



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AMANDA DAMASCENO LEÃO

**NANOPARTÍCULAS GASTRORRESISTENTES DE HIDRÓXIDOS DUPLOS
LAMELARES E GLIBENCLAMIDA: da síntese monitorada por NIR à nanotoxicidade
em modelo animal diabético**

Recife

2020

AMANDA DAMASCENO LEÃO

**NANOPARTÍCULAS GASTRORRESISTENTES DE HIDRÓXIDOS DUPLOS
LAMELARES E GLIBENCLAMIDA: da síntese monitorada por NIR à nanotoxicidade
em modelo animal diabético**

Tese submetida ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e

Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Co-orientadoras: Carmen Alvarez-Lorenzo e Kátia A. S. Aquino

Recife

2020

L437n Leão, Amanda Damasceno

Nanopartículas gastrorresistentes de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida: da síntese monitorada por NIR à nanotoxicidade em modelo animal diabético / Amanda Damasceno Leão. 2020.

197 f.: il.

Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Liberação controlada de fármacos. 2. Teste de biocompatibilidade. 3 Toxicidade de medicamentos. 4. Infravermelho próximo. 5. Argilomineral. I. Soares Sobrinho, José Lamartine (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2020-077)

AMANDA DAMASCENO LEÃO

**NANOPARTÍCULAS GASTRORRESISTENTES DE HIDRÓXIDOS DUPLOS
LAMELARES E GLIBENCLAMIDA: da síntese monitorada por NIR à nanotoxicidade
em modelo animal diabético**

Aprovada em 20/02/2020

Tese submetida ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo (Membro externo)
Universidade Federal de Sergipe-UFS

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior (Membro externo)
Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Júnior (Membro externo)
Universidade Federal do Piauí-UFPI

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (Membro externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF

Dedico este trabalho aos meus pais e tia Zeneide (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela graça da vida, pelas inúmeras bênçãos, oportunidades e pessoas que Ele colocou em minha vida. Em cada etapa senti sua presença guiando meus passos.

Aos meus pais, **Círia e Vital e meu irmão** por todo amor, cuidado e orações a mim destinados, tenho certeza que fui imensamente privilegiada por tê-los comigo.

A todos os meus familiares, pelo apoio e torcida.

A todos os meus amigos, que estando longe ou perto sempre fizeram- se presentes, em especial a **Izak** por toda a amizade desde a graduação. Aos amigos feitos durante o período sanduiche na Espanha **Cristiane, Emanuel, Franciele, Fernanda, Francisco, Gustavo, Marcel, Pricila, Ricardo e Rosângela** por tantos momentos incríveis e inesquecíveis.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho**, por toda confiança e por todas os desafios lançados ao longo deste caminho, cresci, aprendi e sou imensamente grata por tudo.

Às minhas co-orientadoras **Profª. Drª Kátia Aquino** (UFPE) e a **Profª. Drª Carmen Alvarez-Lorenzo** (USC-Espanha), pelas imensas contribuições acadêmicas e pelo exemplo como pessoas e pesquisadoras.

Aos membros da banca, Professores Drs. **Adriano, Armando, Arnóbio e Jacson** pela disponibilidade em corrigir e contribuir com este trabalho.

À toda a equipe do **Núcleo de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos-NCQMC**, nomeadamente à **Profª. Drª Mônica Felts de La Rocca Soares**, aos técnicos **Rosário e Alan** e aos amigos construídos nesta caminhada: **Carla, Eliadna, Emilliany, Igor, Janira, Jabson, Kayque, Katherine, Lucas, Roberta, Thaisa, Thaissa, Yuri** e a todos os outros membros que também sempre terão meu carinho.

À toda a equipe do grupo de *pesquisa I+D Farma en formas de dosificación y sistemas de liberación de medicamentos* da Universidade de Santiago de Compostela na Espanha, por todo o acolhimento e compartilhamento de conhecimentos ao longo do período sanduíche: **Ángela, Blanca, Xian, Clara, Mirtzi, Mariano** e aos professores **Dr. Angel Concheiro e Drª. Carmem Alvarez-Lorenzo**.

Ao professor **Dr. Almir Vanderley** e seus alunos **Juliano** e **Karol**, pela orientação e parceria nos estudos *in vivo* com ratos diabéticos no **Laboratório de Farmacologia e Toxicologia pré-clínica da UFPE**.

À professora **Dr^a. Teresinha Gonçalves**, pela parceria com os ensaios bioquímicos e hematológicos e ao professor **Dr. Jacinto Costa**, pela parceria na parte nas análises histológicas.

A todos os colaboradores diretos e indiretos desta pesquisa **Jabson, Lindomar, Leandro, Felipe, Prof^a Dr^a. Ana Paula Paim** e aos laboratórios parceiros **Laboratório de Combustíveis (LAC-UFPE)** e **Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas (LPN)**

À **CAPES** pela bolsa de doutorado e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduiche-PDSE na Espanha.

À **UFPE**, aos professores e aos demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento repassado, dedicação e pela infraestrutura.

Aos funcionários da Diretoria de Inovação **Carol** e **Sidarta** pela compreensão e suporte nos processos de depósito das patentes.

Muito obrigada!

Independente de qual for a sua escolha, você obterá sucesso em tudo o que fizer desde que realmente queira e esforce - se para isto. (informação verbal)¹

1 Pensamentos da Minha mãe Círia Vieira Damasceno Leão

RESUMO

A glibenclamida (GLIB) é um hipoglicemiante oral amplamente utilizado no tratamento do diabetes mellitus II, no entanto, apresenta baixa solubilidade e alterações na biodisponibilidade. A prospecção de artigos e patentes averiguou o panorama das pesquisas envolvendo seu problema de solubilidade e corroborou com a importância do desenvolvimento de novos sistemas de liberação. Neste contexto, o desenvolvimento de nanopartículas (NP) contendo Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) organomodificados por dodecilsulfato de sódio carreando GLIB apresentou-se como uma possível alternativa para aumentar a taxa de dissolução e promover sua liberação controlada. A síntese foi realizada através de coprecipitação, as NP foram caracterizadas difratometricamente, espectroscopicamente, termicamente, avaliadas quanto ao perfil de co-liberação de GLIB e zinco e quanto a compatibilidade celular. Além disso, a eficácia e nanotoxicidade foram avaliadas através do tratamento de ratos *Wistar* induzidos ao diabetes com streptozotocina. Os parâmetros clínicos foram monitorados ao longo de todo o tratamento e os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos foram avaliados ao fim do tratamento. Além disso, a síntese das NP foi monitorada através da espectroscopia no infravermelho próximo e avaliada quimiometricamente para explicar o mecanismo e a cinética de formação dos HDL. Os dados mostraram adsorubilização de GLIB e revestimento de NP com Eudragit L100®. A organofilização do HDL e a intercalação da GLIB reduziram a área superficial (S_{BET} 23,58 m²/g) e observou-se mudança no potencial zeta (-35,5 ζ) em relação ao HDL primitivo (S_{BET} 41,34 m²/g, 688,8 nm e +14 ζ) indicando que a funcionalização parece uma abordagem apropriada para produzir NP com maior estabilidade coloidal e funcionalidade aprimorada. Os dados de liberação de zinco (2,96% $\pm$ 0,002 ppm) mostraram a eficácia do revestimento em meio ácido e os dados de liberação da GLIB mostraram cinética de liberação de ordem zero com liberação no meio intestinal. Todas as NP foram considerados biocompatíveis e os ensaios de nanotoxicidade e eficácia mostraram a boa resposta clínica para o monitoramento da massa corporal, consumo de ração, consumo de água e capacidade de controle glicêmico das nanopartículas em comparação aos controles ao longo do tratamento. Os ensaios bioquímicos, hematológicos e histológicos realizados ao fim do tratamento também comprovaram ausência de toxicidade das NP e redução significativa da glicemia (111 $\pm$ 25mg/dL) em relação ao grupo diabético não tratado (498 $\pm$ 26mg/dL) e diabético tratado com a GLIB (421,5 $\pm$ 35mg/dL). Para o monitoramento da síntese dos HDL inicialmente partículas instáveis (ζ <+30 mV) eram formadas rapidamente, seguidas por uma segunda etapa

mais lenta devido à cristalização-redissolução. Esses processos foram confirmados usando o método MCR-ALS que demonstrou que a reação de síntese seguiu uma cinética de segunda ordem. Desta forma, foi possível concluir que as NP possibilitaram a liberação controlada da GLIB, melhor taxa de dissolução, biocompatibilidade, eficácia clínica em modelo animal diabético, ausência de sinais de nanotoxicidade e possibilitaram bom controle glicêmico, mostrando-se uma alternativa promissora para o tratamento do diabetes mellitus II. Além disso, o método utilizado foi considerado reprodutível e eficaz para a possível produção industrial do material.

Palavras-chave: Liberação controlada de fármacos. Teste de biocompatibilidade. Toxicidade de medicamentos. Infravermelho próximo. Argilomineral.

ABSTRACT

Glibenclamide (GLIB) is an oral hypoglycemic agent widely used in the treatment of diabetes mellitus II, however, it has low solubility and changes in bioavailability. Prospecting for articles and patents found the panorama of research involving its solubility problem and corroborated the importance of developing new release systems. In this context, the development of nanoparticles (NP) containing double lamellar hydroxides (HDL) organomodified by sodium dodecyl sulfate carrying (GLIB) was presented as a possible alternative to increase the dissolution rate and promote its controlled release. The synthesis was carried out through coprecipitation, the PNs were characterized diffractometrically, spectroscopically, thermally, evaluated for the co-release profile of GLIB and zinc and for cellular compatibility. In addition, efficacy and nanotoxicity were assessed by treating diabetes-induced Wistar rats with streptozotocin. The clinical parameters were monitored throughout the treatment and the biochemical, hematological and histological parameters were evaluated at the end of the treatment. In addition, the synthesis of PN was monitored by spectroscopy in the near infrared and evaluated chemiometrically to explain the mechanism and kinetics of HDL formation. The data showed GLIB adsolubilization and NP coating with Eudragit L100®. HDL organophilization and GLIB intercalation reduced the surface area (S_{BET} 23,58 m²/g) and there was a change in the zeta potential (-35,5 ζ) in relation to the primitive HDL (S_{BET} 41,34 m²/g, 688,8 nm e +14 ζ) indicating that functionalization seems an appropriate approach to produce NP with greater colloidal stability and improved functionality. Zinc release data (2,96% $\pm$ 0,002 ppm) showed the effectiveness of the acid coating and the GLIB release data showed zero order release kinetics with release in the intestinal medium. All PNs were considered biocompatible and the nanotoxicity and efficacy tests showed a good clinical response for monitoring body mass, feed intake, water consumption and glycemic control capacity of the nanoparticles compared to controls during treatment. Biochemical, hematological and histological tests carried out at the end of treatment also demonstrated the absence of toxicity of PN and a significant reduction in blood glucose (111 $\pm$ 25 mg/dL) in relation to the untreated diabetic group (498 $\pm$ 26 mg/dL) and diabetic treated with GLIB (421,5 $\pm$ 35 mg/dL). For monitoring the synthesis of HDL initially unstable particles (ζ <+30 mV) they were formed quickly, followed by a second, slower stage due to crystallization-redissolution. These processes were confirmed using the MCR-ALS method, which demonstrated that the synthesis reaction followed second order kinetics. Thus, it was possible to conclude that the NP enabled the controlled release of GLIB, better dissolution rate, biocompatibility, clinical efficacy in a diabetic animal model, absence

of signs of nanotoxicity and enabled good glycemic control, showing a promising alternative for treatment diabetes mellitus II. In addition, the method used was considered reproducible and effective for the possible industrial production of the material.

Keywords: Controlled drug release. Biocompatibility test. Drug toxicity. Near infrared. Mineral clay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação genérica de um HDL	26
Figura 2-	Representação sequencial da capacidade de estabilização das lamelas	28
Figura 3-	Ânions determinando o espaço interlamelar em HDLs, em (a) apenas ânions e água, em (b) ácido salicílico e água e em (c) ibuprofeno e água	28
Figura 4-	Resumo das principais aplicações e propriedades dos HDL	30
Figura 5-	Representação da estrutura química da glibenclamida	33
Figura 6-	Classificação dos sistemas de administração de medicamentos para glibenclamida de acordo com a natureza química da matriz	37
Figura 7-	Análise de co-word baseada em análise multidimensional e análise de agrupamentos de médias-K.	44
Figura 8-	Distribuição das patentes quanto a classe terapêutica dos fármacos - modelo utilizados.	68
Figura 9-	Estruturas químicas dos fármacos hipoglicemiantes da classe das sulfoniluréias.	68
Figura 10-	Equipamentos utilizados nas sínteses dos HDL acoplados à sonda FLEX-NIR-12S-300HT/081204/1 de Aço Inox SS316L, janela óptica de safira e faixa espectral NIR 400nm – 2200nm acoplada a espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.	81
Figura 11-	Determinação do potencial zeta.	83
Figura 12-	Imagens MEV de Mg ₂ Al-Cl: ampliações 1 –4a e 1b–4b 50.000× e 10.000×, respectivamente.	85
Figura 13-	Imagens MEV de Zn ₂ Al-Cl: ampliações 1 –4a e 1b–4b 50.000× e 10.000×, respectivamente	86
Figura 14-	Espectros de DRX do pó de Zn ₂ Al-Cl e Mg ₂ Al-Cl na faixa de varredura 2θ de 1,5-70°	87
Figura 15-	Dados brutos NIR de um lote de síntese de Mg ₂ Al-Cl.	88
Figura 16-	PCA da síntese de Mg ₂ Al-Cl: (a) gráfico de pontuação PC1 × PC2, (b) gráfico de carga e (c) gráfico de pontuação PC1.	89
Figura 17-	PCA da síntese de Zn ₂ Al-Cl: (a) gráfico de pontuação PC1 × PC2, (b) gráfico de carga e (c) gráfico de pontuação PC1	90
Figura 18-	Perfis de concentração de MCR-ALS para síntese de (a) Mg ₂ Al-Cl e (b) Zn ₂ Al-Cl e suas respectivas curvas cinéticas	92

Figura 19-	Estruturas químicas de tensoativos, a) cloreto de dodecil trimetil amônio e b) dodecil sulfato de sódio. Fonte: autoria própria utilizando o ChewBioDraw Ultra	96
Figura 20-	Representação das sínteses em one-pot	103
Figura 21-	DRX de NP e GLIB. S1 (ZnAl), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido)	107
Figura 22-	Dados térmicos para S1-S6, GLIB, DDS e Eudragit L100® sob atmosfera de N ₂ . S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DDS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido) e S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).	108
Figura 23-	Representação da organização do HDL, S1, S3, S4, S5 e S6. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DDS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).	111
Figura 24-	Caracterização da superfície de NP em (a) isotermas de adsorção-dessorção de N ₂ para NP por B.E.T. e (b) distribuição da área dos poros por B.J.H. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB).	113
Figura 25-	Espectros de infravermelho para S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido), GLIB (glibenclamida) e ED (Eudragit L100®).	114
Figura 26-	Liberação da GLIB de S3 (ZnAl-DSS-GLIB) e S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido) no meio simulado intestinal (pH 7,4).	117
Figura 27-	Viabilidade celular de NP em fibroblastos BALB / 3T3 (CCL-163, ATCC). S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido), GLIB (glibenclamida) e C + corresponde ao controle positivo.	120
Figura 28-	Níveis de glicemia de ratos diabéticos recebendo NP HDL+GLIB (5mg/Kg/v.o.), glibenclamida (5mg/Kg/v.o.), HDL ou veículo. Os dados representam as médias $\pm$ e.p.m. (n=6/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle diabético não tratado.	127
Figura 29-	Glicemia após administração diária de NP HDL+GLIB (5mg/Kg/v.o.), glibenclamida (5mg/Kg/v.o.), HDL ou veículo durante 30 dias de experimento. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo).	128

*Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

- Figura 30- Efeito das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida administradas por via oral na variação da massa corporal (g) em ratos Wistar machos tratados durante 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). *Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$). 130
- Figura 31- Efeito das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida administradas por via oral na variação da massa corporal (g) em ratos Wistar machos tratados durante 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). *Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$). 131
- Figura 32- Cortes histológicos dos pâncreas (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E). NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). As setas indicam alterações nas ilhotas pancreáticas. 135
- Figura 33- Cortes histológicos do fígado (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E). NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$) 136
- Figura 34- Cortes histológicos dos rins (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E). NP: 137

nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo). As setas indicam leve aumento do espaço da cápsula de Bowman.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estruturas polimórficas e pseudopolimórficas da glibenclamida com seus respectivos solventes, formas cristalinas e parâmetros celulares.	34
Tabela 2-	Combinação dos descritores usados nas pesquisas.	35
Tabela 3-	Artigos recuperados na busca na literatura	36
Tabela 4-	Lista completa de artigos selecionados para análise com base nos critérios de inclusão e exclusão, apresentando número de citações, matriz de administração de medicamentos e método utilizado para preparar o sistema de administração de medicamentos.	38
Tabela 5-	Condições do teste de dissolução e aspectos farmacocinéticos dos artigos	40
Tabela 6-	Solubilidade da matriz, interação e estado físico da GLIB nos sistemas	42
Tabela 7-	Lista de instituições às quais os autores dos artigos selecionados foram afiliados, por país.	58
Tabela 8-	Número de artigos selecionados por periódico.	59
Tabela 9-	Frequência das palavras mais usadas no título, resumo e conclusão dos artigos selecionados.	60
Tabela 10-	Descrição da estratégia de buscas e resultados.	65
Tabela 11-	Dados gerais sobre patentes que não mostraram evidências experimentais com GLIB	67
Tabela 12-	Dados gerais das patentes que utilizaram glibenclamida.	70
Tabela 13-	Análise das patentes que utilizaram glibenclamida (comprovação experimental).	71
Tabela 14-	Análise das reivindicações das patentes que utilizam glibenclamida.	74
Tabela 15-	Cálculos para a determinação do parâmetro a (2Xd110)	88
Tabela 16-	Valores de K_{sp} a 25 ° C (Ball, Nordstrom, 1991).	91
Tabela 17-	Surfactantes aniônicos utilizados na modificação de HDL	98
Tabela 18-	Descrição dos eventos termogravimétricos das NP e Eudragit L100®	110
Tabela 19-	Tamanho, PDI e tamanho hidrodinâmico de NP S1 (ZnAl), S2 (ZnAL-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB)	112

Tabela 20-	Determinação de zinco no meio gástrico simulado (pH 1,2) por absorção atômica com chama para S3 (ZnAl-SDS-GLIB) e S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).	116
Tabela 21-	Modelos e equações cinéticos aplicados à liberação de GLIB das NP	118
Tabela 22-	Estabilidade coloidal das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (HDL) organomodificados carreando glibenclamida (S6)	121
Tabela 23-	Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre os parâmetros hematológicos de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo).	132
Tabela 24-	Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo)	133
Tabela 25-	Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre a massa relativa (%) e absoluta (g) de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo). (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASTM	Sociedade Americana de Ensaios e Materiais
AUC	Área sob a curva
B.E.T.	Brunauer-Emmett-Teller
B.J.H.	Barret-Joyner- Halenda
CETENE	Centro de Tecnologia do Nordeste
CMC	Concentração micelar crítica
DBS	Dodecilbenzenosulfonato
DL	Drug loading
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DM II	Diabetes mellitus II
DMEM	<i>Dulbecco modification of Minimum Essential Media</i>
DNT	Diabético não tratado
DP	Desvio padrão
DPC	Diacil fosfatidilcolina
DRX	Difratometria de raio X
DS	Dispersão sólida
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DDS	<i>Drug delivery sistem</i>
DSS	Dodecil sulfato de sódio
Dtg	<i>Derivative thermogravimetry</i>
DT	Tomografia de banco de dados

ED	Eudragit L100®
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GLIB	Glibenclamida
HDL	Hidróxidos duplos lamelares
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL	Líquidos iônicos
LSS	Lauril sulfato de sódio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPC	MMonoacil fosfatidilcolina
MTT	<i>Methyl thiazol tretazolium</i>
NANO	Nanopartícula
NIR	<i>Near-infrared Spectroscopy</i>
NORMO	Normoglicêmico
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido poli-lático
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SE	Evaporação de solvente

SEDDS	Sistemas de distribuição de fármacos autoemulsionantes
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutico
SFB	Soro fetal bovino
SMEDDS	Sistemas de distribuição de fármacos auto-microemulsificantes
SNEDDS	Sistemas de distribuição de fármacos auto-nanoemulsificantes
TGA	<i>Thermal gravimetric analysis</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ângstrom
Cm	Centímetro
mV	Milivolt
Mg	Micrograma
Mg	Miligrama
ml	Mililitros
mA	Miliampere
Z	Potencial zeta
kV	Kilovats
S1	ZnAl
S2	ZnAl-DDS
S3	ZnAl-DDS-GLIB
S4	ZnAl revestido
S5	ZnAl-DDS revestido
S6	ZnAl-DDS-GLIB revestido
Cu	Cobre
Mg ₂ Al. 6H ₂ O	Hidróxido de magnésio hexa-hidratado
AlCl ₃ .6H ₂ O	Hidróxido de alumínio hexa-hidratado
ZnCl ₂	Cloreto de zinco anidro
KOH	Hidróxido de potássio
NaOH	Hidróxido de sódio
HCl	Ácido clorídrico

N ₂	Gás nitrogênio
----------------	----------------

O	Oxigênio
---	----------

Na	Sódio
----	-------

Cl	Cloro
----	-------

S	Enxofre
---	---------

H	Hidrogênio
---	------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	APLICAÇÕES DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES	29
3	OBJETIVOS	31
4	MÉTODOS	32
5	RESULTADOS	33
5.1	ARTIGO 1: ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A DISSOLUÇÃO DA GLIBENCLAMIDA: UMA REVISÃO USANDO TOMOGRAFIA DE BASE DE DADOS	33
5.2	ARTIGO II: VISÃO GERAL E PERSPECTIVAS DA GLIBENCLAMIDA: UMA ANÁLISE DOS SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS DESCRITOS NAS PATENTES	64
5.3	ARTIGO III: MONITORAMENTO <i>in line</i> DA SÍNTESE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES E INSIGHTS DO MECANISMO E CINÉTICA DE FORMAÇÃO	79
5.4	ARTIGO IV: ONE-POT SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATÍVEIS DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES ORGANOMODIFICADOS CARREANDO GLIBENCLAMIDA	96
5.5	ARTIGO V: NANOTOXICIDADE E EFICÁCIA DAS NANOPARTÍCULAS ORGANOMODIFICADAS DE GLIBENCLAMIDA E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES EM MODELO ANIMAL DIABÉTICO	123
6	CONCLUSÃO FINAL DA TESE	138
	REFERÊNCIAS	141
	APÊNDICE A- LISTA DE PUBLICAÇÕES	181

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico grave proveniente da combinação de anormalidades na secreção de insulina e resistência à sua ação, resultando em hiperglicemia. Devido sua alta taxa de ocorrência, o DM é considerado um grande problema de saúde pública em todo o mundo e pesquisas buscam novas alternativas para o seu tratamento.

A glibenclamida (GLIB) é um fármaco bastante prescrito para o DM II, no entanto, sua baixa solubilidade aquosa origina variações em sua biodisponibilidade oral, afetando negativamente o tratamento farmacológico. Vários sistemas de liberação controlada já foram desenvolvidos buscando amenizar este problema. Esta tese buscou o desenvolvimento de nanopartículas (NP) de GLIB e Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) organofilizados como estratégia para incrementar a taxa de dissolução da GLIB e melhorar sua biodisponibilidade.

O trabalho está organizado em 5 artigos: Artigo I (Estratégias para a melhoria da dissolução da glibenclamida: uma revisão baseada na metodologia database tomography) baseou-se na metodologia Database Tomography (DT) para realizar uma revisão de artigos sobre as principais estratégias desenvolvidas para melhorar a taxa de dissolução da glibenclamida. O artigo II (Prospecção tecnológica de patentes: análise crítica de glibenclamida em sistemas de liberação de fármacos) corresponde a uma prospecção tecnológica de patentes que buscou apontar as principais estratégias utilizadas por empresas e/ou grupos de pesquisa no desenvolvimento de tecnologias para aumentar a taxa de dissolução da GLIB. Artigo III (Monitoramento *in line* da síntese de hidróxidos duplos lamelares e insights do mecanismo e cinética de formação) buscou explicar os fatores e mecanismos que envolvem a formação de dois tipos de HDL pelo método de coprecipitação, os sistemas foram monitorados durante sínteses por uma sonda de NIR e caracterizados por MEV, DRX e potencial zeta.

O artigo IV (One-pot síntese de nanopartículas biocompatíveis de hidróxidos duplos lamelares organomodificados com glibenclamida), aborda a obtenção de HDL organomodificados por dodecil sulfato de sódio carreando glibenclamida, nele foi utilizado o método *one pot* de coprecipitação, revestimento dos sistemas, caracterização, liberação *in vitro* e citotoxicidade. O artigo V (Nanotoxicidade e eficácia das nanopartículas organomodificadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares em modelo animal diabético) trata da indução do diabetes mellitus II em ratos Wistar por streptozotocina e do seu tratamento ao longo de 30 dias

com as nanopartículas. Foram avaliados parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos.

