3,85	23,10	3,85	23,10	3,85	23,06	3,85
(009)	35,42	2,53	35,58	2,52	35,46	2,53	35,52	2,52	35,52	2,52	35,28	2,54
c (Å)	22,98		22,65		22,83		22,92		22,80		22,80	
a (Å)	5,06		5,04		5,06		5,04		5,04		5,08	

Figura 11: Arranjo interlamelar do HDL-CaAl com os ânions nitrato, moléculas de água e da Olanzapina.



Fonte: autoria própria.

Os valores da distância interplanar pertencentes ao HDL-NiAl estão representados na tabela 03. O valor de d no plano d_{003} é de 7,66 Å, semelhante ao encontrado na literatura, assim como seu parâmetro de cristalinidade c (VELU, SUZUKI, OSAKI, 2000; SAIHAH, SU, BETTAHAR, 2009; KLEMKAITE et al., 2011). Os autores calculam o valor do parâmetro c para o HDL-NiAl de forma diferente ($c = 3d_{003}$), porém o cálculo para o valor do parâmetro a permanece o mesmo mencionado anteriormente. Ao comparar os valores de d , deste mesmo plano, dos sistemas binários e das misturas físicas, não foi possível observar o aumento do espaçamento basal, sugerindo que não houve intercalação da OLZ por troca iônica com os ânions nitrato. O plano d_{006} do eixo c também não apresentou aumento considerável nos valores de d , tanto para os sistemas binários quanto para as misturas físicas.

Sabe-se que a intensidade dos picos gerados pelos raios X é proporcional à densidade de átomos no plano da estrutura que originou tal pico. Ou seja, quanto mais intenso, maior o número de repetições de uma determinada célula unitária. Na figura 12, podemos observar a sobreposição dos difratogramas gerados pelos sistemas binários à base de HDL-CaAl e OLZ em diferentes concentrações, pelas misturas físicas e seus componentes isolados. Nota-se que o difratograma gerado pelo sistema binário CaAl:OLZ 05% apresenta apenas os padrões cristalinos pertencentes ao HDL-CaAl. O pico de maior intensidade da OLZ em $2\theta = 8,84$, que representa o maior número de repetições de um mesmo plano cristalino, não está presente neste sistema binário, mas é notável na mistura física com a mesma concentração de fármaco. Mesmo sabendo que uma menor quantidade do fármaco presente na análise, devido à composição de 95% de HDL-CaAl, diminuiria a intensidade dos picos, esta baixa concentração não impediu da OLZ ser detectada na análise da mistura física. Além do pico em $2\theta = 8,84$ presente na MF CaAl:OLZ 05%, outros picos entre $2\theta = 14,84$ e $24,0$ pertencentes ao fármaco, que não são observados no sistema binário, foram identificados. Tal fato sugere que o método do solvente utilizado para formação dos sistemas com o HDL-CaAl foi eficiente ao promover uma amorfização do fármaco.

Ainda na mesma figura, no difratograma pertencente ao sistema CaAl:OLZ 20%, já é possível notar a presença de um pequeno, porém presente, pico pertencente ao fármaco em $2\theta = 8,78$, porém o restante das reflexões apresentados pelo fármaco isolado ainda permanecem ausentes. Isto sugere que, à medida que aumenta-se a concentração do fármaco, o HDL-CaAl começa a perder sua capacidade de estabilizar a forma amorfa do fármaco e dá-se início a precipitação de cristais de OLZ. O sistema CaAl:OLZ 30% segue esta mesma lógica, onde, além de apresentar o mesmo pico em $2\theta = 8,70$, este apresentou maior intensidade, que significa

um maior número de repetições deste mesmo plano de refração. O difratograma desta amostra ainda mostrou, além do pico de maior intensidade, outro pico em $2\theta = 17,06$ pertencente ao fármaco. Porém, a MF CaAl:OLZ 30% apresentou, com intensidade consideravelmente maior, além dos picos mencionados anteriormente no sistema binário de mesma concentração, picos entre $2\theta = 10,74$ e $24,02$ referentes a OLZ.

Figura 12: Sobreposição dos difratogramas de raios X dos sistemas binários compostos por HDL-CaAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.

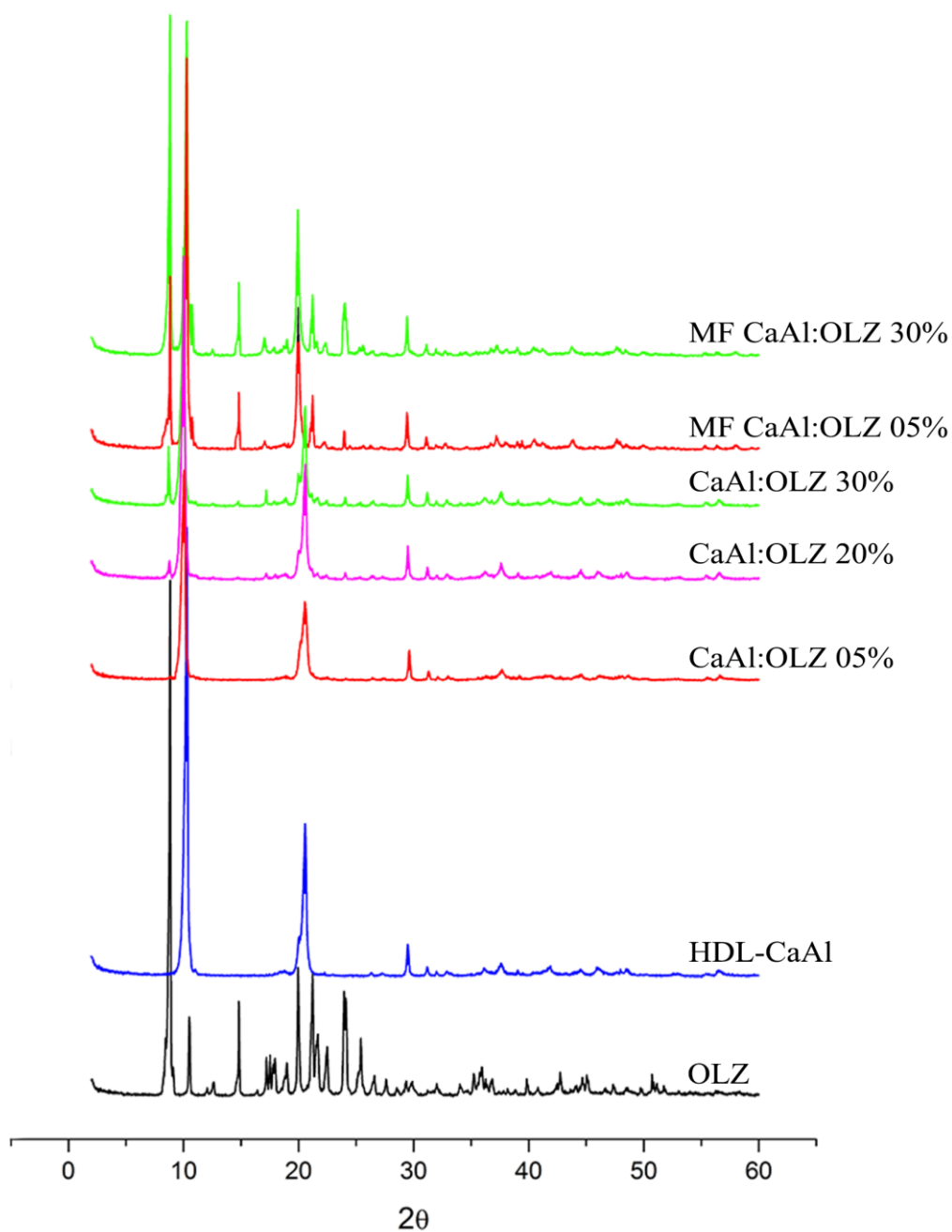
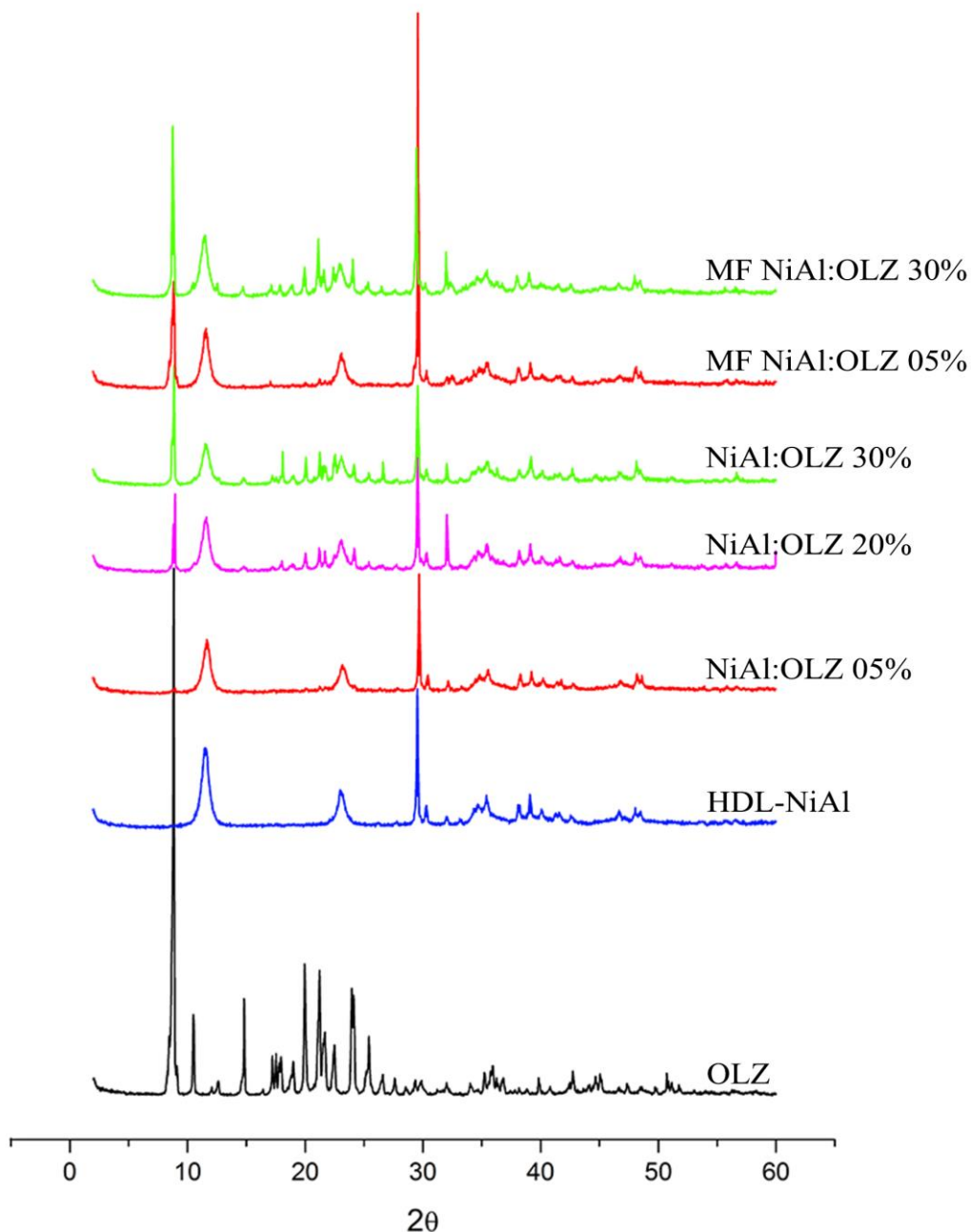


Figura 13: Sobreposição dos difratogramas de raios X dos sistemas binários compostos por HDL-NiAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.



Em relação aos padrões de difração dos sistemas com HDL-NiAl, podemos observar, na figura 13, que da mesma forma que aconteceu no sistema anterior, o NiAl:OLZ 05% apresentou apenas os padrões de reflexão do HDL isolado, enquanto a mistura física de mesma proporção apresentou um pico pertencente ao fármaco em $2\theta = 8,90$. Isto mostra que, apesar da presença de impurezas no HDL-NiAl, que serão posteriormente discutidas na análise térmica, este ainda foi eficiente ao amorfizar o fármaco. Já no NiAl:OLZ 20% é possível observar a

presença de 6 picos referentes ao fármaco com valores de 2θ entre 8,96 e 24,18. Mostrando que, neste ponto, o HDL não se mostra tão eficaz na estabilização da forma amorfa do fármaco.

O sistema com 30% de fármaco não mostrou diferenças significativas quando comparado a mistura física de mesma proporção. Tal fato indica que o HDL-NiAl não foi tão eficiente quanto o HDL-CaAl que, com 30% de fármaco, ainda apresentou uma menor quantidade de padrões cristalinos pertencentes ao fármaco, e com menor intensidade, quando comparado com a mistura física. No sistema contendo 20% de OLZ, o HDL-CaAl também apresentou melhores resultados, onde foi evidenciado apenas um plano cristalino do fármaco, enquanto o sistema com HDL-NiAl com a mesma concentração de OLZ apresentou 6 planos.

5.1.3 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho

O espectro vibracional da região do infravermelho de ambos os HDLs (Figura 14) apresentaram bandas características de compostos do tipo Hidrotalcita reportadas em literatura. É possível observar bandas largas entre 3700 a 3400 cm^{-1} , resultantes da deformação axial das ligações O—H presentes nas hidroxilas das lamelas, e nas moléculas de água adsorvidas no material. Na frequência entre 1650 a 1620 cm^{-1} , é possível observar bandas características de deformação angular das ligações O—H das moléculas de água intercaladas no espaço interlamelar. Entre 1410 e 1400 cm^{-1} , temos bandas características da vibração dos ânions nitrato contidos no espaço interlamelar, e, por fim, abaixo de 1000 cm^{-1} estão presentes as bandas referentes às ligações entre os metais que compõem as lamelas e o oxigênio das hidroxilas. É possível que as bandas entre 1340 e 1360 cm^{-1} correspondam à presença de íons carbonato. A presença destes íons no espectro de vibracional pode se dar devido à contaminação do sistema pela absorção do CO_2 da atmosfera durante o processo de síntese (RAKI, BEUDIN, MITCHELL, 2004; VIEIRA, 2009; KIM, KIM, OH, 2012; SHAFIEI et al., 2012).

Para iniciar a análise do espectro vibracional da região do infravermelho da OLZ (figura 15), partiremos das frequências de onda mais altas, onde a primeira banda característica do fármaco observada é o estiramento da única ligação N—H presente nesta molécula. Esta banda alargada e sua transição para menores comprimentos de onda aponta seu envolvimento em ligações de hidrogênio (AYALA et al., 2006; REUTZEL-EDENS et al., 2003; WAWRZYCKA-GORCZYCA et al., 2004).

Figura 14: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos HDL-CaAl e HDL-NiAl.

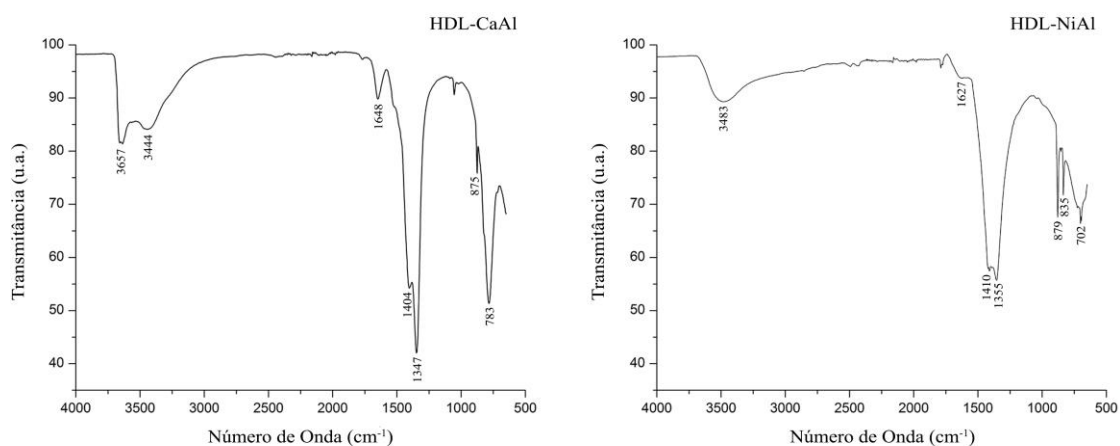
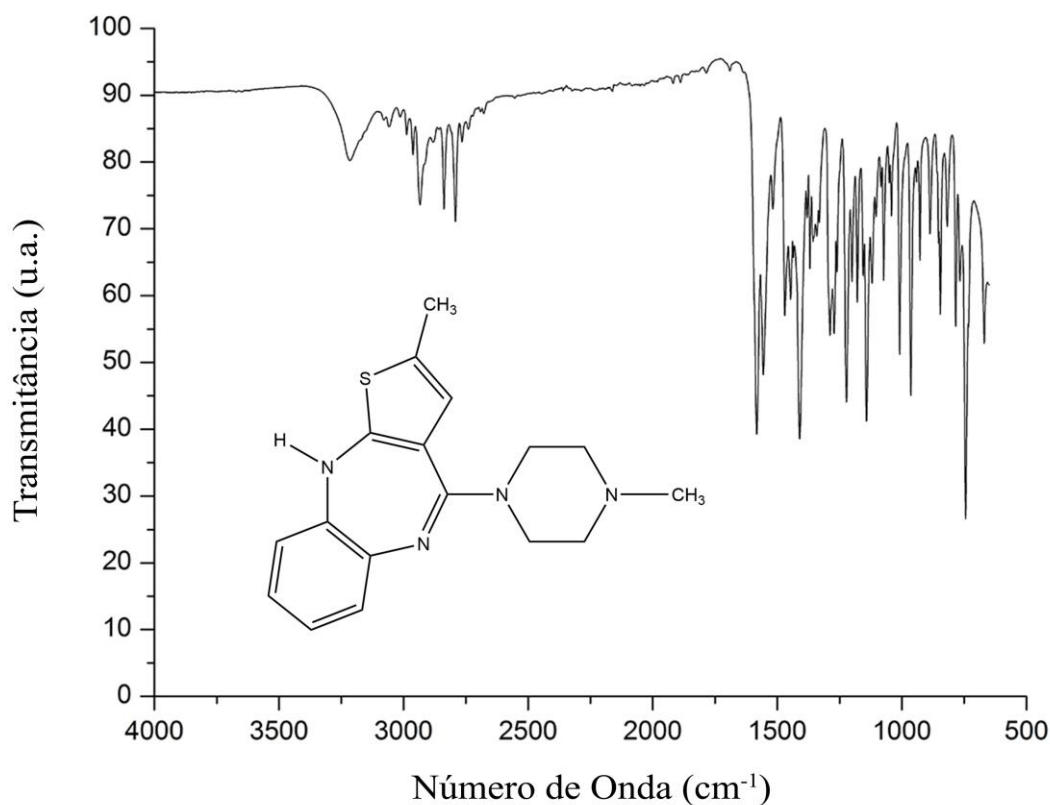


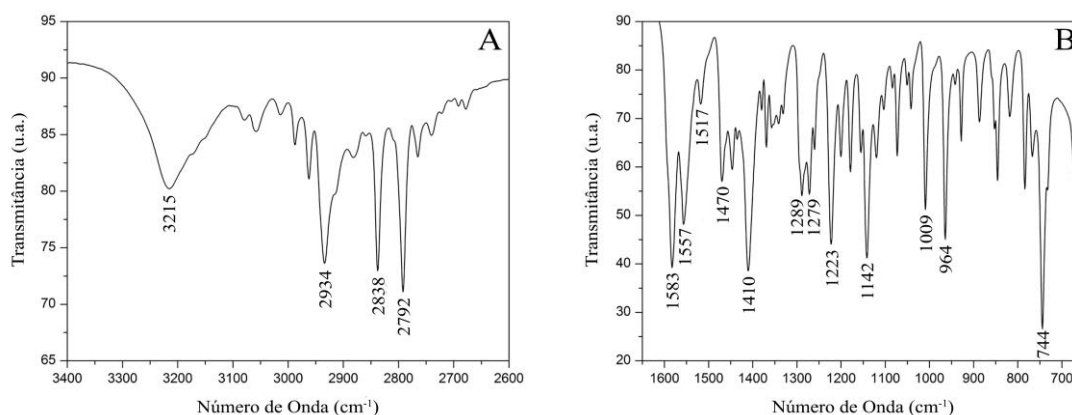
Figura 15: Espectro vibracional na região do infravermelho da Olanzapina isolada.



As bandas seguintes estão associadas com as ligações C—H da OLZ. Autores sugerem que o primeiro grupo de bandas correspondem aos estiramentos C—H do anel tiofeno e benzeno, considerando que as bandas restantes são os modos simétrico e assimétrico dos dois grupos metila (figura 16 A). As principais diferenças entre os polimorfos da Olanzapina estão na região de 600 a 1600 (figura 16 B), onde foi possível identificar picos característicos da

Forma I do fármaco, como a banda presente em 1517 cm^{-1} , estando de acordo com a literatura (AYALA et al., 2006) e corroborando com os dados da difração de raios X apresentados anteriormente.

Figura 16: Espectro vibracional na região do infravermelho da Olanzapina aproximado para melhor visualização das bandas.