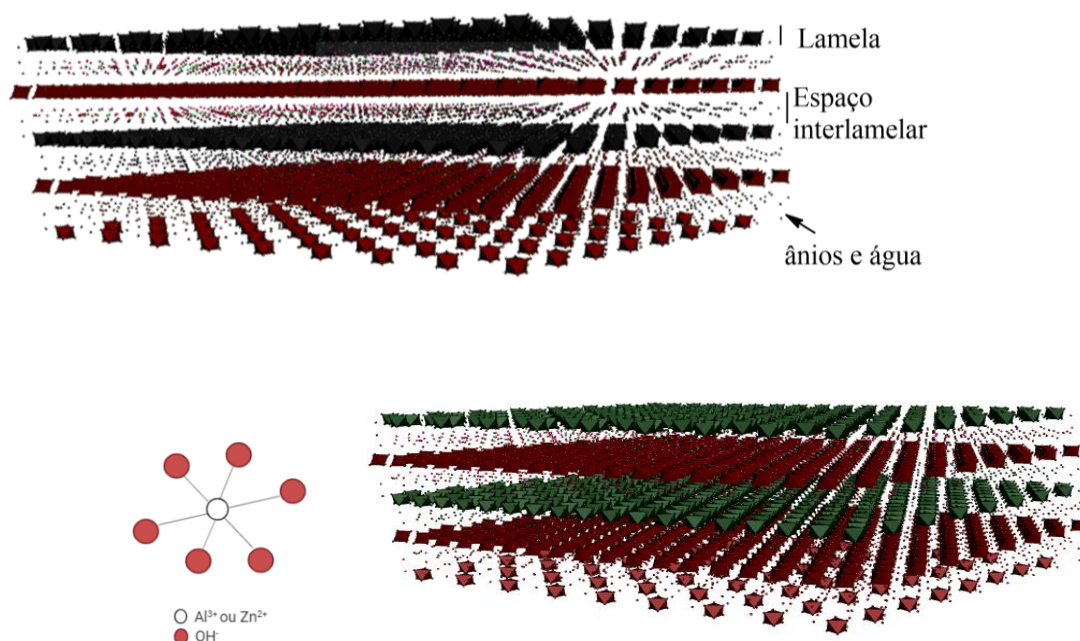
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) são materiais inorgânicos sintéticos ou naturais, estruturados bidimensionalmente e com capacidade de interagir e carrear moléculas orgânicas. São constituídos por camadas de hidróxido de metal carregadas positivamente e dispostas sucessivamente em lamelas, as quais consistem em unidades octaédricas com um cátion central rodeado por íons de hidróxido (ZHAO et al., 2002; FRONDEL et al., 1970).

Apresentam estrutura semelhante à brucita, um mineral de fórmula mínima $Mg(OH)_2$ no qual os cátions magnésio estão localizados no centro de octaedros e os ânions hidroxila estão nos vértices formando um material desprovido de carga (NANGOI et al., 2015; ROJAS et al., 2014).

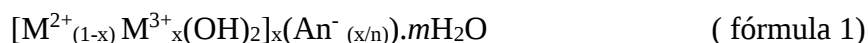
No entanto, diferente da brucita, os HDL apresentam cátions trivalentes além dos divalentes presentes na brucita. A presença de cátions trivalentes resulta em camadas carregadas positivamente, as quais estão ligadas a ânions hidratados na região interlamelar por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças dispersivas permitindo a formação das camadas e resultando em uma estrutura tridimensional (FRONDEL et al., 1970).

Figura 1-Representação genérica de um HDL.



Fonte: autoria própria baseado em dados SIF do *American Mineralogist Crystal Structure Database* no Discovery Studio Visualizer®. (<http://ruff.geo.arizona.edu/AMS/result.php>)

Os cátions nas camadas podem ser dos mais variados tipos, como zinco, cobalto, níquel, manganês, ferro, lantanídeos de cromo, cobalto, vanádio, gálio e a partir da fórmula geral (fórmula 1) podem ser previstas combinações variáveis (KUTLU et al., 2014; WANG, O'HARE, 2012).



(A= ânion; M^{2+} = cátion divalente; M^{3+} = cátion trivalente)

A associação de cátions com coordenação octaédrica é preferida devido à maior capacidade de estabilização, embora cátions com coordenação tetraédrica também possam ser usados, os valores de raio iônico devem estar próximos a faixa de 0,50 – 0,74Å para que ocorra a formação da estrutura semelhante à argila natural, brucita (BURLOV et al., 2016; LIU et al., 2006).

Além disso, a estrutura dos HDL é altamente influenciada pela natureza e distribuição dos ânions intercalados, os quais compensam a carga residual positiva das lamelas estabilizando a estrutura lamelar, quanto maior essa capacidade de estabilização do ânion, mais facilmente o HDL se formará (NEVES, 2016; ROJAS et al., 2015).

A razão entre os cátions (M^{2+}/M^{3+}) determina a densidade de carga na lamela do HDL, este parâmetro influencia as propriedades do material como a capacidade de troca iônica e espessura das intercamadas, de maneira geral o aumento nesta razão diminui a cristalinidade do material (KELKAR, SCHUTZ, 1997). Comparativamente à montmorilonita e esmectita, argilas catiônicas, a densidade de carga dos HDL é superior e a interação entre suas camadas e o ânion interlamelar é mais forte (FERENCZ et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013).

Vários ânions inorgânicos podem ser intercalados como haletos, sulfato, nitrato, cromato, arsenato, ânions complexos ($[Fe(CN)_6]^{4-}$, $[NiCl_4]^{2-}$) como também ânions orgânicos como carboxilatos, sulfonatos, fosfonatos, polímeros aniônicos, macrocíclicos e biomoléculas como fármacos. Destaca-se a grande afinidade que os HDL possuem pelo ânion carbonato em virtude de sua habilidade em ocupar sítios interlamelares formando materiais bem definidos cristalograficamente e com ligações covalentes fortes com as lamelas (MEI et al., 2017; HUDCOVÁ et al., 2017; WANG et al., 2016; ADV, 2016; KUTLU et al., 2014; YUN, PINNAVAIA, 1995).

A relação tamanho/carga é importante para a estabilização do ânion no espaço interlamelar, ânions com grande dimensão e baixa carga são incapazes de equilibrar de forma

homogênea a carga positiva das camadas, desta forma, um equilíbrio deve ser alcançado para que seja possível a formação das lamelas e sua estabilização pelos ânions, na figura 7 podemos observar a capacidade de estabilização de alguns ânions inorgânicos.

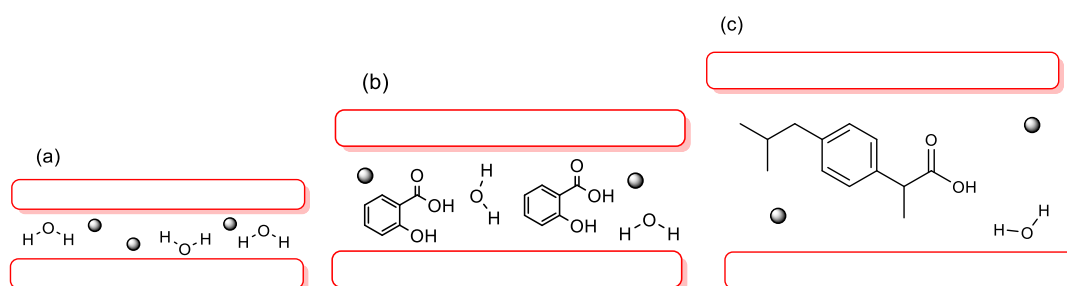
Figura 2-Representação sequencial da capacidade de estabilização das lamelas.



Fonte: autoria própria baseado em Bocclair, Braterman, 1999.

Os ânions também determinam o espaçamento interlamelar, pois dependendo do seu tamanho o espaço entre as lamelas pode ser ampliado para acomodá-los, como representado na figura 8. Além disso, caso os ânions apresentem grupamentos funcionais orgânicos existe a probabilidade de estes direcionarem o crescimento das lamelas e gerarem um sequenciamento em diferentes direções resultando em padrões de agregação variados (MEI et al., 2017, LI et al., 2014; CHEN et al., 2013; XU et al., 2006).

Figura 3- Ânions determinando o espaço interlamelar em HDLs, em (a) apenas ânions e água, em (b) ácido salicílico e água e em (c) ibuprofeno e água.



Fonte: autoria própria baseado em (BARAHUIE et al., 2014).

Moléculas de água encontram-se no espaço interlamelar juntamente com os ânions fazendo parte da estrutura cristalina dos HDL e encontram-se adsorvidas na superfície lamelar e entre os cristalitos (água extrínseca) (RIVES, DEL ARCO, MARTIN, 2014).

As cargas positivas das lamelas também proporcionam fenômenos de superfície nos HDL permitindo que estes funcionem como adsorvato, desta forma, ânions podem ser adsorvidos nas lamelas de maneira mais ou menos intensa dependendo da natureza das forças envolvidas (HWANG et al., 2018; HUDCOVÁ et al., 2017; HALAJNIA et al., 2012).

2.1 APLICAÇÕES DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

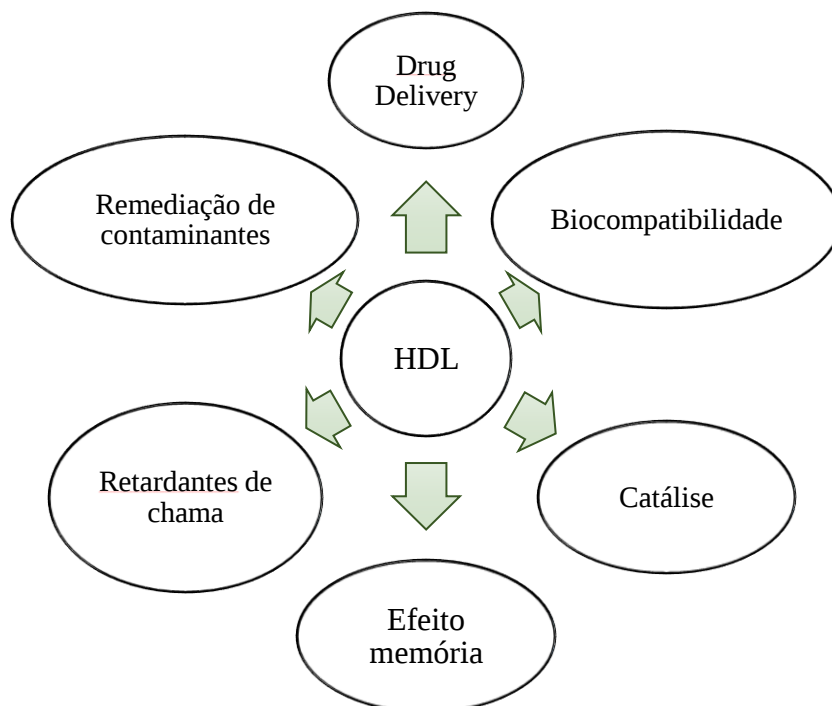
As diferentes combinações de cátions e ânions através de diferentes rotas sintéticas fornecem uma variedade de HDL adaptadas às propriedades químicas e aplicações desejáveis em diferentes campos da ciência como catálise, adsorção (HWANG et al., 2018; HUDCOVÁ et al., 2017; ZHU, XU, 2017; WANG et al., 2016; LI et al., 2014b), retardantes de chama (GAO et al., 2014; WANG et al., 2013) e proteção contra erosão (FERREIRA, 2010).

Os HDL são materiais biocompatíveis, pois não se acumulam nos tecidos e desestruturam-se nos fluidos biológicos resultando em seus íons constituintes, os quais apresentam capacidade de deixar as células através de canais iônicos (CHOI, OH, CHOY, 2009; CHOI, CHOY, 2011a, 2011b). A biocompatibilidade dos HDL possibilita resultados promissores para aplicações biomédicas, sua primeira aplicação foi como antiácido na década de 1960 com o medicamento Talcid®, que foi desenvolvido pela empresa BAYER e corresponde ao HDL MgAl-CO_3 (FU et al., 2019; MEI et al., 2017; CUNHA et al., 2016; CORNEJO et al., 2016; NANGOI et al., 2015; JÁCOME-ACATITLA et al., 2014; CHAKRABOT et al., 2012; VISERAS et al., 2010; HOYO, 2007).

Além disso, podem ser utilizados para proporcionar estabilidade térmica, aumentar a taxa de dissolução de fármacos e controlar sua cinética de liberação (CAPSONI et al., 2018; RIVES et al., 2013; AGUZZI et al., 2007). No entanto, se destinadas à administração oral, as formulações contendo HDL precisam ser protegidas da degradação ácida no estômago, pois suas lamelas se desestruturam promovendo a liberação do intercalante antes de atingirem o local de absorção intestinal (PARELLO, ROJAS, GIACOMELLI, 2010; AMBROGI et al., 2009; LI, EVANS, DUAN, 2004).

Podem ser citados vários trabalhos que veiculam fármacos em HDL como: anticancerígenos (MEI et al., 2017), anti-inflamatórios não esteroidais (DEÁK et al., 2018, RIVES, DEL ARCO, MARTÍN, 2013; PARELLO, ROJAS, GIACOMELLI, 2010), antibióticos (FERENCZ et al., 2015, ROJAS et al., 2015; ZHOU et al., 2015, MISHRA et al., 2013, CARJA et al., 2009), biomoléculas como hemoglobina (ZHAN et al., 2014) e ácidos nucleicos (LI et al., 2014, WONG et al., 2012).

Figura 4- Resumo das principais aplicações e propriedades dos HDL.



Devido à ampla gama de aplicações dos HDL tentativas recentes de preparar HDL em larga-escala foram apresentadas em literatura científica e patentes (LIMA et al., 2009; LIU et al., 2006; XU, QING, LU, 2005; KELKAR, SCHUTZ, 1997). A Coreia do Sul é o país que apresenta destaque na produção e comercialização de medicamentos à base de HDL, o professor Dr. Jin-Ho Choy fundou em 2001 o *Nanohybrid Research* centro direcionado para o desenvolvimento de sistemas híbridos constituídos de HDL (ou sal básico lamelar) e espécies orgânicas de interesse para uso como medicamentos e/ou cosméticos. Dois produtos já foram patenteados e estão disponibilizados para comercialização: Vitabrid C[®] para liberação de vitamina C (GAO et al., 2014) e IAA-Brid[®] para liberação do ácido indol acético (IAA).

3 OBJETIVOS

- Utilizar a tomografia de banco de dados (DT) para revisar as principais estratégias, desenvolvidas até o momento, para melhorar a taxa de dissolução do GLIB descrevendo as principais características de cada estudo e as principais vantagens e desvantagens dos sistemas;
- Realizar uma prospecção em patentes buscando traçar o perfil das principais estratégias desenvolvidas por empresas para melhorar a taxa de dissolução da glibenclamida;
- Utilizar a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e quimiometria para monitorar a síntese de hidróxidos duplos lamelares (HDL) pelo método de coprecipitação e obter *insights* sobre o seu mecanismo e cinética de formação;
- Obter nanopartículas biocompatíveis de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida para a melhoria da sua taxa de dissolução e liberação controlada buscando uma possível opção terapêutica para o tratamento do diabetes mellitus II.
- Avaliar a nanotoxicidade das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares organomodificados e glibenclamida durante o tratamento de ratos *wistar* diabéticos por 30 dias através do monitoramento dos parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos.

4 MÉTODOS

Os dois primeiros artigos correspondem a trabalhos de revisão, para o artigo I foi utilizada a metodologia *DataBase Tomography* para a busca e análise dos artigos e para o artigo II foi realizada uma prospecção de patentes.

No artigo III, o monitoramento da síntese de HDL por coprecipitação foi realizado usando o infravermelho próximo, potencial zeta e microscopia. No artigo IV foram obtidas nanopartículas de HDL modificado com DSS para carreamento da glibenclamida, as nanopartículas foram revestidas com Eudragit L100® e testadas quanto a citotoxicidade. No artigo V as nanopartículas foram testadas em ratos *wistar* diabéticos para avaliação da nanotoxicidade. O diabetes foi induzido com estreptozotocina, durante 30 dias foram monitorados os parâmetros clínicos dos animais e após este período, os animais foram sacrificados e avaliados quanto o perfil hematológico, bioquímico e histológico.

Todas as técnicas e métodos estão detalhadamente descritos em cada artigo.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1: ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A DISSOLUÇÃO DA GLIBENCLAMIDA: UMA REVISÃO USANDO TOMOGRAFIA DE BASE DE DADOS

1 REFERENCIAL TEÓRICO

A glibenclamida (GLIB) é um hipoglicemiante oral pertencente a classe das sulfonilureias e o único fármaco para o tratamento do diabetes mellitus (DM II) que está incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WILD et al., 2004).

Sua ampla utilização ocorre em consequência de sua grande afinidade por receptores pancreáticos e potente ação secretagoga, no entanto, é um fármaco da classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e sua baixa solubilidade aquosa causa variações em sua biodisponibilidade oral, afetando negativamente o tratamento farmacológico de pacientes diabéticos (CLEMENS et al., 2015; GUAN et al., 2014).

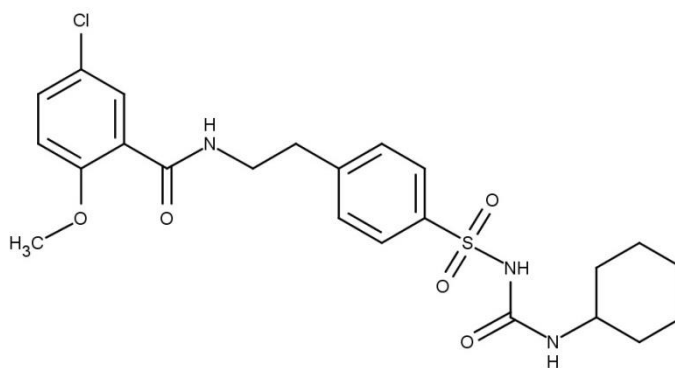
Desta forma, as falhas no tratamento relacionadas à biodisponibilidade da GLIB podem ser muito prejudiciais, pois a descompensação glicêmica no paciente diabético pode levar a complicações graves, como nefropatia, retinopatia, neuropatia e doença arterial coronariana, as quais geralmente levam à incapacidade ou qualidade de vida reduzida. As diferenças significativas observadas nas taxas de dissolução dos comprimidos de GLIB indicam que a biodisponibilidade oral deste fármaco pode variar dependendo da formulação (KOSEK et al., 2003).

Desde que o diabetes tornou-se um grande problema de saúde pública em todo o mundo, a pesquisa sobre o uso seguro e eficaz de medicamentos antidiabéticos tornou-se uma prioridade, estimativas globais da Federação Internacional de Diabetes (IDF) indicam que 382 milhões de pessoas (8,3% dos adultos) tiveram diabetes em 2013 e esse número deverá aumentar para aproximadamente 592 milhões em 2035. Estas perspectivas de crescimento e a gravidade das complicações do diabetes mellitus impulsionam desta forma, os estudos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes (WILD et al., 2004).

1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA GLIBENCLAMIDA

A presença de vários grupos hidrofóbicos em sua estrutura, como anéis aromáticos, cadeia alifática e o radical cíclico, conferem características lipofílicas à sua estrutura (figura 5) (ANDERSSON et al., 2014).

Figura 5- Representação da estrutura química da glibenclamida



Fonte: autoria própria, desenho obtido através do software Marvin®.

A GLIB apresenta-se como um pó cristalino branco, estável em condições ambientais, inodoro e com um peso molecular de 494,01 g/mol, apresenta baixo valor de absorbância na região ultravioleta, com valor máximo em $\lambda = 300\text{nm}$ em metanol e pKa 5.3, portanto, em baixos valores de pH está na forma molecular e em meio básico na forma ionizada.

Três formas polimórficas e três formas pseudopolimórficas são encontradas para a glibenclamida, a forma I é a mais estável e, portanto, é a forma usada pelas indústrias farmacêuticas para a produção de medicamentos. As formas II e III são metaestáveis e, portanto, apresentam menor estabilidade e maior solubilidade em comparação com a forma cristalina I. As formas metaestáveis podem dar origem a pseudopolimorfos obtidos por recristalização em diferentes solventes conforme exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1- Estruturas polimórficas e pseudopolimórficas da glibenclamida com seus respectivos solventes, formas cristalinas e parâmetros celulares.

Estruturas polimórfica e pseudopolimórficas da GLIB	Solvente	Temperatura de fusão (°C)	Forma cristalina	Dimensão de célula
- Polimorfo I Suleiman & Najib (1989)	Metanol, etanol, água, acetona e piridina	172-173	Ortorrômica simples	a= 9,429160 Å b= 9,627872 Å c= 9,050986 Å
- Polimorfo II Pseudopolimorfo I Pseudopolimorfo II Suleiman & Najib (1989)	Acetonitrila Pentanol Tolueno	173,1 159,4 159,4	Ortorrômica simples	a= 16,117 Å b= 12,696 Å c= 9,435 Å
- Polimorfo III Pseudopolimorfo III Hassan et al. (1997)	Mistura de clorofórmio e éter/mistura	168-170 168-170	Monoclínica simples	a = 9,444 Å b= 17,706 Å c= 14,451 Å

1.3 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE TOMOGRAFIA DE BANCO DE DADOS (DT)

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de medicamentos capazes de promover a dissolução e absorção adequadas de medicamentos pouco solúveis é um grande desafio para os pesquisadores, pois vários métodos e matrizes podem ser utilizados. Neste contexto, a metodologia denominada tomografia de banco de dados (DT) para revisar as principais estratégias desenvolvidas até o momento consegue descrever as principais características de cada estudo e as principais vantagens e desvantagens dos sistemas (KHADKA et al., 2014).

A DT é uma técnica que fornece uma ampla perspectiva de diferentes áreas do conhecimento e, conseqüentemente, permite a compreensão de tópicos relacionados a uma área específica. As etapas envolvidas na DT incluem o estabelecimento e a aplicação de critérios para pesquisas na literatura, recuperação de documentos textuais, participação de pesquisadores especialistas de uma área específica para filtrar e interpretar informações e, finalmente, vários tipos de análises métricas, como a frequência de palavras comuns, análise de palavras, análise de citações, origem de cluster e termos relacionados. Além disso, a DT também pode incluir algoritmos computacionais de mineração de texto para otimizar o processamento de grandes volumes de dados (KOSTOFF et al., 2001; KOSTOFF et al., 1999; KOSTOFF et al., 1998).

2 OBJETIVOS

O presente estudo utilizou uma metodologia denominada tomografia de banco de dados (DT) para revisar as principais estratégias desenvolvidas até o momento para melhorar a taxa de dissolução do GLIB descrevendo as principais características de cada estudo e as principais vantagens e desvantagens dos sistemas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo utilizou DT e uma revisão sistemática da literatura, as pesquisas foram realizadas em junho de 2017 no Scopus, ScienceDirect, Springer*, PubMed, Web of Science e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e incluíram artigos publicados de 2014 a 2016**. As múltiplas combinações dos termos da pesquisa foram conectadas através dos operadores booleanos (AND ou OR) e estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Combinação dos descritores usados nas pesquisas.

Lista de termos da busca nas bases
(1) "Drug Delivery Systems" AND "Glyburide"
(2) "Drug Delivery Systems" AND "Glibenclamide"
(3) "Biological Availability" AND "Glyburide"
(4) "Biological Availability" AND "Glibenclamide"
(5) "Glibenclamide" AND "Solubility" AND "Dissolution"
(6) "Glibenclamide" AND "Dissolution"
(7) "Glyburide" AND "Dissolution"
(8) "Glyburide" AND "Solubility" AND "Dissolution"
(9) "Drug Liberation" OR "Drug Delivery Systems" AND "Glyburide"
(10) "Drug Liberation" OR "Drug Delivery Systems" AND "Glibenclamide"
(11) "Glyburide" AND "Drug Liberation"

* Como o Springer não exporta formatos compatíveis com o Start, os estudos recuperados desse banco de dados foram importados usando o plug-in Mendeley Web Importador no Google Chrome. Este plug-in importa dados dos estudos para a nuvem. Os estudos foram analisados e convertidos em arquivos compatíveis com o Start usando o software Mendeley Desktop 1.17.12.

** O período de pesquisa (2014–2016) foi definido com base na necessidade de analisar estudos e resultados recentes. Também foi necessário estabelecer um período que viabilizasse a análise, considerando o grande número de trabalhos disponíveis na literatura.

*** Como grande número de combinações de termos de pesquisa foi pesquisado em seis bancos de dados, muitos artigos repetidos foram incluídos na primeira etapa. Esses estudos foram excluídos na etapa seguinte.

Combinações de termos de pesquisa, operadores booleanos e operadores de pesquisa usados em cada banco de dados.

Um arquivo RIS ou Bibtex foi gerado a partir de cada site do banco de dados e foi importado para o Start v.3.3beta (lapes.dc.ufscar.br/tools/start_tool), um software desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Engenharia de Software da Universidade Federal de São Carlos, Brasil. O Start permitiu importar e organizar as referências coletadas e filtrá-las de acordo com critérios pré-estabelecidos.

Os critérios de inclusão foram artigos originais publicados em inglês, português, francês, alemão ou espanhol relacionados à glibenclamida que se enquadravam no escopo deste estudo.

Os critérios de exclusão foram capítulos de livros; publicações de eventos; revisões literárias; estudos realizados exclusivamente *in vivo*; trabalhos que relataram exclusivamente os resultados de estudos clínicos; estudos farmacológicos; estudos quimiométricos; estudos farmacocinéticos; estudos físico-químicos envolvendo micronização; estudos de métodos analíticos; estudos de formulação; estudos de equivalência farmacêutica; estudos de ampliação industrial; estudos sobre sistemas de aplicação tópica, formulações transdérmicas, formulações bucais e formulações mucoadesivas; estudos genéticos; e artigos não relacionados à glibenclamida.

A seleção dos artigos foi realizada seguindo as etapas previamente definidas e de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

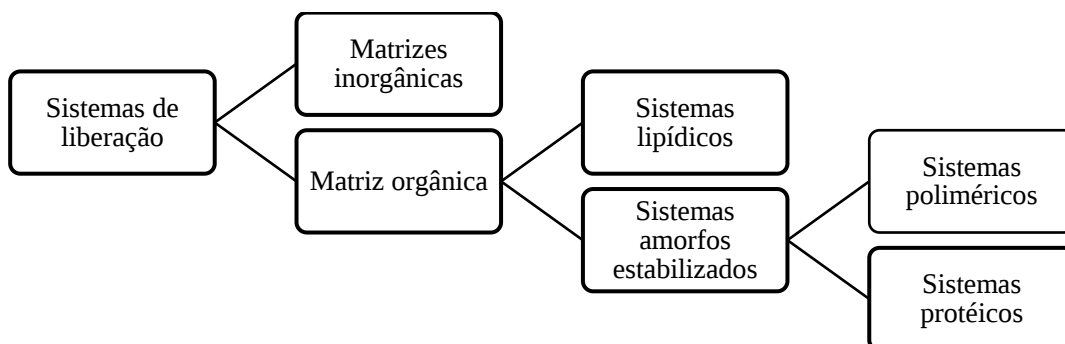
As pesquisas recuperaram 1.619 artigos: 136 da BVS, 246 da PubMed, 153 da Web of Science, 407 da Scopus, 604 do Science Direct e 73 da Springer. A Tabela 3 apresenta os trabalhos agrupados por tipo, após aplicação dos critérios de exclusão e inclusão, o grande número de artigos repetidos ocorreu devido às combinações abrangentes de termos e operadores de pesquisa (disponíveis em cada banco de dados).

Tabela 3- Artigos recuperados na busca na literatura.

Detalhamento	2014-2016
Artigos repetidos	1138
Rejeitados pelos critérios de exclusão técnica	325
Não artigos (capítulos de livro, resumos)	36
Revisões	86
Artigos selecionados para a revisão	34
Total	1619

Também com base em critérios pré-estabelecidos, os artigos selecionados foram classificados de acordo com a natureza química da matriz utilizada, como mostra a Figura 6.

Figura 6- Classificação dos sistemas de administração de medicamentos para glibenclamida de acordo com a natureza química da matriz



Os artigos selecionados para análise estão listados na Tabela 4, que também indica o número de citações, a natureza química da matriz de administração do medicamento e seu método de preparação. A tabela 5 mostra as informações sobre condições de dissolução e testes farmacocinéticos.

Tabela 4- Lista completa de artigos selecionados para análise com base nos critérios de inclusão e exclusão, apresentando número de citações, matriz de administração de medicamentos e método utilizado para preparar o sistema de administração de medicamentos.

Artigo/citações	Tipo de Matriz	Método
<i>Ueda et al (2015)</i> (4 citações)	Orgânico>>Polimérico HPMC- AS(acetil-succinato)	Secagem spray drying.
<i>Thongnookoon, Puttipipatkachorn (2015)</i> (1 citação)	Orgânico>>Polimérico PVP e LSS	Evaporação do solvente
<i>Maiti, Mukherjee, Datta (2014)</i> (4 citações)	Orgânico>>Polimérico>>Biopolímero modificado Goma xantana alquilada (C-16)	Método de evaporação do solvente
<i>Liu et al (2014)</i> (4 citações)	Orgânico>>Lipídico	Autoanoemulsificação
<i>Khames et al (2013)</i> (1 citação)	Orgânico>>Polimérico modificado .Alginato modificado	Gelificação iônica
<i>Guan et al (2014)</i> (8 citações)	Inorgânico>>Sílica	DS com fluido supercrítico
<i>Cirri et al. (2016)</i> (6 citações)	Inorgânico>>NEUSILIN® (Magnesium Aluminometasilicate)	Microemulsão
<i>Bari et al. (2014)</i> (1 citação)	Orgânico>>Lipídico	Autoanoemulsificação
<i>Bakshi et al. (2015)</i> (2 citações)	Orgânico>>Polimérico-modificado Soluplus® e Goma xantana modificada.	Dispersões sólidas por fusão a quente e irradiação por microondas.
<i>Albertini et al. (2014)</i> (2 citações)	Orgânico>>Lipídico	Autoemulsificação
<i>Upadhyay et al. (2014)</i> (0 citação)	Orgânico>> Lipídico	Dispersões sólidas lipídicas
<i>Tabbakhian et al(2014)</i> Publicado em revista não indexada na Web of Science (13 Citações no Google)	Orgânico>>Polimérico HPMCE5, PEG600 e Poloxamer407	Dispersões sólidas de fármaco por evaporação de solvente (SE), solvente e antissolvente de fluido supercrítico (SCF-SAS).
<i>Sinha, Ubaidulla, Nayak (2014)</i> (8 citações)	Orgânico>>Polímeros(Biopolímero) Goma de Okra e alginato e sódio	Gelificação iônica usando CaCl ₂

Higashi et al. (2015) (13 citações)	Orgânico>>Polimérico Eudragit® S 100 (S100).	Dispersões sólidas Secagem por pulverização.
Gyanani et al. (2015) (1 citação)	Orgânico>>Polimérico Ciclodextrina	Várias técnicas de complexação
Shakeel et al. (2013) (2 citações)	Orgânico>>Lipídico Lauroglycol- 90 e Lauroglycol-FCC	Emulsão espontânea.
Shakeel et al. (2014) (11 citações)	Orgânico>>Polimérico(Biopolímero)	Sistema auto-nanoemulsificante
Shakeel et al. (2014) (4 citações)	Orgânico>>Sistema lipídico	Autonanoemulsificação (SNEDDS) e automicrorrutralizante (SMEDDS)
REDDY et al. (2014) (0 citação)	Orgânico>>Polimérico	Método de evaporação do solvente
Laitinen et al. (2014) (21 citações)	Orgânico>>Protéico	Criomoagem
Kumar et al. (2014) (7 citações)	Orgânico>>Lipídico Lecitina	Precipitação por arrefecimento
Gonçalves et al. (2016) (12 citações)	Orgânico>> lipídico	Evaporação do solvente
Deshpande et al. (2015) (1 citação)	Orgânico>>Polimérico HPMC K15M	Precipitação líquida com antisolvente
Censi et al. (2015) (1 citação)	Inorgânico Neusilin® UFL2 (forma sintética amorfa de aluminometasilicato)	Dispersão Sólida
Alawi et al. (2015) (2 citações)	Orgânico Sintético	Dispersão Sólida
Maiti, Susweta Mukherjee(2014) (6 citações)	Orgânico>>Polimérico (Biopolímero modificado) Goma xantana modificada	Dispersão micelar Hidrogel
Nayak et al. (2016) Publicado em revista não indexada na Web of Science (0 Citações no Google)	Orgânico>>Polimérico (HPMC)	Dispersão Sólida
Gautschi et al. (2015) (11 citações)	Orgânico>>Lipídico	Dispersões sólidas lipídicas Evaporação do solvente
Prasad, Garud, Akanksha Garud (2014)	Orgânico>>Polimérico Complexo de inclusão com β -ciclodextrinas	Vários métodos de complexação

Publicado em revista não indexada na Web of Science (0 Citações no Google)		
Essa et al. (2015) (3 citações)	Orgânico>>Polimérico HPMC, poloxâmer	Dispersões sólidas

OBS: DS- dispersão sólida; HPMC- hidroxipropil-metil-celulose.

Tabela 5- Condições do teste de dissolução e aspectos farmacocinéticos dos artigos.

Taxa da dissolução	Condições da dissolução	Ensaio farmacocinéticos	Paper
100% em 24h	Meio: tampão fosfato (0,05 M) pH 6,8 Aparato: pá Volume:500ml	-	Ueda et al, 2015
Eficiência de dissolução 65,52%	Meio: HCl (0,1N) Aparato: pá Volume:900ml	-	Essa et al, 2015
100% em 8h	Meio: tampão fosfato 7,4 Aparato: pá Volume: 900ml	-	Nayak et. al, 2016
70% em 6h	Meio:tampão fosfato pH 7,4 Aparato: cesta Volume:900ml	-	Sinha et. al., 2015
94,2% em 20min	Meio: phosphate buffer pH 6,8 with surfactante Aparato: paddle Volume:900ml	Sistema $C_{max}(ng.ml^{-1}) = 24\,451.14 \pm 2170.5$ $T_{max}(h) = 4.0 \pm 0.0$ $T_{1/2}(h) = 9.57 \pm 0.23$ $AUC_{0-24}(ng.h.ml^{-1}) = 162\,383.64 \pm 237.2$ GLIB $C_{max}(ng.ml^{-1}) = 9428.42 \pm 897.8$ $T_{max}(h) = 4.0 \pm 0.0$ $T_{1/2}(h) = 5.53 \pm 0.42$ $AUC_{0-24}(ng.h.ml^{-1}) = 71\,680.24 \pm 63.6$	Vaghela, Kulkarni, 2015
83% em 8h	Meio:foi realizado em membrana de diálise com tampão fosfato 6.8 Aparato: pá Volume:900ml	-	Deshpand et. al., 2015
Liberação de 93%	Meio: tampão fosfato7,4 Aparato: pá Volume:900ml	-	Prasad, Garud, Garud, 2014

99,89% em 3h	Meio: tampão fosfato 7,4 Aparato: pá Volume: 500ml	GLIB $C_{max}(\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}) = 19.8 \pm 0.15$ $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 392706 \pm 4303$ Sistema $C_{max}(\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}) = 12.6 \pm 0.25$ $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 238069 \pm 1424$	Kumar et. al., 2014
	Meio: HCl 1,2 Volume: 900ml	GLIB $C_{max}(\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}) = 56.05 \pm 1.2$ $T_{max}(\text{h}) = 2 \pm 0.4$ $T_{1/2}(\text{h}) = 4.75 \pm 0.53$ $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 294.95 \pm 1.5$ Sistema $C_{max}(\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}) = 48.53 \pm 1.2$ $T_{max}(\text{h}) = 6 \pm 0.1$ $T_{1/2}(\text{h}) = 5.56 \pm 0.51$ $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 320.78 \pm 1.4$	Upadhyay, Pandit, Wahi, 2014
99% em 1h	Meio: água deionizada Aparato: pá Volume: 500ml	-	Shakeel et al., 2014
100% em 24h	Meio: tampão fosfato pH 7,4 Aparato: membrana de diálise Volume: 250ml	-	Gonçalves et al., 2016
100% em 20 min	Meio: PBS 6,8 ou 7,4. Aparato: pá Volume: 900ml	GLIB $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 3064 \pm 1141$ SYSTEM $AUC_{0-24}(\text{ng}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 1210 \pm 325$	Liu et al., 2014
90% em 15min	Meio: tampão fosfato 7,4 Aparato: pá Volume: 900ml	GLIB $AUC_{0-24}(\text{mg}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 103.52 \pm 22.6$ SYSTEM $AUC_{0-24}(\text{mg}.\text{h}.\text{ml}^{-1}) = 139.34 \pm 22.6$	Bari et al., 2014
50% em 90min	Meio: PBS 7,4 Volume: 500ml	-	Albertini et al., 2014
80% em 20 min	Meio: 900ml de tampão fosfato 7,4 Aparato: pá Volume: 900ml	-	Thongnopkoon, Puttipipatkachorn, 2015
	Meio: tampão fosfato 7,4 Método do disco rotatório usando NTR-VS6P (Toyama Sangyo Co. Ltd., Osaka, Japão). Volume: 500ml	-	Higashi et al., 2015
70% em 2h	Meio: tampão acetato pH 5,5 com 0,1% LSS Aparato: pá Volume: 1000ml	-	Gyanani, Siddalingappa, Betageri, 2015
100% em 24h	Meio: tampão fosfato 7,4	-	Reddy et al., 2014

	Volume:900ml		
92% em 5h	Meio: tampão fosfato Aparato: cesta Volume:900ml	-	Sinha, Ubaidulla, Nayak, 2014
83% em 8h	Meio: bolsa de diálise em tampão fosfato Aparato: pá Volume:900ml	-	Maiti, Mukherjee, 2014
89,5% em 1h	Meio: água Volume:500ml	-	Shakeel et al., 2014
100%	Meio: tampão fosfato pH 7,4 Aparato: pá Volume:500ml	-	Kames et al., 2014)

Tabela 6- Solubilidade da matriz, interação e estado físico da GLIB nos sistemas.

Artigos	Natureza da matriz de liberação	Interação entre a GLIB e o sistema	Efeito do estado físico da GLIB
Ueda et al, 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Amorfo
Maiti, Mukherjee, 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Liu et al., 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Kames et al., 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Guan, 2014	Matriz insolúvel	Interação eletrostática	Amorfo
Bari et al., 2014	Matriz solúvel	Interação hidrofóbica	Solubilização em matriz lipídica
Albertini et al., 2014	Matriz solúvel	Interação hidrofóbica	Solubilização em matriz lipídica
Upadhyay, Pandit, Wahi, 2014	Matriz solúvel	Interação hidrofóbica	Solubilização em matriz lipídica
Sinha et. al., 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Sinha, Ubaidulla, Nayak, 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Higashi et al., 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Amorfo
Gyanani, Siddalingappa, Betageri, 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo

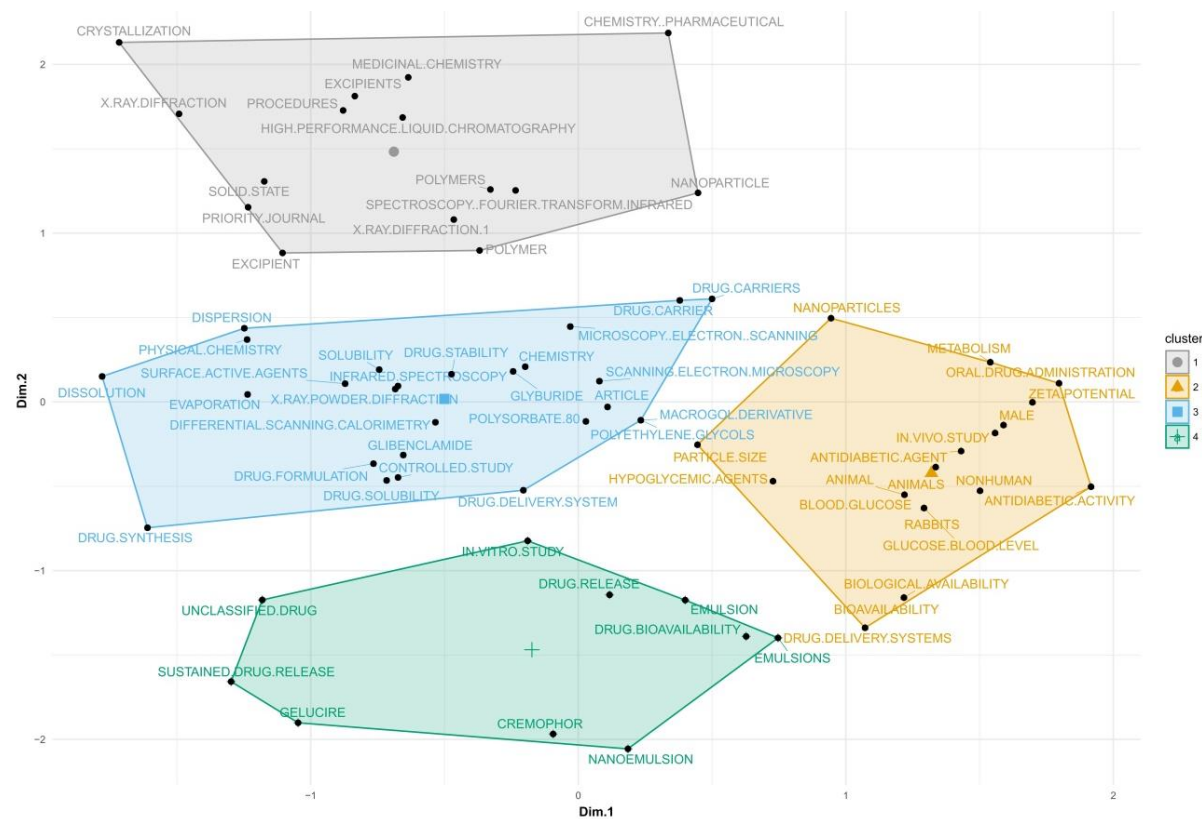
Shakeel et al., 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Solubilização em matriz lipídica
Reddy et al., 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Kumar et. al., 2014	Matriz solúvel	Interação hidrofóbica	Solubilização em matriz lipídica
Gonçalves etl al, 2016	Matriz solúvel	Interação hidrofóbica	Solubilização em matriz lipídica
Deshpand et. al., 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Vaghela, Kulkarni, 2015	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Maiti, Mukherjee, 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo
Prasad, Garud, Garud, 2014	Matriz solúvel	Interação eletrostática	Polimorfo

O número de citações de uma revista científica está associado à sua relevância. (BROWN et al., 2015; VORKUKA et al, 1996) Da mesma forma, o número de citações de um determinado artigo é uma indicação da qualidade do estudo, uma vez que os artigos citados alcançam maior impacto científico e, consequentemente, maior repercussão (KOSTOFF, 2002).

O número de citações é tradicionalmente analisado durante um período para revelar tendências científicas e tecnológicas. O número de citações de um artigo indicado pelo Web of Science, Scopus e Google é um dado padronizado e automático que pode fornecer essas informações.

Os artigos também foram analisados usando o pacote Bibliometrix (Aria, Curccurullo, 2017) no software R (CRAN). A Figura 7 apresenta um gráfico bidimensional que combina análise multidimensional e análise de agrupamentos de médias-K para análise de co-word. A análise de co-palavras é uma técnica de análise bibliométrica usada para quantificar e extrair informações sobre a relação entre palavras e diferentes tópicos. Quatro grupos de palavras aparecem agrupadas por similaridade; essas palavras-chave são indexadas no Scopus.

Figura 7- Análise de co-word baseada em análise multidimensional e análise de agrupamentos de médias-K.



4.1 SISTEMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS COM GLIB E MATERIAIS ORGÂNICOS

4.1.1 Sistemas amorfos estabilizados

4.1.1.2 Sistemas poliméricos

A baixa solubilidade e a lenta dissolução da GLIB podem ser atribuídas em parte à sua natureza hidrofóbica; sua baixa solubilidade aquosa resulta em baixa molhabilidade e umedecimento, que é a primeira etapa de um processo de dissolução. O desenvolvimento de sistemas poliméricos é uma das principais estratégias utilizadas em formulações para medicamentos pouco solúveis, como a GLIB, porque os polímeros podem exercer um efeito solubilizante, causando a transformação completa ou parcial do medicamento em uma estrutura amorfa e mais solúvel (ESSA et al., 2015; KONO et al., 2008). Como resultado, os artigos que desenvolveram sistemas poliméricos para entrega de GLIB receberam um número maior de citações.

As dispersões sólidas de fármaco-polímero, bem como soluções sólidas, são sistemas amplamente utilizados para superar problemas de solubilidade (ESSA et al., 2015; PRASAD et al., 2014). A inibição da cristalização é determinada pelo nível de interação e supersaturação característico de cada polímero ou sistema polimérico. Estudos indicam que a cristalização é inibida pela desaceleração da nucleação de fármacos, portanto, investigações moleculares sobre cristalização são necessárias para elucidar o mecanismo de manutenção do estado supersaturado de fármacos pouco solúveis em várias classes de polímeros (UEDA et al., 2015).

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero derivado da celulose amplamente utilizado na indústria farmacêutica. Os pesquisadores incorporaram a GLIB em formulações contendo diferentes porcentagens de HPMC e obtiveram um sistema capaz de controlar sua liberação por difusão através da matriz polimérica. O sistema alcançou 100% de liberação de GLIB em 8h. (NAYAK et al., 2016; OSORIO et al., 2011).

Outro estudo utilizou HPMC, poloxâmer 407 e bicarbonato de sódio para produzir comprimidos flutuantes. Dessa maneira, a formulação combinou os benefícios de HPMC, poloxâmer e bicarbonato de sódio em um sistema DS ternário. O bicarbonato de sódio melhorou a dissolução do GLIB aumentando o pH da camada de difusão (GLIB é um ácido fraco, pKa 5,3), enquanto os polímeros reduziram a nucleação promovendo a amorfização do medicamento (ESSA et al., 2015).

Esses resultados são consistentes com os relatados por Ueda et al. (2015) em um estudo que investigou o efeito da combinação de GLIB ou clortalidona com succinato de acetato de HPMC (HPMC-AS). O HPMC-AS foi capaz de inibir efetivamente a cristalização de GLIB em soluções supersaturadas. Os espectros de ^1H RMN mostraram que o polímero suprimia a mobilidade molecular, impedindo o rearranjo dos agregados pré-nucleares e mantendo a GLIB em estado amorfo por longos períodos.

Tabbakhian et al. (2014) também desenvolveram e avaliaram sistemas de administração de medicamentos contendo HPMC. As formulações DS compostas de GLIB, HPMC, PEG e poloxâmer em diferentes concentrações foram preparadas por dois métodos, evaporação de solvente (SE) ou técnica de solvente-anti-solvente de fluido supercrítico (SCF-SAS). Os sistemas SCF-SAS tiveram um desempenho melhor no teste de dissolução do que os sistemas SE. A dissolução de GLIB em solução tampão de fosfato (pH 9,5) foi muito baixa, aproximadamente $19\% \pm 0,98\%$ em 45 min, enquanto a dissolução de formulações de GLIB preparadas por SE e SCF-SAS no mesmo período foi de 50 a 81% e 89 a 100%, respectivamente. Após 2 h, foi observada uma dissolução completa (100%) das formulações preparadas por SCF-SAS, enquanto a dissolução das formulações preparadas por SE variou de 61 a 99%. O aumento na taxa de dissolução de GLIB foi provavelmente o resultado da dispersão molecular do fármaco no veículo polimérico. Esse efeito foi evidente em formulações preparadas por SCF-SAS, em comparação com as preparadas por SE, provavelmente porque o fluido supercrítico melhorou a plastificação de polímeros, reduziu a cristalinidade de GLIB e aumentou a difusão do fármaco na matriz polimérica (tabela 5a).

Outros pesquisadores obtiveram um aumento de 6,4 vezes na taxa de dissolução da GLIB usando um sistema de nanosuspensão composto por GLIB, HPMC K15M e lactose, preparados pela técnica de precipitação com líquido anti-solvente (LAS). Uma vantagem desse método sobre o SE e o SCF-SAS é que elimina a necessidade de equipamentos especializados e possui fácil escalabilidade (SINHA et al., 2015).

A etilcelulose é outro polímero derivado da celulose que tem sido usado para melhorar a dissolução da GLIB. Testes realizados usando microcápsulas de GLIB revestidas com etilcelulose mostraram que esse sistema pode ser usado para liberação controlada oral desse fármaco. As taxas de liberação de GLIB foram melhoradas e a liberação foi lenta, controlada e completa (quase 100%) em 24 horas (REDDY et al., 2014).

Um estudo completo foi realizado sobre as alterações polimórficas da GLIB na SD. (THONGNOPKOON, PUTTIPIATKHACHORN, 2015) Em sistemas DS ternários que consistem em GLIB, polivinilpirrolidona K30 (PVP-K30) e lauril sulfato de sódio (LSS), preparado por evaporação de solvente, a GLIB mostrou sofrer uma transformação da forma ceto mais estável para a forma enol (forma polimórfica IV) em um tautomerismo de ceto-enol. A caracterização espectroscópica sugeriu duas regiões possíveis na molécula onde essa alteração polimórfica pode ocorrer, as porções amida e sulfonilureia. A forma amorfa de GLIB foi mantida por estabilização estérica por PVP-K30, na qual uma rede de polímeros foi formada em torno das superfícies das partículas. Portanto, pode-se dizer que o polímero carregado atuou como um estabilizador para controlar o crescimento dos cristais, impedindo a cristalização (THONGNOPKOON, PUTTIPIATKHACHORN, 2015). A miscibilidade fármaco-polímero no nível molecular, bem como a estabilização do estado amorfo da droga, são fatores cruciais para aumentar a taxa de dissolução. (HIGASHI et al., 2015) Assim, a taxa de dissolução de GLIB e a solubilidade do equilíbrio foram melhoradas e as partículas da forma IV da GLIB tiveram mais de 80% de dissolução em 20 minutos. Essa alta taxa de dissolução foi atribuída à estabilidade da forma polimórfica IV, que possui maior energia potencial que a forma cristalina (THONGNOPKOON, PUTTIPIATKHACHORN, 2015).