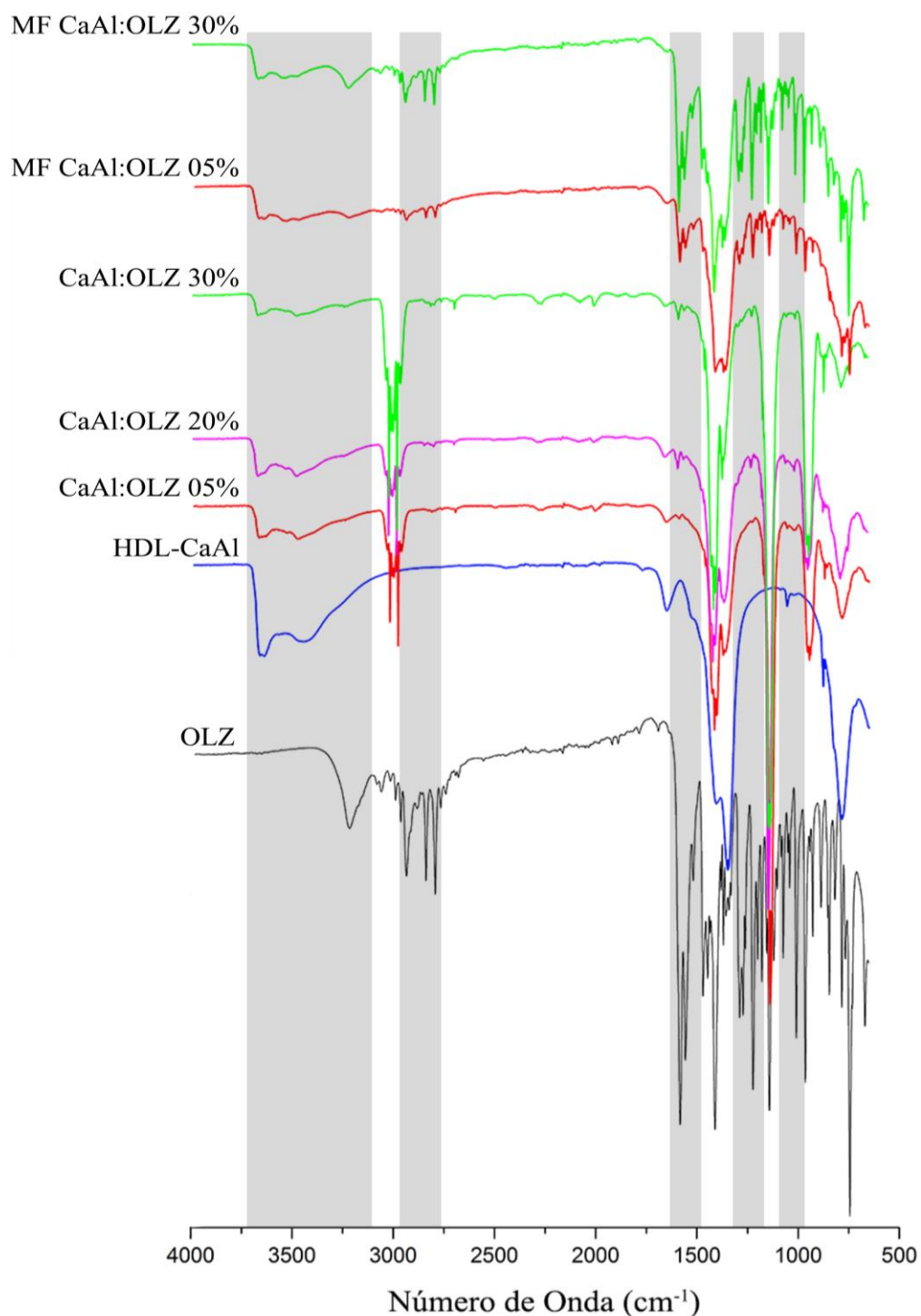
Analisando esta faixa de baixa energia, a região entre 1600 e 1500 cm^{-1} está preenchida por bandas associadas com as ligações duplas $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$, assim como deformações angulares das ligações $\text{C}-\text{H}$ e $\text{N}-\text{H}$. Em 1583 cm^{-1} temos o estiramento pertencente a ligação $\text{C}=\text{N}$, enquanto a banda em 1557 cm^{-1} representa o estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$. O fato da banda $\text{C}=\text{N}$ estar abaixo de 1600 cm^{-1} evidencia a participação desta ligação no padrão de formação das ligações de hidrogênio da Forma I da OLZ (AYALA et al., 2006; REUTZEL-EDENS et al., 2003; WAWZYCKA-GORCZYCA et al., 2004).

A próxima região do espectro, 1500 a 1300 cm^{-1} , apresenta as deformações dos grupos metil, metileno e $\text{C}-\text{H}$, contudo, tais bandas são facilmente sobrepostas, tornando difícil realizar uma análise precisa. Na frequência de 1470 cm^{-1} , temos a deformação do grupo metil ligado ao anel piperazina e, logo em seguida, em 1410 cm^{-1} temos a banda pertencente ao grupo metil ligado ao anel tiofeno. Entre 1300 e 1100 cm^{-1} , as bandas dos estiramentos $\text{C}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{N}$ são dominantes (AYALA et al., 2006).

Em comprimentos de onda mais baixos, os principais componentes do espectro vibracional são as deformações e torções dos anéis. Portanto, as vibrações de baixa energia são originadas das deformações do esqueleto da molécula e de suas vibrações em conjunto. Abaixo de 1100 cm^{-1} , algumas características relevantes podem ser identificadas, como a deformação

da respiração do anel benzeno no plano em 744 cm^{-1} , associada com a deformação das ligações C—H fora do plano do anel. As deformações do grupo piperazina, associada com o grupo metil em 1009 cm^{-1} e as contribuições do anel diazepina e tiofeno em 964 cm^{-1} são bem identificados no espectro (AYALA et al., 2006).

Figura 17: Sobreposição dos espectros vibracionais dos sistemas binários compostos por HDL-CaAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.

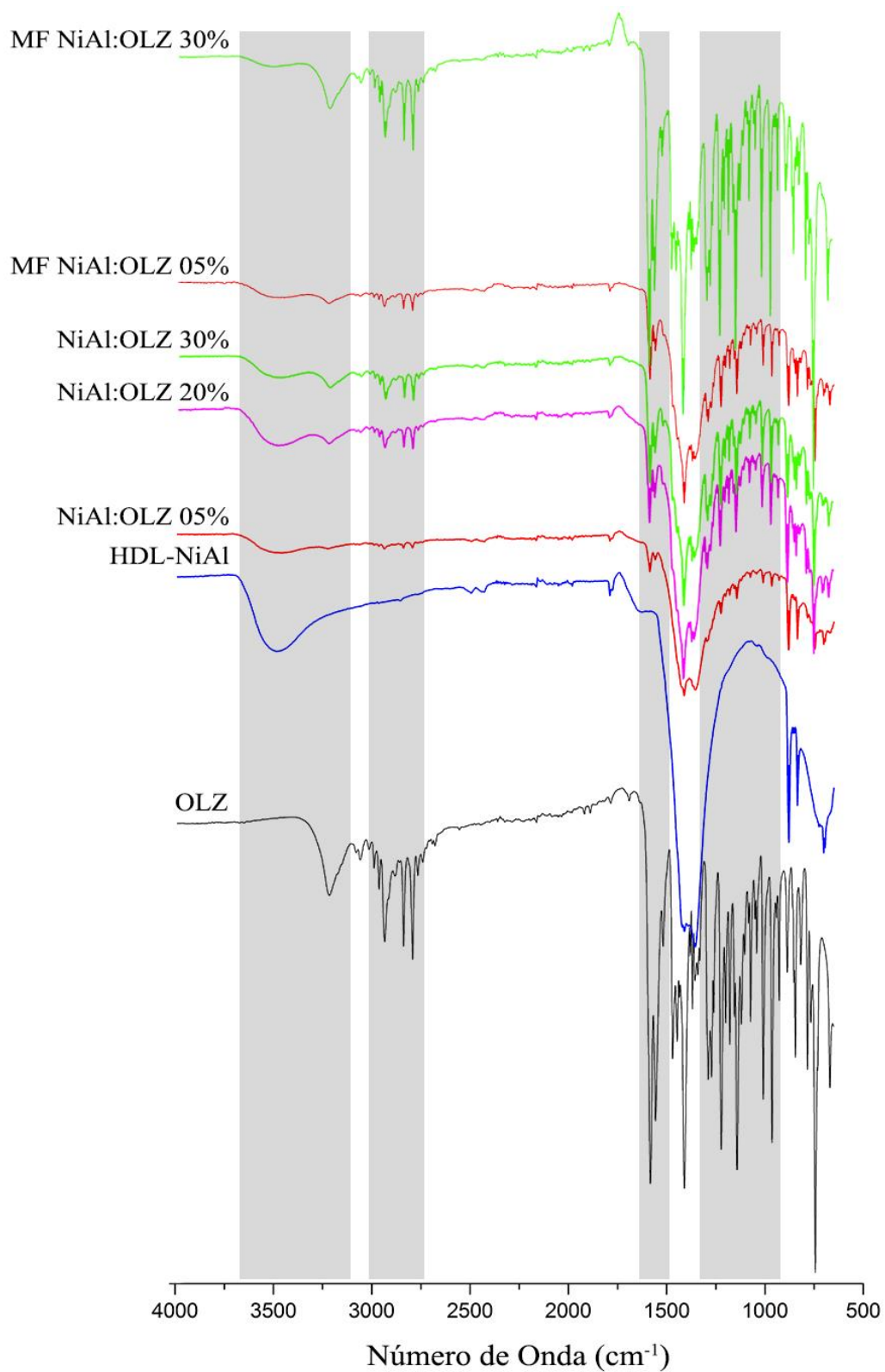


Na figura 17, podemos observar a sobreposição dos espectros vibracionais dos sistemas binários à base de HDL-CaAl e OLZ, em diferentes concentrações, suas misturas físicas e componentes isolados para fins comparativos. Comparando o espectro vibracional da OLZ isolada com o espectro do sistema CaAl:OLZ 05%, podemos notar que houve uma diminuição na intensidade das bandas referentes a deformação axial das ligações O—H presente nas lamelas e nas moléculas de água adsorvidas na superfície do material, além do deslocamento da banda em 3444 cm^{-1} . Em 3215 cm^{-1} , a banda pertencente a ligação N—H do fármaco não está presente no sistema binário, porém pode ser notada na mistura física de mesma concentração. Na região seguinte, houve considerável descolamento e supressão de bandas referentes a vibração das ligações C—H do anel benzeno e tiofeno, fato que não foi observado na mistura física.

Ainda na mesma imagem, no espectro referente ao HDL-CaAl, em 1648 cm^{-1} , banda característica da vibração das ligações O—H das moléculas de água no espaço interlamelar, nota-se uma considerável diminuição da intensidade desta banda no espectro do sistema binário, indicando a saída de moléculas de água do espaço interlamelar. Logo em seguida, o sistema CaAl:OLZ 05% não apresenta bandas na região referente às vibrações das ligações C=N e C=C, destacada em cinza, porém é possível nota-las na mistura física. Isto indica que o fármaco interagiu de tal forma que impediu a livre vibração de tais ligações presentes no anel tiofeno e diazepina. Tal hipótese é sustentada, ainda, pela supressão das bandas em regiões abaixo de 1100 cm^{-1} . Tais bandas representam as deformações do esqueleto carbônico da OLZ, apresentando as principais alterações em 1009 , 964 e 744 cm^{-1} , características das deformações da respiração do anel benzeno, associada à vibração das ligações C—H fora do seu plano, deformações do anel piperazina, diazepina e tiofeno.

Tais variações indicam que as moléculas de água de hidratação podem ter dado lugar ao fármaco, à medida que este, aos poucos, precipitou e se adsorveu na superfície do material, promovendo interações físicas. Isto justifica a supressão, diminuição de intensidade ou deslocamento de determinadas bandas do fármaco, que provam que houve, de fato, interação entre fármaco e carreador. Além destas, as alterações nas regiões de baixa intensidade sugerem uma interação com o material que envolveu toda a molécula do fármaco.

Figura 18: Sobreposição dos espectros vibracionais dos sistemas binários compostos por HDL-NiAl e OLZ, assim como de suas misturas físicas e componentes isolados.



Os sistemas binários com HDL-NiAl também foram eficientes ao promover interações com a OLZ. Na figura 18, podemos observar que o sistema NiAl:OLZ 05% promoveu interações semelhantes às mencionadas no sistema anterior, com o HDL-CaAl. Na região de maior frequência, observa-se a diminuição da intensidade da banda referente à deformação axial das ligações O—H e a supressão da banda resultante da ligação N—H do fármaco. Uma diferença, em relação ao sistema com HDL-CaAl, foi observada na região entre 3000 e 2750 cm^{-1} , destacada em cinza, que consiste de uma supressão das bandas referentes às ligações C—H, que ainda foram notadas na mistura física de mesma concentração. Tal fato sugere que houve uma maior interação com o esqueleto carbônico do fármaco neste sistema. As bandas nas regiões de frequência mais baixa também apresentaram padrões semelhantes ao sistema anterior, suprimindo as bandas resultantes das ligações C=N, C=C, C—N, C—C, assim como a respiração do anel benzeno e as torções dos anéis piperazina, diazepina e tiofeno.

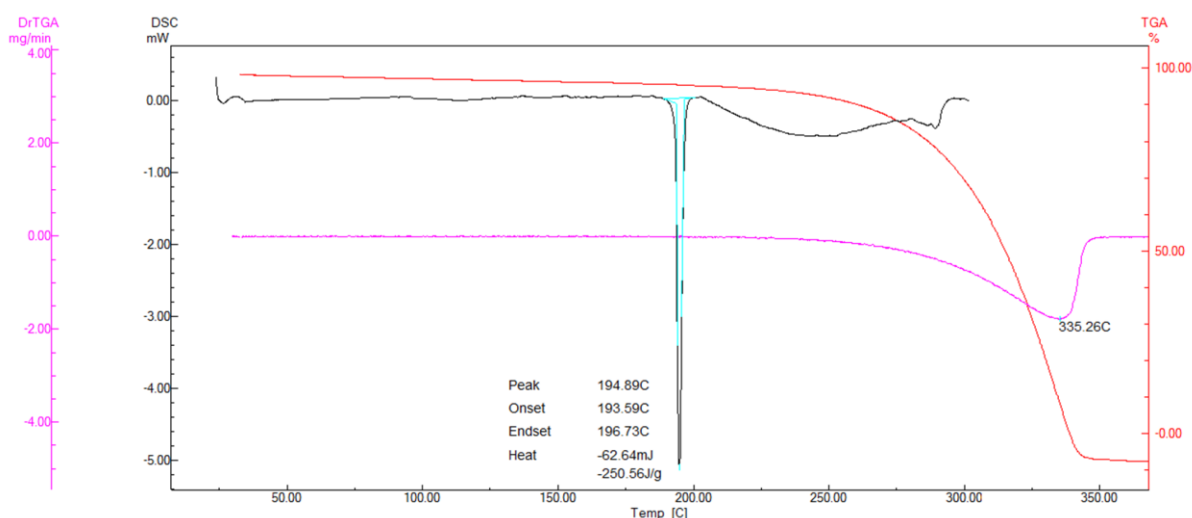
Sabe-se que eventos como a supressão, diminuição de intensidade, deslocamento e alargamento de bandas, observados em regiões semelhantes em ambos os sistemas (CaAl:OLZ e NiAl:OLZ), em todas as concentrações, podem estar relacionados com a formação de ligações de Hidrogênio. Porém, assim como foi observado nas análises de DR-X, à medida que aumentou-se a concentração do fármaco, as interações deste com o respectivo HDL diminuíram gradativamente, como pode ser observado com o aumento da intensidade e do número de bandas presentes. Porém, comparando ambos os sistemas binários com 30% de fármaco e suas respectivas misturas físicas de mesma concentração, é possível notar grande diferença na intensidade destas bandas quando comparadas com o fármaco isolado, provando que, apesar de saturado, o material ainda promove considerável interação.

5.1.4 Análise Térmica

A partir das curvas DSC e TG obtidas pela calorimetria diferencial de varredura e pela termogravimetria, respectivamente, foi possível evidenciar o comportamento térmico da OLZ isolada, que pode ser observado na figura 19. Seu ponto de fusão consiste de um evento endotérmico, bem definido, característico de compostos cristalinos, tendo faixa de fusão entre 193,59 (T_{onset}) e 196,73 $^{\circ}\text{C}$ (T_{endset}), com pico em 194,89 $^{\circ}\text{C}$, estando de acordo com a literatura (POLLA et al., 2005; PERES-FILHO et al., 2011; FREITAS et al., 2012). É possível observar que não ocorre perda de massa durante este evento e que, logo após seu término, a fusão é seguida do início da degradação do fármaco (PERES-FILHO et al., 2011). De acordo com Polla et al. (2005), o ponto de fusão é o único evento identificável nas curvas de DSC para a Forma

I da Olanzapina, resultado este que está de acordo com os pontos discutidos nas análises de DR-X e IV. A derivada da curva termogravimétrica mostra o evento de degradação ocorrendo aproximadamente entre 280 a 350 °C, tendo seu pico em 325,26 °C.

Figura 19: Curvas TGA, DrTGA e DSC da Olanzapina isolada obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



As figuras 20 e 21 representam as curvas de TGA, DrTGA e DSC do HDL-CaAl e NiAl, respectivamente, onde nota-se que todos os eventos endotérmicos apresentados no DSC estão associados à perdas de massa nas curvas termogravimétricas, sendo este comportamento característico de compostos lamelares que apresentam moléculas de água e hidroxilas compondo sua estrutura (VIEIRA, 2009; RAKI, BEAUDOIN, MITCHELL, 2004). No geral, dois principais eventos endotérmicos foram evidenciados durante a decomposição do composto e sua perda de massa.

O primeiro evento da curva TGA do HDL-CaAl, com T_{onset} em 66,21 °C e T_{endset} em 139,46 °C, representa a perda de massa (-10,821%) resultante da remoção de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície das lamelas e no espaço interlamelar. Este fenômeno também foi observado na curva TGA do HDL-NiAl, com T_{onset} de 82,51 °C e T_{endset} de 144,96 °C, perdendo 3,834% de sua massa. Tais eventos podem ser identificados separadamente pelo DSC de ambos os HDLs nesta mesma faixa de temperatura, onde o primeiro evento endotérmico corresponde ao desprendimento da água adsorvida na superfície e, o segundo, da água contida no espaço interlamelar (RAKI, BEAUDOIN, MITCHELL, 2004).

Figura 20: Curvas TGA, DrTGA e DSC do HDL-CaAl obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

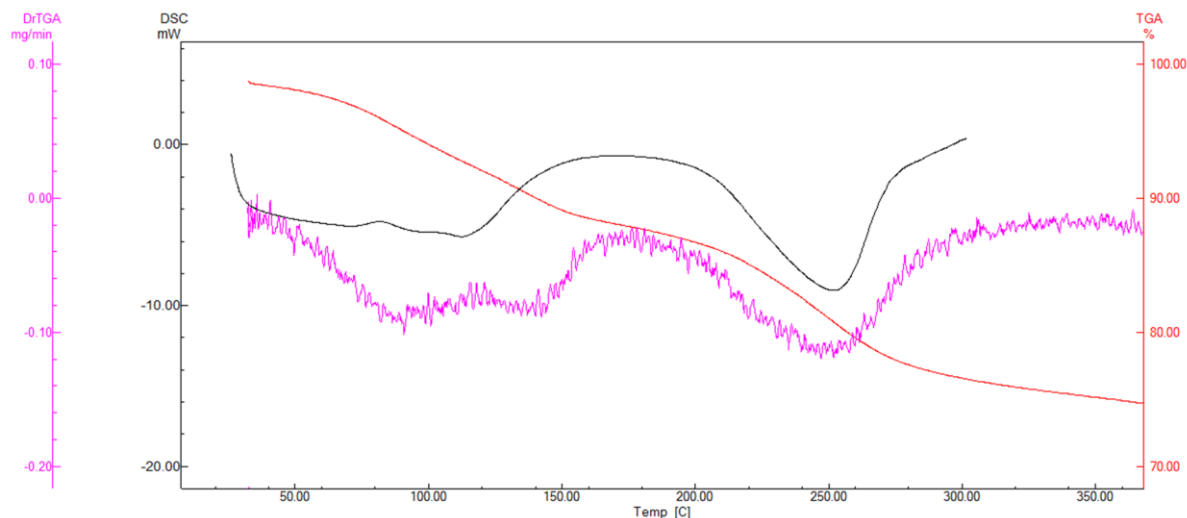
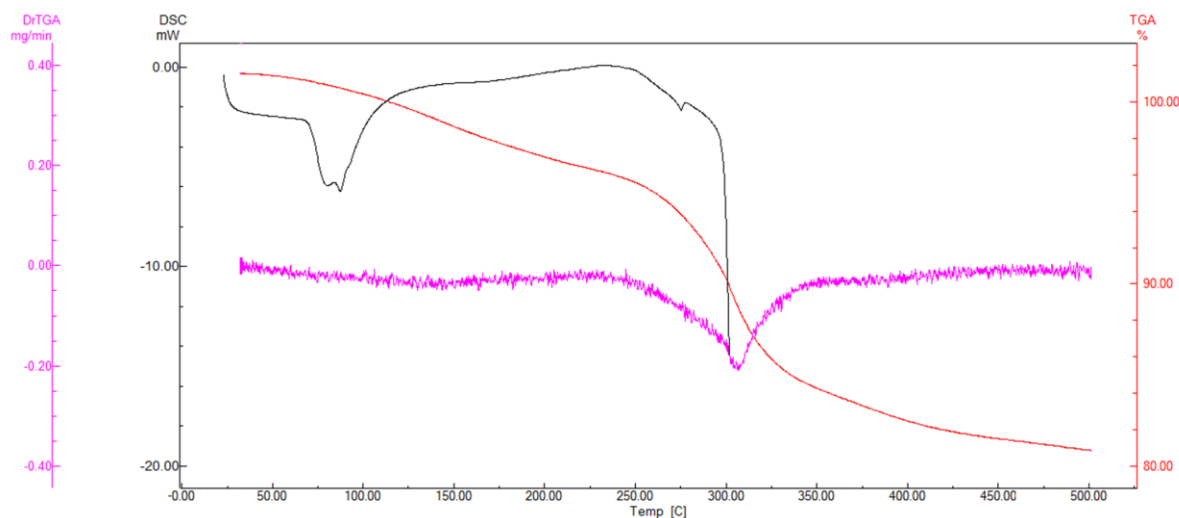
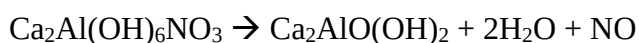


Figura 21: Curvas TGA, DrTGA e DSC do HDL-NiAl obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



No segundo evento, a curva TGA do HDL-CaAl apresentou T_{onset} em 215,40 °C e T_{endset} em 272,65 °C, com perda de massa de 11,210%, enquanto a curva o HDL-NiAl teve T_{onset} em 285,66 °C e T_{endset} em 319,37 °C, com perda de massa de 14,913%. Tal evento está associado, em ambos os casos, com a desidroxilação das lamelas que constituem os HDLs e a redução do nitrato interlamelar para nitrito (SHAFIEI et al., 2012).