As principais propriedades físico-químicas consideradas importantes para o desempenho de dissolução dos sistemas poliméricos são a tendência do fármaco em cristalizar em meio aquoso, as interações fármaco-polímero e a proporção de fármaco e polímero usada na formulação. Em outro estudo, algumas dessas propriedades foram avaliadas usando um sistema DS da GLIB e Eudragit® S100. O sistema teve um desempenho de dissolução GLIB independente da taxa de carga do medicamento; isto é, GLIB foi retida em um estado amorfo durante o teste de dissolução, mesmo quando em altas porcentagens na formulação (tabela 5) (HIGASHI et al., 2015).

Os espectros de RMN mostraram um deslocamento químico de C(1) e C(7), carbonos próximos ao grupo amida GLIB, atribuído à tautomerização entre as formas amida-imida, que causaram sua amorfização. Essas observações sugerem que quase todas as moléculas de GLIB interagiram com o Eudragit® S100 e estavam em uma forma metaestável polimórfica quando o conteúdo de GLIB estava abaixo de 25%.

O monitoramento por UV e ELSD (detector de dispersão evaporativo da luz) mostrou que a dissolução simultânea de GLIB e o polímero ocorreu tanto em porcentagens altas quanto baixas de GLIB, demonstrando que a miscibilidade em nível molecular nem sempre é

necessária para estruturas polimórficas estáveis no estado amorfo em meio aquoso (HIGASHI et al., 2015).

Foi avaliada a influência de vários processos usados para incorporar GLIB na hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) na dissolução. Os métodos de processamento do leito fluido, granulação por pulverização e co-evaporação-granulação foram avaliados, e a granulação úmida foi considerada como um processo padrão para comparação (GYANANI, SIDDALINGAPPA, BETAGERI, 2015).

Os comprimidos contendo GLIB-HP β CD preparados por diferentes métodos mostraram perfis de taxa de dissolução semelhantes. No entanto, o estudo forneceu uma indicação de quais técnicas podem ser as mais adequadas em situações particulares. Por exemplo, a granulação por pulverização é considerada a melhor opção para formulações que contêm baixa carga de droga, pois permite a distribuição uniforme da droga por toda a mistura de granulação, enquanto a granulação por via úmida pode ser preferida em outros casos, por ser uma solução simples e econômica. e método tradicional para obter sistemas de administração de medicamentos (GYANANI, SIDDALINGAPPA, BETAGERI, 2015).

Maiti e Mukherjee também avaliaram a influência do método de preparação dos sistemas de β -ciclodextrina (β -CD) na taxa de dissolução da GLIB. Neste estudo, foi observada uma diferença significativa entre os resultados das formulações obtidas pelos métodos de malaxagem, coprecipitação ou neutralização; após 2 h, as taxas de dissolução foram de 75, 83 e 93%, respectivamente, enquanto a GLIB pura apresentou uma taxa de dissolução inferior a 50%. O melhor resultado, obtido com a formulação preparada pelo método de neutralização, foi atribuído à maior capacidade desse método na redução da cristalinidade da GLIB (MAITI, MUKHERJEE, DATA, 2014).

4.1.1.3 Sistemas poliméricos naturais (biopolímeros)

A aplicação de polissacarídeos naturais no desenvolvimento de medicamentos tem sido de grande interesse para os pesquisadores devido à sua ampla disponibilidade, grande biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de dilatação e custo-efetividade (PRAJAPATI et al., 2014). O alginato de sódio, por exemplo, é há muito utilizado em sistemas de administração de medicamentos por sua capacidade de promover diferentes perfis de dissolução de medicamentos (KHAMES et al., 2014).

Este polissacarídeo polianiónico linear obtido a partir de algas marinhas contém grupos hidroxil e carboxil que fornecem hidrofilicidade à molécula e podem explicar o aumento que promovem na solubilidade do medicamento. No entanto, como o alginato de sódio diminui a eficiência de encapsulação e promove uma rápida degradação, os pesquisadores modificam quimicamente esse biopolímero com o objetivo de melhorar a encapsulação e prolongar o perfil de liberação (SINHA et al., 2014). O alginato foi transformado em derivado de amida, apresentando maior densidade de carga e consequente maior capacidade de transporte de GLIB. Essas propriedades favoreceram a dissolução e o sistema alginato modificado foi capaz de atingir uma liberação de 100% de GLIB, enquanto o alginato não modificado obteve uma liberação de 69,2%. As propriedades da superfície do biopolímero foram modificadas, o que afetou a molhabilidade, a solubilidade e a liberação de GLIB, mostrando seu potencial em superar os problemas de biodisponibilidade da GLIB (KHAMES et al., 2014).

Um estudo combinou goma de quiabo (*Hibiscus esculentus*) e alginato de sódio não modificado por gelificação iônica. A desintegração da estrutura do alginato no pH intestinal promoveu erosão e dissolução da matriz, levando à rápida dissolução da GLIB. O sistema incha, formando uma espessa camada de difusão capaz de sustentar a liberação de GLIB por 8 h. A liberação da GLIB seguiu um modelo cinético de ordem zero (tabela 5) (SINHA, UBAIDULLA, NAYAK, 2014).

Os biopolímeros também podem ser aplicados como adsorventes em sistemas sólidos. Quitosana e casca de café foram usadas como adsorventes para sistemas auto-emulsificantes. A casca de café serviu como um bioadsorvente e aumentou a superfície de ligação do GLIB, favorecendo sua dissolução. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram uma liberação de 98,91% de GLIB a partir da formulação otimizada de liberação sustentada. Esses resultados demonstram como os polímeros naturais podem ser usados para fins terapêuticos como bioadsorventes de baixo custo (SHAKEEL et al., 2014).

Outro tipo de sistema polimérico que foi estudado é o sistema micelar polimérico. O qual apresenta várias vantagens, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e multiplicidade de grupos funcionais. A goma xantana é um polissacarídeo hidrofílico derivado da bactéria *Xanthomonas campestris*, que possui grupos funcionais -OH que podem ser modificados quimicamente. Portanto, a goma xantana é um polissacarídeo promissor para a modulação da taxa de dissolução do medicamento e é considerada segura, pois é aprovada pelo FDA para uso como aditivo alimentar (BAKSHI, SADHUNKHAN, MAITI, 2015).

As micelas de polímero consistem em um núcleo hidrofóbico estabilizado por um invólucro de cadeias hidrofílicas expostas ao meio aquoso. Como resultado, as micelas de polímero podem proteger os medicamentos contra a inativação biológica (aumentando sua biodisponibilidade) e, do ponto de vista físico-químico, apresentam maior estabilidade do que as formulações lipídicas, pois possuem uma concentração crítica mais baixa de micelas do que os surfactantes. (KATAOKA, HARADA, NAGASAKI, 2001).

Maiti e Mukherjee (2014) modificaram a goma xantana para alterar o perfil de dissolução da GLIB. A alquilação (C-16) foi realizada para produzir micelas poliméricas e O-carboximetilação, para a formação de hidrogel. O sistema micelar promoveu uma mudança notável no perfil de liberação da GLIB, independentemente do meio simulado usado, seja ácido ou básico. O hidrogel, no entanto, apresentou liberação dependente do pH, promovendo menor liberação no meio ácido quando comparado ao meio básico. Os grupos carboxila do hidrogel tornam-se ionizados em valores mais altos de pH (meio intestinal), gerando uma força repulsiva entre as cadeias e levando a uma maior capacidade de liberação *in vitro* de GLIB. Este sistema é vantajoso, pois a GLIB é absorvida no intestino. No entanto, a dispersão micelar mostrou maior atividade hipoglicêmica *in vivo* em comparação com o hidrogel. Esse efeito pode ser atribuído à maior solubilidade da GLIB em micelas, o que aumenta sua biodisponibilidade.

Esses resultados estão de acordo com os relatados em outro estudo (MAITI, MUKHERJEE, 2014) no qual a adição de um grupo alquil à goma xantana também foi realizada para promover a formação de micelas poliméricas. O sistema core-shell aumentou a taxa de dissolução do GLIB em 122 vezes, atingindo o dobro da concentração em apenas 30 minutos. Bakshi et al. (2015) também usaram goma xantana carboximetilada em DS contendo Soluplus® e GLIB.

4.1.1.3 Sistemas co-amorfos proteicos

As principais estratégias para melhorar a dissolução de GLIB bem como para a maioria dos fármacos fracamente solúveis, com frequência, concentram-se na preparação de dispersões sólidas poliméricas. No entanto, sistemas co-amorfos têm sido utilizados como uma alternativa às dispersões sólidas poliméricas e cocristais. Os sistemas co-amorfos oferecem vantagens sobre as dispersões poliméricas sólidas devido à significativa higroscopicidade de alguns polímeros, que podem levar a instabilidades físicas após a exposição a alta umidade relativa. (NEUMAN, REUTZEL-EDENS, ZOGRA, 2018)

Sistemas co-amorfos de GLIB e sinvastatina com os aminoácidos ácido aspártico, lisina, serina e treonina produzidos por crioplastia foram investigados. (LAITINEN et al., 2014) Neste

estudo, observou-se que a formação do tautômero menos estável termodinamicamente estável do GLIB foi suprimida em relação à sua forma amorfa pura, aumentando a estabilidade física dos sistemas.

O estudo de estabilidade foi realizado semanalmente por três meses e as propriedades de estado sólido dos sistemas foram avaliadas. O fator estabilizador da GLIB foi a presença dos aminoácidos, que serviram como obstáculos para sua conversão em seu tautômero de ácido imídico menos estável, retardando a cristalização da GLIB. A importância deste estudo é evidente, pois é o artigo mais citado (21 citações) dos estudos analisados nesta revisão. Foi o primeiro a relatar a interferência de estruturas tautoméricas em sistemas co-amorfos. Além disso, os autores demonstraram como os aminoácidos são excipientes promissores para a formação de sistemas co-amorfos. (LAITINEN et al., 2014)

Outra nova abordagem usando aminoácidos é a entrega de medicamentos usando líquidos iônicos (ILs). ILs são sais no estado líquido compostos por íons e cátions. Eles se associam através de interações dipolo-dipolo para formar agregados ou complexos à medida que sua concentração é aumentada. Em outro estudo, o triptofano e a colina foram usados como veículo para fornecer GLIB, aumentando assim sua solubilidade. As interações foram investigadas pela análise de RMN e as alterações mais significativas corresponderam aos prótons aromáticos, sugerindo que sua associação com ILs ocorre através da formação de múltiplas ligações de hidrogênio e interações $\pi - \pi$ através do anel aromático. (ALAWI et al., 2015)

4.1.2 Sistemas lipídicos

Sistemas de emulsão e sistemas de nanoemulsão líquidos e sólidos foram os principais sistemas lipídicos utilizados nos estudos selecionados para aumentar a taxa de dissolução da GLIB. Notavelmente, um estudo empregou uma abordagem menos comum para sistemas de administração de medicamentos baseados em lipídios. Gautschi et al. (2015) desenvolveram dispersões líquidas de GLIB-fosfolipídios que compreendiam complexos na forma de DS com alta carga de drogas, uma conquista muito interessante para sistemas que fornecem drogas pouco solúveis (GAUTSCHI, HOOGEVEST, KUENTZ, 2015).

A DS foi obtida pela técnica de evaporação do solvente. Monoacil fosfatidilcolina (MPC) e diacil fosfatidilcolina (DPC) foram utilizados como lipídios. As diferenças entre os fosfolipídios foram evidenciadas pela análise das taxas de dissolução intrínseca em uma célula de fluxo contínuo e em ensaios in vivo (GAUTSCHI, HOOGEVEST, KUENTZ, 2015).

O MPC tendeu a formar micelas, o que promoveu melhor solubilização, contribuindo para as maiores taxas de dissolução dos sistemas de MPC. Os sistemas DPC, por outro lado, alcançaram taxas mais baixas de dissolução, pois eram capazes apenas de formar vesículas em vez de micelas (GAUTSCHI, HOOGEVEST, KUENTZ, 2015).

Esses testes demonstram a importância do tipo de matriz no desenvolvimento de um sistema de administração de medicamentos. O MPC é um pequeno fosfolípido de cadeia única que possui uma fração lipofílica menor que o DPC. Além disso, o MPC possui uma geometria molecular em forma de cone que permite a formação de micelas após a hidratação. No entanto, é necessário ser crítico quanto à capacidade de discriminação do método empregado. No mesmo estudo, os sistemas apresentaram eficiências variadas em testes *in vitro* e *in vivo*. Os sistemas DPC tiveram melhores resultados de teste *in vivo* do que os resultados *in vitro* devido à lipólise do DPC, o que leva à geração de MPC e, consequentemente, maior capacidade de formar micelas (GAUTSCHI, HOOGEVEST, KUENTZ, 2015).

Os pesquisadores desenvolveram uma forma de dosagem multiparticulada e de liberação sustentada, macromolecular, preparada a partir de DS de GLIB e metformina. Os sistemas DS foram desenvolvidos usando Gelucire 50/13 e PEG 200, 400, 4000 e 6000 em diferentes proporções como transportadoras (UPADHYAY, KUMAR, KUMAR, 2014). Sistemas bioadesivos são frequentemente usados para liberação sustentada; no entanto, matrizes lipídicas flutuantes também podem ser usadas para essa finalidade. Gelucires são polioxilglicerídeos ou macrogolglicerídeos que podem ser usados adequadamente em formulações flutuantes devido à sua alta hidrofiliabilidade e baixa densidade (JANNIN, MUSAKHANIAN, MARCHAUD, 2001).

O sistema multiparticulado foi preparado em várias proporções pelo método de fusão e passando por uma malha fina. As taxas de dissolução *in vitro* dos sistemas foram comparadas com as do Betanase®. A solubilidade aumentou proporcionalmente à concentração de Gelucire na DS, como resultado da formação de micelas pelo surfactante, promovendo a solubilização micelar (UPADHYAY, KUMAR, KUMAR, 2014).

A metformina também foi incorporada nas formulações para melhorar a resposta terapêutica dos pacientes. Um teste de estabilidade físico-química foi realizado durante três meses nas condições de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e 65% de umidade relativa. Não foram observadas alterações na estabilidade térmica do sistema. (UPADHYAY, KUMAR, KUMAR, 2014).

Uma correlação *in vitro-in vivo* (IVIVC) foi usada para selecionar os excipientes apropriados, otimizar os processos de fabricação para fins de controle de qualidade e caracterizar os padrões de liberação de novas formulações. Nos últimos anos, o conceito e a aplicação de IVIVC para formas de dosagem farmacêuticas ganharam atenção na indústria farmacêutica, em pesquisas científicas e em agências reguladoras (Tabela 5) (UPADHYAY, KUMAR, KUMAR, 2014).

4.1.3 Sistemas de tamanho nanométricos baseados em lipídios

Os sistemas nanoparticulados são amplamente utilizados porque suas nano dimensões aumentam a biodisponibilidade do medicamento. A aplicação combinada de nanotecnologia e formulações baseadas em lipídios vem ganhando atenção como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos, já que a dispersão quase molecular de moléculas de medicamentos em matrizes lipídicas e a presença de surfactantes aumentam fortemente a solubilização e absorção gastrointestinal *in vivo* (DURÁN-LOBATO, MARTIN-BANDERAS, DURA, 2015; VITORINO et al., 2011).

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) surgiram como alternativas a outros sistemas, como nanoemulsões, micelas, lipossomas e sistemas de polímeros, por sua alta capacidade de carga de medicamentos, proteção contra degradação e modulação de liberação. (KUMAR et al., 2014; MEHNERT, MADER, 2001) Gonçalves et al. (2016) desenvolveram SLN usando Precirol® e lecitina pela técnica de evaporação do solvente. O sistema apresentou liberação sustentada *in vitro*, atingindo 100% de liberação após 24 h. O sistema também teve um efeito hipoglicêmico *in vivo* maior que o da GLIB pura, alcançando uma redução mais rápida da glicemia e uma duração mais longa do efeito. Esses resultados positivos indicaram que a abordagem SLN proposta foi bem-sucedida em melhorar a biodisponibilidade oral da GLIB, confirmando seu potencial como um sistema de administração eficaz para uma terapia adequada para diabetes.

Recentemente, formulações orais baseadas em sistemas de distribuição de fármacos auto-microemulsificantes (SMEDDS), sistemas de distribuição de fármacos auto-nanoemulsificantes (SNEDDS) e sistemas de distribuição de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) foram investigadas como veículos em potencial para otimizar a dissolução, permeação e biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis. Alguns pesquisadores investigaram a influência de surfactantes e co-surfactantes na eficiência de emulsificação do SEDDS. (ALBERTINE et al., 2014; SHAKEEL et al., 2014a, SHAKEEL et al., 2014b)

Testes demonstraram que surfactantes com altos balanços hidrofílicos-lipofílicos (HLB) como Labrasol®, Gelucire 44/14, Tween 80 e Cremophor EL são adequados para sistemas de auto-nanoemulsificação ou auto-microemulsificação e formulações preparadas com Labrafil verificou-se que o M1944CS era estável em todas as etapas dos testes de estabilidade termodinâmica. (SHAKEEL et al., 2014)

A influência do co-surfactante etanol e Transcutol HP nas formulações foi avaliada. O transcutool apresentou vantagens sobre o etanol devido à menor volatilidade nas cápsulas e consequente maior estabilidade. No entanto, as formulações contendo etanol foram consideradas mais eficientes como resultado de sua capacidade de reduzir efetivamente a tensão interfacial. O etanol produz um filme interfacial flexível, que leva a uma redução na tensão interfacial, resultando em SNEDDS ou SMEDDS estáveis (SHAKEEL et al., 2014a).

Os estudos de liberação mostraram que a taxa de dissolução está associada ao tamanho das gotículas dos sistemas. O SEDDS teve uma liberação de 73,2% em 60 minutos e o SNEDDS teve uma liberação de 88,8% no mesmo período. Assim, os resultados dos estudos de liberação de drogas *in vitro* estavam de acordo com os do teste de auto-nanoemulsificação; a maior liberação de GLIB no SNEDDS deveu-se ao menor tamanho das gotículas, menor viscosidade e, possivelmente, maior área superficial alcançada com esse tipo de sistema (SHAKEEL et al., 2014a).

Os pesquisadores também desenvolveram sistemas nanoemulsificados e compararam sua eficiência à dos comprimidos GLIB comercializados. A capacidade de solubilização do surfactante contido na formulação permitiu a liberação mais rápida, atingindo mais de 75% de liberação em 5 minutos em PBS (pH 7,4), enquanto os comprimidos disponíveis comercialmente liberaram apenas 43,2% de GLIB (LIU ET AL., 2014).

O estudo farmacocinético em cães corroborou com os resultados *in vitro*, pois foi observado um aumento de 1,5 vezes na área sob a curva (AUC) após a administração oral de SNEDDS. Os autores também acreditavam que essa biodisponibilidade aumentada poderia ser atribuída à capacidade do Cremophor® RH e Tween 80 de inibir transportadores de efluxo ABC e proteínas de resistência a múltiplas drogas, pois pode ocorrer efluxo de drogas por esses compostos nas células intestinais e hepáticas. Portanto, a inibição do efluxo pode ter contribuído para os resultados *in vivo*, promovendo uma absorção aumentada. No entanto, essas contribuições precisam ser testadas para verificar sua influência no desempenho da liberação de medicamentos (LIU et al., 2014).

Em geral, a escolha do surfactante baseia-se em sua capacidade de solubilizar GLIB e emulsificar o sistema. Os surfactantes com maiores valores de HLB apresentaram melhor capacidade de emulsificação, pois sua hidrofiliabilidade permitiu a rápida e fácil dispersão da fase oleosa na fase aquosa, produzindo uma emulsão muito fina de óleo em água.

O uso preferencial de surfactantes não iônicos em relação aos surfactantes iônicos foi observado nos artigos citados nesta seção, pois geralmente são considerados mais seguros e fornecem melhor estabilidade da emulsão em uma ampla faixa de valores de pH e força iônica (NAZZAL et al., 2002). Além disso, os surfactantes não iônicos produzem alterações reversíveis na mucosa gastrointestinal facilitando a permeabilidade e absorção da GLIB.

Formulações à base de lipídios permitem que o fármaco permaneça em estado dissolvido por todo o trato gastrointestinal, resultando em melhor permeação através da membrana intestinal (POUTON, 2000). Os SNEDDS são geralmente administrados como cápsulas duras ou moles, que podem interagir com a formulação ou causar uma distribuição não uniforme da dose. Assim, a conversão de formulações líquidas em formulações sólidas pode resolver os problemas acima mencionados.

Bari et al. (2014) desenvolveram SNEDDS adsorvidos no Aerosil 200. Os estudos de liberação de drogas *in vitro* mostraram uma melhora significativa na taxa de dissolução da GLIB atingindo uma liberação completa após 30 minutos, enquanto a GLIB pura liberou apenas 20% após 30 minutos. Além disso, uma redução significativa nos níveis glicêmicos observados nos testes *in vivo* sugere que o pó preparado pode ter um efeito terapêutico maior em comparação com o fármaco puro. O Aerosil 200 foi considerado um bom transportador, pois sua alta área de superfície promove boa adsorção para a conversão de formulações líquidas em pós (BARI et al., 2014).

4.1.4 Administração de GLIB por medicamentos usando materiais inorgânicos

Considera-se que sistemas inorgânicos contendo Neusilin® melhoram a dissolução de partículas de GLIB, eles podem ser utilizados como agentes de umidade e espessantes, além disso, Neusilin® pode ser utilizado para adsorção, pois apresenta grupos silanol em sua superfície, o que o torna potencial doador de prótons, bem como um aceitador.

O Neusilin® UFL2 é um aluminossilicato sintético de magnésio comumente usado em formulações sólidas como diluente para melhorar a qualidade de comprimidos, pós, grânulos e

cápsulas. Este composto foi recentemente testado como transportador devido à sua capacidade de amorfização sob co-moagem (VAGHELA, KULKARNI, 2015; REDDY et al., 2014; THONGNOPKOON, PUTTIPIATKHACHORN, 2014) e granulação por fusão a quente. (LOU et al., 2013; GUPTA, VANWERT, 2003)

Censi et al. (2015) desenvolveram dispersões sólidas nanométricas de GLIB micronizadas com Neusilin® UFL2 (aluminometasilicato de magnésio amorfo) em porcentagens variadas e na presença de polissorbato 80. Até uma dada razão droga/transportador, a GLIB foi liberada por difusão através do transportador, como ocorre quando o transportador é insolúvel e não intumescível, como Neusilin. No entanto, em sistemas com uma porcentagem maior de Neusilin® UFL2, a liberação da GLIB era controlada pela dissolução do transportador. Além de alterar o perfil de dissolução da GLIB como resultado do aumento das porcentagens de Neusilin®, os sistemas mostraram um grande potencial para promover taxas de dissolução mais altas como resultado da amorfização da GLIB (CENSI et al., 2015).

Matrizes inorgânicas também podem ser usadas para melhorar a estabilidade e as propriedades tecnológicas dos sistemas convencionais de administração de medicamentos. Cirri et al. (2016) desenvolveram SMEDDS de GLIB e Neusilin®, nos quais o Neusilin® foi usado como um adsorvente para melhorar as propriedades da microemulsão (CIRRI et al., 2016).

As microemulsões apresentaram baixa estabilidade por causa da oxidação dos lipídios durante o armazenamento, bem como problemas de incompatibilidade quando transportados em cápsulas de gelatina. A adsorção no Neusilin® tornou possível combinar os benefícios da microemulsão, como a dissolução aprimorada de GLIB, com os de formas farmacêuticas sólidas, como maior estabilidade de armazenamento e facilidade de manuseio e embalagem.

Além disso, a comparação entre a microemulsão líquida e a forma sólida evidenciou que a taxa de dissolução da forma sólida aumentou devido às propriedades de Neusilin®, que promoveram um aumento na área superficial efetiva dos sistemas, propriedades de umedecimento e amorfização da GLIB. Essas propriedades permitiram a rápida dissolução da GLIB e reduziram os processos de precipitação do medicamento após o contato com o meio de dissolução.

Este artigo foi um dos mais citados entre os estudos sobre sistemas inorgânicos (6 citações), isso mostra que a estratégia proposta pode ser empregada com sucesso no desenvolvimento de comprimidos de liberação rápida de outros medicamentos pouco solúveis, possibilitando

combinar a solubilidade e dissolução dos sistemas tradicionais de administração de medicamentos com as propriedades de matrizes inorgânicas como o Neusilin®.

Novos métodos associados a matrizes inorgânicas podem ser utilizados no desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos para obter vantagens tecnológicas. Recentemente, a aplicação do SCF no desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos vem ganhando atenção, sendo utilizada em medicamentos de classe II como o GLIB, pois evitam a coalescência de partículas e reduzem o diâmetro de medicamentos pouco solúveis, contribuindo para o aumento de sua taxa de dissolução (MICHAEL et al., 2002; REVERCHON et al., 2009).

Guan et al. (2014) desenvolveram sistemas DS contendo GLIB e sílica comercial usando dióxido de carbono fluido supercrítico (CO₂). A mistura física de GLIB e sílica foi submetida a CO₂ supercrítico e as formulações DS foram convertidas em comprimidos. A análise *in vitro* dos sistemas revelou uma liberação mais rápida de GLIB em comparação com a do medicamento comercial micronizado. Os resultados dos testes *in vivo* corroboraram com os resultados *in vitro*; a AUC dos comprimidos compostos foi 2,01 vezes maior que a dos comprimidos comerciais GLIB micronizados (GlynasePresTab®) (GUAN et al., 2014).

Além de melhorar a taxa de dissolução da GLIB, a principal vantagem dos sistemas baseados em líquidos supercríticos é o não uso de solventes orgânicos, diferindo dos métodos convencionais de preparação de DS. Atualmente, a escolha de métodos e materiais amigos da natureza recebeu muita atenção da comunidade científica, justificando o grande número de citações neste artigo (8 citações) (REVERCHON et al., 2009).

4.2 ORIGEM DAS PUBLICAÇÕES E FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

A Tabela 7 apresenta uma lista de instituições às quais os autores dos artigos selecionados foram afiliados. Pesquisadores afiliados a instituições de ensino e pesquisa na Índia foram a maioria.

Tabela 7-Lista de instituições às quais os autores dos artigos selecionados foram afiliados, por país.

País	Instituições às quais os autores dos artigos selecionados foram afiliados	País	Instituições às quais os autores dos artigos selecionados foram afiliados
Albania	University of Medicine	India	Dr. K. N. Modi Institute of Pharmaceutical Education and Research
China	Shenyang Pharmaceutical University	India	Jiwaji University
Denmark	University of Copenhagen	India	Institute of Professional Studies-College of Pharmacy
Egypt	Beni-Suef University	Iran	Isfahan University of Medical Sciences
Egypt	University of Tanta	Italy	University of Florence
Finland	University of Eastern Finland	Italy	UOC Farmaceutica Territoriale
Finland	University of Helsinki	Italy	Menarini Manufacturing Logistics and Services
Germany	Phospholipid Research Center	Italy	University of Bologna
India	Gupta College of Technological Sciences	Italy	University of Camerino
India	School of Pharmacy (Lalitha College of Pharmacy)	Japan	Chiba University
India	National Institute of Pharmaceutical Education and Research, NIPER	Jordan	Applied Science University
India	IFTM University	Jordan	University of Jordan
India	Uttar Pradesh Technical University	Jordan	TQ Pharma
India	IIT-Banaras Hindu University, BHU	Malaysia	Asian Institute of Medicine Science and Technology
India	C. L. Baid Metha College of Pharmacy	Portugal	University of Lisbon
India	Seemanta Institute of Pharmaceutical Sciences	Saudi Arabia	Taif University
India	Annamacharya College of Pharmacy	Saudi Arabia	King Saud University
India	National College of Pharmacy	Switzerland	University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland
India	Bengal College of Pharmaceutical Science and Research	Thailand	Mahidol University
India	Acharya & BM Reddy College of Pharmacy	UK	Keele University
India	JSS University of Higher Education & Research	USA	Western University of Health Sciences
India	Aditya Bangalore Institute for Pharmacy Education & Research		

Fatores epidemiológicos podem nos ajudar a entender esses dados, pois vários países asiáticos têm altas taxas de DM. A Índia é um dos epicentros dessa epidemia global, tendo o segundo maior número de diabéticos no mundo (69 milhões de indivíduos em 2015) (DIFFERDING, 2017).

Vários dos artigos indicam determinantes genéticos (disfunção das células β) e ambientais, como desnutrição materna, hábitos alimentares e padrões de consumo como fatores que corroboram com a alta prevalência dessa doença na Índia (JOSHI, GISG, 2016). Uma publicação recente da Nature traçou o perfil do país e demonstrou como a alta incidência de DM e suas complicações são um grave problema de saúde pública. Como resultado, vários centros de pesquisa estão buscando alternativas terapêuticas para o DM, especialmente o DM II, que afeta a maioria dos pacientes e responde pela maior parte do mercado de medicamentos para diabetes justificando em parte, o grande interesse dos pesquisadores pelo tema, podendo ser esse fato um indicador, mas não os explicando em sua totalidade. (UNNIKRISHNAN, ANJANA, MOHAN, 2016)

A tabela 8 apresenta os periódicos em que os artigos foram publicados e a tabela 9 mostra a lista das palavras mais frequentes nos artigos selecionados.

Tabela 8- Número de artigos selecionados por periódico.

Revista	Número de artigos selecionados por jornal
AAPS PHARMSCITECH	1
ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY	1
DHAKA UNIVERSITY JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES	1
DRUG DELIVERY	1
DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY	2
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS	3
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	4
INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	2
INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY AND TECHNOLOGY	1
JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY	2
JOURNAL OF MICROENCAPSULATION	3
JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS	1
MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS	1
MOLECULAR PHARMACEUTICS	2
PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY	2
POWDER TECHNOLOGY	1
RESEARCH IN PHARMACEUTICAL SCIENCES	1
RSC ADVANCES	1

Tabela 9- Frequência das palavras mais usadas no título, resumo e conclusão dos artigos selecionados.

Palavras mais citadas no título		Palavras mais citadas no resumo		Palavras mais citadas na conclusão*	
Word	Frequency	Word	Frequency	Word	Frequency
Glibenclamide	19	Drug	128	Drug	107
Drug	10	Dissolution	52	Dissolution	47
Solid	8	Release	47	Solid	35
Dissolution	7	Glibenclamide	44	Release	32
Characterization	6	Solid	39	Glibenclamide	25
Using	6	Amorphous	30	Formulation	25
Delivery	6	Formulations	29	Dispersion	22
Oral	6	Prepared	26	Can	21
Release	5	Study	25	Rate	21
Dispersions	4	Using	25	Amorphous	20
Controlled	4	Self	23	Prepared	18
Vitro	4	Solubility	22	Formation	17
Development	4	Drugs	20	Results	17
Evaluation	4	Water	20	Study	16
Technique	3	HPMC	19	Properties	16

* O artigo 21 (SHAKEEL et al., 2014) não foi considerado nesta análise, pois não apresentava uma seção separada “Conclusão”.

As Tabelas 7 e 8 oferecem uma visão resumida do tópico durante um determinado período (2014–2016). Essa é uma das técnicas de mineração de texto mais conhecidas. Em relação ao presente estudo, são revelados os periódicos que mais se interessaram pela dissolução do GLIB e as palavras mais frequentemente relacionadas a esse tópico.

Embora outros estudos de revisão tenham analisado volumes maiores de artigos por períodos mais longos, a presente revisão mostra os resultados de trabalhos recentes que foram cuidadosamente analisados e selecionados. Isso levou a uma redução significativa do número de artigos selecionados. Estudos futuros devem expandir o período analisado pela mineração de texto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo combinou DT e uma revisão sistemática da literatura para apresentar uma revisão abrangente dos estudos mais recentes sobre estratégias para contornar a baixa solubilidade da GLIB. Dos 1.619 artigos recuperados, 34 artigos preencheram os critérios estabelecidos e foram analisados na íntegra.

Os sistemas poliméricos têm sido uma das principais estratégias utilizadas para melhorar a dissolução da GLIB devido ao seu efeito solubilizante e porque podem promover a

transformação completa ou parcial da GLIB em sua forma amorfa. Foi observada uma melhora nas taxas de dissolução de sistemas com GLIB compostos por HPMC ou etilcelulose como resultado da formação de dispersões moleculares. A tautomerização da GLIB em sistemas contendo PVP ou Eudragit® e a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas foram outras estratégias adotadas para melhorar a sua dissolução. As técnicas que podem ser usadas para formar sistemas poliméricos são diversas.

Os polissacarídeos naturais foram amplamente aplicados nos sistemas de distribuição devido à sua disponibilidade, biocompatibilidade e capacidade de expansão. Além disso, a estrutura dos polissacarídeos naturais pode ser modificada para melhorar suas propriedades, como por alquilação da goma xantana para modular a liberação do medicamento, derivação amídica do alginato para aumentar sua capacidade de transporte de GLIB e O-carboximetilação da goma xantana para obter um pH sensível à radiação para proteção do GLIB contra fluidos gástricos.

Os sistemas de administração de medicamentos à base de lipídios, como sistemas emulsificados e nanoemulsificados, foram extensivamente investigados devido à sua capacidade de manter a GLIB em solução em todo o trato gastrointestinal, resultando em uma permeação melhorada através da membrana intestinal e, conseqüentemente, aumentando a biodisponibilidade da GLIB.

Apesar das vantagens oferecidas pelos sistemas à base de polímeros/biopolímeros e lipídios, a baixa estabilidade térmica, termodinâmica ou física (higroscopicidade) de alguns polímeros e os problemas de estabilidade enfrentados pelos sistemas lipídicos, como oxidação durante o armazenamento, são fatores negativos que devem ser observados e considerados no desenvolvimento de tais sistemas. Conseqüentemente, sistemas mais elaborados como aqueles que contêm micelas poliméricas e matrizes menos tradicionais, como proteínas, surgem como alternativas para suas vantagens na estabilidade física.

Matrizes inorgânicas também foram estudadas para melhorar a estabilidade e as propriedades tecnológicas dos sistemas convencionais de administração de medicamentos. Os materiais aluminossilicatos, como Neusilin®, são transportadores insolúveis e não intumescíveis que podem ser usados como adsorventes para aumentar a área efetiva da superfície dos sistemas, melhorando a umidificação e a amorfização da GLIB fornecem reforço térmico e permitem a preparação de produtos farmacêuticos sólidos mais estáveis.

Cada sistema apresenta particularidades e vantagens que devem ser pesadas pelo pesquisador para obter um sistema que atinja boa capacidade de transporte da GLIB, taxa de

dissolução e estabilidade. Os custos de cada material, a técnica empregada e outros excipientes que podem ser usados em cada sistema também devem ser considerados.

O presente estudo procurou aplicar uma combinação de DT e uma revisão sistemática da literatura para apresentar as estratégias atuais usadas para desenvolver sistemas de administração GLIB, bem como orientar e incentivar estudos futuros e programas de acompanhamento farmacoterapêutico do DM II.

5.2 ARTIGO II: VISÃO GERAL E PERSPECTIVAS DA GLIBENCLAMIDA: UMA ANÁLISE DOS SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS DESCRITOS NAS PATENTES

1 REFERENCIAL TEÓRICO

O diabetes mellitus II (DM II) é a quinta causa de morte no mundo e está intrinsicamente associada a várias complicações, o tratamento destas complicações como cardiopatias, retinopatia, nefropatias e amputações ocasiona grandes gastos aos pacientes e redução da capacidade produtiva, pois pacientes portadores do DM I e II apresentam redução de 20 e 10 anos na média de vida em relação a não diabéticos (MILLER, COSTACOU, ORCHAD, 2019; RAMAN et al., 2014; HOSSEININASAB et al., 2014; FOWLER, 2008; GROSS et al., 2005).

Além disso, a Organização Mundial da Saúde estima que o diabetes é uma das doenças mais letais e foi responsável por pelo menos 3 milhões de mortes por ano em todo o mundo (WIL et al., 2004). O medicamento de escolha para o tratamento inicial do DM II é a metformina, no entanto, metade dos pacientes que atingem o controle glicêmico com monoterapia requerem a associação de outro medicamento dois anos depois em virtude do caráter progressivo da doença, desta forma, o fármaco glibenclamida (GLIB) torna-se bastante utilizada na prática clínica (LEÃO et al., 2019a,b; CLEMENS et al., 2015; LOHITHASU et al., 2013).

No entanto, a glibenclamida é um hipoglicemiante oral que possui variação na biodisponibilidade, em decorrência de sua baixa solubilidade, podendo resultar no comprometimento do tratamento farmacológico do DM II. Em decorrência deste fator a GLIB é bastante estudada em *Drug Delivery System* (DDS) que buscam melhorar suas propriedades de taxa de dissolução (MUKHERJEE et al., 2020; CLEMENS et al., 2015).

No capítulo I, foi apresentada a prospecção utilizando a metodologia *Data Base Tomography* com artigos sobre a glibenclamida (1.619 artigos foram encontrados), nos quais observaram-se vários tipos de matrizes (polímeros, proteínas, lipídeos e matrizes inorgânicas) e tecnologias empregadas para melhorar sua taxa de dissolução. No entanto, dados sobre as principais tecnologias e abordagens desenvolvidas por empresas ou universidades e que são patenteáveis ainda não foram analisadas, além disso, este tipo de abordagem para a análise de produtos farmacêuticos ainda é pouco explorado (LEÃO et al., 2019b).

As patentes são outorgas concedidas pelo Estado que permitem o monopólio temporário para exploração comercial de uma tecnologia. A obtenção de patentes permite que:

(a) os solicitantes e inventores obtenham um bônus por inicialmente terem investido em P&D;

(b) recuperem os recursos investidos;

(c) obtenham lucro (LEMLEY, FELDMAN, 2016; BHATTACHARYA, SAHA, 2011). Nesse sentido, estão associadas à inovação, pois incentivam o surgimento de novas tecnologias (VAN, EISENKOT, 2017; BHATTACHARYA S, SAHA, 2011; MOSER, 2013).

As patentes se constituem em relevante fonte de informação tecnológica (prospecção) para empresas, especificamente inteligência competitiva e foresight (ALDERING, LEKER, SONG, 2019; GAO, 2018; KIM, IM, JUN, 2017; CHANG, FAN, 2016; BREITZMAN, THOMAS, 2015). Pois, podem ser utilizadas na análise do surgimento, monitoramento e "morte" (obsolescência) de tecnologias (KIM, IM, JUN, 2017; CHANG, FAN, 2016; COLOMBELLI, KRAFFT, QUATRARO, 2014), incluindo o estudo nas áreas de Química (SJÖGREN et al., 2018; BARTH, 2018) e Farmácia (SJÖGREN et al., 2018; HORNE, KINSTRIE, COPLAND, 2015; ALMARSSON, PETERSON, ZAWOROTKO, 2012; SINGH, MITAL, KAUR, 2016). Além disso, podem ser fonte de informação tecnológica para o desenvolvimento de pesquisa acadêmica (REYMOND, QUONIAM, 2016). A análise de patentes, juntamente com a análise de artigos científicos e outros documentos pode fundamentar a construção de relatórios para a obtenção do estado da arte de tecnologias (AALDERING, LEKER, SONG, 2019; GAO et al., 2013).

Ao contrário de boa parte das plataformas e editoras relacionadas com revistas científicas, existe uma série de bancos de patentes de livre acesso para download dos documentos, sendo este um fator relevante. Além disso, algumas plataformas, gratuitas e pagas, permitem efetuar a busca em bases de dados de diferentes países de uma só vez. O que permite ganhar tempo na consulta das informações.

1 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou realizar uma prospecção em patentes buscando-se traçar o perfil das principais estratégias desenvolvidas por empresas para melhorar a taxa de dissolução da glibenclamida, na qual foram analisadas as matrizes e excipientes utilizados, as técnicas e as reivindicações destes documentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a coleta das informações das patentes foi utilizado o sistema Derwent World Patents Index (DWPI) (DWPI, 2020), o qual aglutina o conteúdo das bases de patentes de diversos países de forma padronizada permitindo uma maior eficiência e abrangência da busca de anterioridade tecnológica.

Foi elaborada uma estratégia de busca com base em termos da área do conhecimento e das tecnologias relacionadas ao tema. Na estratégia, limitou-se ao período de 2000 a 2016. A busca foi efetuada em novembro de 2017 e realizada por meio da opção de “busca avançada”, com a base no tópico, utilizando os termos "Drug Delivery Systems", "Glibenclamide", "Glyburide", "Biological Availability", "Solubility", "Dissolution". Para otimizar o refinamento da busca, foi efetuado o recurso de truncamento da primeira com a segunda busca, por meio do operador booleano “AND”.

Foram considerados como critérios de exclusão: patentes que tratassem exclusivamente de métodos analíticos, estudos apenas sobre eficácia e/ou toxicidade clínica ou pré-clínica ou que não estejam dentro do escopo do trabalho. Como critérios de inclusão, foram consideradas as patentes onde: (1) o inventor descreveu diretamente (fez menção no título e/ou resumo) que a invenção esteve associada a Glib; e (2) o inventor apenas citou a Glib na seção de reivindicações, como medida de proteção para este fármaco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de busca revelou um total de 80 pedidos de patentes. (Tabela 10)

Tabela 10-Descrição da estratégia de buscas e resultados.

BUSCA	Syntax da busca	Nº de Patentes
1	TS= (“Biological Dissolution” Availability” OR “Solubility” OR	93.703
2	TS= (“Drug Delivery Systems” and “glibenclamide” OR “Glyburide”	658
3	Combinação (1 AND 2)	80

Inicialmente foi realizada a análise do título e resumo das 80 patentes, das quais, 46 foram excluídas por não tratarem de técnicas e ou processos envolvendo a GLIB. As 34 patentes selecionadas na primeira etapa foram avaliadas na íntegra. Das 34 patentes selecionadas pelos critérios de inclusão e exclusão, 28 patentes apenas citam a GLIB nas reivindicações (tabela 11) e 6 patentes efetuaram testes com a GLIB, a estas foi dada ênfase na análise dos resultados do presente estudo.

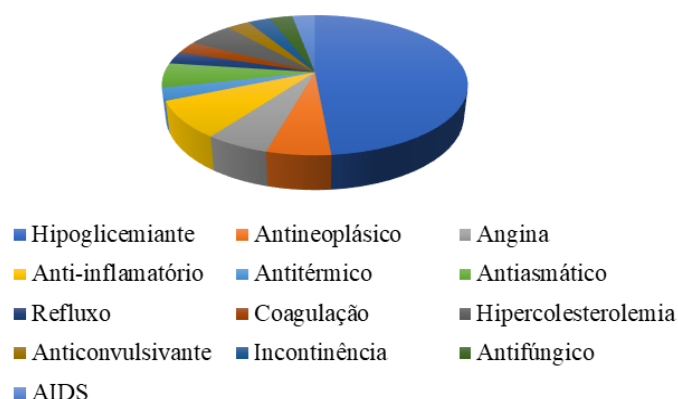
Tabela 11- Dados gerais sobre patentes que não mostraram evidências experimentais com GLIB.

WO2008140461-A1	Metformine	Oral hypoglycemic	Tablet (Product)
WO2007036671-A2	Metformine e Acyclovir	Oral Hypoglycemic and AIDS Treatment	pH-responsive polymeric microparticles (Product)
WO2008008120-A1	Ibuprofen, acetaminophen, ketoconazole	Anti-inflammatory, antipyretic and antifungal	Film making process (Product and process)
WO2007004236-A2	Atorvastatin	Treatment of hypercholesterolemia	Structural change of drugs to alter solubility (Product)
WO2010033179-A1	Bicalutamide	Antineoplastic	Reverse wet granulation process (Process)
WO2007086929-A1	Prototype drug	-	(Product and Process)
WO2008140460-A1	Theophylline	Antiasthmatic	Polymeric blend of HPMC. (Product)
WO2003066028-A1	Metformine e glimepiride	Oral hypoglycemic	Particle size and coating reduction
WO200000179-A1	Solid dispersion containing cisapride	Treatment of gastroesophageal reflux	Solid dispersion
WO2003106382-A2	vitamin K (phytomenadione), paclitaxel	Coagulation disorders, Cancer treatment	Nanostructured fluid (Product)
WO2005105044-A1	Glipizida.	Oral hypoglycemic	Complexation with cyclodextrins (Process)
WO2003026637-A2	Metformine	Oral hypoglycemic	Hydrogels
KR2008092885-A	Metformine e glimepiride	Oral hypoglycemic	Polymeric system with cellulose derivatives (Product)
WO2005053612-A2	Fenofibrate, topiramate and carbamazepine	Treatment of hypercholesterolemia, anticonvulsant and antidepressant	Micelas (Product)
WO2006022759-A1	Theophylline, diltiazem, diclofenac	Anti-asthmatic, anti-anginal, Anti-inflammatory	Formed by polymers that control the release. (Product)
WO2014161815-A1	Drugs, vitamins, nutraceuticals and cosmetics	-	Polymeric system based on glycogen and glucose. (Product)
WO2003063834-A1	Oxybutynin	Treatment of urinary incontinence	The system was coated with HPMC and ethyl cellulose. (Product)
US2002164371-A1	Isosorbide	Treatment of angina	Polymeric system (Product)
WO2005123134-A2	Metformine	Oral hypoglycemic	Polymeric system - cellulose derivatives (Product)
WO2005053612-A2	Fenofibrate, topiramate and carbamazepine	Treatment of hypercholesterolemia, anticonvulsant and antidepressant	Micelas (Product)
WO2006022759-A1	Theophylline, diltiazem, diclofenac	Anti-asthmatic, anti-anginal, Anti-inflammatory	Formed by polymers that control the release. (Product)
WO2014161815-A1	Drugs, vitamins, nutraceuticals and cosmetics	-	Polymeric system based on glycogen and glucose. (Product)
WO2003063834-A1	Oxybutynin	Treatment of urinary incontinence	The system was coated with HPMC and ethyl cellulose. (Product)
US2002164371-A1	Isosorbide	Treatment of angina	Polymeric system (Product)
WO2005123134-A2	Metformine	Oral hypoglycemic	Polymeric system - cellulose derivatives (Product)

Podemos atribuir o maior percentual de patentes que não realizaram testes com a GLIB às características próprias das patentes, pois elas buscam proteger, através das reivindicações, uma grande quantidade de aplicações ou substâncias de uma formulação mesmo não realizando, de fato, testes com todos os objetos protegidos.

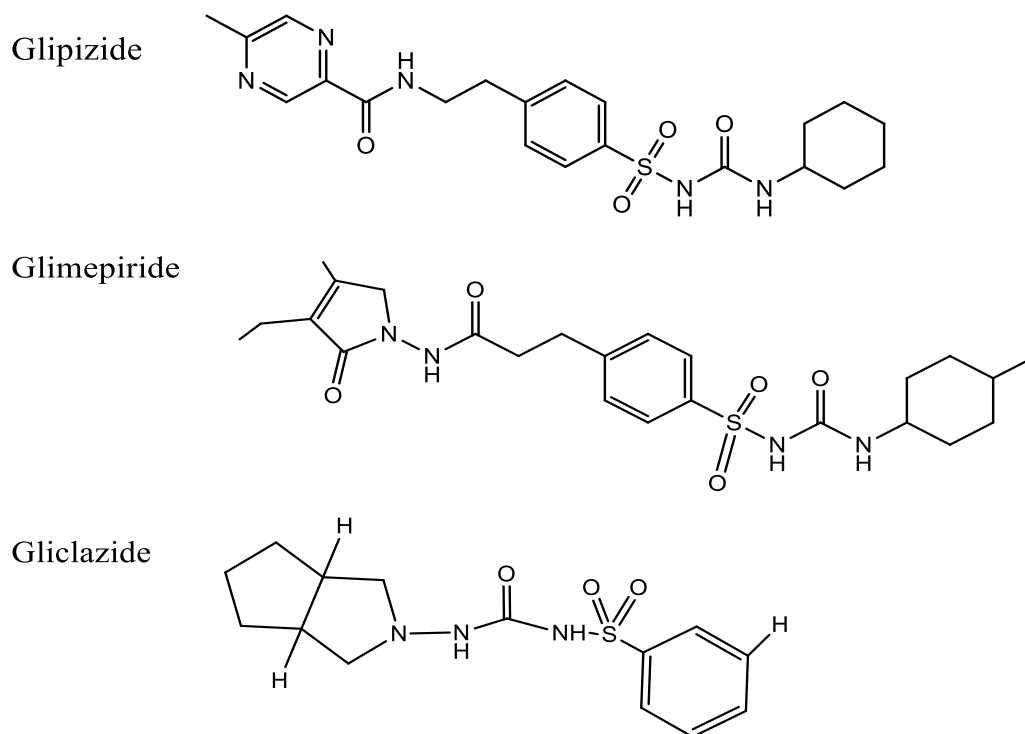
A figura 8 contém o perfil das classes terapêuticas abrangidas nas patentes, observa-se que os depositantes não levam em consideração as especificidades químicas e físico-químicas das moléculas contidas nas diferentes classes terapêuticas, fato importantíssimo e que pode comprometer os métodos e produtos.

Figura 8- Distribuição das patentes quanto a classe terapêutica dos fármacos - modelo utilizados.



Apenas 3 fármacos, de todos os protegidos nas patentes, são da mesma classe terapêutica da GLIB apresentando, portanto, semelhança estrutural (estrutura química) com ela. A glipizida, glimepirida e gliclazida (figura 9), assim como a GLIB, são sulfoniluréias e possuem o grupamento sulfonilurético com uma substituição do anel fenílico característico (YURIEV; KONG; ISKANDER, 2004). Para estes fármacos a semelhança química poderia ser utilizada como justificativa para serem incluídos nas reivindicações, mesmo que ainda possam apresentar pequenas distinções de performance nos produtos.

Figura 9- Estruturas químicas dos fármacos hipoglicemiantes da classe das sulfoniluréias.



Fonte: autoria própria, desenho obtido através do software Marvin®.

É importante acrescentar que este fato abre a possibilidade de outras empresas conseguirem o patenteamento de produtos ou métodos citados nas reivindicações das demais patentes caso realizem, concretamente, os testes e experimentos utilizando a GLIB.

A tabela 12 contém as informações gerais das patentes que fizeram testes com a GLIB e a tabela 13 resume as informações mais detalhadas sobre a classificação destas patentes, as metodologias utilizadas e os principais resultados

Tabela 12-Dados gerais das patentes que utilizaram glibenclamida.