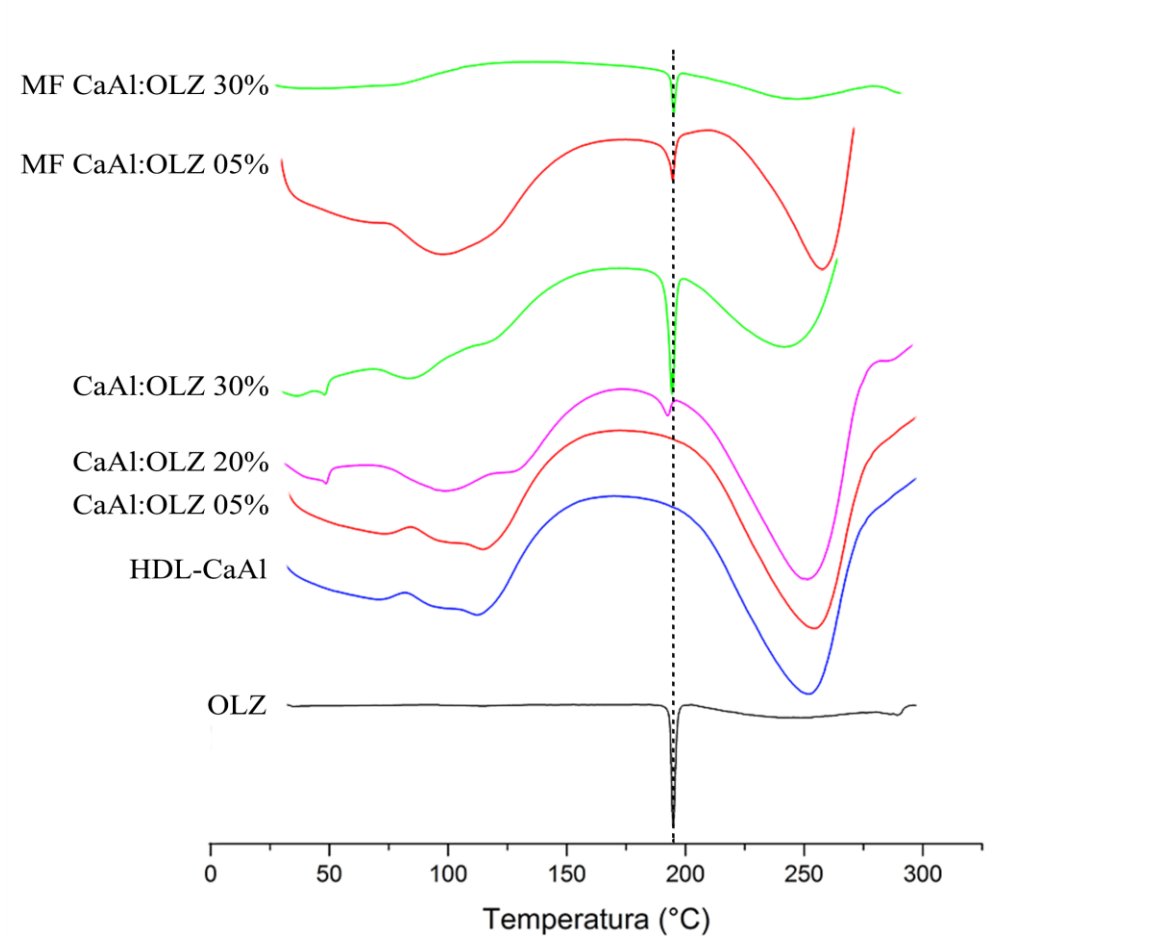
A partir daqui, as análises irão focar no ponto de fusão do fármaco, que está diretamente relacionado com a cristalinidade do mesmo, tanto no sistema com HDL-CaAl (Tabela 04), quanto no sistema com HDL-NiAl (Tabela 05). Na figura 22, temos representadas as curvas DSC para os sistemas binários à base de HDL-CaAl, em diferentes concentrações de fármaco, e também de seus componentes isolados, assim como das misturas físicas para fins comparativos. De início, logo percebe-se que o sistema binário CaAl:OLZ 05% apresenta apenas os eventos de perda de água e desidroxilação referentes ao HDL-CaAl isolado, não apresentando o ponto de fusão característico da OLZ, sendo, portanto, a sobreposição exata da curva DSC do HDL isolado. Na mistura física de mesma proporção, já foi possível notar tal evento endotérmico com pico em 194,67 °C, semelhante ao fármaco isolado, indicando que a mistura física não apresentou nenhuma interação com o fármaco que viesse a alterar seu comportamento térmico de forma significativa.

Tabela 05: Temperaturas e entalpia do evento endotérmico de fusão da Olanzapina isolada, nos sistemas binários e misturas físicas com HDL-CaAl.

AMOSTRA	T _{onset} DSC (°C)	T _{pico} DSC (°C)	T _{endset} DSC (°C)
OLZ	193,59	194,89	196,73
CaAl:OLZ 05%	-	-	-
CaAl:OLZ 20%	187,27	192,44	195,22
CaAl:OLZ 30%	191,64	194,41	196,50
MF CaAl:OLZ 05%	192,82	194,67	196,30
MF CaAl:OLZ 30%	193,70	195,05	196,64

Na próxima curva de DSC, correspondente ao sistema CaAl:OLZ 20% já é possível notar o ponto de fusão correspondente ao fármaco, porém, este apresenta-se com alterações significativas. Seu processo de fusão tem início em 187,27 °C, com pico em 192,44 °C, diferente do fármaco isolado que apresentou T_{onset} em 193,59 °C e T_{pico} em 194,89 °C. Este sistema binário, então, diminuiu a temperatura de início da fusão do fármaco em 6,32 °C, e seu pico de fusão em 2,45 °C. Também foi possível notar um menor T_{onset} (191,64 °C) no sistema CaAl:OLZ 30%, o que não foi observado na mistura física de mesma proporção, porém, não houve alteração considerável no T_{pico}.

Figura 22: Sobreposição das curvas de DSC dos sistemas binários entre HDL-CaAl e OLZ, assim como suas misturas físicas e componentes isolados, obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

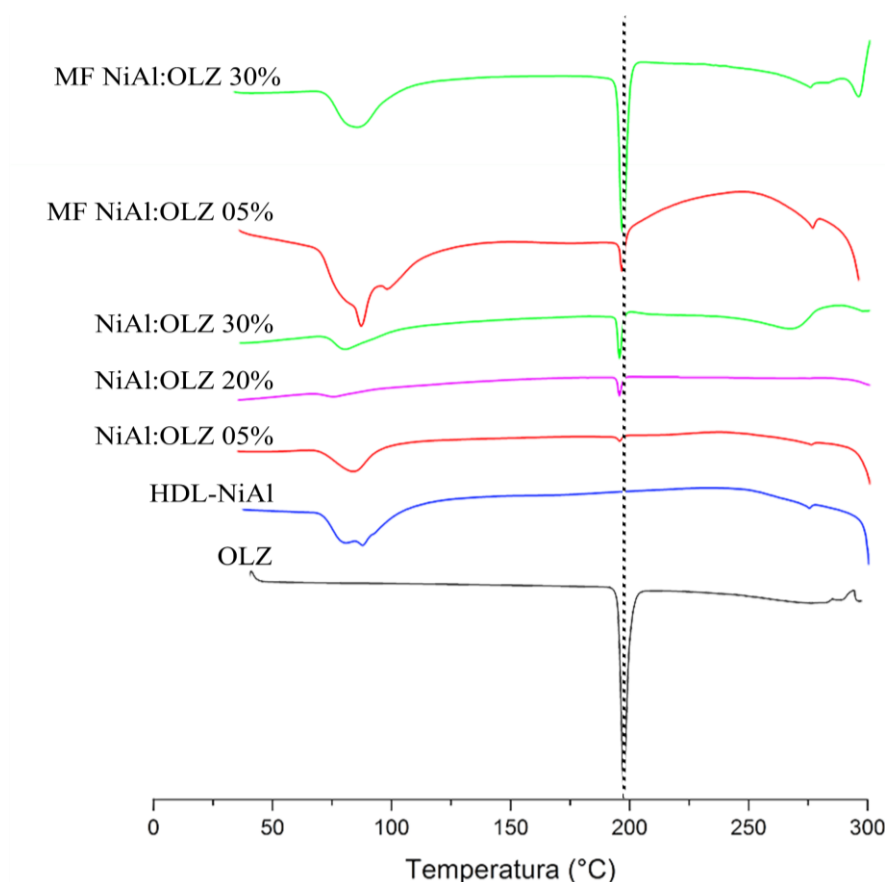


Na figura 23, temos a sobreposição das curvas de DSC dos sistemas binários à base de HDL-NiAl, seus componentes isolados e misturas físicas para fins comparativos. Percebe-se que, diferente dos sistemas com HDL-CaAl, não houve alterações significativas no T_{onset} ou no T_{pico} , e já no sistema NiAl:OLZ 05% é possível observar o evento endotérmico referente à fusão da OLZ. Isto indica que o HDL-NiAl não foi tão eficiente quanto o HDL-CaAl na amorfização do fármaco.

Tabela 06: Temperaturas e entalpia do evento endotérmico de fusão da Olanzapina isolada e nos sistemas binários e misturas físicas com HDL-NiAl.

AMOSTRA	T_{onset} DSC (°C)	T_{pico} DSC (°C)	T_{endset} DSC (°C)
OLZ	193,59	194,89	196,73
NiAl:OLZ 05%	193,45	194,97	197,98
NiAl:OLZ 20%	193,66	194,90	196,47
NiAl:OLZ 30%	193,52	194,92	196,79
MF NiAl:OLZ 05%	193,83	194,93	199,23
MF NiAl:OLZ 30%	193,95	196,13	199,37

Figura 23: Sobreposição das curvas DSC dos sistemas binários entre HDL-NiAl e OLZ, assim como suas misturas físicas e componentes isolados, obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



A redução do ponto de fusão do fármaco para temperaturas mais baixas pode ser explicada pela interação entre os carreadores e a OLZ durante o processo de aquecimento de cada análise. A curva do sistema CaAl:OLZ 05% constatam completo desaparecimento do pico endotérmico correspondente a transição sólido-líquido da OLZ. Tal desaparecimento, as reduções dos tamanhos dos picos, ou até os alargamentos dos mesmos, indicam que houve uma redução da cristalinidade, corroborando com os resultados da difração de raios X apresentados previamente (KRISHNAMOORTHY et al., 2011; SERAFINI et al., 2012).

5.1.5 Perfil de Dissolução *in vitro* dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados

Na figura 24, podemos comparar os perfis de dissolução da OLZ livre, com os sistemas CaAl:OLZ nas concentrações de 05, 20 e 30% de fármaco, e nas misturas físicas. Na tabela 06, temos expressos os valor exatos da porcentagem de OLZ solubilizada de cada tempo de análise. Inicialmente, até os 30 minutos de experimento, percebe-se que a OLZ não apresentou-se no meio de dissolução numa concentração passível de quantificação por espectrofotômetro. Já o

sistema CaAl:OLZ 05%, em 5 minutos, apresenta 18,00 % de fármaco solubilizado e, em 30 minutos, 62,05%. Considerável diferença quando comparado ao fármaco isolado.

Tabela 07: Percentual de Olanzapina solubilizada proveniente dos sistemas binários com HDL-CaAl, assim como as misturas físicas em intervalo de tempo de 0 a 180 minutos.

T. (min.)	OLZ		CaAl:OLZ 05%		CaAl:OLZ 20%		CaAl:OLZ 30%		MF 05%		MF 30%	
	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	-	-	18,00	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	39,52	1,41	10,97	0,65	2,47	0,46	-	-	-	-
15	-	-	46,53	1,70	16,46	0,19	4,30	1,58	-	-	-	-
20	-	-	51,15	0,45	26,12	1,65	8,21	1,16	-	-	-	-
30	-	-	62,05	1,50	27,81	0,60	16,95	0,63	-	-	-	-
45	3,49	0,78	63,25	2,02	31,96	1,55	32,61	0,80	1,32	1,27	12,65	0,86
60	12,45	0,57	72,28	0,52	39,19	1,28	37,74	1,38	16,46	0,76	13,50	0,91
80	19,16	1,76	78,60	0,74	47,19	1,25	38,09	1,24	16,65	1,73	15,32	1,50
100	24,21	0,96	79,55	0,76	54,66	0,45	50,08	0,62	32,17	0,69	16,60	1,17
120	31,02	1,30	85,76	0,44	62,46	0,70	59,21	0,78	35,00	1,56	34,67	1,47
180	50,56	1,29	89,08	0,87	76,94	1,23	58,53	1,53	39,53	0,18	42,58	0,75

(%): Porcentagem de OLZ solubilizada. SD: desvio padrão da média.

Em 45 minutos de dissolução, temos 3,49 % de Olanzapina solubilizada, enquanto o sistema binário mencionado anteriormente já apresenta 63,65% de fármaco dissolvido no meio. Este valor representa um incremento de solubilidade de 1823,78%, em 45 minutos de experimento. Os sistemas com 20 e 30% de fármaco promoveram a solubilização a partir de 10 minutos de experimento, enquanto as misturas físicas com 05 e 30% de fármaco apenas em 30 minutos, assim como a OLZ isolada. Ao final da dissolução, os sistemas binários CaAl:OLZ 05%, 20% e 30% promoveram uma solubilização total de 89,08, 76,94 e 58,53% do fármaco, respectivamente. Já as misturas físicas com 05 e 30% de OLZ apresentaram solubilização máxima de 39,53 e 42,58%, respectivamente.

Na figura 25, podemos analisar os perfis de dissolução da OLZ livre, dos sistemas NiAl:OLZ nas concentrações de 05, 20 e 30% de fármaco, e das misturas físicas. Os valores exatos da porcentagem de Olanzapina solúvel em cada tempo de análise estão representados na tabela 07. Da mesma forma que no caso anterior, o sistema binário NiAl:OLZ 05% também iniciou a solubilização do fármaco já com 05 minutos de dissolução, apresentando 19,11 % do fármaco dissolvido, enquanto a mistura física de mesma proporção apenas iniciou a solubilização em 45 minutos de experimento, com 11,06 % de OLZ dissolvida. Neste mesmo

ponto, enquanto o fármaco isolado apresentava 3,49 % de sua quantidade total dissolvida, o sistema NiAl:OLZ 05% já promovia a solubilização de 37,35% de fármaco, que representa um incremento de solubilidade de 1070,02%.

Figura 24: Perfis de dissolução da OLZ isolada, dos sistemas binários com HDL-CaAl e das misturas físicas em 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, temperatura 37 °C e 50 rpm.

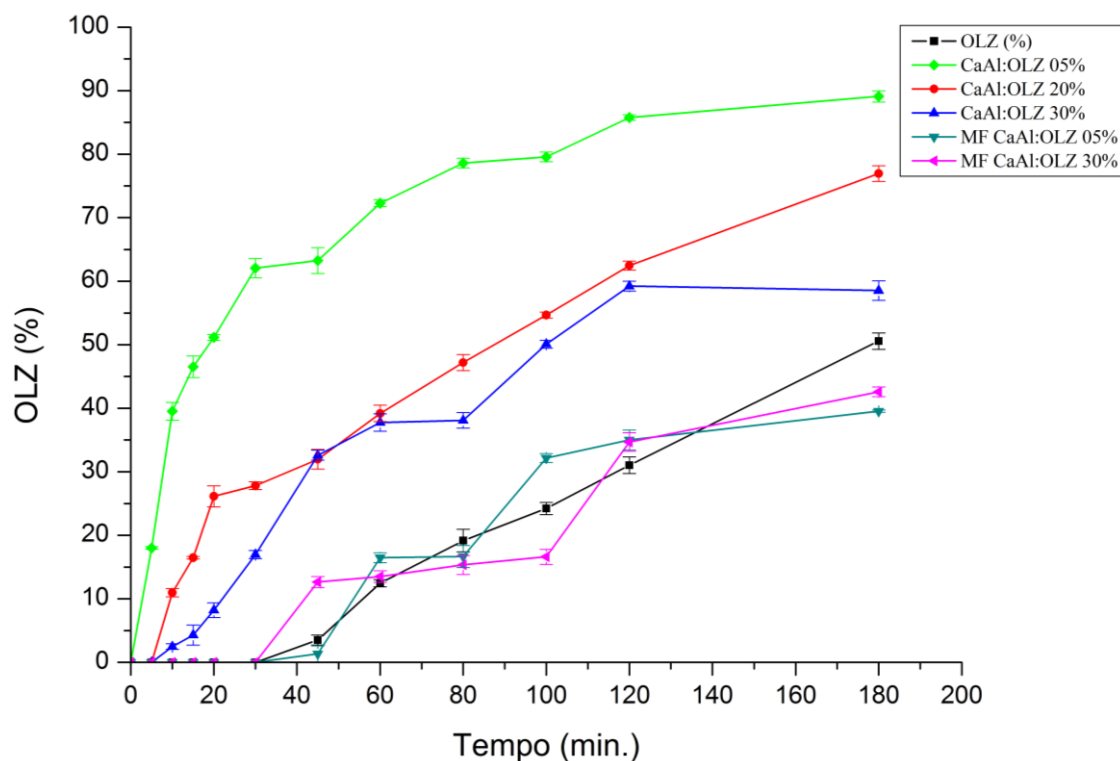
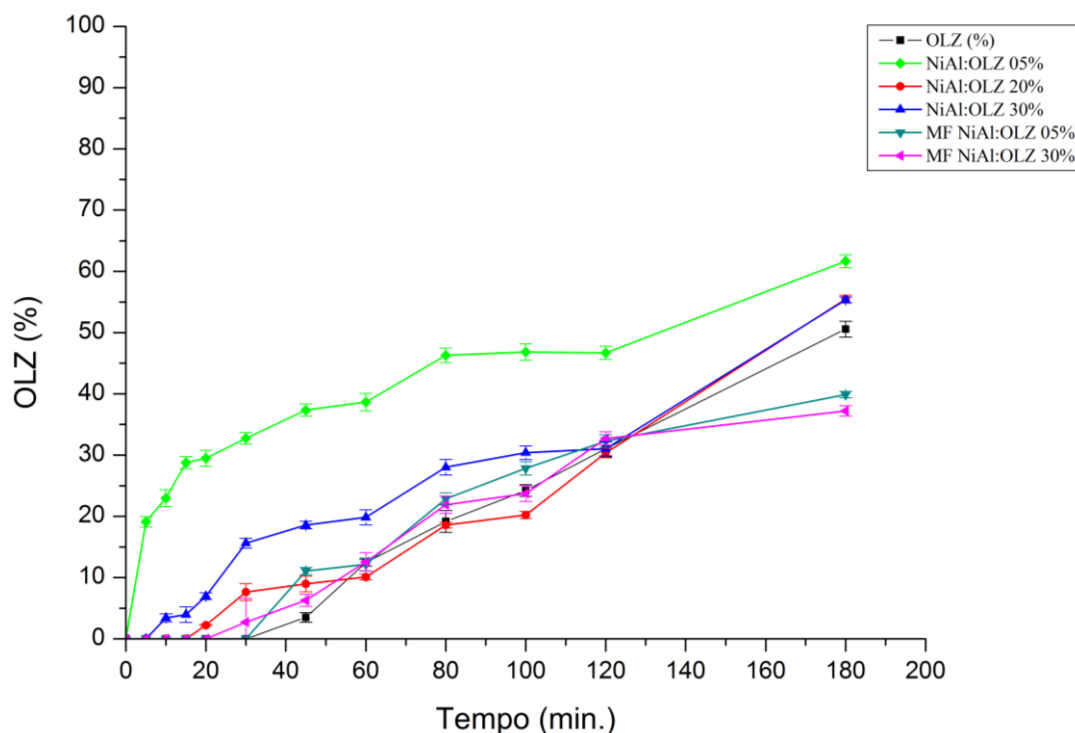


Tabela 08: Porcentagem de Olanzapina solubilizada proveniente dos sistemas binários com HDL-NiAl, assim como as misturas físicas em intervalo de tempo de 0 a 180 minutos.

T. (min.)	OLZ		NiAl:OLZ 05%		NiAl:OLZ 20%		NiAl:OLZ 30%		MF 05%		MF 30%	
	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD	(%)	SD
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	-	-	19,11	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	22,96	1,38	-	-	3,43	0,65	-	-	-	-
15	-	-	28,78	0,98	-	-	3,96	1,27	-	-	-	-
20	-	-	29,50	1,30	2,24	0,08	6,95	0,54	-	-	-	-
30	-	-	32,74	0,94	7,64	1,37	15,62	0,79	-	-	2,73	3,87
45	3,49	0,78	37,35	1,02	8,95	1,28	18,56	0,62	11,06	0,57	6,29	0,98
60	12,45	0,57	38,65	1,41	10,09	0,45	19,83	1,22	12,15	1,05	12,55	1,50
80	19,16	1,76	46,27	1,18	18,55	0,44	28,00	1,28	22,85	0,98	21,89	1,42
100	24,21	0,96	46,83	1,32	20,22	0,59	30,38	1,11	27,83	1,08	23,72	1,27
120	31,02	1,30	46,68	1,07	30,35	0,77	31,02	1,14	32,27	1,05	32,71	1,07
180	50,56	1,29	61,66	1,04	55,46	0,62	55,34	0,46	39,87	0,52	37,20	0,83

(%): Porcentagem de OLZ solubilizada. SD: desvio padrão da média.

Figura 25: Perfis de dissolução da OLZ isolada, dos sistemas binários com HDL-NiAl e das misturas físicas em 900 mL de meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, temperatura 37 °C e 50 rpm.



O sistema NiAl:OLZ 20% iniciou a solubilização do fármaco em 20 min, diferente do sistema com 30% (10 min), porém, em 180 min de experimento, ambos solubilizaram cerca de 55% do fármaco, não apresentando diferenças significativas. Ao final do experimento, os sistemas binários NiAl:OLZ 05, 20 e 30% apresentaram solubilização total de 61,66, 55,46 e 55,34% da OLZ, enquanto as misturas físicas com 05 e 30% de fármaco solubilizaram 39,87 e 37,20% de fármaco, respectivamente, semelhante às misturas físicas com HDL-CaAl.

Como a OLZ é uma base fraca ($pK_a = 7,5 \pm 0,5$), sua dissolução é favorecida em condições ácidas (FREITAS et al., 2012). Porém, mesmo com a dissolução sendo realizada em pH 7,4, o sistema CaAl:OLZ 05% em 180 minutos, conseguiu solubilizar quase 90% do fármaco. Já em outro estudo de dissolução, em pH 7,0, realizado por Freitas et al. (2012), os autores conseguiram uma solubilização máxima, em 30 minutos, de cerca de 35% do total de OLZ complexada em ciclodextrinas. Este valor não aumentou até o final do experimento em 60 minutos. Numa breve comparação, o sistema CaAl:OLZ 05% em 30 minutos já apresentava 62,05% de fármaco dissolvido, concentração, esta, que aumentou para 72,28 % em 60 minutos, mostrando-se, então, mais eficiente que o sistema proposto pelos autores mencionados.

Já em outro estudo realizado por Krishnamoorthy et al. (2011), dispersões sólidas entre Olanzapina e dois diferentes carreadores, amido pré-gelatinizado e amido glicolato de sódio, também conseguiram aumentar a taxa de dissolução do fármaco quando comparado ao mesmo isolado. Em 60 minutos de experimento, os autores conseguiram solubilização máxima de cerca de 70% do fármaco na proporção mais eficiente dos componentes da formulação. Tal resultado está equiparado ao apresentado nesta dissertação, mencionado no parágrafo anterior.