Registro da Patente / Kind Codes	TÍTULO	País/ano de inscrição prioritária	Depositante	IPC
WO2003043603-A1 (International application published with ISR)	Pharmaceutical composition useful for oral drug delivery comprises amorphous hollow particles containing poorly soluble agents embedded within the walls of the particles	USA/2001	ADVANCED INHALATION RES INC	A61K-009/14; A61K-009/16; A61K-031/58
WO2006109175-A2 (International application published with ISR)	Solid oral dosage form of glyburide having a specific particle size distribution, useful for the treatment of type II diabetes	ÍNDIA/2005	AUROBINDO PHARMA LTD	A61K-031/64; A61K-009/14; C07C-311/59; A61K-000/00; A61K-031/155
US2005260274-A1 (Patent Application Publication)	Preparation of nanoparticles of bioactive agent comprises selecting solvent composition and deposition substrate; preparing solution of agent in solvent composition; applying solution to substrate as droplets and evaporating the solution	USA/2001	HEWLETT-PACKARD DEV CO LP(HEWP-C) e PESSOA FÍSICA	A61K-009/20; A61K-009/14; A61K-009/51; A61K-009/28; B05D-003/00; B29B-009/00
US2001036479-A1 (Patent Application Publication)	Use of glyburide having a defined particle size distribution in the treatment of type II diabetes	USA/2000	PESSOA FÍSICA	A61K-009/48; A61K-009/14; A61K-009/20
US2007098802-A1 (Patent Application Publication)	Preparation of organic nanoparticles, useful to treat medical and veterinary conditions, comprises generating mixture of organic material and liquids, adding liquid to mixture and precipitating organic material to form nanoparticles	USA/2005	PESSOA FÍSICA	A61K-031/337; A61K-031/401; A61K-031/43; A61K-031/56; A61K-031/573; A61K- 031/7034; A61K- 031/7048; A61K-038/13; A61K-009/14
US2005260273-A1 (Patent Application Publication)	Preparation of deposited bioactive agent which is medicament, by preparing solution of bioactive agent in solvent composition, and applying solution to substrate as droplets where evaporation of solution produces bioactive agent particles	USA/2001	HEWLETT-PACKARD DEV CO LP(HEWP-C) e PESSOA FÍSICA	A61K-009/14; G01N-000/00; A61J-003/00; A61K-009/20; A61K-009/70

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 13-Análise das patentes que utilizaram glibenclamida (comprovação experimental).

Patent Registration	Patent Type	Description of the main advantages	Dissolution rate increase	Development stage / Tests
WO2003043603-A1	Product	Micronized system obtained by Spray Drying	Comparison of pharmacokinetics between the protected product and Glinase® in vivo (rats)	Experimental proof of concept with the presentation of in vitro tests
WO2006109175-A2	Product and process	Micronized system in association with Metformin. Process for preparing solid dosage forms involving micronization and dry granulation (slugging, compaction), wet granulation and direct compression.	In vivo bioequivalence studies were performed in comparison to MICRONASE® 5 mg tablets as a reference.	Experimental proof of concept with the presentation of in vitro tests
US2005260274-A1	Process	Process of obtaining nanoparticles	No comparison was made with the IFA or medications.	Not applicable
US2001036479-A1	Product	Product consisting of micronized GLIB through an air jet mill	In vitro dissolution according to the American pharmacopoeia. No comparative tests with medication or other formulation.	Experimental proof of concept with the presentation of in vitro tests
US2007098802-A1	Product	Nanoparticle release system	No tests were performed to assess the improvement in the dissolution rate	Experimental proof of concept with the presentation of in vitro tests
US2005260273-A1	Process	Thermal ejection cartridge obtaining amorphous GLIB microparticles	No tests were performed to assess the improvement in the dissolution rate.	Experimental proof of concept with the presentation of in vitro tests.

Fonte: Dados da pesquisa.

A análise detalhada destas patentes foi realizada levando em consideração os métodos e materiais utilizados.

A taxa de dissolução de fármacos depende do tamanho de partícula, em decorrência disto, esta estratégia foi a mais utilizada, 3 das patentes promoveram redução de tamanho da GLIB: WO2003043603-A1, US2001036479-A1 e WO2006109175-A2.

No entanto, a redução mecânica origina elevada energia durante o seu processo podendo causar degradação química e/ou física do fármaco pelo cisalhamento e estresse térmico, além disso, partículas menores que 5 microns tendem a aglomerar-se e pode ocorrer a formação de polimorfos. Objetivando reduzir estes efeitos, as patentes citadas buscaram inovações que superassem os problemas da técnica convencional.

A estratégia utilizada na WO2003043603-A1 foi o *Spry Drying* para a formação de partículas com menor diâmetro. As partículas foram produzidas através da pulverização de uma solução utilizando vários solventes orgânicos. As gotículas secas porosas exibiram um aumento exponencial de solubilidade em decorrência da redução do seu diâmetro. Estes sistemas foram veiculados em cápsulas e testados em ratos *Sprague-Dawley*, observou-se aumento da taxa de dissolução da GLIB entre 2 a 25 vezes em comparação ao fármaco *in bulk*.

Suas reivindicações protegeram também a associação da GLIB micronizada com excipientes como surfactantes, matrizes e estabilizadores. A US2001036479-A1 também realizou micronização, no entanto, a GLIB foi micronizada através de moinho de jato de ar. Os comprimidos foram desenvolvidos com diferentes tamanhos de partícula, permitindo desta forma, o desenvolvimento de uma correlação entre o tamanho das partículas de GLIB e o seu desempenho *in vivo*.

Em suas reivindicações, sugere-se que a GLIB seja co-formulada com outros fármacos para o tratamento do diabetes do tipo II facilitando, desta forma, o tratamento de pacientes que fazem uso de vários medicamentos. O invento foi desenvolvido juntamente com cloridrato de metformina, no entanto, outros ativos podem ser incluídos, como acarbose, rosiglitazona, pioglitazona ou outras tiazolidinedionas e biguanidas. A WO2003043603-A1 também englobou em suas reivindicações a associação a outros fármacos, no entanto, não se limitou a quais classes seriam, deixando sem restrição.

A WO2006109175-A2 também micronizou a GLIB, e para obter formas de dosagem sólidas realizou granulação a seco (*slugging*, compactação), granulação úmida e compressão direta. Os estudos de bioequivalência *in vivo* foram realizados em comprimidos de 5 mg de

GLIB preparados de acordo com o método desta invenção e comparados com comprimidos de 5 mg de MICRONASE® sob condições de jejum.

As US2007098802-A1 e US2005260274-A1 desenvolveram sistemas nanométricos para a solubilização da GLIB. Na patente US2007098802-A1 foram desenvolvidas nanopartículas orgânicas formadas pela solubilização da GLIB em mistura de etanol e clorofórmio (70:30), formação de emulsão e precipitação de nanopartículas contendo o fármaco, sendo possível controlar o tamanho final das partículas com base na concentração inicial na solução de etanol/clorofórmio.

Na US2005260274-A1 foi desenvolvido um método de preparação de nanopartículas compreendendo: solvente; substrato de deposição formado por polímeros hidrofílicos, solução do agente bioativo, em que a composição de solvente inclui pelo menos dois tipos de solventes e aditivo polimérico. O substrato de deposição foi selecionado de modo que a evaporação da composição do solvente produzisse uma pluralidade de nanopartículas substancialmente amorfas.

Observamos, de maneira geral, que os excipientes para carreamento da GLIB foram de vários tipos (tabela 14). Quando são usados excipientes hidrofílicos eles desintegram-se rapidamente na água, e quando são hidrófobos, ocorre o oposto, o substrato não se degrada facilmente após a ingestão. Os excipientes também podem objetivar a formação de um filme orgânico e apresentarem dissolução ou desintegração responsiva a faixas de pH diferentes.

Tabela 14-Análise das reivindicações das patentes que utilizam glibenclamida.

Patent Registration	No. of claims	Associations described in the claims
WO2003043603-A1	63	Surfactants, matrix builders and stabilizers
WO2006109175-A2	10	Binders such as povidone, low viscosity hydroxypropylmethylcellulose, starch, pregelatinized starch, lubricants such as magnesium stearate, hydrogenated vegetable oil, sodium lauryl sulfate, stearic acid, sodium stearyl fumarate and the like. In addition to glidants, non-stick, dyes, flavorings, coating components.
US2005260274-A1	31	Digoxin, prednisolone, lovastatin and indomethacin.
US2001036479-A1	10	Excipients highly soluble in water, such as mannitol, croscarmellose sodium, microcrystalline cellulose, povidone and magnesium stearate. The claims also included binders, such as povidone or low viscosity hydroxypropylmethylcellulose and a lubricant, such as magnesium stearate or sodium stearyl fumarate.
US2007098802-A1	26	Other active agents that have the ability to be precipitated as nanoparticles and formed by the method of the invention.
US2005260273-A1	30	Not applicable

A US2005260273-A1 desenvolveu um cartucho de ejeção térmica de fármacos em gotículas. O ejetor é projetado para fazer com que gotas sejam ejetadas e os pulsos de ejeção possam ser usados para aquecer a solução de ejeção e vaporizá-la. A GLIB em solução é ejetada produzindo, após a evaporação dos solventes, micropartículas esféricas amorfas.

A ejeção da solução pode ser precisamente cronometrada para disparar uma porção desejada do substrato de entrega, esta tecnologia de aplicação digital permite a deposição altamente reprodutível de agentes bioativos, controle da morfologia, medição do tamanho das gotas e distribuição, com precisão, do agente bioativo.

Desta forma, a GLIB, ou qualquer outro fármaco em que a tecnologia seja aplicada pode ser depositado sobre um substrato de entrega de uma maneira altamente controlada. Parâmetros adicionais também podem ser modificados para obter um tamanho de gota selecionado, como a forma de pulso, a tensão, a corrente, duração do pulso, parâmetros de aquecimento, frequência de disparo, número de rajadas e temperatura do substrato do ejetor.

Em comparação ao observado na revisão sobre *drug delivery* com glibenclamida (LEÃO et al., 2019b) observa-se a distinção entre as principais matrizes utilizadas nos sistemas de liberação e quanto à análise das tecnologias empregadas em patentes e artigos. As patentes apresentaram-se mais direcionadas para o desenvolvimento de nanopartículas, enquanto os artigos apresentam uma maior diversidade quanto aos tipos de sistemas de liberação como dispersões sólidas, micelas poliméricas, co-cristais, nano e microemulsões. Assim como observa-se algo semelhante em relação à natureza das matrizes utilizadas, os artigos empregam polímeros sintéticos e naturais, lipídeos, proteínas e materiais inorgânicos

Essas observações podem ser atribuídas a própria natureza da pesquisa acadêmica que possui maior liberdade no direcionamento das pesquisas, além do tempo para o seu desenvolvimento ser menos rígido e possibilitar desvios ou novas perspectivas dentro de um mesmo estudo. Enquanto as indústrias farmacêuticas possuem planos de pesquisa mais rigidamente definidos com valores de financiamento e de tempo de desenvolvimento criteriosamente pré-estabelecidos baseados em metas e programas de crescimento dentro da empresa.

Observa-se ainda que as empresas detentoras destas patentes (tabela 14) são de pequeno porte, fator que pode acentuar a restrição quanto ao desenvolvimento de novas estratégias para a baixa solubilidade da GLIB resultando em menor diversificação de estratégias (RUBERG et al., 2019)

À exceção da patente WO2003043603-A1 que apresenta testes pré-clínicos em ratos, estas patentes (tabela 14) são caracterizadas por descreverem tecnologias que encontram-se em estágio de testes *in vitro*, os quais correspondem a um estágio de desenvolvimento ainda embrionário, se considerarmos todas as etapas necessárias para inserção de um medicamento no mercado (VAN, EISENKOT, 2017; LEMLEY, FELDMAN, 2016; BHATTACHARYA, SAHA, 2011;).

Apesar de atualmente existirem mais de 7 mil estudos clínicos sobre diabetes tipo 2, poucos são os trabalhos envolvendo DDS. A maioria dos estudos de desenvolvimento de DDS para o tratamento de Diabetes tipo 2 não consegue seguir para a etapa de pesquisa clínica. Essa questão não é uma exclusividade desta doença, pois também ocorre em outros casos. O desenvolvimento inicial das pesquisas ocorre muitas vezes em institutos de pesquisa e universidades, porém a indústria farmacêutica é quem avalia e escolhe a tecnologia que entende possuir maior potencial competitivo no mercado. (BUTLER, 2008)

No entanto, estudos recentes têm apontado a genômica como tecnologia promissora para o tratamento de diferentes doenças, incluindo diabetes tipo 2 (MAZAHERIOUN et al., 2017; SORIANO-TÁRRAGA et al., 2016; BAYS et al., 2007), tornando-se uma forte alternativa de investimento para as próximas décadas. Esta hipótese é reforçada por recentes estudos publicados na *American Diabetes Association* (FLOREZ, 2016; FRADKIN, HANLON, RODGERS 2016; RICH, CEFAL, 2016) e em outros relevantes jornais da área (MOHAN, RADHA, 2019; PRASAD, GROOP, GLOYN, 2019; DRUCKER, 2018; MERINO, FLOREZ, 2018, 2017; SCHEEN, 2016; PEARSON, 2016; KLEINBERGER, POLLIN 2015; MALANDRINO, SMITH, 2011).

Nesse sentido, tem crescido o financiamento de pesquisas em medicina personalizada por parte da indústria farmacêutica (REDDY, 2016; LAZARIDIS, 2016; HU, 2012; SANGHERA, BLACKETT, 2012; TOYE, 2003; RAZ, 2013; STOLERMAN, FLOREZ, 2014). Isso tem sido percebido por meio das publicações declaradamente desenvolvidas com recursos de empresas. Os investimentos na área têm sido reforçados também por iniciativa do governo norte americano desde meados dos últimos anos do governo Obama (MCCARTHY, 2015; REARDON, 2015; HAWGOOD, 2015)

Os problemas relacionados com a glibenclamida poderão deixar de ser um gargalo se a terapia gênica, de fato, nas próximas décadas, for considerada o tratamento mais adequado e economicamente viável para o diabetes tipo 2. Dessa forma, é possível que este seja um indício

de uma mudança tecnológica. Contudo, são necessárias investigações mais profundas sobre as possibilidades terapêuticas existentes e disponíveis com a medicina de precisão para o tratamento da diabetes tipo 2. Além disso, é necessário investigar alternativas de como estas tecnologias podem ser disponibilizadas nos sistemas de saúde dos diferentes países (ricos ou pobres) e como e quando isto poderá ocorrer. Nesse sentido, novos estudos poderão contribuir com valiosas reflexões.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pode-se concluir que a prospecção de patentes é uma importante ferramenta para a compreensão de um segmento de pesquisa e de tendências de mercado, e através dela podemos constatar que apenas um pequeno percentual (7,5%) dos pedidos totais de patentes realmente realizam testes com a GLIB, no entanto, as reivindicações englobam outras classes de medicamentos para tratamento do DM II.
- Observou-se que as principais técnicas desenvolvidas e legalmente protegidas são a micronização e a formação de nanopartículas;
- A maioria das patentes que descrevem essencialmente tecnologias para o transporte de glibenclamida foram desenvolvidas no início dos anos 2000. Além disso, ao que parece, são tecnologias que não continuaram no processo de desenvolvimento, especificamente testes pré-clínicos e clínicos.
- De todas as patentes analisadas, nenhuma apresentou testes clínicos concluídos ou em andamento e apenas uma patente apresentou testes pré-clínicos em ratos, evidenciando que os trabalhos envolvendo DDS e GLIB seguem uma perspectiva comum aos demais sistemas de DDS, eles não conseguem seguir para a etapa de pesquisa clínica porque as indústrias farmacêuticas, que geralmente financiam esta etapa, são as responsáveis por selecionar os projetos mais alinhados a sua política de crescimento e de retorno financeiro.

5.3 ARTIGO III: MONITORAMENTO *in line* DA SÍNTESE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES E *INSIGHTS* DO MECANISMO E CINÉTICA DE FORMAÇÃO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Apesar de possuírem ocorrência natural em terrenos sedimentares, os HDL geralmente são obtidos em laboratório devido às vantagens proporcionadas ao material pela síntese, como alto grau de pureza e capacidade de controle de suas propriedades, como tamanho de partícula e morfologia (RIVES, DEL ARCO, MARTIN, 2014; CUNHA et al., 2010).

Os HDL podem ser sintetizados com uma composição apenas inorgânica com ânions inorgânicos intercalados em suas lamelas, ou com composição mista, orgânica-inorgânica (MEI et al., 2017, ADV et al., 2016; JÁCOME-ACATITLA et al., 2014). Os métodos de síntese podem ser classificados em diretos ou indiretos, na síntese direta é possível obter o material de interesse diretamente, sem passar por precursores, na síntese indireta inicialmente é obtido um HDL por método direto e em seguida o seu ânion intercalante pode ser substituído por outro ânion de interesse através dos métodos de troca iônica ou calcinação. A síntese direta pode ocorrer por vários métodos os principais são: método de coprecipitação ou método do sal-base, método do sal-óxido e síntese por micro-ondas (FERECZ et al., 2015; CONTEROSITO et al., 2013).

A coprecipitação ou método do sal-base é um método muito utilizado por diversos grupos de pesquisa por ser em uma única etapa (*one-pot*) e por apresentar materiais com menor tamanho de partícula, boa cristalinidade, menor contaminação com íons carbonato e maior capacidade de carregamento da espécie escolhida (AHMAD et al., 2015; HAYASHI et al., 2015; ALANSI et al., 2015; ALAWI et al., 2015).

Este método consiste na adição simultânea de cátions metálicos a uma solução básica e pode ser realizada em pH constante ou variável, a coprecipitação em pH constante permite maior controle dos parâmetros de síntese e, consequentemente, propriedades dos HDL, já que o pH influencia marcadamente as propriedades do material obtido, como cristalinidade e pureza de fase (MIYATA, 1975; DE ROY et al., 2001; ROJAS et al., 2014).

A síntese em pH constante apresenta como vantagens a maior homogeneidade dos materiais obtidos e a maior versatilidade quanto ao controle das condições, pois níveis variáveis de pH levam a formação de materiais mais heterogêneos, uma vez que os precipitados obtidos

no início da reação provavelmente difeririam daqueles no final (GALVÃO et al., 2016; SUN et al., 2015; SUN, DEY, 2015; ROJAS et al., 2014).

A síntese do HDL gera grande interesse e parâmetros críticos para obter HDL monodispersos, como concentração da solução salina, taxa de agitação e taxa de adição dos sais, vem sendo estudados pois o escalonamento industrial destas matrizes e o sucesso de sua aplicação na indústria farmacêutica e biomédica depende do controle, reprodutibilidade e segurança de sua produção (SUN et al., 2015; SUN, DEY, 2015; ZHOU et al., 2012; OLFS et al., 2009).

1.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR): UMA IMPORTANTE FERRAMENTA DE CARACTERIZAÇÃO

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) vem sendo utilizada como um método não destrutivo para a caracterização de materiais, sua aplicabilidade é bem diversificada sendo utilizada em diversos segmentos como na área agrícola, alimentícia e no monitoramento de reações orgânicas. Além disso, o NIR é uma importante ferramenta de *Quality by Design* (QbD) para acompanhar processos industriais e auxiliar na compreensão de parâmetros de processo que afetam a qualidade dos produtos, como na formulação de medicamentos e no desenho de processos (ZHANGO, MAO, 2017).

Na área de argilominerais o NIR tem sido usado para caracterizar argilas catiônicas, no entanto, poucos estudos relataram o seu uso para caracterizar HDL e apenas o presente trabalho, até o momento, aplicou o NIR para monitoramento da síntese de HDL (ALLRED et al., 2018, JIE et al., 2018, POST, CRAWFORD, 2014, ZHANG et al., 2011, PENTRA et al., 2009). No NIR as vibrações moleculares resultam em transições harmônicas (overtones), sobretons e bandas de combinação (XIAO et al., 2018). Os sobretons são bandas com valores de frequência correspondentes a múltiplos inteiros daqueles das vibrações normais, enquanto as bandas de combinação são combinações lineares das frequências normais ou múltiplos inteiros destas (GIESE et al., 2018).

O NIR tornou-se importante para análise de processos, uma vez que é uma ferramenta eficiente e avançada para o monitoramento contínuo e aquisição constante de dados e útil para o controle e entendimento de processos de maneira multivariada (COZZOLINO, 2016). No entanto, como na região do NIR as absorções são de baixa intensidade ocorrem sobreposições e combinações das ligações tornando a interpretação das bandas complexa. Desta forma, é necessário recorrer a métodos estatísticos para que as informações contidas nos espectros sejam

correlacionadas com os métodos analíticos convencionais. Através da quimiometria os dados experimentais medidos pelo NIR são transformados em informações quimicamente relevantes a partir de métodos estatísticos, matemáticos e informáticos (POPPI, 2018).

Dentro da quimiometria, a calibração multivariada é amplamente utilizada para o tratamento de dados espectrais, as principais técnicas de análise multivariada para a elaboração de modelos são análise por componentes principais (PCA), regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR) e mínimos quadrados parciais (PLS):

- A PCA é uma das ferramentas da quimiometria que têm como objetivo principal reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original possibilitando que as informações mais relevantes fiquem concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância nas últimas (GIESE et al., 2018).
- A regressão PLS é usada para análises quantitativas, nela, tanto a matriz das variáveis independentes X como a das variáveis dependentes Y são combinações lineares obtidas via componentes principais (KILLNER, ROHWEDDER, PASQUINI, 2011).

Além disso, para a aplicação de qualquer análise multivariada, os dados espectrais devem ser pré-processados, ou seja, corrigidos, pois sofrem inúmeras interferências. Desta forma, o pré-tratamento espectral deve ser realizado objetivando reduzir, eliminar ou padronizar o impacto desses fatores não desejáveis nos espectros, sem alterar a informação espectroscópica contida neles (BEGHI et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e quimiometria para monitorar a síntese de hidróxidos duplos lamelares (HDL) pelo método de coprecipitação e obter *insights* sobre o seu mecanismo e cinética de formação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar uma sonda com faixa de leitura no infravermelho próximo para monitorar a síntese de HDL dos tipos $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ pelo método de coprecipitação em meio orgânico;
- Comprovar que o NIR pode ser utilizado como ferramenta analítica para o controle de produção *in line* da síntese de hidróxidos duplos lamelares;

- Verificar a reprodutibilidade do método de coprecipitação para a produção de HDL;
- Determinar as cinéticas de formação dos HDL $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e estabelecer as possíveis distinções nos seus mecanismos de formação;
- Utilizar as determinações de carga superficial (potencial eletrocinético), microscopia eletrônica de varredura (MEV) difratometria de raio X (DRX) como técnicas de suporte na elucidação do mecanismo e da cinética da formação dos HDL;

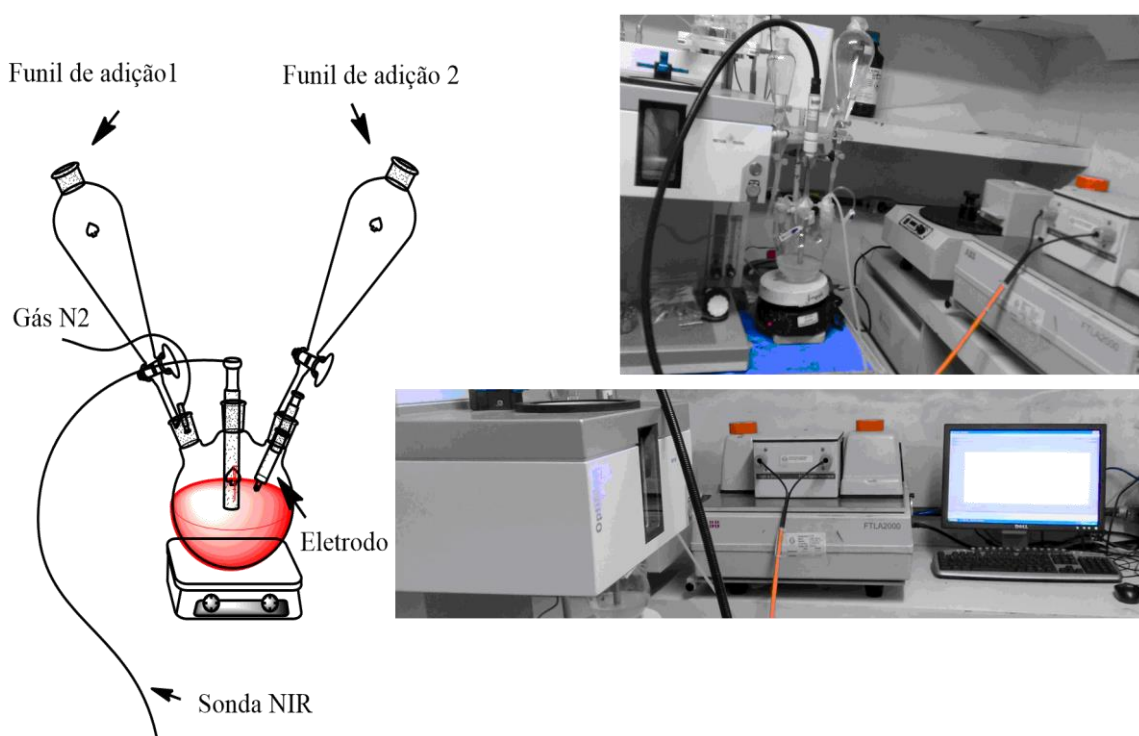
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KOH , $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 anidro foram obtidos da Sigma Aldrich®, enquanto o metanol P.A. (padrão analítico) foi obtido da Merck.