Tais fatos apresentados corroboram com os resultados da caracterização por DR-X, que demonstraram uma relação diretamente proporcional entre a concentração do fármaco no sistema e sua precipitação na forma cristalina, menos solúvel em água. Assim como os resultados apresentados na espectroscopia vibracional da região do infravermelho, onde os sistemas de menor concentração apresentaram uma maior interação com os carreadores. Esta relação também foi observada na análise térmica, demonstrando picos endotérmicos de fusão do fármaco mais intensos nos sistemas de maior concentração. Ou seja, é esperado que os sistemas contendo 30% de OLZ promovam uma menor solubilização desta, quando comparados aos sistemas com 05%, já que o fármaco nos sistemas mais concentrados apresenta maior grau de cristalinidade e menor interação com o carreador (ZENG et al., 2011; FREITAS et al., 2012). O fato das misturas físicas de ambos os HDLs não terem apresentado incremento de solubilidade também corrobora com os resultados apresentados pelos padrões de difração de Raios-X e pela análise térmica, já que estas formulações apresentaram sobreposição dos picos referentes aos padrões cristalinos e ao ponto de fusão do fármaco isolado. O mesmo se aplica aos espectros do infravermelho, onde as misturas físicas apresentaram sobreposição das bandas referentes ao fármaco isolado.

5.2 PARTE II: Estudos de Toxicidade *in vitro* dos Sistemas Binários Obtidos e Seus Componentes Isolados

Para os testes à seguir, elegeram-se os sistemas binários CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, por terem apresentado resultados mais promissores na caracterização físico-química. Além disso, estes sistemas apresentam uma maior concentração de HDL (90%), quando comparados aos demais. Dessa forma, seria mais interessante para obter mais informações sobre a toxicidade dos HDLs, além da OLZ, e contribuir de forma relevante com a literatura.

5.2.1. Potencial Antioxidante *in vitro* dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical DPPH*

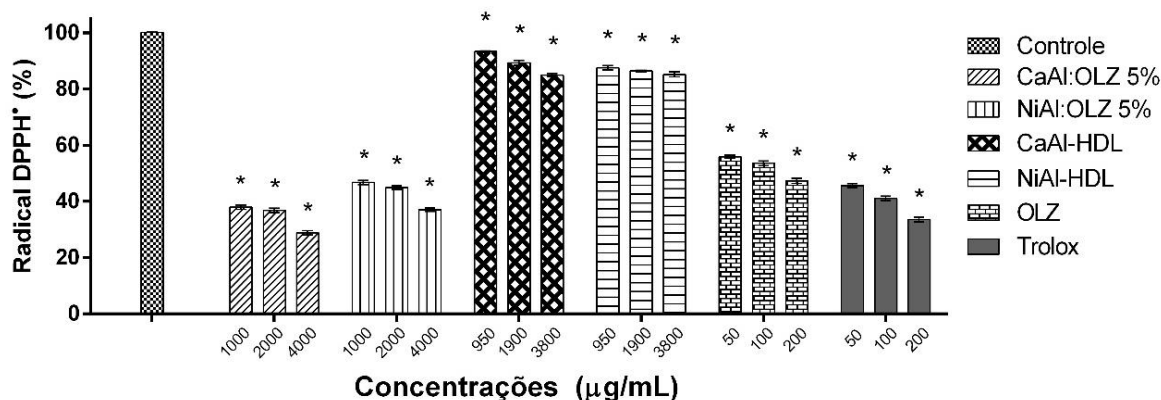
Os resultados correspondentes a inibição do radical DPPH* pelos sistemas binários formados por HDL e OLZ, e seus componentes isolados (HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ), estão representados na figura 26. Para distribuição das diferentes amostras, foram selecionadas três diferentes concentrações para os sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05%, e para seus componentes isolados utilizou-se a concentração equivalente à presente em cada uma das três diferentes amostras do sistema binário. Esta lógica foi seguida em todos os testes *in vitro* seguintes realizados neste trabalho.

As concentrações dos sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% foram distribuídas em 1000, 2000 e 4000 µg/mL, HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados em 950, 1900 e 3800 µg/mL, e OLZ isolada em 50, 100 e 200 µg/mL (concentrações equivalentes àquelas presentes nos sistemas binários), onde cada respectivo sistema teve percentual máximo de 71.15 ± 0.76 , 62.91 ± 0.62 , 15.04 ± 0.59 , 14.79 ± 0.94 e 52.67 ± 0.89 % dos radicais DPPH* inibidos, quando comparados ao controle negativo (100% de produção de radical DPPH*). O antioxidante padrão Trolox, nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, teve redução máxima da produção deste radical em 66.40 ± 0.85 %.

De acordo com os resultados da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH*, os valores da EC₅₀ para o sistema CaAl:OLZ 5%, NiAl:OLZ 5% e OLZ isolada foram de 8,541, 11,63 e 13,65 µg/mL, com intervalo de confiança de 95% variando de 2,666 a 27,36, 4,862 a 27,28 e 6,797 a 27,40, respectivamente. Os HDLs isolados apresentaram EC₅₀ de 57,54 e 17,00 µg/mL para o CaAl-HDL e NiAl-HDL, com intervalo de confiança de 95% variando de 51,65 a 64,09 e 7,138 a 40,49, respectivamente.

Este método possui rápida e fácil execução, tornando-o um dos mais utilizados para determinação da capacidade antioxidante de diversos compostos (MACHADO et al., 2015). O teste discrimina a capacidade antioxidante através do decréscimo nos valores de absorbância ($\lambda = 517$ nm) da solução do radical DPPH* (cor roxa) em espectrofotômetro, onde o DPPH* é reduzido a DPPH₂ (cor amarela) (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012). Como observado acima, os resultados obtidos neste teste demonstram a grande capacidade antioxidante da OLZ tanto isolada quanto no sistema com os diferentes HDLs.

Figura 26: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o radical DPPH•. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição in vitro, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (100% de produção de radical DPPH•) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



Observando os resultados do padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL), nota-se que, em todas as concentrações, o padrão apresentou capacidade antioxidante superior a OLZ isolada com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Porém, ao associar a OLZ com o HDL-CaAl, formado o sistema binário CaAl:OLZ 05%, foi possível notar um acréscimo significativo de 40,83, 36,10 e 35,08 % na sua capacidade antioxidante nas concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL de OLZ, respectivamente, mostrando uma atividade significativamente maior que o padrão Trolox nas três diferentes concentrações, num intervalo de confiança estatística de 95%. Tal ganho na sua capacidade antioxidante deu-se, provavelmente, devido a interação com o excipiente funcional proposto neste trabalho.

Da mesma forma, porém com menor expressão, houve aumento da capacidade antioxidante da OLZ quando associada ao HDL-NiAl, no sistema binário NiAl:OLZ 05%, de 20,82 %, 18,65% e 19,43% nas concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL de fármaco, respectivamente, diferença que mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando comparamos tal sistema com a OLZ isolada. A Clozapina, antipsicótico com estrutura química extremamente semelhante à Olanzapina, também apresenta capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• (KRACMAROVA, POHANKA, 2014), mostrando concordância com os resultados apresentados pela OLZ e seus sistemas binários.

Num estudo publicado por Deepu et al., (2015), novos compostos sintéticos, com estrutura química semelhante a fármacos como Olanzapina e Quetiapina, também mostram potencial antioxidante frente ao radical DPPH• com EC_{50} variando entre 136,36 a 661,03 µg/mL. Numa breve comparação, o sistema CaAl:OLZ 5% apresentou EC_{50} de 8,541 µg/mL,

valor 15 vezes menor que os novos compostos sintéticos. O mesmo estudo ainda utilizou o Hidroxitolueno Butilado (BHT), como antioxidante padrão, que apresentou EC_{50} de 10,87 $\mu\text{g/mL}$, valor este, ainda, maior que a EC_{50} do sistema CaAl:OLZ 5%. Os excipientes isolados não apresentaram diferenças significativas entre si na inibição do radical DPPH $^{\bullet}$, porém, quando comparados com o controle negativo (100% de radical DPPH $^{\bullet}$), o HDL-CaAl e o HDL-NiAl apresentaram contribuições na redução do radical DPPH $^{\bullet}$.

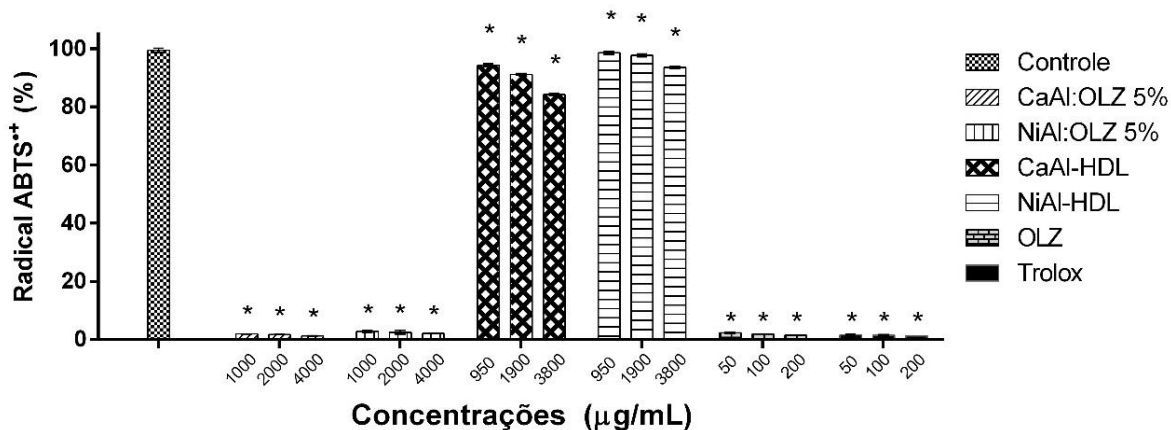
5.2.2 Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Radical ABTS $^{++}$

Os resultados correspondentes a inibição do radical ABTS $^{++}$ pelos sistemas binários HLD:OLZ 5%, e seus componentes isolados, todos em três diferentes concentrações, estão representados na figura 27. As concentrações dos sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e dos componentes isolados HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ foram distribuídas da mesma forma descrita no teste anterior, onde cada respectiva amostra apresentou percentual máximo de $98,74 \pm 0,08$, $97,82 \pm 0,05$, $15,78 \pm 0,33$, $6,47 \pm 0,49$ e $98,44 \pm 0,05$ % dos radicais ABTS $^{++}$ reduzidos, quando comparados ao controle negativo (100% de produção do radical ABTS $^{++}$). O padrão antioxidante Trolox, nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, teve sua redução máxima na produção deste radical livre de $98,72 \pm 0,02$ %.

De acordo com os resultados da capacidade antioxidante frente ao radical ABTS $^{++}$, os valores da EC_{50} para o sistema CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% e OLZ isolada foram de 0,6814, 1,117 e 1,691 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, com intervalo de confiança de 95% variando de 0,0415 a 11,17, 0,0004 a 25,87 e 0,1624 a 17,60, respectivamente. Os HDLs isolados apresentaram EC_{50} de 73,19 e 107,7 $\mu\text{g/mL}$ para o HDL-CaAl e HDL-NiAl, respectivamente, com intervalo de confiança de 95% variando de 59,18 a 90,52 e 86,11 a 134,6, respectivamente.

A produção do radical ABTS $^{++}$ (coloração azul/verde) dá-se através da oxidação do 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), em solução, pela reação com o persulfato de potássio. A capacidade antioxidante pelo decréscimo na produção do radical ABTS $^{++}$ é avaliada por espectrofotometria ($\lambda = 734 \text{ nm}$). Quando comparados aos resultados apresentados pela inibição do radical DPPH $^{\bullet}$, a inibição do radical ABTS $^{++}$ mostrou um maior potencial antioxidante. Isto sugere que o mecanismo de ação antioxidante das amostras pode ocorrer pela transferência de elétrons (MACHADO et al., 2015).

Figura 27: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o radical ABTS^{•+}. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (100% de produção de radical ABTS^{•+}) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



Observando a figura 27, nota-se que os sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% e a OLZ isolada apresentaram grande capacidade antioxidante, sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre si, mostrando que a associação do fármaco com ambos os HDLs não prejudicou seu potencial. Os resultados obtidos pelo sistema CaAl:OLZ 05% e pela OLZ isolada, em todas as concentrações, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando comparados ao padrão antioxidante Trolox. Tal equivalência estatística não foi observada na comparação com o sistema NiAl:OLZ 05%, que apresentou porcentagem de inibição ligeiramente menor que o Trolox, porém de forma significativa.

A manutenção do potencial antioxidante deste fármaco é de grande importância. Em 2014, Gilca et al. publicaram um trabalho com pacientes esquizofrênicos divididos em dois grupos, um deles tratado com Clozapina, que apresenta estrutura química extremamente semelhante a Olanzapina, e outro grupo tratado com Risperidona. Neste estudo, através de um ensaio com o radical ABTS^{•+}, foi possível determinar que os pacientes tratados com Clozapina tiveram suas capacidades antioxidantes prejudicadas, devido ao aumento na concentração deste radical, sugerindo que este fármaco tem impacto negativo na concentração de antioxidantes plasmáticos em humanos, resultando num aumento da concentração de derivados do ácido tiobarbitúrico. O fato de, nos resultados apresentados nessa dissertação, a OLZ isolada e associada aos diferentes HDLs ter apresentado grande potencial de inibição *in vitro*, mostra uma vantagem deste antipsicótico atípico e de sua associação em os excipientes funcionais propostos quando comparamos com os tratamentos convencionais.

Por outro lado, em 2010, Türkez e Togar, através do radical ABTS^{•+}, reportaram uma diminuição da capacidade antioxidante total e um aumento do estresse oxidativo total de células de sangue humano *in vitro* expostas a Olanzapina à medida que aumentava-se a concentração do fármaco. Outro estudo realizado com humanos diagnosticados com transtorno bipolar divididos em dois grupos, um tratado com Lítio e outro tratado com Lítio associado à Olanzapina, revelou que o tratamento combinado prejudicou a capacidade antioxidante total dos indivíduos, quando comparados aos valores antes do início do tratamento. Isto acaba dificultando o combate aos radicais livres e, possivelmente, facilitando a peroxidação lipídica no cérebro (ALIYAZICIOGLU, et al., 2007).

Nos resultados expostos neste trabalho, os sistemas binários entre ambos os HDLs e a OLZ foram extremamente eficazes ao inibir a produção deste radical *in vitro*, criando boas expectativas para futuros testes *in vivo*. O HDL-NiAl isolado não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle negativo (100% de radical ABTS^{•+}), indicando que a inibição apresentada pelo sistema NiAl:OLZ 5% é de derivada da ação exclusiva do fármaco. Já o HDL-CaAl isolado apresentou uma pequena, porém significativa ($p > 0.05$), redução na produção deste radical.

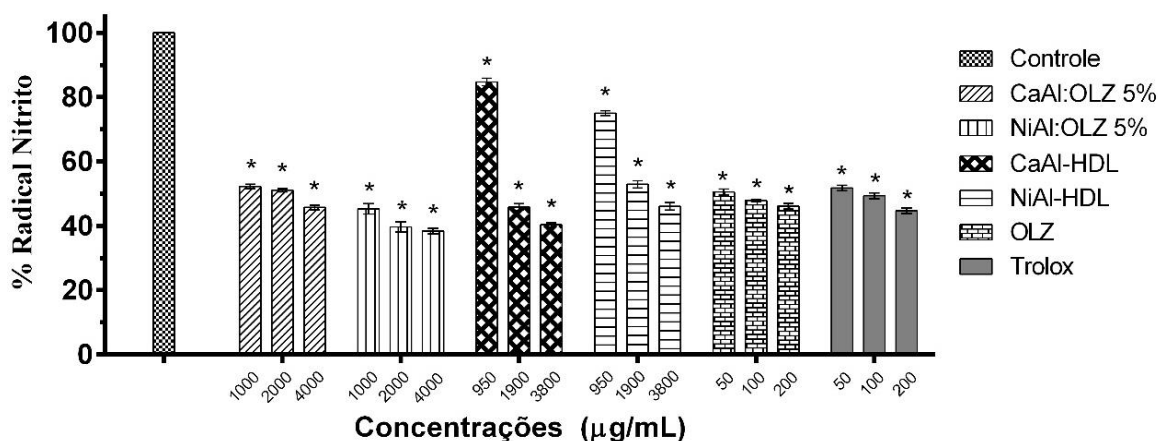
5.2.3 Potencial Antioxidante *in vitro* dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção do Íon Nitrito (NO_2^-)

Os resultados correspondentes a inibição do íon nitrito pelos sistemas binários entre ambos os HDLs e a OLZ, e seus componentes isolados, todos em três diferentes concentrações estão representados na figura 28. As concentrações dos sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, seus componentes isolados HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ, foram distribuídas em quantidades equivalentes, como descrito nos resultados anteriores, onde as respectivas amostras apresentaram inibição máxima de $54,29 \pm 0,75$, $61,61 \pm 0,84$, $59,68 \pm 0,64$, $53,92 \pm 1,17$ e $53,89 \pm 0,90$ % da produção dos íons nitrito, quando comparados com o controle negativo (100% de produção de radicais nitrito). O padrão antioxidante Trolox, nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, teve redução máxima de $55,32 \pm 0,87$ % na produção deste íon.

De acordo com os resultados da capacidade antioxidante frente ao radical nitrito, os valores da EC_{50} para o sistema CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% e a OLZ isolada foram de 8,574, 22,97 e 12,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, com intervalo de confiança de 95% variando de 1,758 a 41,81, 12,25 a 43,08 e 4,908 a 29,71, respectivamente. Os HDLs isolados apresentaram

EC₅₀ de 62,34 e 52,55 µg/mL para o HDL-CaAl e HDL-NiAl, respectivamente, com intervalo de confiança de 95% variando de 60,96 a 63,76 e 50,73 a 54,43, respectivamente.

Figura 28: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra o íon nitrito. Os resultados representam a média ± SD dos valores da inibição *in vitro*, n = 3. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. **p* < 0.05 vs. Controle (100% de produção de radical nitrito) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



O óxido nítrico apresenta importante papel no sistema imunológico, combatendo agentes infecciosos, no sistema neurológico, tendo alta influência na ação de neurotransmissores, no sistema circulatório, como vasodilatador, etc. Este radical pode ser produzido através de enzimas presentes em macrófagos, hepatócitos e células renais. Porém, sua produção em excesso por ser prejudicial aos tecidos saudáveis, causando estresse oxidativo (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991). Pacientes com transtorno bipolar, por exemplo, apresentam níveis plasmáticos elevados de NO[•] quando comparados a pessoas saudáveis, mostrando a relação entre este radical e a psicopatologia (GENGERLIOGLU et al., 2007). Radicais NO[•] também são encontrados em concentrações elevadas em pacientes esquizofrênicos (CHITTIPROL et al., 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante através da inibição do NO[•] foi baseada no princípio de que o nitroprussiato de sódio, em solução aquosa, espontaneamente gera NO[•], o qual interage com o oxigênio e produz íons nitrito (NO₂⁻), que podem ser identificados pelo reagente de Griess (BASU, HAZRA, 2006). O princípio desta avaliação consiste na interação entre a amostra em análise e o NO[•], inibindo a produção do íon NO₂⁻. A figura 28 mostra que o padrão antioxidante Trolox foi eficaz ao diminuir a produção destes íons. Não houve diferença estatisticamente significativa (*p* < 0.05) entre os resultados apresentados pelo Trolox, quando

comparados ao sistema CaAl:OLZ 05% e a OLZ isolada, mostrando-se também eficazes ao inibir os radicais NO[•], quando comparados ao controle negativo (100% de produção de íons NO₂⁻). Já no caso do sistema NiAl:OLZ 05%, houve um acréscimo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de 10,70, 15,84 e 14,33 % na inibição da produção de íons NO₂⁻ nas concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL de OLZ, respectivamente, mostrando que a interação com o excipiente funcional lhe conferiu um melhor desempenho na inibição da produção deste íon.

Um estudo realizado com pacientes diagnosticados com transtorno bipolar tratados com olanzapina, risperidona, quetiapina, clorpromazina e outros antipsicóticos, mostrou que não houve alterações significativas nos níveis de NO[•] após 30 dias de tratamento (GERGERLIOGLU et al., 2007). Tal resultado também observado por Zhang et al., (2012) em pacientes tratados com Risperidona e Haloperidol, que não apresentaram diferença significativa nos níveis de NO[•] antes e depois de um tratamento durante 12 dias. Em contrapartida, os antipsicóticos atípicos perospirona, quetiapina e zisperidona se mostraram eficientes ao inibir significativamente a produção de NO[•] através do interferon- γ de células da micróglia (BIAN et al., 2008).

Novas moléculas sintéticas têm mostrado resultados promissores na inibição deste radical. Moléculas com estrutura química semelhante a antipsicóticos como Olanzapina e Quetiapina, apresentaram EC₅₀ variando entre 16,55 a 35,01 µg/mL (DEEPU et al., 2015). Porém, o resultado apresentado pelo sistema CaAl:OLZ 5% (8,574 µg/mL) mostra-se mais eficaz e promissor.

5.2.4 Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Contra a Produção de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados correspondentes a inibição da peroxidação lipídica pelos sistemas binários entre HDL e OLZ, e seus componentes isolados, todos em três diferentes concentrações estão representados na figura 29. As concentrações das amostras foram distribuídas assim como descrita nos ensaios anteriores. Os sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, e seus componentes isolados HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ apresentaram valores máximos de inibição de $90,17 \pm 0,35$, $66,93 \pm 1,06$, $66,73 \pm 0,51$, $78,60 \pm 1,59$ e $79,47 \pm 0,65$ % da peroxidação lipídica, respectivamente, quando comparada ao controle negativo (100% de

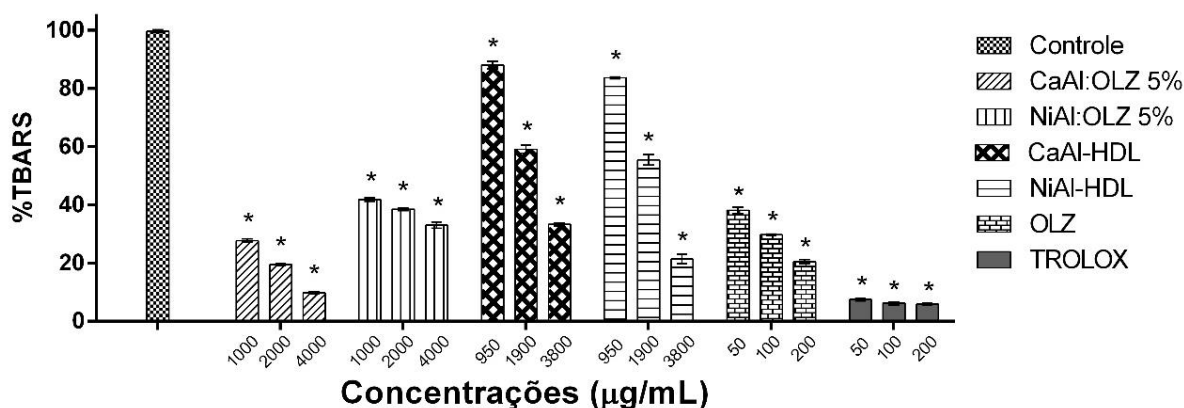
produção de TBARS). O padrão Trolox, nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, apresentou redução máxima da peroxidação de $94,06 \pm 0,46 \%$.