Método de Síntese e Monitoramento com NIR

A síntese dos HDL via coprecipitação foi realizada em solução metanólica em pH constante (MIYATA, OKADA, 1977). O sistema de reação consistiu em um balão de três entradas acoplado aos elementos: dois funis de adição, um eletrodo (solução orgânica) e a sonda de NIR. Conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10- Equipamentos utilizados nas sínteses dos HDL acoplados à sonda FLEX-NIR-12S-300HT/081204/1 de Aço Inox SS316L, janela óptica de safira e faixa espectral NIR 400nm – 2200nm acoplada a espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.



Para a síntese do HDL $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, um dos funis continha KOH ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e o outro uma solução aquosa de $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($8,03 \times 10^{-3} \text{ mol}$) e $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($4,01 \times 10^{-3} \text{ mol}$). Estas soluções foram adicionadas gota a gota ao balão até $\text{pH } 9,5 \pm 0,5$. Para a síntese do HDL $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ LDH, foram conectados aos funis soluções de KOH ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e uma solução aquosa de ZnCl_2 anidro ($6,03 \times 10^{-3} \text{ mol}$) e $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($3,01 \times 10^{-3} \text{ mol}$) até $\text{pH } 7,5 \pm 0,5$.

A taxa de gotejamento dos reagentes foi de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume das soluções foi de 100 mL. Após as sínteses, os sistemas permaneceram em agitação por 12 h, seguidas por centrifugação a 5000 rpm por 5 min usando água e metanol (três vezes cada) e em seguida o material foi seco em estufa a 50°C .

Durante as sínteses, os sistemas foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio, agitação magnética e foram monitorados usando sondas NIR *in situ* por 180 min. As taxas de aquisição foram de 1 espectro por minuto com a média de 64 digitalizações no intervalo de 10.000 a 4000 cm^{-1} . O fundo do espectro foi adquirido usando metanol, o meio das sínteses (branco).

O equipamento contendo a sonda NIR consistia em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier FOMA FTLA 2000–160 GRAMS A/I acoplado a uma sonda de aço inoxidável FLEX-NIR-12S-300HT / 081204/1 SS316L e uma janela óptica safira, que apresentava a faixa espectral NIR de $4000 \text{ a } 10.000 \text{ cm}^{-1}$ (1000–2500 nm). Todos os cálculos para as análises PCA e mínimos quadrados parciais (PLS) foram realizados usando o Matlab R2015a (Mathworks) e PLS Software Toolbox versão 8.1.2 (Eigenvector Research, Inc.).

Análise do Potencial Eletrocinético

Alíquotas de cada sistema foram coletadas após 5 minutos de síntese, a cada 10 minutos durante a primeira hora de síntese e a cada 20 minutos durante a segunda e terceira hora de síntese. Os níveis de pH foram os mesmos que os utilizados para as sínteses: $9,5 \pm 0,5$ e $7,5 \pm 0,5$ para $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, respectivamente. As medições do potencial eletrocinético foram realizadas usando o equipamento Zetasizer Nano ZSP Malvern®.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Alíquotas dos produtos das sínteses foram coletadas de ambos sistemas e as imagens MEV foram obtidas usando um Fanta Quanta FEG 250 instrumento com cânula de emissão de campo e aceleração tensão de 1 a 30 kV equipada com AMETEK, HX-1001. Detectores de desvio de silício Apollo X (SDDs). As amostras foram definidas usando fita adesiva de carbono dupla

face e revestidas com ouro utilizando um Quorum Metalizador Q150R, por 30 s a 20 mA, usando plasma gerado em atmosfera de argônio.

Análise de DRX

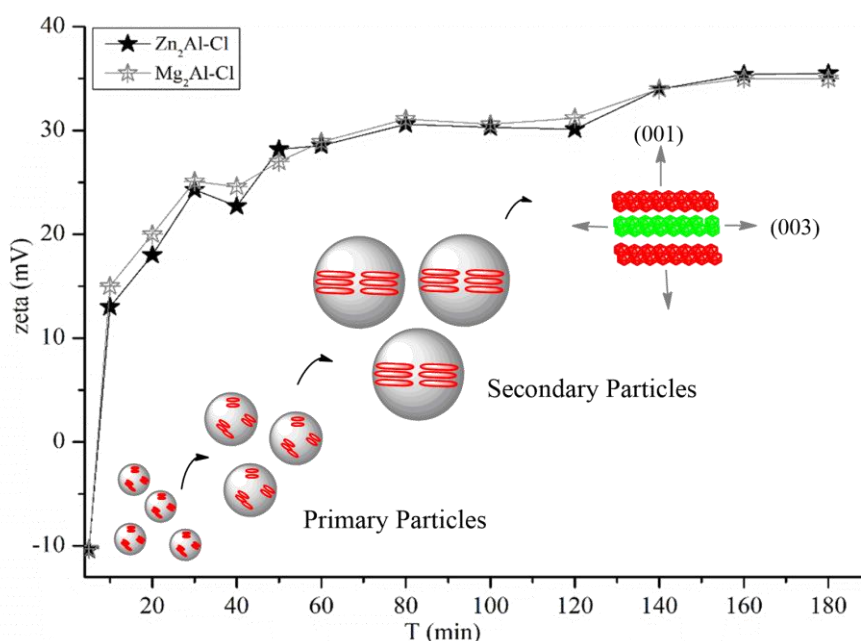
Os difratogramas em pó dos HDL foram obtidos utilizando um instrumento Rigaku MiniFlex DRX utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$. O difratômetro usado continha um filtro de níquel operado em tensão de 30 kV e corrente de 15 mA e apresentava a faixa de varredura (2θ) de $1,5-70^\circ$ à taxa de $0,02^\circ/\text{s}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao sintetizar os HDL neste estudo, os sais que foram adicionados simultaneamente ao KOH foram inicialmente convertidos em intermediários no meio reacional: $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Zn}(\text{OH})_2$, os quais se dissolveram até os produtos finais $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, respectivamente (WANG et al., 2012; SUN, DEY, 2015).

As medições do potencial eletrocinético (Figura 11) indicaram que, no início do processo de síntese, ambos os HDL apresentaram baixos valores de ζ devido aos fenômenos de nucleação (SUN, DEY, 2015), que ocorreram rapidamente (5-80 min) e levaram à formação de partículas iniciais instáveis.

Figura 11- Determinação do potencial zeta dos HDL sintetizados ao longo de 180min.



Após 80 min de síntese, o ζ atingiu +30 mV indicando que as partículas se tornaram mais estáveis, isso foi atribuído à lentidão do processo de nucleação e início da recristalização. A nucleação e recristalização são fenômenos opostos, que ocorreram a taxas mais lentas no tempo devido ao aumento da cristalinidade dos HDL.

Existe uma relação estreita entre o ζ e a distribuição de Al^{3+} íons, uma vez que a presença de Al^{3+} aumentou a densidade de carga dos HDL aproximando os contra-íons (OH^- e ânion interlamelar) a sua superfície. À medida que a síntese progredia, a nucleação foi substituída por cristalização, esta favoreceu a dispersão uniforme dos cátions nas camadas dos HDL e, consequentemente, afetou a densidade de carga. Portanto, a concentração de adsorvente em torno das partículas dos HDL foi mais uniforme do que no início da síntese e em um padrão mais uniforme na dupla camada formada no plano de cisalhamento (XU et al., 2008; HANAOR et al., 2012; ZHOU et al., 2012; LEE et al., 2015; SUN, DEY, 2015).

O crescimento dos HDL e sua morfologia discóide foram monitorados usando MEV (Figuras 12 e 13). As partículas evoluíram de partículas primárias para a forma discoidal devido à taxa de crescimento impedida no plano 001 (espectros de DRX na Figura 14), que apresentou maior densidade de carga e entalpia de hidratação.

Figura 12- Imagens MEV de Mg_2Al-Cl : ampliações 1 –4a e 1b–4b 50.000 $\times$ e 10.000 $\times$, respectivamente.

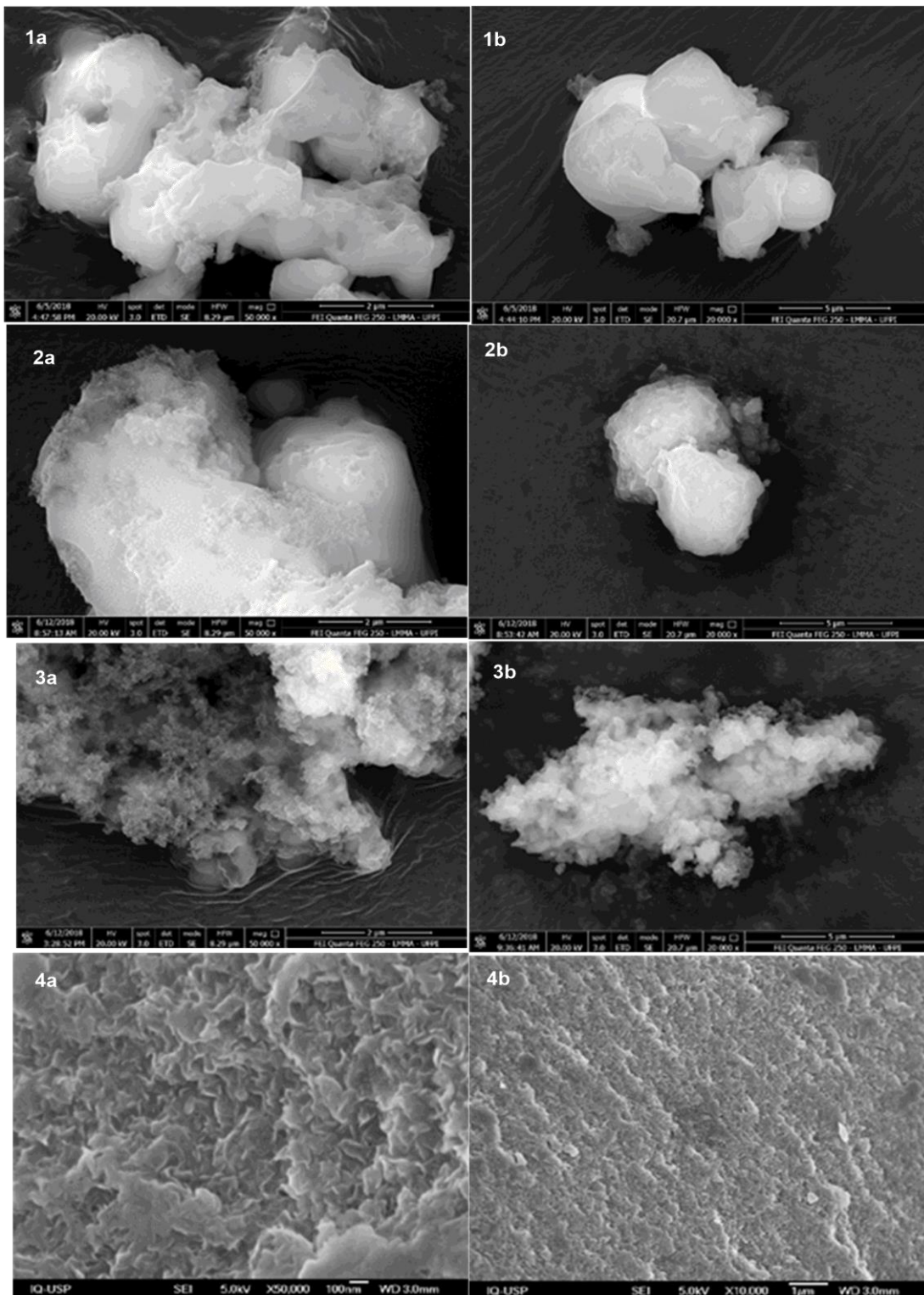
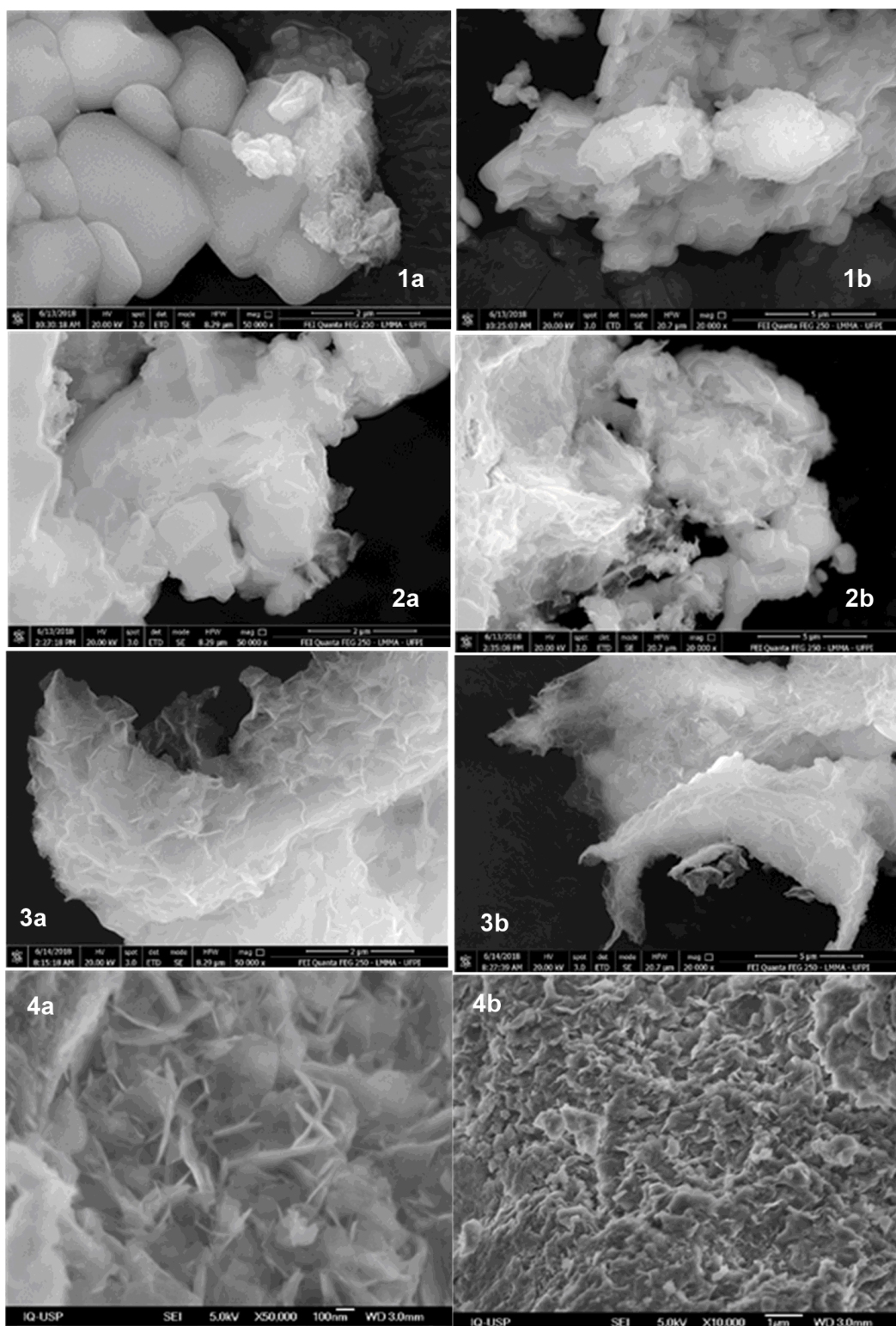


Figura 13- Imagens MEV de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$: ampliações 1 –4a e 1b–4b 50.000 $\times$ e 10.000 $\times$, respectivamente



Por outro lado, a aglomeração das partículas ocorreu principalmente nas bordas da superfície, onde a densidade de carga e a entalpia foram as mais baixas, permitindo o crescimento horizontal das lamelas em detrimento da região central (espectros de DRX na Figura 14) (BOCLAIR et al., 1999; BOCLAIR, BRATERMAN, 1999; GALVÃO et al., 2016; ZHAO et al., 2002).

As partículas primárias tornaram-se secundárias através do crescimento agregado e seu tamanho dependeu da extensão da aglomeração irreversível, que indiretamente depende da densidade da carga superficial e da entalpia de hidratação das partículas primárias cristalizadas. Desta forma, as superfícies das bordas de alta energia cresceram a uma taxa superior à superfície basal de baixa energia promovendo a orientação para o crescimento conforme ilustrado nas imagens MEV pós-síntese (Figuras 12 e 13), onde a formação de partículas em forma discoide, as quais exibem energia superficial minimizada pode ser observada. Esses resultados também indicam que o crescimento dos HDL em meios orgânicos é semelhante à orientação dos HDL sintetizados em meio aquoso (SUN, DEY, 2015; SUN et al., 2015).

Análise de DRX

O espaço intercalar d_{003} foi obtido usando a equação de Bragg e apresentou valor de aproximadamente 7,0 Å para todas as amostras (Figura 14), estes valores estão de acordo com os relatados na literatura para HDL do tipo Mg_2Al-Cl e Zn_2Al-Cl , assim como os valores da distância para o plano (110) de aproximadamente 1,5 Å e o do parâmetro cristalográfico $a = 2 \times d_{110}$ também foram consistentes com a literatura para os HDL do tipo Zn_2Al-Cl e Mg_2Al-Cl , como pode ser visto na tabela 15 (MIYATA, 1975; FORANO et al., 2006).

$$\text{Equação de Bragg: } n\lambda = 2.d.\sin$$

Em que, n é a ordem de difração, d o espaço interlamelar e λ o comprimento de onda da radiação.

Figura 14- Espectros de DRX do pó de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ na faixa de varredura 2θ de $1,5-70^\circ$.

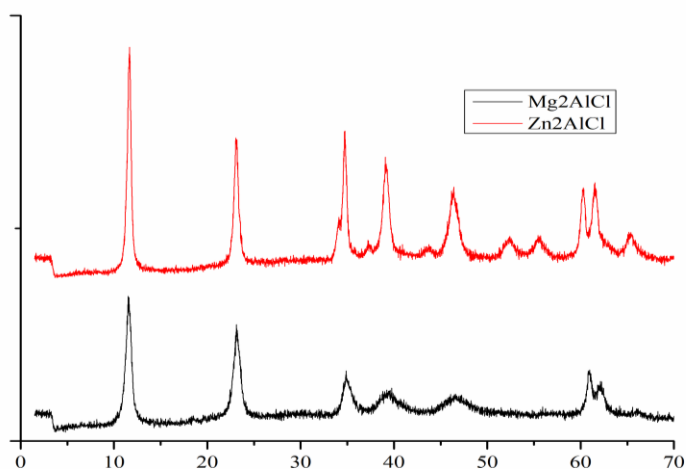


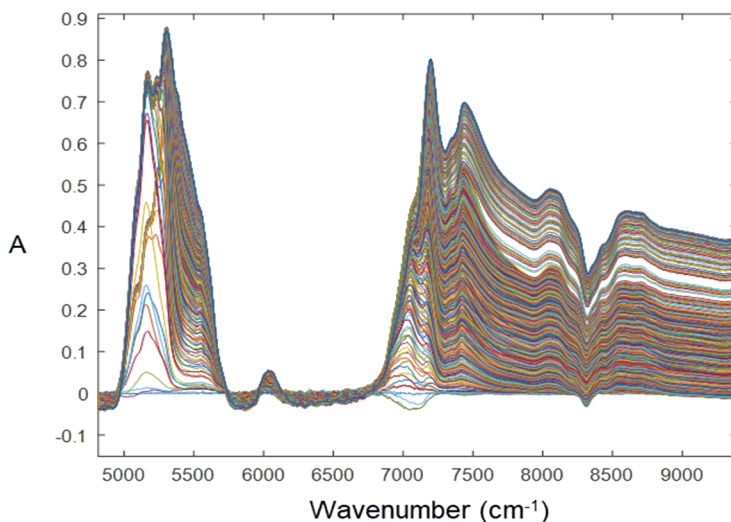
Tabela 15-Cálculos para a determinação do parâmetro a ($2X_{d110}$).

HDL	2θ (110)	d (Å)	a (Å)
$\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$	60.2°	1.5353	3.06
$\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$	62.0°	1.5010	3.02

NIR e análises quimiométricas

Os espectros brutos de NIR para o processo de síntese foram obtidos na faixa de 4545 a 10.000 cm^{-1} (Figura 15) e correspondem às regiões principalmente relacionadas à formação de O-H (Frost et al., 2009). Vários estudos, que incluíram espectroscopia de infravermelho médio e próximo mostram que as três regiões mais importantes para a análise do NIR são: os sinais na faixa de 12.500 a 9.000 cm^{-1} que correspondem ao segundo harmônico de alongamento das ligações O-H (FROST et al., 2007; PALMER et al., 2007; FROST et al., 2009), os sinais entre $9000-6000\text{ cm}^{-1}$ que representam o primeiro harmônico da vibração de alongamento fundamental das ligações O-H e a faixa de $6000-4000\text{ cm}^{-1}$ que contém as bandas de tons harmônicos das ligações O-H de moléculas de água (FROST, ERICKSON, 2005; MORA et al., 2010; MORA et al., 2011).

Figura 15- Dados brutos NIR de um lote de síntese de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$.



A matriz de dados brutos foi organizada considerando os diferentes lotes para a síntese dos HDL $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ em três lotes por síntese. Para cada lote, 180 leituras foram adquiridas na faixa de $4000\text{-}10.000\text{ cm}^{-1}$. A análise de componentes principais (PCA) foi a ferramenta quimiométrica usada para processar o grande quantitativo de dados. Geralmente, a PCA é usada para visualizar a estrutura de dados, encontrar semelhanças entre amostras, detectar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade dos conjuntos de dados (BRO, SMILDE, 2014), onde a maior parte da variabilidade dos dados é explicada por um número reduzido de variáveis latentes, ortogonais e uma combinação linear dos dados originais (FERRER-RIQUELME, 2009).

O modelo da PCA foi desenvolvido usando os três lotes de síntese de cada HDL, o principal objetivo da análise era identificar as contribuições espectrais do processo de síntese e avaliar a consistência entre os diferentes lotes fabricados. Usando a PCA foi possível determinar as contribuições mais importantes, para $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ a primeira componente principal (PC1) foi associada a contribuição positiva das bandas entre $5038\text{ e }7144\text{ cm}^{-1}$. A segundo componente principal (PC2) foi associada aos valores negativos das bandas entre $5030\text{ e }7236\text{ cm}^{-1}$ para o passo inicial e às bandas positivas entre $5315\text{ e }7144\text{ cm}^{-1}$ para a etapa final (Figuras 16c e 17c, respectivamente). Similarmente, para $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ a PC1 foi associado ao valor positivo do 5000 cm^{-1} , enquanto a PC2 foi associada ao valor negativo em 5663 cm^{-1} para a etapa inicial e aos valores positivos entre $5308\text{ e }7152\text{ cm}^{-1}$ para a etapa final. Todas as regiões da banda foram mencionadas anteriormente para a atividade OH. O intervalo de $4000\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$ não apresentou informações relevantes para o monitoramento do processo.

Figura 16- PCA da síntese de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$: (a) gráfico de pontuação $\text{PC1} \times \text{PC2}$, (b) gráfico de carga e (c) gráfico de pontuação PC1 .

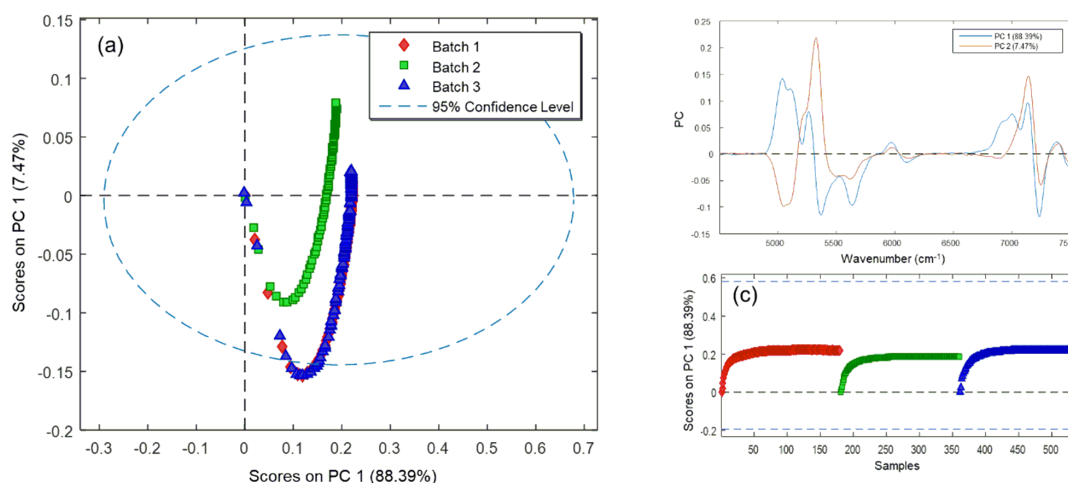
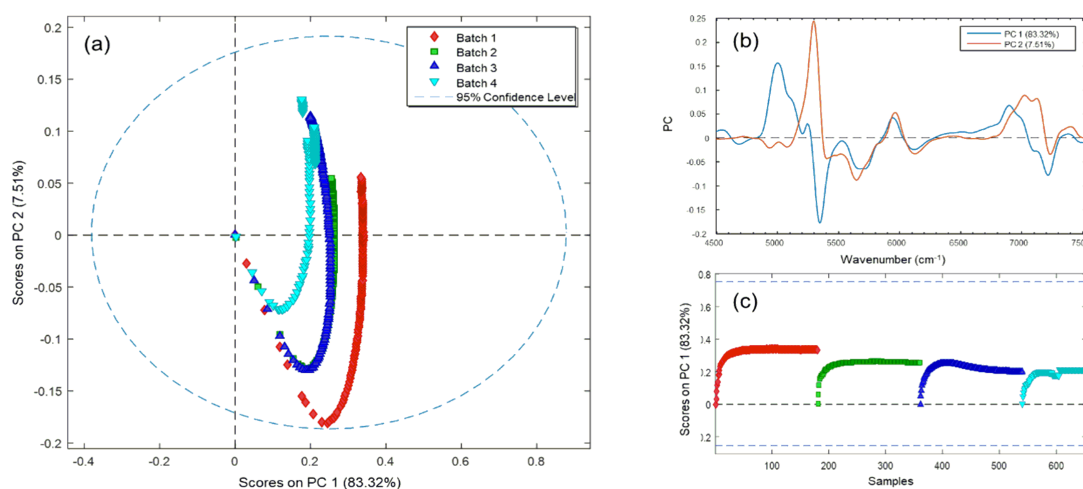


Figura 17- PCA da síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$: (a) gráfico de pontuação $\text{PC1} \times \text{PC2}$, (b) gráfico de carga e (c) gráfico de pontuação PC1 .