De acordo com os resultados da capacidade antioxidante frente a produção de TBARS, os valores da EC_{50} para o sistema CaAl:OLZ 5%, NiAl:OLZ 5% e OLZ isolada foram de 20,24, 12,35 e 22,80 µg/mL, com intervalo de confiança de 95% variando de 13,01 a 31,47, 5,190 a 29,41 e 15,51 a 33,51, respectivamente. Os HDLs isolados apresentaram EC_{50} de 83,87 µg/mL para o HDL-CaAl e 85,68 µg/mL para o HDL-NiAl, com intervalo de confiança de 95% variando de 78,04 a 90,14 e 77,02 a 95,31, respectivamente.

É possível observar, na figura 29, que todas as amostras testadas apresentaram inibição da peroxidação lipídica proporcional à sua concentração, onde o padrão Trolox apresentou o melhor desempenho. A OLZ isolada apresentou $38,09 \pm 1,08$, $29,71 \pm 0,29$ e $20,52 \pm 0,65 \%$ de TBARS produzidos, comparados ao controle negativo (100% de produção de TBARS), nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente. Porém, associada ao HDL-CaAl, no sistema binário CaAl:OLZ 05%, este percentual caiu para $27,73 \pm 0,55$, $19,51 \pm 0,36$ e $9,82 \pm 0,35 \%$ nas mesmas concentrações equivalentes ao fármaco isolado, o que representa um ganho respectivo de 16,73, 14,50 e 13,45 % na capacidade de inibição da peroxidação lipídica. O incremento desta capacidade antioxidante é de grande importância, pois há relatos frisando a importante correlação entre peroxidação lipídica e a psicopatologia da esquizofrenia, onde altos níveis de produtos desta peroxidação foram encontrados no plasma, células vermelhas do sangue, fluido cérebro-espinhal (ZHANG et al., 2006) e plaquetas, devido menor atividade das enzimas antioxidantes (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2005).

Um estudo realizado com amostras de sangue humano incubadas com Quetiapina, Haloperidol e Olanzapina revelou que, após 1h de incubação, a OLZ não causou mudanças significantes nos níveis de TBARS. Porém, após 24h de incubação, em concentrações mais elevadas, este fármaco aumentou os níveis de peroxidação lipídica no plasma. A Quetiapina apresentou inibição máxima de 15 % da produção de TBARS, enquanto o Haloperidol teve 14% de inibição máxima (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2011). Em contrapartida, o sistema binário CaAl:OLZ 5%, proposto por este trabalho, apresentou porcentagem de inibição de 72,26, 80,48 e 90,17 % *in vitro* nas concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL de OLZ. Tal resultado se mostra promissor, tendo em vista que, além de ter promovido uma inibição significativamente ($p > 0.05$) maior que o fármaco isolado, não promoveu o aumento da peroxidação, como foi observado nos resultados *in vivo* reportados anteriormente, indicando diminuição da toxicidade do fármaco.

Figura 29: Capacidade antioxidante dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema, contra a peroxidação lipídica. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da inibição *in vitro*, $n = 3$. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (100% de produção de TBARS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



Numa comparação com cérebro de ratos após tratamento com Haloperidol, Clozapina, Olanzapina e Aripiprazol, foi revelado que houve aumento nos níveis de TBARS na região do estriado após administração do Haloperidol. Porém, após administração das outras drogas, tais níveis não apresentaram diferença significativa ao comparar com o grupo controle. Já no córtex pré-frontal, o tratamento com OLZ e o Aripiprazol diminuiu os níveis de TBARS quando comparados, também, ao grupo controle (MARTINS et al., 2008).

Em outra comparação realizada numa pesquisa com indivíduos diagnosticados com transtorno bipolar tratados com OLZ associada ao Lítio, notou-se uma diminuição significativa nos níveis de TBARS, além dos níveis de triglicerídeos e total de colesterol, quando comparados aos resultados com o Lítio sozinho ou com os níveis de peroxidação anteriores ao tratamento (ALIYAZICIOGLU et al., 2007). Em estudo realizado com pacientes diagnosticados com esquizofrenia, Singh et al. (2008) afirmaram que pacientes esquizofrênicos tratados com Haloperidol apresentaram aumento da peroxidação lipídica quando comparados com pacientes tratados com novos antipsicóticos, como a OLZ.

É de conhecimento da comunidade científica que, apesar das diversas vantagens, a OLZ pode causar efeitos citotóxicos no sistema nervoso e imune, promover ganho excessivo de peso, adiposidade, complicações metabólicas (SHERTZER et al., 2010), entre outras questões também relacionadas com o metabolismo e peroxidação lipídica em diversos tipos celulares comentados anteriormente. A proposta de novas formulações que promovam melhorias na

atividade de fármacos, incremento de solubilidade, entre outras vantagens, mostra-se como alternativa para diminuição da dose efetiva mínima diminuindo, também, efeitos colaterais que podem comprometer a saúde de determinados pacientes.

5.2.5 Potencial Antioxidante in vitro dos Sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% e Seus Componentes Isolados Pelo Potencial Redutor

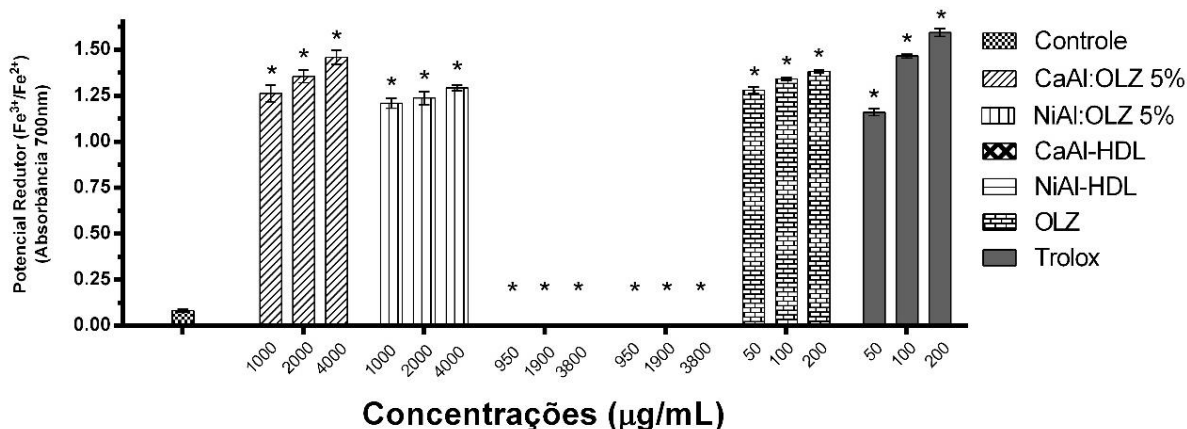
Os resultados correspondentes ao potencial redutor dos sistemas binários entre ambos os HDLs e OLZ, assim como seus componentes isolados, todos em três diferentes concentrações, estão representados na figura 30. As concentrações dos sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05% foram distribuídas em 1000, 2000 e 4000 µg/mL, e OLZ isolada em 50, 100 e 200 µg/mL, quantidades equivalentes àsquelas presentes nos sistemas, onde os valores máximos das absorbâncias ($\lambda = 700$ nm) para cada foi de $1,458 \pm 0,039$, $1,291 \pm 0,015$ e $1,380 \pm 0,007$ nm, respectivamente, representando o potencial redutor dos compostos, que foram significativamente ($p < 0.05$) maiores que o controle negativo. O HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados apresentaram absorbâncias iguais a zero nas três diferentes concentrações, já o padrão Trolox, utilizado nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, apresentou valor máximo de absorbância de $1,592 \pm 0,020$ nm. De acordo com os resultados do potencial redutor, os valores da EC_{50} para o sistema CaAl:OLZ 5%, NiAl:OLZ 5% e OLZ isolada foram de 14,37, 5,612 e 11,27 µg/mL, com intervalo de confiança de 95 % variando de 5,405 a 38,21, 0,4573 a 68,88 e 5,525 a 23,00, respectivamente.

O potencial redutor de ambos os sistemas, CaAl:OLZ 5% e NiAl:OLZ 5%, foi avaliado pela redução do Fe^{3+} (amarelo) em Fe^{2+} (verde). Esta mudança de coloração ocorre devido a capacidade de transferência de elétrons das amostras, processo este que ocorre nas reações de busca por radicais livres e inibição de peroxidação lipídica (MACHADO et al., 2015). O ferro é conhecido por gerar radicais livres através das reações de Fenton e Harber-Weiss, desta forma, agentes quelantes são efetivos como antioxidantes secundários devido ao seu potencial de reduzir e estabilizar o íon metálico, como já citado por Deepu et al. (2015).

A redução promovida pelas amostras testadas, estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo, representada na figura 30, mostra que a capacidade antioxidante é proporcional a concentração das amostras, corroborando com os testes antioxidantes anteriores. Comparando os dois sistemas binários, o CaAl:OLZ 05% apresentou maior potencial redutor com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando

comparado ao sistema NiAl:OLZ 05%, o que justifica este sistema ter apresentado maior porcentagem de inibição na maioria dos testes antioxidantes anteriores. Já comparando os sistemas binários com o fármaco isolado, nas concentrações equivalentes de 50 e 100 µg/mL não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), porém na concentração equivalente de 200 µg/mL o sistema CaAl:OLZ 05% apresentou absorvância de $1,458 \pm 0,039$ nm e a OLZ isolada $1,380 \pm 0,007$, mostrando um aumento significativo no desempenho do fármaco num intervalo de confiança estatística de 95%.

Figura 30: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes no sistema. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da inibição *in vitro*, $n = 3$. Trolox (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (sem as amostras de HDL:OLZ e seus componentes isolados) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



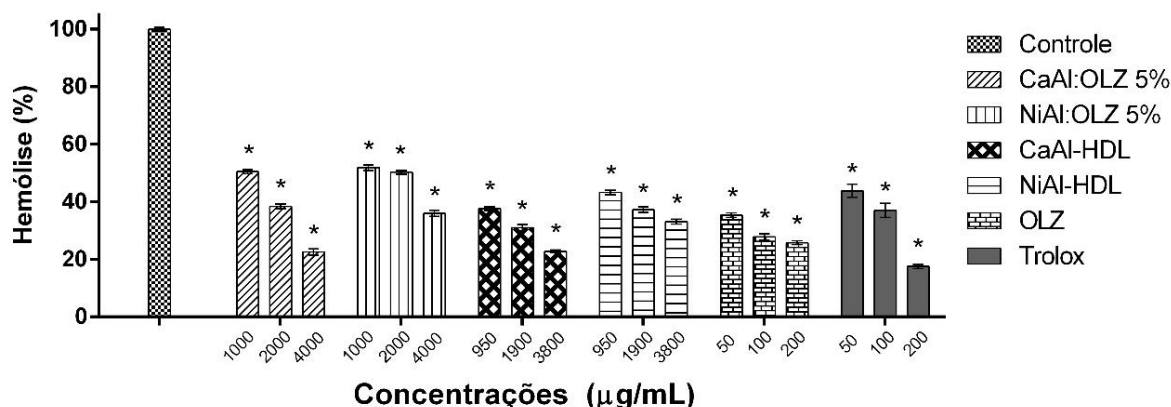
Num estudo mencionado em testes anteriores por Deepu et al., (2015), novas moléculas apresentaram EC_{50} variando entre 39,59 a 105,60 µg/mL. Em contrapartida, os sistemas com OLZ se mostraram mais eficientes, chegando a apresentar EC_{50} de 5,612 µg/mL no sistema NiAl:OLZ 05%, mais eficiente até que o próprio fármaco isolado (11,27 µg/mL). O fato dos HDLs isolados não terem apresentado nenhum potencial redutor neste teste, mas ter apresentado certos valores de inibição da produção de radicais livres em outros testes, sugere que, quando há inibição por parte dos HDLs isolados, este processo ocorre por um mecanismo diferente da troca de elétrons.

5.2.6 Inibição da Hemólise Induzida por AAPH em Eritrócitos de Ratos:

A inibição da hemólise dos eritrócitos é um ótimo ensaio para investigar os danos da oxidação das membranas induzida por radicais livres (CHWALEK et al., 2006). Neste teste, o AAPH provoca a hemólise pela oxidação dos lipídeos que compõe a membrana celular, mecanismo este responsável pela perda da integridade de sua membrana, levando à morte celular (SICINSKA et al., 2006). Na figura 31, observa-se a porcentagem de inibição de hemólise induzida por AAPH em eritrócitos incubados com os sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, seus componentes isolados HDL-CaAl, HDL-NiAl e OLZ, todos distribuídos em concentrações equivalentes mencionadas nos testes anteriores, foi de $77,48 \pm 1,08$, $64,04 \pm 1,04$, $77,24 \pm 0,51$, $66,92 \pm 0,88$ e $74,21 \pm 0,65$ %, respectivamente, quando comparada ao controle negativo (100% de hemólise). O padrão Trolox, nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, obteve redução máxima de $82,46 \pm 0,74$ % da hemólise.

De acordo com os resultados da inibição da hemólise, os valores da EC_{50} para o sistema CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% e OLZ isolada foram de 36,55, 21,04 e 23,32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, com intervalo de confiança de 95% variando de 30,71 a 43,51, 10,67 a 41,51 e 19,05 a 28,54. Os HDLs isolados apresentaram EC_{50} de 19,31 para o HDL-CaAl e 18,67 $\mu\text{g/mL}$ para o HDL-NiAl com intervalos de confiança de 95% variando de 13,74 a 27,24 e 19,05 a 28,54, respectivamente.

Figura 31: Capacidade de inibição da hemólise de eritrócitos pelos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g/mL}$) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes àquelas presentes no sistema. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da inibição *in vitro*, $n = 3$. Trolox (50, 100 e 200 μg) foi utilizado como antioxidante padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (100% de hemólise induzida por AAPH) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



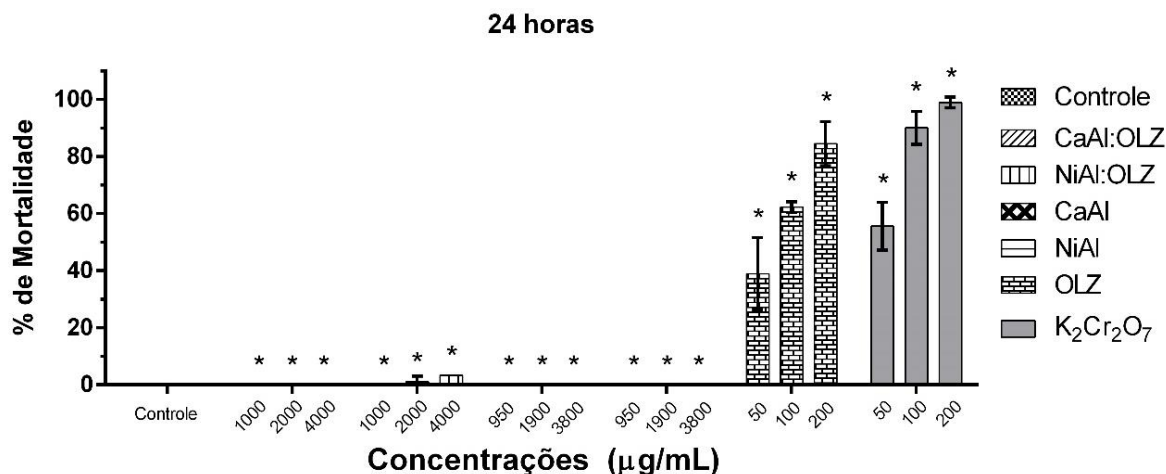
Nota-se, na figura 31, que ambos os sistemas e seus componentes isolados apresentaram considerável capacidade de inibição da hemólise. Comparando os resultados com o padrão Trolox (50, 100 e 200 µg/mL), é possível observar que o fármaco isolado apresentou maior inibição da hemólise nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Não foi observado acréscimo na capacidade do fármaco inibir a hemólise quando associada tanto ao HDL-CaAl ou HDL-NiAl. Contudo, ambos os sistemas, CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, e os HDLs isolados apresentaram capacidade de inibição da hemólise estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando comparadas com o controle negativo.

Eritrócitos têm-se mostrado como uma boa escolha no estudo de pacientes com transtornos psiquiátricos. Numa pesquisa pioneira com um grande número de pacientes diagnosticados com esquizofrenia, Khan et al. (2002) notaram que sob condições estáveis de alimentação ou condições peroxidativas no cérebro, a distribuição dos ácidos graxos poli-insaturados essenciais nas membranas das células vermelhas do sangue reflete na distribuição no sistema nervoso central. Este estudo revela que tais ácidos graxos estão presentes em menor concentração em pacientes tratados com Haloperidol, Clozapina, Olanzapina ou Risperidona, quando comparados ao grupo controle. Isto acontece, principalmente, devido ao aumento da peroxidação lipídica na membrana dos eritrócitos, evidenciada pelo aumento dos níveis de TBARS, promovendo a hemólise. Evitar reações hemolíticas é de grande importância, tendo em vista que outros antipsicóticos, como a Quetiapina, também estão associados com doenças do sangue, como a trombocitopenia trombótica púrpura (HUYNH, 2005).

5.2.7 Teste de Toxicidade *in vitro* em Artemia salina

Antes de serem realizados testes *in vivo* de um determinado produto, são necessários ensaios preliminares para guiar futuros experimentos. A toxicidade *in vitro* dos sistemas e seus componentes individuais foi avaliada pelo teste da *A. salina*, que é considerado útil para uma avaliação preliminar geral da toxicidade de um determinado composto, e há boa correlação com alguns ensaios citotóxicos com células humanas (MEYER et al., 1982). Dessa forma, foram avaliados os sistemas CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, e a OLZ isolada em concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL de fármaco. A concentração do HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados foi distribuída em 950, 1900 e 3800 µg/mL, equivalente a quantidade presente nos sistemas com OLZ.

Figura 32: Toxicidade em *Artemia salina* dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes nos sistemas. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da taxa de mortalidade *in vitro*, n = 10. Dicromato de Potássio (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como agente tóxico padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (tampão PBS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).

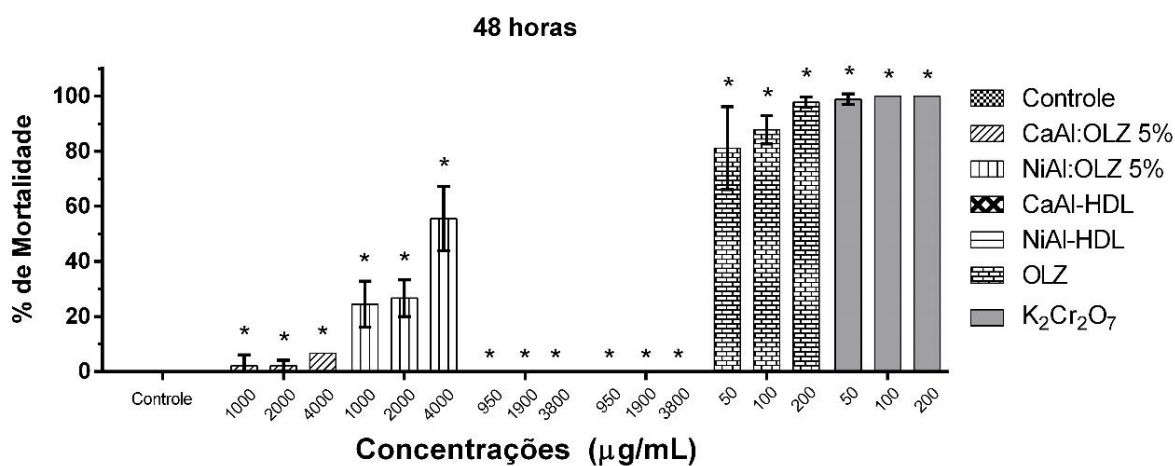


Com 24h de experimento, foi realizada a primeira contagem das *A. salina* e foi possível observar que não houve morte no controle negativo, assim como nos tubos contendo o sistema CaAl:OLZ 05% e com HDLs isolados, como representado na figura 32. O sistema NiAl:OLZ 05% apresentou taxa de mortalidade de $1,11 \pm 1,92$ % na concentração equivalente de 100 µg/mL de fármaco, porém não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle negativo que apresentou taxa de mortalidade de 0 %. Já na concentração equivalente de 200 µg/mL de fármaco, o sistema apresentou taxa de mortalidade de $3,33 \pm 0,0$ %. No caso da OLZ isolada, houve uma taxa de mortalidade de $38,88 \pm 12,61$, $62,22 \pm 1,92$ e $84,44 \pm 7,69$ % nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL de fármaco, respectivamente. O controle positivo, realizado com dicromato de potássio, apresentou taxa de mortalidade de $55,55 \pm 8,38$, $90,0 \pm 5,77$ e $98,8 \pm 1,92$ % nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente. O sistema NiAl:OLZ 05% apresentou valor de EC_{50} de 128,1 com intervalo de confiança de 95% variando de 17,55 a 934,9 µg/mL, enquanto a OLZ isolada mostrou $EC_{50} = 89,16$ com intervalo de confiança de 95% variando de 29,47 a 269,8.

Observa-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 100% na toxicidade da OLZ quando associada ao HDL-CaAl, reduzindo sua taxa de mortalidade à 0%, mesmo apresentando a mesma concentração de fármaco que foi utilizada na amostra de OLZ isolada. Quanto ao sistema NiAl:OLZ 05% houve uma pequena taxa de mortalidade, porém apenas significativa ($p < 0,05$) na amostra mais concentrada (200 µg/mL equivalentes

de OLZ) quando comparada ao controle negativo. O HDL-CaAl e o HDL-NiAl não apresentaram taxa de mortalidade frente aos espécimes de *A. salina* no primeiro dia de contagem.

Figura 33: Toxicidade em *Artemia salina* dos sistemas CaAl:OLZ 05%, NiAl:OLZ 05% (1000, 2000 e 4000 µg/mL) e seus componentes isolados em diferentes concentrações, equivalentes às presentes nos sistemas. Os resultados representam a média $\pm$ SD dos valores da taxa de mortalidade *in vitro*, n = 10. Dicromato de Potássio (50, 100 e 200 µg/mL) foi utilizado como agente tóxico padrão. * $p < 0.05$ vs. Controle (tampão PBS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como teste post hoc).



Com 48 horas de experimento foi realizada mais uma contagem dos crustáceos e foi possível observar um aumento na taxa de mortalidade nas amostras de ambos os sistemas binários entre HDL e OLZ, da OLZ isolada e do controle positivo com dicromato de potássio, representado na figura 33. Nas respectivas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, o sistema CaAl:OLZ 05% apresentou uma taxa de mortalidade de $2,22 \pm 3,84$, $2,22 \pm 1,92$ e $6,66 \pm 0,0$ % e EC₅₀ de 190,0, já o sistema NiAl:OLZ 05% apresentou $24,44 \pm 8,38$, $26,66 \pm 6,66$ e $55,55 \pm 11,70$ % de taxa de mortalidade e EC₅₀ de 169,1.

A análise estatística, num intervalo de confiança de 95%, demonstra que não houve diferença significativa entre as taxas de mortalidade apresentadas pelo controle negativo e pelo sistema CaAl:OLZ 05% em 48 horas de experimento, enquanto o fármaco isolado apresenta alta taxa de mortalidade, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle positivo (K₂Cr₂O₇) nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Já na comparação entre controle negativo e sistema NiAl:OLZ 05% há uma taxa de mortalidade estatisticamente significativa, porém, ainda consideravelmente inferior às taxas apresentadas pela Olanzapina isolada, apresentando diminuição de 30,13, 30,37 e 56,81 % da mortalidade

do fármaco nas concentrações equivalentes de 50, 100 e 200 µg/mL. É importante apontar que tanto na contagem de 24h quanto na de 48h as amostras com HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados não apresentaram toxicidade, mantendo vivas todos as *A. salinas* assim como no controle negativo.

5.2.8 Correlações Entre os Testes Antioxidantes *in vitro*

O coeficiente da correlação (r) entre os diferentes valores de capacidade antioxidante das amostras testadas foi determinado e pode ser observado na tabela 07. As correlações entre os testes *in vitro* para o sistema de CaAl:OLZ 05% mostraram-se altamente positivas com valores de r acima de 0,936, assim como a OLZ isolada, que apresentou valores de r acima de 0,961. No caso do sistema NiAl:OLZ 05%, foi possível observar duas correlações, DPPH[•] vs. NO₂⁻ e NO₂⁻ vs. TBARS, com valores de $r = 0,768$ e $0,886$, respectivamente. Na correlação ABTS^{•+} vs. NO₂⁻ para o HDL-CaAl e HDL-NiAl isolados foram observados valores de $r = 0,811$ e $0,792$, respectivamente. Para as correlações restantes ambos os HDLs isolados apresentaram valores de r acima de 0,907.

Tabela 09: Correlação do coeficiente de Pearson (r) entre os diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidante das amostras testadas.

Correlação	CaAl:OLZ 05%		NiAl:OLZ 05%		HDL-CaAl		HDL-NiAl		OLZ	
	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
DPPH [•] vs. ABTS ^{•+}	0,978	0,134	0,960	0,180	0,982	0,121	0,936	0,230	0,961	0,179
DPPH [•] vs. NO ₂ ⁻	0,998	0,036	0,768	0,443	0,907	0,276	0,956	0,189	0,933	0,235
DPPH [•] vs. TBARS	0,936	0,095	0,977	0,136	0,998	0,036	0,999	0,035	0,973	0,147
Nitrito vs. TBARS	0,954	0,193	0,886	0,307	0,930	0,240	0,939	0,223	0,990	0,088
ABTS ^{•+} vs. TBARS	0,989	0,095	0,988	0,044	0,970	0,157	0,954	0,195	0,999	0,032
ABTS ^{•+} vs. NO ₂ ⁻	0,988	0,098	0,916	0,263	0,811	0,398	0,792	0,418	0,996	0,056

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A caracterização físico-química das amostras indicaram redução da cristalinidade da Olanzapina em todas as formulações, para ambos os HDLs, com destaque para os sistemas binários CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, que apresentaram maior capacidade de estabilização da forma amorfa do fármaco.

Todos os sistemas binários obtidos, com ambos os HDLs, promoveram incremento na taxa de dissolução da Olanzapina, que não foi observado em nenhuma das misturas físicas. Os sistemas binários CaAl:OLZ 05% e NiAl:OLZ 05%, com destaque para o primeiro, apresentaram uma maior capacidade de solubilização da OLZ, corroborando com os resultados da caracterização físico-química.

A OLZ isolada e nos sistemas binários, com ambos os tipos de HDL, apresentaram capacidade antioxidante *in vitro* em todos os testes realizados. Em alguns casos, como na inibição do radical DPPH[•], do NO[•] e da peroxidação lipídica, o sistema binário entre HDL e OLZ apresentou resultados mais eficazes quando comparados ao fármaco isolado, indicando que a interação entre HDL e OLZ promoveu um aumento do seu potencial antioxidante.

O teste toxicológico preliminar com *A. salina* apresentou resultado promissor diminuindo drasticamente a taxa de mortalidade dos crustáceos e não apresentando toxicidade para as amostras contendo os HDLs isolados, o que favorece, juntamente com os resultados dos testes antioxidantes e a caracterização físico-química, a proposta de utilização dos HDLs como um excipiente funcional na indústria farmacêutica.

Este trabalho gerou um pedido de patente registrado no INPI sob o código: BR 10 2015 016882 9.

Como perspectivas tem-se:

- Realizar caracterizações complementares, como análise de tamanho de partículas, análise elementar, isoterms de adsorção, volume de poros, entre outras, para melhor embasar os resultados já obtidos;
- Publicação destes resultados na forma de dois artigos.
- Realizar futuros testes de toxicidade *in vivo* dos sistemas binários e seus componentes isolados;

- Avaliar o incremento de solubilidade promovido pelos HDLs em fármacos de diferentes classes terapêuticas;
- Obter microesferas de nanocompósitos formados por polímeros gastrorresistentes recobrando sistemas binários entre HDL e fármacos de diferentes classes terapêuticas;
- Avaliar a biodisponibilidade dos nanocompósitos gastrorresistentes obtidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL ALI S. H. H.; AL-QUBAISI, M.; HUSSEIN, M. Z.; ISMAIL, M.; ZANAIL, Z.; HAKIM, M. N. Controlled release and angiotensin-converting enzyme inhibition properties of an antihypertensive drug based on a perindopril erbumine-layered double hydroxide nanocomposite. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2129-2141, 2012

ALBAYRAK, Y.; ÜNSAL, C.; BEYAZYÜZ, M.; ÜNAL, AHMET, KULOGLU, M. Reduced total antioxidant level and increased oxidative stress in patients with deficit schizophrenia: A preliminary study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 45, p. 144-149, 2013.

ALIYAZICIOGLU, R.; KURAL, B.; ÇOLAK, M.; KARAHAN, C.; AYVAZ, S.; DEGER, O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. **Journal of Exp. Med.**, v. 213, p. 79-87, 2007.

ALLADA, R.K., NAVROTSKY, A., BERBECO, H.T., CASEY, W.H. Thermochemistry and aqueous solubilities of hydrotalcite-like solids. **Science**, v. 296, p. 721-723, 2002.

ALLISON D.B.; CASEY D. F. Antipsychotic-associated weight gain: a review of the literature. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, p. 22-31, 2001.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia, Fundamentos Práticos**. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Cap 2, p. 40-45; cap 15, p. 161-164; cap 24, p. 294-297; cap 25, p. 301-313, 2006.

ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, E. B. F.; SILVA, O. A.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 118, p. 69-78, 2014.

AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. **International Journal Pharmaceuticals**, v. 220, p. 23-32, 2001.

AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; PERIOLI, L.; NOCCHETTI, M.; GRANDOLINI, G. Effect of hydrotalcite like compounds on dissolution of poorly water soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 1407-1417, 2003.

AMBROGI, V.; CIARNELLI, V.; NOCCHETTI, M.; PERIOLI, L.; ROSSI, C. A novel gliclazida hydrotalcite nanohybrid for improving drug dissolution rate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 73, p. 285-291, 2009.

ANDREAZZA, A.C.; CASSINI, C.; ROSA, A.R.; LEITE, M.C.; ALMEIDA, L.M.; NARDIN, P.; CUNHA, A.B.; CERESÉ, K.M.; SANTIN, A.; GOTTFRIED, C.; SALVADOR, M.; KAPCZINSKI, F.; GONÇALVES, C.A. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, p. 523–529, 2007.

ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; BOND, D.J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG L.T. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J Affect Disord.**, v. 111, p. 135-44, 2008.

ANDREAZZA, A.C.; SHAO, L.; WANG, J.F.; YOUNG L.T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, p. 360-368, 2010.

ANDREAZZA, A.C.; YOUNG, L.T. The neurobiology of bipolar disorder: identifying targets for specific agents and synergies for combination treatment. **Int J Neuropsychopharmacology**, p. 1-14, 2013.

ANDREAZZA, A. C.; GILDENGERS, A.; RAJJI, T. K.; ZUZARTE, P. M. L.; Mulsant, B. H.; YOUNG, L. T. Oxidative stress in older patients with bipolar disorder. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 314–319, 2015.

AYALA A.P.; SIESLER, H. M.; HOFFMAN, G. G.; POLLA, G. I.; VEGA, D. R. Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, p. 69-79, 2006.

BAEK, M.; KIM, I. S.; YU, J.; CHUNG, H. E.; CHOY, J. H.; CHOI, S. J. Effect of different forms of anionic nanoclays on cytotoxicity. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v. 11, p. 1803–1806, 2011.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-18, 2016.

BASILE, F., VACCARI, A. **Applications of hydrotalcite-type anionic clays (layered double hydroxides) in catalysis**. In: Rives, V. (Ed.), Layered Double Hydroxides: Present and Future. Nova Science Publishers, New York. Cap 10, 2001.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytother. Res.**, v. 20, p. 896–900, 2006.

BENGESSER, S. A.; LACKNER, N.; BIRNER, A.; FELLENDORF, F. T.; PLATZER, M.; MITTEREGGER, A.; UNTERWEGER, R. Peripheral markers of oxidative stress and antioxidative defense in euthymia of bipolar disorder - Gender and obesity effects. **Journal of Affective Disorders**, v. 172, p. 367-374, 2015.

BERBER, M. R.; HAFEZ, I. H.; MINAGAWA, K.; MORI, T.; TANAKA, M. Nanocomposite formulation system of lipid-regulating drugs based on layered double hydroxide: synthesis, characterization and drug release properties. **Pharmaceutical Resistance**, v. 27, p. 2394-2401, 2010.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; DEAN, O.M.; GIORLANDO, F.; MAES, M. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 804–817, 2011.

BIAN, Q.; KATO, T.; MONJI, A.; HASHIOKA, S.; MIZOGUCHI, Y.; HORIKAWA, H.; KANBA, S. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon- γ . **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 42-48, 2008.

BLANCHET, L.; BUYDENS, M. C.; SMEITINK, J.A.; WILLEMS, P.H.; KOOPMAN, W.J. Isolated mitochondrial complex I deficiency: explorative data analysis of patient cell parameters. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4023-4033, 2011.

BORTOLASCI, C.C.; VARGAS, H.O.; SOUZA-NOGUEIRA, A.; BARBOSA, D.S.; MOREIRA, E.G.; NUNES, S.O.; BERK, M.; DODD, S.; MAES, M. Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene polymorphism-smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder. **J. Affect. Disord.**, v. 159, p. 23–30, 2014.

BOŠKOVIĆ, M.; VOVK, T.; PLESNIČAR, B. K.; GRABNAR, I. Oxidative stress in schizophrenia. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 9, n. 2, p. 301, 2011.

BOTAN, R.; NOGUEIRA, T. R.; LONA, L. M.F. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar Via Polimerização In Situ. **Polymers**, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2011.

BROWN, N. C.; ANDREAZZA, A. C.; YOUNG, L. T. An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. **Psychiatry Research**, v. 218, p. 61-68, 2014.

CAMACHO L. A., PÉREZ J. A. M. **The Ephemeral Nature of Free Radicals: Chemistry and Biochemistry of Free Radicals**. In: Morales González J. A.; FERNÁNDEZ S. A. M., BAUTISTA Á. M, VARGAS M. N, MADRIGAL S. E. O. Antioxidants and Chronic Degenerative Diseases. México: Ciencia al Día. 2009. p. 27-76

CARRIAZO, D.; DEL ARCO, M.; MARTIN, C.; RAMOS, C.; RIVES, V. Influence of the inorganic matrix nature on the sustained release of naproxen. **Microporous Mesoporous Materials**, v. 130, p. 229–238, 2010.

CATTS, V.S.; CATTS, S.V.; JABLENSKY A.; CHANDLER, D.; WEICKERT, C.S.; LAVIN, M.F. Evidence of aberrant DNA damage response signaling but normal rates of DNA repair in dividing lymphoblasts from patients with schizophrenia. **World J Biol Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 114–125, 2012.

CENTI, G., PERATHONER, S. Catalysis by layered materials: a review. **Microporous Mesoporous Mater**, v. 107, 3-15, 2008.

CHAKRABORTY, M.; DASGUPTA, S.; BOSE, P.; MISRA, A.; MANDAL, T. K.; MITRA, M.; CHAKRABORTY, J.; BASU, D. Layered double hydroxide: inorganic organic conjugate nanocarrier for methotrexate. **J. Phys. Chem. Solids**, v. 72, p. 779–783, 2011.

CHIOU, W.L.; RIEGELMAN, S. Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 1505-1510, 1969.

CHITTIPROL, S.; VENKATASUBRAMANIAN, G.; NEELAKANTACHAR, N.; BABU, S. V. S.; REDDY, N. A.; SHETTY, K. T.; GANGADHAR, B. N. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: A longitudinal study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, p. 310-313, 2010.

CHOI, S. J.; OH, J. M.; PARK, T.; CHOY, J. H. Cellular toxicity of inorganic hydroxide nanoparticles. **Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 4017-4020, 2007.

CHOI, S. J.; OH, J. M.; CHOY, J. H. Human-related application and nanotoxicology of inorganic particles: complementary aspects. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, p. 615-620, 2008.

CHOI, S., DRESE, J. H., JONES, C. W. Adsorbent materials for carbon dioxide capture from large antropogenic point sources. **Chemistry & Sustainability Energy & Materials**, v. 21, p. 796-854, 2009.

CHOI, G., LEE, J.-H., OH, Y.-J., CHOY, Y.B., PARK, M.C., CHANG, H.C., CHOY, J.-H. Inorganic-polymer nanohybrid carrier for delivery of a poorly-soluble drug, ursodeoxycholic acid. **International Journal of Pharmeuticals**, v. 402, p. 117-122, 2010.

CHOI, S. J.; CHOY, J. H. Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 803-814, 2011.

CHOU, S.; JONES, S.; LI, M. Adolescent olanzapine sensitization is correlated with hippocampal stem cell proliferation in a maternal immune activation rat model of schizophrenia. **Brain Research**, v. 1619, p. 122-135, 2015.

CHOWDARI, K.V.; BAMNE, M.N.; NIMGAONKAR, V.L. Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, p. 2037–2045, 2011.

CHOY, J. H.; PARK, M.; OH, J. M. Bio-nanohybrids based on layered double hydroxide. **Current Nanoscience**. v. 2, p. 275-281, 2006.

CHOY, J. H.; CHOI, S. J.; OH, J. M.; PARK, D. H. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. **Applied Clay Science**, v. 36, p. 122-132, 2007.

CHWALEK, M.; LALUN, N.; BOBICHON, H.; PLÉ, K.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: hemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, p. 1418–1427, 2006.

COMAS, J.; DIEUZEIDE, M. L.; BARONETTI, G.; LABORDE, M.; AMADEO, N. Methane steam reforming and ethanol steam reforming using a Ni(II)-Al(III) catalyst prepared from lamellar double hydroxides. **Chemical Engineering Journal**, v. 118, p. 11-15, 2006.

COOPER, E. R. Nanoparticles: a personal experience for formulating poorly water soluble drugs. **Journal of Control. Release**, v. 141, p. 300-302, 2010.

COPOGLU, U. S.; VIRIT, B.; KOKACYA, M. H.; ORKMEZ, M.; BULBUL, F.; ERBAGCI, A. B.; SEMIZ, M.; ALPAK, G.; UNAL, A. Increased oxidative stress and oxidative DNA damage in non-remission schizophrenia patients. **Psychiatry Research**, v. 229, p. 200-205, 2015.

CORDEIRO, R. M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, p. 438–44, 2014.

COSTA, F.R.; SAPHIANNIKOVA, M.; WAGENKNECHT, U.; HEINRICH, G. Layered double hydroxide based polymer nanocomposites. **Adv. Polym. Sci.**, v. 210, p. 101-168, 2008.

COSTANTINO, U.; NOCCHETTI, M.; **Layered double hydroxides and their intercalation compounds in photochemistry and medicinal chemistry**. In: RIVES, V., Layered Double Hydroxides: Present and Future. Nova Science Publishers, New York. 2001 p. Cap 12, p. 383-411.

CONSTANTINO, U.; LEROUX, F.; NOCCHETTI, M.; MOUTSY, C. **LDH in Physical, Chemical, Biochemical, and Life Sciences**. In: Handbook of Clay Science, v. 5B, 2013. Cap 6, p 765-791.

COSTANTINO, U., GALLIPOLI, A., NOCCHETTI, M., CAMINO, G., BELLUCCI, F., FRACHE, A. New nano-composites constituted of polyethylene and organically modified Zn-Al-hydrotalcites. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 90, p. 586-590, 2005.

COSTANTINO, U.; MONTANARI, F.; NOCCHETTI, M.; CANEPA, F.; FRACHE, A. Preparation and characterization of hydrotalcite/carboxyadamantane intercalation compounds as fillers of polymeric nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 1079-1086, 2007.

COSTANTINO, U.; BUGATTI, V.; GORRASI, G.; MONTANARI, F.; NOCCHETTI, M.; TAMMARO, L.; VITTORIA, V. New polymeric composites based on poly (ε-caprolactone) and layered double hydroxides containing antimicrobial species. **Applied Material Interfaces**, v. 1, p. 668-677, 2009.

CRADDOCK, N.; OWEN, M. J. The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy. **British Journal of Psychiatry**, v. 186, p. 364–366, 2005.

CROWLEY, K. J.; ZOGRAFI, G. Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 492-507, 2002.

CUNHA, V. R. R.; PETERSE, P. A. D.; GONCALVES, M. B.; PETRILLI, H. M.; TAVIOT-GUEHO, C.; LEROUX, F.; TEMPERINI, M. L. A.; CONSTANTINO, V. R. L. Structural, spectroscopic (NMR, IR, and Raman), and DFT investigation of the self-assembled nanostructure of pravastatin-LDH (layered double hydroxides) systems. **Chem. Materials**, v. 24, p. 1415-1425, 2012.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 813–24, 2007.

DEEPU, C. V.; RAGHAVENDRA, G. M.; REKHA, N. D.; MANTELINGU, K.; RANGAPPA, K. S.; BHADREGOWDA, D. G. Synthesis and biological evaluation of novel 1,5-benzothiazepin-4(5H)-ones as potent antiangiogenic and antioxidant agents. **Current Chemistry Letters**, v. 4, p. 133-144, 2015.

DEL ARCO, M., GUTIÉRREZ, S., MARTÍN, C., RIVES, V., ROCHA, J. Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). **Journal of Solid State Chemistry**, v. 177, p. 3954-3962, 2004.

DEL ARCO, M.; FERNANDEZ, A.; MARTIN, C.; RIVES, V. Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg, Al, Fe-hydrotalcites. **Appl. Clay Science**, v. 42, p. 538-544, 2009.

DEL HOYO, C. Layered double hydroxides and health: an overview. **Applied Clay Science**, v. 36, p. 103-121, 2007.

DETKE, H. C.; DEL BELLO, M. P.; LANDRY, J.; USHER, R. W. Olanzapine/Fluoxetine Combination in Children and Adolescents With Bipolar I Depression: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 217-224, 2015.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B.; RABE-JABLONSKA, J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. **Platelets**, v. 16, p. 386–391, 2005.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; KONTEK, B.; RABE-JABLONSKA, J. Quetiapine, Olanzapine and Haloperidol affect human plasma lipid peroxidation in vitro. **Neuropsychobiology**, v. 63, p. 197-201, 2011.

DIKALOV S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med**, v. 51, p. 1289–301, 2011

DOMECQ, J.P.; PRUTSKY, G.; LEPPIN, A.; SONBOL, M.B.; ALTAYAR, O.; UNDAVALLI, C.; WANG, Z.; ELRAIYAH, T.; BRITO, J.P.; MAUCK, K.F.; LABABIDI, M.H.; PROKOP, L.J.; ASI, N.; WEI, J.; FIDAHUSSEIN, S.; MONTORI, V.M.; MURAD, M.H. Clinical review: Drugs commonly associated with weight change: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, p. 363-370, 2015.

DUAN, X.; EVANS, D. G. **Layered Double Hydroxide**. In: MINGOS, D. M. P. Structure and Bonding, v. 118, 2006.

DUPIN, J.C.; MARTINEZ, H.; GUIMON, C.; DUMITRIU, E.; FECHETE, I. Intercalation compounds of Mg–Al layered double hydroxides with dichlophenac: different methods of preparation and physico-chemical characterization. **Applied Clay Science**, v. 27, p. 95-106, 2004.

EVANS, D.G.; DUAN, X. Preparation of layered double hydroxides and their applications as additives in polymers, as precursors to magnetic materials and in biology and medicine. **Chem. Community**, p. 485-496, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. Moringa oleífera: bioactive compounds and nutritional potencial. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FLATOW, J.; BUCKLEY, P.; MILLER, B. J. Meta-Analysis of Oxidative Stress in Schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 74, p. 400-409, 2013.

FONTE, C.; FATIGONI, S.; ROILA, F. A review of olanzapine as an antiemetic in chemotherapy-induced nausea and vomiting and in palliative care patients. **Oncology Hematology**, v. 95, n. 2, p 214-221, 2015.

FORANO, C.; VIAL, S.; MOUSTY, C. Nanohybrid enzymes-layered double hydroxides: potential applications. **Current Nanoscience**, v. 2, p. 283-294, 2006.

FORANO, C.; CONSTANTINO, U.; PRÉVOT, V.; GUEHO, C. T. **Layered Double Hydroxides (LDH)**. In: Handbook of Clay Science, v 5A, 2013. Cap 14.1, p. 745-782.

FREITAS, M. R.; ROLIM, L. A.; SOARES, M. F. L. R.; ROLIM-NETO, P. J.; ALBUQUERQUE, M. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L. Inclusion complex of beta-cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; HOUENOU, J.; JAMAIN, S.; GOLDSTEIN, B.I.; FRYE, M.A.; LEBOYER, M.; BERK, M.; MALHI, G.S.; LOPEZ-JARAMILLO, C.; TAYLOR, V.H.; DODD, S.; FRANGO, S.; HALL, G.B.; FERNANDES, B.S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; YATHAM, L.N.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L.T. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 321–332, 2013.

FUDALA, A.; PÁLINKÓ, I.; KIRICSI, I. Preparation and characterization of hybrid organic-inorganic composite materials using the amphoteric property of amino acids: amino acid intercalated layered double hydroxide and montmorillonite. **Inorg. Chem.**, v. 38, p. 4653–4658, 1999.

GAO, L.; LIU, G.; MA, J.; WANG, X.; ZHOU, L.; LI, X.; WANG, F. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 307–324, 2013.

GÉRARDIN, C.; KOSTADINOVA, D.; SANSON, N.; COQ, B.; TICHIT, D. Supported metal particles from LDH nanocomposite precursors: control of the metal particle size at increasing metal content. **Chem. Mater.**, v. 17, p. 6473–6478, 2005.

GERGERLIOGLU, H. S.; SAVAS, H. A.; BULBUL, F.; SELEK, S.; UZ, E.; YUMRU, M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimaniac treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 697-702, 2007.

GILCA, M.; PIRIU, G.; GAMAN, L.; DELIA, C.; IOSIF, L.; ATANASIU, V.; STOLAN, I. A study of antioxidant activity in patients with schizophrenia taking atypical antipsychotics. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 4703-4710, 2014.

GILLMAN, G.P. A simple technology for arsenic removal from drinking water using hydrotalcite. **Sci. Total Environ.**, v. 366, p. 926-931, 2006.

GIRISH, T. K.; VASUDEVARAJU, P.; RAO, U. J. S. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*vigna mungo* L.) husk extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1690-1696, 2012.

GOLDSTEIN, B.I.; YOUNG, L.T. Toward clinically applicable biomarkers in bipolar disorder: focus on BDNF, inflammatory markers, and endothelial function. **Current Psychiatry Rep**, v. 15, p. 425, 2013.

GÖTZ, M. E., KÜNIG, G.; RIEDERER, P.; YODIM, M. B. H. **Oxidative Stress: free radical production in neural degeneration**. In: BELL, C. Chemical Factors in Neural Growth, Degeneration and Repair, Elsevier Science. Cap. 17, 1996.

GROVER, K., KOMARNENI, S., KATSUKI, H. Uptake of arsenate by synthetic layered double hydroxides. **Water Res.**, v. 43, p. 3884-3890, 2009.

GU, Z.; ROLFE, B. E.; THOMAS, A. C.; CAMPBELL, J. H.; LU, G. Q.; XU, Z. P. Cellular trafficking of low molecular weight heparin incorporated in layered double hydroxide nanoparticles in rat vascular smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 32, p. 7234-7240, 2011.

GUBERT, C.; STERTZ, L.; PFAFFENSELLER, B.; PANIZZUTTI, B. S.; REZIN, G. T.; MASSUDA, R.; STRECK, E. L.; GAMA, C. S.; KAPCZINSKI, F.; KUNZ, M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1396-1402, 2013.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 107, p. 949–57, 2010.

GUZMÁN, H. R.; TAWA, M.; ZHANG, Z.; RATANABANANGKON, P.; SHAW, P.; GARDNER, C. R.; CHEN, H.; MOREAU, J. P.; ALMARSSON, O.; REMENAR, J. F. Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n.10, p 2686-2702, 2007.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1 –85, 1990.

HAN, J.; DOU, Y.; WEI, M.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Antireflection/antifogging coatings based on nanoporous films derived from layered double hydroxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 169, p. 371-378, 2011.

HATCH, J.; ANDREAZZA, A.; OMODELE, O.; REZIN, G. T.; MOODY, A.; GOLDSTEIN, B. I. Cardiovascular and psychiatric characteristics associated with oxidative stress markers among adolescents with bipolar disorder. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 79, p. 222-227, 2015.

HE, J.; WEI, M.; LI, B.; KANG, Y.; EVANS, D. G.; DUAN, X. **Preparation of double layered hydroxides**. In: DUAN, X., EVANS, D.G. Layered Double Hydroxides. Springer, Berlin. 2006, p. 89-119.

HEISER, P.; ENING, F.; KRIEG, J. C. Effects of haloperidol, clozapine and olanzapine on the survival of human neuronal and immune cells in vitro. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 851-856, 2007.

ILLAIK, A.; VUILLERMOZ, C.; COMMEREUC, S.; TAVIOT-GUÉHO, C.; VERNEY, V.; LEROUX, F. Reactive and functionalized LDH fillers for polymer. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, p. 1362-1366, 2008.

INACIO, J.; TAVIOT-GUÉHO, C.; FORANO, C.; BESSE, J. P. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. **Appl. Clay Sci.**, v. 18, p. 255–264, 2001.

ISRAELI, Y.; TAVIOT-GUEHO, C.; BESSE, J. P.; MOREL, J. P.; MOREL-DESROSIERS, N. Thermodynamics of anion exchange on a chloride-intercalated zinc–aluminum layered double hydroxide: a microcalorimetric study. **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, v. 5, p. 791-796, 2000.

JAMIALAHMADI, K.; ARASTEH, O.; RIAHI, M. M.; MEHRI, S.; RIAHI-ZANJANI, B.; KARIMI, G. Protective effects of glucosamine hydrochloride against free radical-induced erythrocytes damage. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 38, p. 212-219, 2014.

JOHNSON, J. L. H.; HE, Y.; YALKOWSKY, S. H. Prediction of precipitation-induced phlebitis: A statistical validation of an in vitro model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 1574-1581, 2003.

JORGENSEN, A.; BROEDBAEK, K.; FINK-JENSEN, A.; KNORR, U.; HENRIKSEN, T. Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. **Psychiatry Res**, v. 209, n. 3, p. 417–23, 2013.

KALINICHEV, A. G.; KUMAR, P. P.; KIRKPATRICK, R. J. Molecular dynamics computer simulations of the effects of hydrogen bonding on the properties of layered double hydroxides intercalated with organic acids. **Philos. Mag.**, v. 90, p. 2475–2488, 2010.

KAMEDA, T.; SAITO, S.; UMETSU, Y. Mg-Al layered double hydroxide intercalated with ethylene-diaminetetraacetate anion: Synthesis and application to the uptake of heavy metal ions from an aqueous solution. **Sep. Purif. Technology**, v. 47, p. 20-26, 2005.

KHAN, M. M.; EVANS, D. R.; GUNNA, V.; SCHEFFER, R. E.; PARIKH, V. V.; MAHADIK, S. P. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. **Schizophrenia Research**, v. 58, p. 1-10, 2002.

KANING, J. L. Properties of fused mannitol in compressed tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, p. 188-192, 1964.

KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F.; TEIXEIRA, A.L.; MAGALHAES, P.V.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KLAMT, F.; KLAMT, F.; MOREIRA, J.C.; BITTENCOURT PASQUALI, M.A.; FRIES, G.R.; QUEVEDO, J.; GAMA, C.S.; POST, R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, p. 156–161, 2011.

KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; BOND, D.J.; LAM R.W.; YOUNG L.T. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early vs. late-stage bipolar disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 12, p. 447 –58, 2009.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 420, p. 1-10, 2011.

KHADKA, P.; RO, J.; KIM, H.; KIM, I.; KIM, J. T.; KIM, H.; CHO, J. M.; YUN, G.; LEE, J. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 1-16, 2014.

KIM, T.; KIM, H.J.; OH, J. Interlayer Structure of Bioactive Molecule, 2-Aminoethanesulfonate, Intercalated into Calcium-Containing Layered Double Hydroxides. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p.7, 2012.

KIM, T. W.; SLOWING, I. I.; CHUNG, P. W.; LIN, V. S. Y. Ordered Mesoporous Polymer-Silica Hybrid Nanoparticles as Vehicles for the Intracellular Controlled Release of Macromolecules. **ASC Nano**, v. 5, n. 1, p. 360-366, 2011.

KLEMKAITE K.; et al. Synthesis and characterization of layered double hydroxides with different cations (Mg, Co, Ni, Al), decomposition and reformation of mixed metal oxides to layered structures. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, p. 275-282, 2011.

KLUGE, M. SCHACHT, A.; HUBERTUS, H.; RUMMEL-KLUGE, WEHMEIER, P. DALAL, M. Olanzapine and clozapine differently affect sleep in patients with schizophrenia: Results from a double-blind, polysomnographic study and review of the literature. **Schizophrenia Research**, v. 152, p. 255-260, 2014.

KONRADI, C.; SILLIVAN, S.E.; CLAY, H.B. Mitochondria, oligodendrocytes and inflammation in bipolar disorder: evidence from transcriptome studies points to intriguing parallels with multiple sclerosis. **Neurobiology Dis.**, v. 45, p. 37-47, 2012.

KONTUREK, J. W.; BENEKE, M.; KOPPERMANN, R.; PETERSEN-BRAUN, M.; WEINGARTNER, U. The efficacy of hydrotalcite compared with OTC famotidine in the on-demand treatment of gastroesophageal reflux disease: a non-inferiority trial. **Med. Sci. Monitor**, v. 13, p. 44-49, 2007.

KOVANDA, F., ROJKA, T., DOBESOVA, J., MACHOVIC, V., BEZDICKA, P., OBALOVA, L., JIRATOVA, K., GRYGAR, T. Mixed oxides obtained from Co and Mn containing layered double hydroxides: preparation, characterization and catalytic properties. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 179, 812-823, 2006.

KRACMAROVA, A.; POHANKA, M. The impact of clozapine on regulation of inflammation in murine macrophage cells. **Neuroendocrinology Letters**, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2014.

KRISHNAMOORTHY, V.; NAGALINGAM, A.; PRASAD, V. P. R.; PARAMESHWARAN, S.; GEORGE, N.; KALIYAN, P. Characterization of olanzapine-solid dispersions. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, p.13-24, 2011.

KUMAR, S.; DAS, C. K. Stearate modification of layered double hydroxide (LDH) for polyurethane elastomeric nanocomposites. **Elastometry**, v. 14, p. 15-22, 2010.

KUMAR, S.; BHARGAVA, D.; THAKKAR, A.; ARORA, S. Drug Carrier Systems for Solubility Enhancement of BCS Class II Drugs: A Critical Review. **Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 3, p. 217-256, 2013.

KUNZ, M.; GAMA, C. S.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M.; CERESÉR, K. M.; GOMES, F. A.; BELMONTE-DE-ABREU, P. S.; BERK, M.; KAPCZINSKI, F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1677–1681, 2008.

LAGALY, G.; MECKING, O.; PENNER, D. Colloidal magnesium aluminum hydroxide and heterocoagulation with a clay mineral: I. Properties of colloidal magnesium aluminum hydroxide. **Colloid Polym. Sci.**, v. 279, p. 1090-1096, 2001a.

LAGALY, G.; MECKING, O.; PENNER, D. Colloidal magnesium aluminum hydroxide and heterocoagulation with a clay mineral: II. Heterocoagulation with sodium montmorillonite. **Colloid Polym. Sci.**, v. 279, p. 1097-1103, 2001b.

LAGUNA, H.; LOERA, S.; BARRA, I. A. I.; LIMA, E.; VERA, M. A.; LARA, V. Azoic dyes hosted on hydrotalcite-like compounds: non-toxic hybrid pigments. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 98, p. 234–241, 2007.

LANGLEY, B.; RATAN, R. R. Oxidative stress-induced death in the nervous system: cell cycle dependent or independent? **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, p. 621 –629, 2004.

LANONE, S.; ROGERIEUX, F.; GEYS, J.; DUPONT, A.; MAILLOT-MARECHAL, E.; BOCZOWSKI, J.; LACROIX, G.; PETER, H. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 14, p. 1-6, 2009.

LATTERINI, L.; NOCCHETTI, M.; COSTANTINO, U.; ALOISI, G. G.; ELISEI, F. Organized chromophores in layered inorganic matrices. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, p. 728-740, 2007.

LEGGAT, R. B.; TAYLOR, S. A.; TAYLOR, S. R. Adhesion of epoxy to hydrotalcite conversion coatings: I. Correlation with wettability and electrokinetic measurements. **Colloids Surf. A Physicochem**, v. 210, p. 69-81, 2002.

LEITE, A. S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. S.; JÚNIOR, A. L. G.; LIMA, S. G.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; LOPES, J. A. D. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the allium cepa and *Artemia salina* bioassays. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-16, 2015.

LEROUX, F. Organo-modified anionic clays into polymer compared to smectite-type nanofiller: potential applications of the nanocomposites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 303-315, 2006.

LEROUX, F.; PREVOT, V. Nano-/Microporous materials: nanostructured layered double hydroxides. In: SCOTT, R.A.; LUKEHART, C.M. **Nanomaterials: Inorganic and Bioinorganic Perspectives**. John Wiley & Sons, Inc. p. ISBN 978-0470-51644-51647, 2008.

LEROUX, F., FORANO, C., PREVOT, V., TAVIOT-GUEHO, C. **LDH assemblies and related nanocomposites**. In: NALWA, H.S. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, American Scientific Publishers, Valencia, California, USA. p. 413-453, 2011.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47-60, 2000.

LEVY, G. Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. **American Journal of Pharmacy and Sciences**, v. 135, p. 78-92, 1963.

LI, B.; HE, J.; EVANS, D.G.; DUAN, X. 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, A.; QIN, L.; WANG, W.; ZHU, R.; YU, Y.; LIU, H.; WANG, S. The use of layered double hydroxides as DNA vaccine delivery vector for enhancement of anti-melanoma immune response. **Biomaterials**, v. 32, p. 469-477, 2011.

LIANG, X.; ZANG, Y.; XU, Y.; TAN, X.; HOU, W.; WANG, L.; SUN, Y. Sorption of metal cations on layered double hydroxides. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 433, p. 122-131, 2013.

LIMOUSIN, G.; GAUDET, J.P.; CHARLET, L. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. **Appl. Geochem.**, v. 22, p. 249-275, 2007.

LINARES, C.F., SOLANO, S., INFANTE, G. The influence of hydrotalcite and cancrinite type zeolite in acidic aspirin solutions. **Microporous Mesoporous Materials**, v. 74, p. 105-110, 2004.

LINDSLEY, C. W. The top prescription drugs of 2009 in the US: CNS therapeutics rank among highest grossing. **ASC Chemical Neuroscience**, v. 1, p 407-408, 2010.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 235-249, 2000.

LOH, Z. H.; SAMANTA, A. K.; HENG, P. W. S. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 255-274, 2015.

LOMBARDO, G. M.; PAPPALARDO, G. C.; COSTANTINO, F.; COSTANTINO, U.; SISANI, M. Thermal effects on mixed metal (Zn/Al) layered double hydroxides (LDHs): direct modelling of the x-ray powder diffraction (XRPD) line-shape through molecular dynamics (md) simulation. **Chem. Mater.**, v. 20, p. 5585–5592, 2008.

LOPEZ-SALINAS, E., TORRES-GARCÍA, E., GARCÍA-SÁNCHEZ, M. Thermal behavior of hydrotalcite-like $(\text{Mg}_{1-x}\text{Ga}_x(\text{OH})_2)(\text{CO}_3)_{x/2} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ as a function of gallium content. **J. Phys. Chem. Solids**, v. 58, p. 919–925, 1997.

LI, X.F.; ZHENG, Y.L.; XIU, M.H.; KOSTEN, C.; ZHANG, X.Y. Reduced plasma total antioxidant status in first-episode drug-naïve patients with schizophrenia. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1064–1067, 2011.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; SOUSA, E. B. V.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; SOUSA, D. P.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M. Spectroscopic studies on the in vitro antioxidant capacity of insolently ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 47-53, 2015.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 35, p. 676 -692, 2011.

MAHADIK, S. P.; EVANS, D.; LAL, H. Oxidative stress and role of antioxidant and N-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 463–493, 2001.

MAHENDRAN R, LIEW E, SUBRAMANIAM M. De novo emergence of obsessive-compulsive symptoms with atypical antipsychotics in Asian patients with schizophrenia or schizoaffective disorder: a retrospective, cross-sectional study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 68, p. 542–545, 2007.

MANSOURI, S.; KRALJ, T. P.; MORTON, D.; CHEN, X. D.; WOO, M. W. Squeezing out ultrafine hydrophobic and poor water-soluble drug particles with water vapor. **Advanced Powder Technology**, v. 25, p. 1190-1194, 2014.

MANZI-NSHUTI, C.; HOSSENLOPP, J.M.; WILKIE, C.A. Fire retardancy of melamine and zinc aluminum layered double hydroxide in poly (methyl methacrylate). **Polymer Degradation Stability**, v. 93, p. 1855-1863, 2008.

MARTINS, M. R.; PETRONILHO, F.C.; GOMES, K. M.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J. Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. **Neurotoxicology Research**, v. 13, p. 63-69, 2008.

MATUSINOVIC, Z.; ROGOSIC, M.; SIPUSIC, J. Synthesis and characterization of poly (styrene-comethyl methacrylate)/layered double hydroxide nanocomposites via in situ polymerization. **Polymer Degradation Stability**, v. 94, p. 95-101, 2009.

MAYOR-OXILIA, R. R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. R. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 5, n. 2, p. 23-29, 2015.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G. G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 427-440, 2011.

MESSIAS E.L.; CHEN, C.Y.; EATON, W.W. Epidemiology of schizophrenia: Review of findings and myths. **Psychiatr Clin North Am**, v. 30, p. 323–338, 2007.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982

MEYN, M.; BENEKE, K.; LAGALY, G. Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. **Inorg. Chem.**, v. 29, p. 5201–5207, 1990.

MICÓ, J. A.; ROJAS-CORRALES, M. O.; GIBERT-RAHOLA, J.; PARELLADA, M.; MORENO, D.; FRAGUAS, D.; GRAELL, M.; GIL, J.; IRAZUSTA, J.; CASTRO-

FORNIELES, J.; SOUTULLO, C.; ARANGO, C.; OTERO, S.; NAVARRO, A.; BAEZA, I.; MARTÍNEZ-CENGOTITABENGOA, M.; GONZÁLEZ-PINTO, A. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case-control study. **BMC Psychiatry**, v. 14, p. 11–26, 2011.

MILLANGE, F.; WALTON, R. I.; O'HARE, D. Time-resolved in situ X-ray diffraction study of the liquid-phase reconstruction of Mg-Al-carbonate hydrotalcite-like compounds. **J. Mater. Chem.**, v. 10, p. 1713–1720, 2000.

MINAGAWA, K.; BERBER, M. R.; HAFEZ, I. H.; MORI, T.; TANAKA, M. Target delivery and controlled release of the chemopreventive drug sulindac by using an advanced layered double hydroxide nanomatrix formulation system. **J. Mater. Sci. Mat. Med.**, v. 23, p. 973–981, 2012.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chem.** v. 130 n. 4, p. 1036–1043, 2012.

MIYATA, S. Physico-chemical properties of synthetic hydrotalcites in relation to composition. **Clay Minerals**, v. 28, p 50–56, 1980.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using 18 O-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 6172–6179, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109–42, 1991.

MONICZEWSKI, A.; GAWLIK, M.; SMAGA, I.; NIEDZIELSKA, E.; KRZEK, J.; PRZEGALINSKI, E.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 560–568, 2015.

MONZON, A., ROMEO, E., MARCHI, A.J. **Hydrogenation catalysis by mixed oxides prepared from LDHs**. In: Rives, V. (Ed.), Layered Double Hydroxides: Present and Future. Nova Science Publishers, New York. Cap 11, p. 323–382, 2001.

MOUSTY, C. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, p. 315–325, 2010.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs - a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 151-170, 2004.

QUEDNOW, B. B.; GEYER, M. A.; HALBERSTADT, A. L. **Serotonin and Schizophrenia**. In: MÜLLER, C. P.; JACOBS, B. L. Handbook of behavioral neurobiology of serotonin. Elsevier, San Diego, CA, USA. 2010, Cap 4.6.

NIMURA, S.; YAMAGUCHI, T.; UEDA, K.; KADOKURA, K.; AIUCHI, T.; KATO, R.; OBAMA, T.; ITABE, H. Olanzapine promotes the accumulation of lipid droplets and the expression of multiple perilipins in human adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 1-7, 2015.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W.R. The rate of solution of solid substances in their own solutions, **Journal of American Chemical Society**, v. 19, p. 930-934, 1897.

NYAMBO, C.; CHEN, D.; SU, S.; WILKIE, C. A. Does organic modification of layered double hydroxides improve the fire performance of PMMA? **Polymer Degradation Stability**, v. 94, p. 1298-1306, 2009.

OH, J. M.; BISWICK, T. T.; CHOY, J.H. Layered nanomaterials for green materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 2553-2563, 2009.

OH, J. M.; PARK, C.; CHOY, J. Intracellular drug delivery of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 1632-1635, 2011.

OHARA, A.; SAYURI, M. **Oxygen radicals and related species in principles of free radical biomedicine**. In: Pantopoulos, K.; Schipper, H. M. Principles of Free Radical Biomedicine, v. I, New York, Nova Biomedical Books. 2012.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; ALENCAR, M. V. O. B.; JUNIOR, A. L. G.; SOUZA, A. A.; CAVALCANTE, A. C. M.; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

OMWOMA, S.; CHEN, W.; TSUNASHIMA, R.; SONG, Y. F. Recent advances on polyoxometalates intercalated layered double hydroxides: From synthetic approaches to functional material applications. **Coordination Chemistry Reviews**, 2013.

ONOE, S.; KOJO, Y.; AOKI, Y.; KAWABATA, Y.; YAMAUCHI, Y.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of amorphous solid dispersion of tranilast with enhanced solubility in gastric fluid and improved oral bioavailability. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 4, p. 379-387, 2012.

OZCAN, M.E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **Int Clin Psychopharmacology**, v. 19, p. 89-95, 2004.

PAISANA, M. C.; MÜLLERS, K. C.; WAHL, M. A.; PINTO, J. F. Production and stabilization of olanzapine nanoparticles by rapid expansion of supercritical solutions (RESS). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 109, p. 124-133, 2016.

PANDA, H. S.; SRIVASTAVA, R.; BAHADUR, D. In-vitro release kinetics and stability of anticardiovascular drugs—intercalated layered double hydroxide nanohybrids. **Journal of Physico Chemistry. B**, v. 113, p. 15090–15100, 2009.

PARELLO, M. L.; ROJAS, R.; GIACOMELLI, C. E. Dissolution kinetics and mechanism of Mg–Al layered double hydroxides: a simple approach to describe drug release in acid media. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 351, p. 134-139, 2010.

PERES-FILHO M. J.; GAETI, M. P. N.; OLIVEIRA, S. R.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M. Thermoanalytical investigation of olanzapine compatibility with excipients used in solid oral dosage forms. **Journal Thermal Analysis Calorimetry**, v. 104, p. 255-260, 2011.

PÉREZ, M. R.; PAVLOVIC, I.; BARRIGA, C.; CORNEJO, J.; HERMOSÍN, M. C.; ULIBARRI, M. A. Uptake of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ on Zn-Al layered double hydroxide intercalated with EDTA. **Appl. Clay Sci.**, v. 32, p. 245-251, 2006.

PÉREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. **Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico**. In: MORÁLES-GONZÁLEZ, J. A. Oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants. Janeza Trdine, Rijeka, Croácia. 2013, Cap 3, p. 59-85.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; NOCCHETTI, M.; SISANI, M.; PAGANO, C. Preformulation studies on host–guest composites for oral administration of BCS class IV drugs: HTlc and furosemide. **Appl. Clay Sci.**, v. 53, p. 696-703, 2011

PHILLIPS, M.L.; KUPFER, D.J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. **Lancet**, v. 381, p. 1663–1671, 2013.

POLLA G.I.; VEGA, D. R.; LANZA, H.; TOMBARI, D. G.; BAGGIO, R.; AYALA, A. P.; FILHO, J. M.; FERNÁNDEZ, D.; LEVYA, G.; DARTAYET, G. Thermal behavior and stability in olanzapine. **International Journal Pharmaceutics**, v. 301, p. 33-40, 2005.

POSATI, T.; BELLEZZA, F.; TARPANI, L.; PERNI, S.; LATTERINI, L.; MARSILI, V.; CIPICIANI, A. Selective internalization of ZnAl-HTlc nanoparticles in normal and tumor cells. A study of their potential use in cellular delivery. **Applied Clay Science**, v. 55, p. 62-69, 2012.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. L699–722, 1995.

QIN, L.; XUE, M.; WANG, W.; ZHU, R.; SHILONG, W.; SUN, J.; ZHANG, R.; SUN, X.; The in vitro and in vivo anti-tumor effect of layered double hydroxides nanoparticles as delivery for podophyllotoxin. **Int. J. Pharm.**, v. 388, p. 223-230, 2010.

QIU, L.; QU, B. Polymer-layered double hydroxide nanocomposites. **RSC Nanosci. Nanotechnology**, v. 16, p. 32-63, 2011.

QURESHI, G. A. **Neurotransmission, oxidative stress, and coexistence of neurotransmitters in parkinson's disease**. In: QURESHI, G. A.; PARVEZ, H. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. Cap 18, p. 399-431, 2007

RAFFA, M.; BARHOUMI, S.; ATIG, F.; FENDRI, C.; KERKENI, A.; MECHRI, A. Reduced. Antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, p. 371–375, 2012.

RAKI, L.; BEAUDOIN J. J; MITCHELL, L. Layered double hydroxide-like materials: nanocomposites for use in concrete. **Coment and Concrete Research**. v. 34, p. 1717-1724, 2004.

REGULSKA, E.; KARPINSKA. J. Photocatalytic degradation of olanzapine in aqueous and river waters suspension of titanium dioxide. **Applied Catalysis B: Enviromental**, v. 117-118, p. 96-104, 2012.

REN, L., WAN, L., DUAN, X. Bio-active molecule immobilisation on layered double hydroxides. **International Journal Nanotechnology**, v. 3, p. 545-556, 2006.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. **Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination**. In: Catala A., Lipid peroxidation. InTech, 2012.

REUTZEL-EDENS, S.; BUSH, J. K.; MAGEE, P. A.; STEPHENSON, G. A.; BYRN, S. R. Anhydrates and Hydrates of Olanzapine: Crystallization, Solid-State Characterization, and Structural Relationships. **Crystal Growth & Design**, v. 3, n. 6, p. 897-907, 2003.

REZVANI, Z., SARKARAT, M. Synthesis and characterization of magnetic composites: intercalation of naproxen into Mg-Al layered double hydroxides coated on Fe₃O₄. Z. **Anorg. Allg. Chem.**, v. 5, p. 874–880, 2012.

RIVES, V.; DEL ARCO, M.; MARTÍN, C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. **Applied Clay Science**, v. 88-89, p. 239-269, 2014.

ROCHA, M.A. **Materiais híbridos nanoestruturados à base de hidróxidos duplos lamelares e o fármaco sulindaco**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ROMERO, A. C.; HERNÁNDEZ, A. G. O.; CERÓN, T. F.; CHÁVEZ, A. A. **The Exogenous Antioxidants**. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants. Janeza Trdine, Rijeka, Croácia, 2013.

ROSSI, C.; SCHOUBEN, A.; RICCI, M.; PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; LATTERINI, L.; ALOISI, G. G.; Intercalation of the radical scavenger ferulic acid in hydrotalcite-like anionic clays. **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 47–55, 2005.

RUIZ-HITZKY, E.,; ARANDA, P.; DARDER, M.; RYTWO, G. Hybrid materials based on clays for environmental and biomedical application. **J. Mater. Chem.**, v. 20, p. 9306-9321, 2010.

RYU, S. J.; JUNG, H.; OH, J. M.; LEE, J.K.; CHOY, J. H.. Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system. **J. Phys. Chem. Solids**, v. 71, p. 685–688, 2010.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 273, p. 442–55, 2013.

SAIAH, F.B.D.; SU, B.; BETTAHAR, N. Nickel-iron layered double hydroxide (LDH): Textural properties upon hydrothermal treatments and application on dye sorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 206-217, 2009.

SARODE, A. L.; MALEKAR, S. A.; COTE, C.; WORTHEN, D. R. Hydroxypropyl cellulose stabilizes amorphous solid dispersions of the poorly water soluble drug felodipine. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 512-519, 2014.

SAVAS, H.A.; GERGERLIOGLU, H.S.; ARMUTCU, F.; HERKEN, H.; YILMAZ, H.R.; KOCOGLU, E.; SELEK, S.; TUTKUN, H.; ZOROGLU, S.S.; AKYOL, O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 7, p. 51–55, 2006.

SCHECKEL, K.G.; SCHEINOST, A.C.; FORD, R.G.; SPARKS, D.L. Stability of layered Ni hydroxide surface precipitates: a dissolution kinetics study. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 64, p. 2727-2735, 2000.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, p. 1763-1755, 2006.

SEFTEL, E. M.; COOL, P.; LUTIC, D. Mg– Al and Zn– Fe layered double hydroxides used for organic species storage and controlled release. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 5071-5078, 2013.

SEGURA-VALDEZ, M. L.; AGREDANO-MERENO, L. T.; NEPOMUCENO-MEJÍA, T.; FRAGOSO-SORIANO, R.; ÁLVAREZ, FERNÁNDEZ, G.; ZAMOURA-CURA, A.; LARA-MARTÍNEZ, R.; JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F. **Cell Nanobiology**. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants. Janeza, Trdine, v. 9. Rijeka, Croácia, 2013

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulpha thiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. **Chem. Pharm. Bull**, v. 9, p. 866-872, 1961.

SERAFINI, M. R., MENEZES, P. P., COSTA, L. P., LIMA, C. M., QUINTANS, L. J., JUNIOR, CARDOSO, J. C. Interaction of p-cymene with beta-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 109, p. 951-955, 2012

SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 603-616, 2007.

SHAFIEI, S. S.; SOLATI-HASHJIN, M.; RAHIM-ZADEH, H.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Synthesis and characterisation of nanocrystalline Ca–Al layered double hydroxide {[Ca₂Al(OH)₆]NO₃.nH₂O}: in vitro study. **Advances in Applied Ceramics**, v. 0, n. 0, p 1-8, 2012.

SHARMA, P.; DENNY, W. A.; GARG, S. Effect of wet milling process on the solid state of indomethacin and simvastatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 40-48, 2009.

SHARPE, M. A.; ROBB, S. J.; CLARK, J. B. Nitric oxide and Fenton/Haber–Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. **J. Neurochem.**, v. 87, n. 2, p. 386–394, 2003.

SIMONELLI, A.P.; MEHTA, S. C.; HIGUCHI, W. I. Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone (PVP)-sulfathiazole coprecipitates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 538–549, 1969.

SIMOVIC, S.; HUI, H.; SONG, Y.; DAVEY, A. K.; RADES, T.; PRESTIDGE, C. A. An oral delivery system for indomethacin engineered from cationic lipid emulsions and silica nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 143, p. 367-373, 2010.

SINGH, O.P.; CHAKRABORTY, I.; DASGUPTA, A.; DATA, S. A comparative study of oxidative stress and interrelationship of important antioxidants in haloperidol and olanzapine treated patients suffering from schizophrenia. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 50, p. 171–176, 2008.

SINGHAL, A.; MORRIS, V. B.; LABHASETWAR, V.; GHORPADE, A. Nanoparticle-mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress. **Cell Death Dis.**, v. 4, p. 903, 2013.

SIROTA, P.; GAVRIELI, R.; WOLACH, B. Overproduction of neutrophil radical oxygen species correlates with negative symptoms in schizophrenic patients: Parallel studies on neutrophil chemotaxis, superoxide production and bactericidal activity. **Psychiatry Re**, v. 121, p. 123–132, 2003.

SLOWING, I. I.; TREWYN, B. G.; GIRI, S.; LIN, V. S. Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. **Advanced Functional Materials**, v. 17, p. 1225-1236, 2007.

SMAGA, I.; NIEDZIELSKA, E.; GAWLIK, M.; MONICZEWSKI, A.; KRZEK, J.; EDMUNDO, P.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 569-580, 2015.

SPARKS, D. L.; **Sorption Phenomena on Soils**. In: SPARKS, D. L. Environmental Soil Chemistry, Academic Press, Burlington, 2003, p. 133-186.

STEFANESCU, C.; CIOBICA, A. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. **J. Affect. Disord.**, v. 143, p. 34-38, 2012.

STRANGE, R. C.; JONES, P. W.; FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 357-363, 2000.

STREUBEL, A.; SEIPMANN, J. BODMEIER. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 501-508, 2006.

SUN, W.; HE, Q.; LU, L.; LIU, H. Synthesis and properties of layered double hydroxides intercalated with cinnamic acid series organic UV ray absorbents. **Mater. Chem. Phys.**, v. 107, p. 261-265, 2008.

TAGAMI, K.; KASIWASE, Y.; YOKOYAMA, A.; NISHIMURA, H.; MIYANO, K.; SUZIKI, M.; SHIRAISHI, S.; MATOBA, M.; OHE, Y.; UEZONO, Y. The atypical antipsychotic, olanzapine, potentiates ghrelin-induced receptor signaling: an in vitro study with cells expressing cloned human growth hormone secretagogue receptor. **Neuropeptides**, 2015.

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-Guest Interactions between Swelling Clay Minerals and Poorly Water-Soluble Drugs: Solubilization of Griseofulvin by Complex Formation with a Swelling Clay Mineral. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 146, n. 2, p. 557-564, 1991.

TAMMARO, L.; COSTANTINO, U.; BOLOGNESE, A.; SAMMARTINO, G.; MARENZI, G.; CALIGNANO, A.; TETE, S.; MASTRANGELO, F.; CALIFANO, L.; VITTORIA, V. Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications. **Int. J. Antimicrob. Agents** v. 29, p. 417-423, 2007.

TAMMARO, L.; VITTORIA, V.; CALARCO, A.; PETILLO, O.; RICCITIELLO, F.; PELUSO, P. Effect of layered double hydroxide intercalated with fluoride ions on the physical,

biological and release properties of a dental composite resin. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 60-67, 2014.

TAMMINGA, C.A.; HOLCOMB, H.H. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. **Mol. Psychiatry**, v. 10, p. 27–39, 2005.

TAN L.; LIU J.; LIU X. Clinical research of olanzapine for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. **J Exp Clin Cancer Res.**, v. 28, p. 1-7, 2009.

TANAKA, N.; IMAI, K.; OKIMOTO, K.; UEDA, S.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): In vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 1, p. 51–56, 2006.

THAKURIA, R.; NANGIA, A. Polymorphic form IV of olanzapine. **Crystal Structure Communications**, v. 67, p 461-463, 2011.

THYVEETIL, M. A.; COVENEY, P. V.; GREENWELL, H. C.; SUTER, J. L. Role of host layer flexibility in DNA guest intercalation revealed by computer simulation of layered nanomaterials. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 12485-12495, 2008.

TICHIT, D.; GÉRARDIN, C.; DURAND, R.; COQ, B. Layered double hydroxides: precursors for multifunctional catalysts. **Top. Catal.**, v. 39, p. 89-96, 2006.

TODOROVIĆ, N.; TOMANOVIĆ, N.; GASS, P.; FILIPOVIĆ, D. Olanzapine modulation of hepatic oxidative stress and inflammation in socially isolated rats. **Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 94-102, 2016.

TOHEN, M.; McINTYRE, R. S.; KANBA, S.; FUJIKOSHI, S.; KATAGIRI, H. Efficacy of olanzapine in the treatment of bipolar mania with mixed features defined by DSM-5. **Journal of Affective Disorders**, v. 168, p. 136-141, 2014.

TUNÇEL, Ö. K.; SARISOY, G.; BILGICI, B.; PAZVANTOĞLU, O.; ÇETİN, E.; ÜNVERDİ, E.; AVCI, B.; BÖKE, Ö. Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. **Psychiatry Research**, v. 228, n. 3, p. 688-694, 2015

TÜRKEZ, H.; TOGAR, B. The genotoxic and oxidative damage potential of olanzapine in vitro. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, n. 9, p. 583-588, 2010.

ULIBARRI, M. A.; HERMOSÍN, M. C. **Layered double hydroxides in water decontamination**. In: Rives, V. *Layered Double Hydroxides: Present and Future*. NOVA Sci. Pub., Inc., New York. 2001, p. 251–284.

URBANETZ, N.A. Stabilization of solid dispersions of nimodipine and polyethylene glycol 2000. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 67-76, 2006.

VALENTE, J. S., FIGUERAS, F., GRAVELLE, M., KUMBHAR, P., LOPEZ, J., BESSE, J. P. Basic properties of the mixed oxides obtained by thermal decomposition of hydrotalcites containing different metallic compositions. **Journal of Catal.**, v. 189, p. 370-381, 2000.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; ARCOS, D. Mesoporous materials for drug delivery. **Angewandte Chemie**, v. 45, p. 7548-7558, 2007.

VAN DROOGE, D.J.; Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1-2, p. 220–229, 2006.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Delivery Today**, v. 12, n. 23/24, p. 1068-1075, 2007.

VELU, S.; SUSUKI, K.; OSAKI, T. A comparative study of reactions of methanol over catalysts derived from NiAl- and CoAl-layered double hydroxides and their Sn-containing analogues. **Catalysis Letters**, v. 69, p. 43-50, 2000.

VIEIRA, A. C. **Síntese, Caracterização e Aplicação de Hidróxidos Duplos Lamelares**. 2009, 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

VILHELMSSEN, T.; ELIASSEN, H.; SCHAEFER, T. Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. **International Journal of Pharmacy**, v. 303, p. 132–142, 2005.

VIPPAGUNTA, S. R.; WANG, Z.; HORNUNG, S.; KRILL, S. L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 294-304, 2006.

VREYSEN, S., MAES, A. Adsorption mechanism of humic and fulvic acid onto Mg/Al layered double hydroxides. **Applied Clay Sciences**, v. 38, p. 237-249, 2008.

WANG, M., ZHU, M., SUN, B. A new nano-structured flame-retardant poly(ethylene terephthalate). *Journal of Macromolecular Sciency, Part A: Pure Applied Chemistry*, v. 43, p. 1867-1875, 2006.

WANG, J.; ZHOU, J.; LI, Z.; SONG, Y.; LIU, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, M. Magnetic, luminescent Eu-doped Mg–Al layered double hydroxide and its intercalation for ibuprofen. *Chem.: A Eur. J.*, v. 16, p. 14404–14411, 2010a.

WANG, X.R., LU, J., YAN, D., WEI, M., EVANS, D.G., DUAN, X.. A photochromic thin film based on salicylideneaniline derivatives intercalated layered double hydroxide. **Chem. Phys. Lett.**, v. 493, p. 333–339, 2010b.

WAGH, M.P.; PATEL, J.S. Biopharmaceutical classification system: scientific basis for biowaiver extensions. **Int J Pharm Sci**, v. 2, p. 12-19, 2010.

WARREN, D. B.; BENAMEUR, H.; PORTER, C. J. H.; POUTON, C. W.; Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 10, p. 704-731, 2010.

WAWRZYCKA-GORCZYCA, I.; KOZIOL, A. E.; GLICE, M.; CYBULSKI, J. Polymorphic form II of 2-methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno-[2,3-b] [1, 5]benzodiazepine. **Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online**, v. 60, p. 66–68, 2004.

WILLIAMS, G.R.; O'HARE, D. Towards understanding, control and application of layered double hydroxide chemistry. **J. Mater. Chem.**, v. 16, p. 3065-3074, 2006.

WU, Z.; ZHANG, X.Y.; WANG, H.; TANG, W.; XIA, Y.; ZHANG, F.; LIU, J.; FU, Y.; HU, J.; CHEN, Y.; LIU, L.; CHEN, C.; XIU, M.H.; KOSTEN, T.R.; HE, J. Elevated plasma superoxide dismutase in first-episode and drug naive patients with schizophrenia: inverse association with positive symptoms. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, p. 34–38, 2012.

XIA, S. J.; NI, Z. M.; XU, Q.; HU, B. X.; HU, J. Layered double hydroxides as supports for intercalation and sustained release of antihypertensive drugs. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 181, p. 2610-2619, 2008.

XU, Z. P.; WALKER, T.L.; LIU, K. L.; COOPER, H. M.; LU, G. Q. M.; BARTLETT, P. F. Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, p. 163-174, 2007.

XU, Z. P.; ZHANG, J.; ADEBAJO, M. O.; ZHANG, H.; ZHOU, C. Catalytic applications of layered double hydroxides and derivatives. **Applied Clay Science**, v. 53, p. 139-150, 2011.

XUAN, J.; PAN, G.; QIU, Y.; YANG, L.; SU, M.; LIU, Y. Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. **J Proteome Res**, v. 10, p. 5433–5443, 2011.

XUE, Y. H.; ZHANG, R.; SUN, X. Y.; WANG, S. L. The construction and characterization of layered double hydroxides as delivery vehicles for podophyllotoxins. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 8, p. 1197–1202, 2007.

YAN, D., LU, J., WEI, M., HAN, J., MA, J.L., LI, F., EVANS, D.G., DUAN, X. Ordered poly(p-phenylene)/layered double hydroxide ultrathin films with blue luminescence by layer-by-layer assembly. **Angew. Chem.**, v. 48, p. 3073–3076, 2009

YAO, J.K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. **Dis Markers**, v. 22, p. 83–93, 2006.

YAO, H. B.; FANG, H. Y.; TAN, Z. H.; WU, L. H.; YU, S. H. Biologically inspired, strong, transparent, and functional layered organic-inorganic hybrid films. **Angew. Chem.**, v. 49, p. 2140-2145, 2010.

YE, L.; QU, B. Flammability characteristics and flame retardant mechanism of phosphateintercalated hydrotalcite in halogen-free flame retardant EVA blends. **Polymer Degradation Stability**, v. 93, p. 918-924, 2008.

YU, L. X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 921-925, 2002.

ZENG, J.; REN, Y.; ZHOU, C.; YU, S.; CHEN, W. Preparation and physicochemical characteristics of the complex of edaravone with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1101–1105, 2011.

ZHANG, Q.; DENG, C.; HUANG, X.F. The role of ghrelin signalling in second-generation antipsychotic-induced weight gain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p. 2423-2438, 2013.

ZHANG, Q.; HE, M.; DENG, C.; WANG, H.; LIAN, J.; HUANG, X.F. Hypothalamic ghrelin signaling mediates olanzapine-induced hyperphagia and weight gain in female rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, p. 807-818, 2014.

ZHANG, Y. T.; FAN, L. H.; ZHI, T. T.; ZHANG, L.; HUANG, H.; CHEN, H. L. Synthesis and characterization of poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrotalcite nanocomposite hydrogels for carbonic anhydrase immobilization. **J. Polym. Sci. A Polym. Chem.**, v. 47, p. 3232-3240, 2009.

ZHANG, Y., ZHANG, Y., ZHANG, H., LIU, J. Preparation and flame resistance of hydrotalcite/epoxy nanocomposites containing red phosphorous. **Adv. Mater. Res.** v. 194-196, p. 1460-1463, 2011.

ZHANG, Y.; ZHI, Z. LI, X.; GAO, J.; SONG, Y. Carboxylated mesoporous carbon microparticles as new approach to improve the oral bioavailability of poorly water-soluble carvedilol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 403-411, 2013.

ZHANG, Y.; CHE, E.; ZHANG, M.; SUN, B.; GAO, J.; HAN, J.; SONG, Y. Increasing the dissolution rate and oral bioavailability of the poorly water-soluble drug valsartan using novel hierarchical porous carbon monoliths. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 375-383, 2014.

ZHANG, X. Y.; TAN, Y. L.; CAO, L. Y.; WU, G. Y.; XU, Q.; SHEN, Y.; ZHOU, D. F. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. **Schizophrenia Resasrch**, v. 81, p. 291-300, 2006.

ZHANG, X. Y.; ZHOU, D. F.; SHEN, Y. C.; ZHANG, P. Y.; ZHANG, W. F.; LIANG, J.; CHEN, D. C.; XIU, M. H.; KOSTEN, T. A.; KOSTEN, T. R. Effects of risperidona and haloperidol on superoxide dismutase and nitric oxide in schizophrenia. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 1928-1934, 2012.

ZHANG, X.Y.; YAO, J. K. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 197-199, 2013.

ZHANG, X. Y.; CHEN, D. C.; TAN, Y. L.; TAN, S. P.; WANG, Z. R.; YANG, F. D.; OKUSAGA, O. O.; ZUNTA-SOARES, G. B.; SOARES, J. C. The interplay between BDNF

and oxidative stress in chronic schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 201-208, 2015.

ZHAO, Y.; XIAO, F.; JIAO, Q. Hydrothermal Synthesis of Ni/Al Layered Double Hydroxide Nanorods. **Journal of Nanotechnology**, v. 2011, p. 6, 2011.

ZHU, J.; YUAN, P. HE, H.; FROST, R.; TAO, Q.; SHEN, W.; BOSTROM, T. In situ synthesis of surfactant/silane-modified hydrotalcites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p. 498-504, 2008.

ZLATKOVIĆ, J.; TODOROVIĆ, N.; BOŠKOVIĆ, M.; PAJOVIĆ, S. B.; DEMAJO, M.; FILIPOVIĆ, D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 393, p. 43-57, 2014.

ZHU, H., HUANG, S., YANG, Z., LIU, T. Oriented printable layered double hydroxide thin films via facile filtration. **Journal of Material Chemistry**, v. 21, p. 2950-2956, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GEN-1 14/07/2015 019150000153 16:15 REPE  BR 10 2015 016882 9	< Uso exclusivo do INPI >	
Espaço reservado para o protocolo	Espaço reservado para a etiqueta	Espaço reservado para o código QR

		INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes
---	---	--

	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
 - 1.2 Qualificação: IFES-INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR - AUTARQUIA FEDERAL
 - 1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08
 - 1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235-CIDADE UNIVERSITÁRIA-RECIFE-PE
 - 1.5 CEP: 50670-901
 - 1.6 Telefone: 81-2126-8958
 - 1.7 Fax: 81-2126-8959
 - 1.8 E-mail: patentes_dine.propesq@ufpe.br

☒ continua em folha anexa

2. **Natureza:**
☒ Invenção
 ☐ Modelo de Utilidade
 ☐ Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
 OBTENÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS DE OLANZAPINA COM HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES DESTINADO A FORMULAÇÃO DE MEDICAMENTOS

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx **Data de Depósito:** xxxxxxxxxxxx

5. **Prioridade:**
☐ Interna (66)
 ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
<XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

☐ continua em folha anexa