Os gráficos de pontuação para ambos os processos apresentaram informações sobre o caminho da síntese, a qual terminou com a formação dos HDL. O primeiro passo, corresponde à nucleação das partículas (passo rápido) e o segundo passo corresponde à cristalização (passo mais lento), os quais foram confirmados pela análise do potencial eletrocinético. As duas etapas são representadas no gráfico de pontuação PC1 (Figuras 16c e 17c).

Aproximadamente 30 minutos após o início do processo, a inclinação está relacionada ao primeiro passo (nucleação) e o platô, após 30 min, representa o segundo passo (cristalização). Os resultados da PCA também forneceram informações sobre a adequação do

processo de síntese considerando os resíduos de Hotteling T2 (Figuras 16d e 17d). Ao final do processo, nenhuma das amostras apresentou alterações anormais e que não se comportaram de maneira diferente da maioria das amostras usadas para construir o modelo, isso demonstrou a reprodutibilidade dos lotes de fabricação diferente.

A principal diferença entre as sínteses de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ estava relacionado às taxas de formação desses HDL, assim, avaliando suas cargas (Figuras 16b e 17b, respectivamente), a formação esteve essencialmente associada ao aumento da intensidade das bandas 7198 e 7437 cm^{-1} devido à ligação O-H na estrutura octaédrica associada à formação de camadas e primeiro harmônico da água ($2\nu\text{H}_2\text{O}$) (MADEJOVÁ et al., 2000; MADEJOVA et al., 2009; ZHANG et al., 2011; SUN, DEY, 2015). A taxa de crescimento de materiais cristalinos é o resultado das diferenças de fluxo de espécies iônicas na superfície da solução, que são regidos pelas solubilidades dos sais envolvidos na formação de cristais.

Assim, usando os produtos de solubilidade dos sais podemos inferir o comportamento de cada componente (ALLADA et al., 2002, 2005). A constante de solubilidade (K_{sp}) de $\text{Al}(\text{OH})_3$ a 25°C é menor que a de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ e isso afetou o processo de supersaturação e facilitou a precipitação rápida do íon Al^{3+} como hidróxido durante a síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$. Além disso, K_{sp} de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ a 25°C também foi maior do que do $\text{Al}(\text{OH})_3$ e, portanto, o comportamento descrito acima também foi observado durante a síntese de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ (SUN, DEY, 2015; SUN et al., 2015). Os valores de K_{ps} são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Valores de K_{sp} a 25 ° C (Ball, Nordstrom, 1991).

Hydroxides		K_{ps}
$\text{Al}(\text{OH})_3$	Amorfo	10^{-33}
	Boehmite	$10^{-31,7}$
	Gibbsite	$10^{-33,8}$
$\text{Mg}(\text{OH})_2$		10^{-11}
$\text{Zn}(\text{OH})_2$		10^{-16}

Para analisar as solubilidades dos reagentes e espécies intermediárias, foi realizado um ensaio alterando as razões molares iniciais dos reagentes (RUSSELL et al., 1955; PANIAS et al., 2001). O julgamento foi realizado durante o quarto lote de síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e a pontuação da PCA, os valores (Figuras 17a e c) exibiram uma quebra no padrão de síntese. A primeira característica importante a avaliar foi o encaixe não sobreposto para lotes diferentes que

ocorreram devido à variabilidade nos volumes de reagentes adicionados, isso foi controlado manualmente usando o pHmetro e as variações foram principalmente visualizadas usando a PC2 (ANUP, THATOD, GAZIT, 2016).

As variações no quarto lote (azul claro no Fig. 17c) foi evidenciada pela quebra do platô e após a correção os escores foram relacionados ao passo inicial, portanto, as sínteses só poderiam ser monitoradas por 112 min.

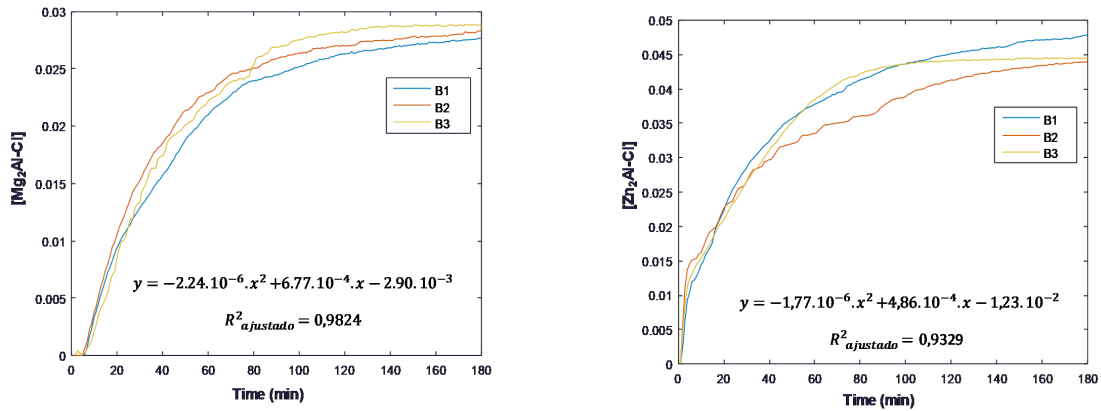
Abordando um conjunto de dados que obedeça às exigências quimicamente significativas ao modelo bilinear (Lei de Beers), a resolução de curvas multivariadas (MCR) foi adequada para recuperar informações subjacentes: a resolução consiste em separar as informações dos diferentes constituintes do conjunto de dados multivariado. Executou-se a análise de forma aumentada acoplando diferentes lotes para atingir os perfis de concentração e garantir a consistência espectral da resolução porque continham informações fornecidas pelos diferentes lotes, em termos de nível de concentração diferente (variabilidade do lote) e composição, que ajuda na melhoria da resolução do resultado (JAUMOT et al., 2005; PRATS-MONTALBÁN et al., 2011; TAULER, 1995).

A análise de mínimos quadrados alternados por resolução de curva multivariada (MCR-ALS) foi realizada para obter os perfis de concentração relativa para a síntese dos HDL considerando que os lotes eram reprodutíveis de acordo com os resultados da PCA. Os modelos MCR-ALS apresentaram falta de ajuste de 7,5 e 10,1% para a síntese de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, respectivamente. Esses valores podem ser considerados adequados devido o controle manual da adição dos reagentes, responsável pelas principais variações nos perfis de concentração dos HDL tanto para os reagentes quanto para os produtos consumidos.

Os espectros otimizados não coincidem com os reais porque a aquisição não fornece espectros NIR das amostras, mas espectros relacionados às mudanças que ocorreram no sistema durante a síntese dos HDL. Contudo, os perfis de concentração adquiridos representavam os reagentes consumidos e a formação dos HDL e estavam de acordo com os dados relatados na literatura (SUN, DEY, 2015). Os perfis de concentração dos produtos para os três lotes são apresentados na Figura 18. As curvas cinéticas foram obtidas ajustando as curvas de regressão aos perfis de concentração usando a curva polinomial de segunda ordem na Eq. (1):

$$F(x) = p_1x^2 + p_2x + p_3 \quad (1)$$

Figura 18- Perfis de concentração de MCR-ALS para síntese de (a) $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ e (b) $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e suas respectivas curvas cinéticas.



Os gráficos de tais funções são dados por parábolas. Desta forma, as concentrações máximas são dadas através das coordenadas do vértice do mesmo:

$$V=(X_{\max}, Y_{\max}) = \left(\frac{-b}{2a}, \frac{-4ac}{4a} \right) \quad (2)$$

Além disso, essas funções aumentam em toda a faixa de 0 a $X_{\max}$. Assim, as seguintes equações foram derivadas para os HDL neste estudo:

- $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$:

$$X_{\max} = \frac{6,77.10^{-4}}{4,48.10^{-6}} = 151 \text{ min} \quad (3)$$

- $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$:

$$X_{\max} = \frac{4,46.10^{-4}}{3,54.10^{-6}} = 137 \text{ min} \quad (4)$$

Considerando as curvas ajustadas para o modelo cinético e os cálculos 1 e 2, o $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ apresentou a taxa de formação mais rápida e alcançou a concentração máxima após 137 min. Esse resultado foi em concordância com o menor valor de K_{ps} para $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$. Depois de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$ atingirem a concentração máxima nos tempos de 137 e 151 min respectivamente, as concentrações permaneceram inalteradas devido ao alto grau de cristalinidade alcançado pelos materiais. Esses resultados foram corroborados com dados de MEV, DRX e potencial eletrocinético, sugerindo que o processo de síntese apresentasse um estágio inicial rápido, atribuído ao processo de nucleação e um segundo estágio mais lento, atribuído à cristalização e redissolução dos HDL.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pode-se concluir que o acompanhamento das reações utilizando a sonda de NIR foi capaz de monitorar a síntese de HDL e permitir o controle *in line* da sua formação;
- Através dos dados quimiométricos e testes de T Hotelin e Q2 foi possível verificar a reprodutibilidade do método de coprecipitação para a produção de HDL;
- Foi possível propor um modelo cinético de segunda ordem para as sínteses e além disso observar que a taxa de formação de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ foi superior ao de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$;
- Usando os resultados quimiométricos, potencial eletrocinético, MEV e DRX combinado com informações teóricas, foi possível inferir que os mecanismos que governavam a formação de HDL envolviam supersaturação, nucleação, precipitação e redissolução em duas etapas;
- Desta forma, pode-se concluir que a combinação de técnicas foi adequada para controlar e avaliar o processo de síntese de HDL pelo método de coprecipitação em meio orgânico e identificar seus pontos críticos.

5.4 ARTIGO IV: *ONE-POT* SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATÍVEIS DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES ORGANOMODIFICADOS CARREANDO GLIBENCLAMIDA

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) apresentam pequeno espaçamento entre suas camadas, pois a alta densidade de carga das lamelas e o alto teor de espécies aniônicas e de água, no espaço interlamelar, resultam em significativas interações eletrostáticas e propriedades hidrofílicas (ROJAs et al., 2015). Embora exista a capacidade de ampliação do espaço interlamelar estas interações podem funcionar como barreira para a intercalação de moléculas volumosas ou de baixa polaridade (MEI et al., 2017). Desta forma, modificações na superfície dos HDL podem ser realizadas para facilitar a interação com estes tipos de moléculas.

1.2 ORGANOFILIZAÇÃO DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

As modificações envolvem, frequentemente, a inserção de espécies aniônicas com cauda hidrofóbica na superfície dos HDL tornando-os organofilizados (CURSINO et al., 2015; 2013; WANG et al., 2005). A cauda hidrofóbica reduz as forças atrativas entre as lamelas e provoca a expansão da distância entre elas, desta forma, o aumento do espaço interlamelar facilita a entrada de moléculas volumosas e/ou promove a esfoliação do HDL (ZHAO et al., 2011).

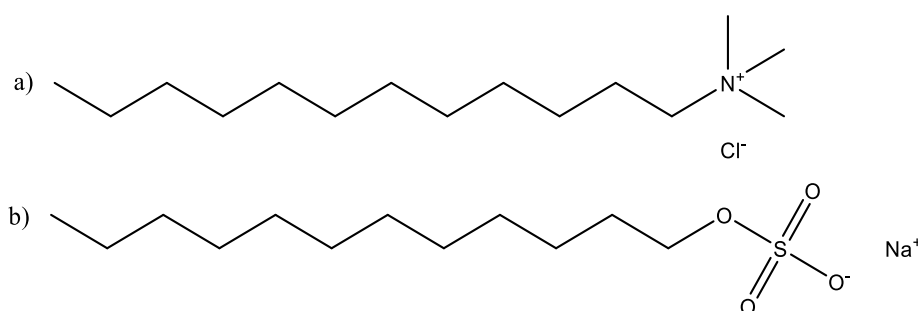
A organofilização além de promover alteração do espaço interlamelar proporciona alteração nas propriedades de superfície dos HDL passando de hidrofílica para hidrofóbica. Estas alterações facilitam a posterior interação com cadeias poliméricas, moléculas hidrofóbicas e solventes não aquosos.

Surfactantes sulfonados, como dodecilsulfato (DDS) e dodecilbenzenosulfonato (DBS) já foram intercalados em HDL do tipo Mg_2Al e observou-se que eles ocuparam a região interlamelar e comportaram-se de maneira semelhante a micelas (KUTLU et al., 2014; WANG et al., 2005). A forte tendência da agregação do surfactante resulta em um campo hidrofóbico que apresenta capacidade de solubilizar compostos orgânicos hidrofóbicos (OMDEO et al., 2017; DÉKÂNY et al., 1997).

Os surfactantes são compostos que se distinguem por sua estrutura anfifílica, cada molécula contém porções hidrofílicas e hidrofóbicas que lhes conferem o fenômeno de atividade superficial. A solubilidade em água de um tensoativo é dada pela existência de cargas em sua região polar, desta forma, quanto mais carga ele apresentar mais solúvel será em água, não importando se as cargas são negativas ou positivas (SALA et al., 2018).

Dependendo do grupo hidrofílico da molécula, os tensoativos podem ser classificados em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e anfotéricos. O tensoativo que apresenta carga positiva na região polar da molécula é chamado de tensoativo catiônico, pois é o cátion de um sal (LOKERSE et al., 2018). Quando a região polar apresenta carga negativa, este tipo de tensoativo é chamado de aniônico, a parte polar apresenta alta polaridade e alta capacidade de atração de moléculas de água, isso faz com que os tensoativos aniônicos sejam muito solúveis em água (LAMICHHANE et al., 2018) na figura 19 estão representados tensoativos catiônico e aniônico.

Figura 19- Estruturas químicas de tensoativos, a) cloreto de dodecil trimetil amônio e b) dodecil sulfato de sódio. Fonte: autoria própria utilizando o ChewBioDraw Ultra.



Os tensoativos catiônicos são, normalmente, menos solúveis em água que os tensoativos aniônicos, pois o nitrogênio por ser comparativamente menos eletronegativo que o oxigênio atenua sua polaridade e reduz a solubilidade em água dos tensoativos catiônicos (LOKERSE et al., 2018; STEFFES et al., 2008).

Os tensoativos conhecidos como anfóteros (ou anfotéricos) apresentam tanto a carga negativa como a positiva na mesma molécula e comportam-se como aniônicos ou catiônicos dependendo do pH da solução, em meio alcalino comportam-se como tensoativos aniônicos e em meio ácido comportam-se como tensoativos catiônicos (PATEL et al., 2011; LUKYANOV, TORCHILIN, 2004).

A modificação dos HDL altera a polaridade da superfície, os HDL deixam de ser hidrofílicos e passam a ser hidrofóbicos. Desta forma, os compostos hidrofóbicos podem

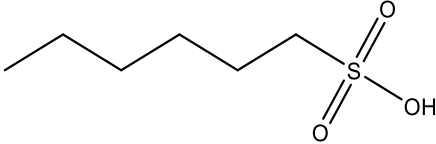
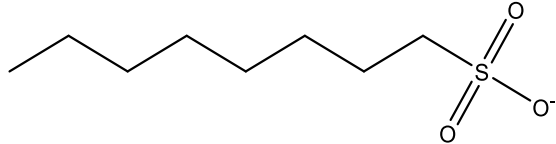
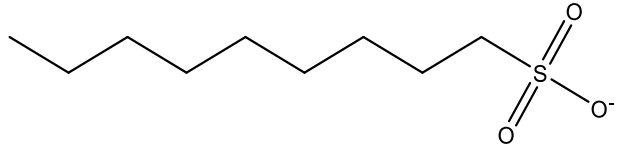
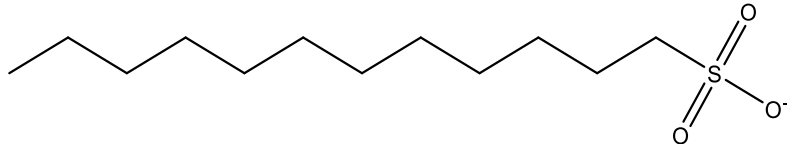
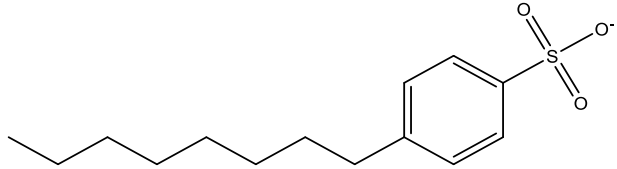
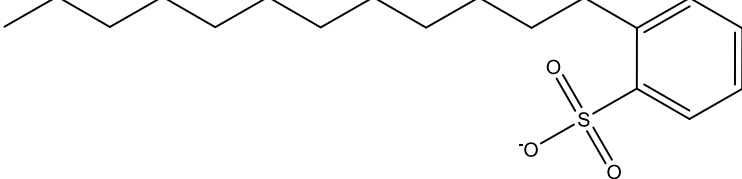
interagir com a cauda dos surfactantes melhorando a solubilidade de moléculas pouco solúveis em um fenômeno chamado adsolubilização ou co-adsorção, que é análogo a solubilização micelar em solução aquosa (ZHAO et al., 2011; FARÍAS et al., 2010).

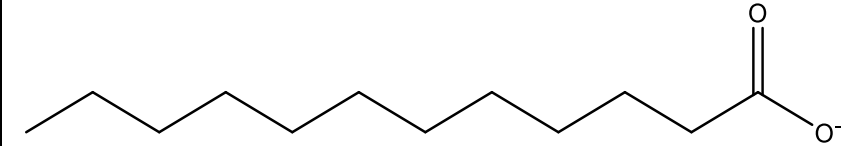
A adsolubilização é um fenômeno caracterizado pela adsorção de surfactantes em interfaces sólido-líquido por exemplo, podendo modificar a superfície do sólido e favorecer a absorção de moléculas da solução pela qual não seriam absorvidas pelo sólido na ausência do surfactante (CURSINO et al., 2015, WU, HARWEEL, O'REAR, 1987). Zang et al.(2017) modificaram o HDL do tipo Mg_2Al com hexanossulfonato de sódio e dodecanossulfonato de sódio para a recuperação de corantes industriais e observaram que a presença dos surfactantes foi muito importante para a afinidade entre organo-HDL e os poluentes orgânicos.

Podem ser citados ainda trabalhos envolvendo a adsolubilização do pesticida clorpirifos em HDL do tipo Mg_2Al modificado com DSS e DBS.(WANG et al., 2005) Além da adsolubilização de tiofeno em HDL Zn_2Al e nitrofenol por HDL modificado com DSS, podendo estes dois últimos serem aplicados a estações de tratamento de águas residuais para a eliminação de contaminantes orgânicos (ZHAO et al., 2011).

Os tensoativos aniônicos são os mais utilizados com HDL em decorrência da possibilidade de interação com as cargas catiônicas das suas lamelas, na tabela 17 são apresentadas as estruturas de alguns surfactantes já utilizados. Para eles, os perfis DRX mostraram a variação do espaço interlamelar de acordo com o tamanho de sua cadeia carbônica (ZHANG et al., 2017).

Tabela 17- Surfactantes aniônicos utilizados na modificação de HDL.

Surfactante	Estrutura química	
Hexanossulfonato		(Zhang et al., 2017)
Octilssulfonato		(You; Zhao; Vance, 2002a)
Nonessulfonato		(Zhang et al., 2017)
Dodecanossulfonato		(Zhang et al., 2017; LV et al., 2015; Cursino et al., 2015; Cursino et al., 2013 Zhao et al., 2011; Iyi, Tamura, Yamada, 2009; Costa et al., 2008; Wang et al., 2005; You, Zhao, Vance, 2002a; Zhao, Nagy, 2004; Clearfield et al., 1991;)
Octilbenzenosulfonato		(You, Zhao, Vance, 2002a)
Dodecilbenzenosulfonato		(Cursino et al., 2015; Cursino et al., 2013; Iyi, Tamura, Yamada, 2009; Costa et al., 2008; Wang et al., 2005; You, Zhao, Vance, 2002a,b)

Ácido láurico	 <chem>[O-]C(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>	(Lv et al., 2015)
---------------	---	-------------------

Surfactantes também foram utilizados para promover a delaminação de HDL, os surfactantes minimizam as forças de Van der Waals entre as lamelas e favorecem interações com solventes não aquosos, os quais podem ser utilizados como dispersantes. Pagano et al.(2000) promoveram a delaminação total do HDL Zn_2Al usando DSS como um surfactante aniônico e butanol como o dispersante. O objetivo deste tipo de estudo é desenvolver um método de delaminação de HDL que levará a uma nova geração de materiais nos quais a superfície total do composto em camadas será acessível para reatividade química ou para a preparação de novos materiais porosos ou orientados (LEE, CHOI, KIM, 2010; ADACHI-PAGANO, FORANO, BESSE, 2000).

Os surfactantes podem também ser utilizados auxiliando na formação de nanocompósitos poliméricos. As argilas bem dispersas e esfoliadas na matriz polimérica proporcionam avanços nas propriedades finais do material como melhor resistência a tensão ou a resistência a altas temperaturas (GOHATRE et al., 2017; KUTLU et al., 2014; SENGUPTA et al., 2007; KOJIMA, USUKI, KAWASUMI, 1993).

Na área farmacêutica fármacos também podem ser incorporados, a camptotecina foi carregada em nanopartículas de HDL do tipo $MgAl$ associadas ao colato de sódio, no entanto como foi utilizada uma concentração do surfactante acima de sua concentração micelar crítica (CMC) o surfactante envolveu a camptotecina em micelas (TYNER, SCHIFFMAN, GIANNELIS, 2004).

A glibenclamida (GLIB), como relatado nos capítulos I e II, é uma sulfonilureia de segunda geração amplamente usada no tratamento do diabetes mellitus tipo II, mas sua baixa solubilidade aquosa compromete sua absorção após a administração oral dessa maneira são necessárias estratégias para melhorar sua taxa de dissolução.

1.3 SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A British Standards Institution define nanociência como a área de estudo da matéria em nanoescala, a qual lida com o entendimento de suas propriedades físicas, químicas e possíveis implicações clínicas dependentes do tamanho (RASMUSSEN et al., 2019; BSI, 2007).

A nanotecnologia na área farmacêutica, comumente, está voltada para estratégias que possibilitem a entrega específica de fármacos em seu local de ação reduzindo a possibilidade de efeitos colaterais e possibilitando a liberação controlada e/ou aumento da penetração intracelular. Além disso, nanomateriais podem fornecer proteção contra a degradação

prematura e interação com o ambiente biológico, entrega direcionada, penetração intracelular e melhora na biodisponibilidade (ALEXIS et al., 2008).

No entanto, as vantagens e propriedades dos nanomateriais são dependentes do design destes sistemas e influenciadas por características como tamanho, carga, modificações da superfície e hidrofobicidade. O tamanho e a distribuição das nanopartículas são fatores importantes para determinar sua interação com a membrana celular e a penetração através das barreiras fisiológicas, além de está intimamente relacionada com a sua toxicidade, pois as pequenas dimensões geram aumentam da área de contato e, conseqüentemente, da reatividade podendo induzir uma resposta inflamatória mais facilmente (KUMARI, YADAV, YADAV, 2010; BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2004).

Diferente de outros materiais já amplamente utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas, como PLA e PLGA os materiais inorgânicos como os HDL surgem como uma alternativa inovadora pois através do controle da etapa de síntese podem ser obtidos materiais com variadas propriedades. O controle e planejamento de aspectos como nucleação, envelhecimento, tratamento pós síntese (hidrotérmico) e natureza do ânion interlamelar são fatores de síntese que determinam o tamanho dos HDL, pois afetam o empilhamento de suas camadas e conseqüentemente o seu tamanho de partícula (AGRAWAL et al., 2013; ROJAS et al., 2011; OH et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter nanopartículas biocompatíveis de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida para a melhoria da sua taxa de dissolução e liberação controlada buscando tornar-se uma possível opção terapêutica para o tratamento do diabetes mellitus II.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas de HDL do tipo Zn_2Al organomodificadas com dodecil sulfato de sódio (DSS) e glibenclamida intercalada através da síntese por coprecipitação em *one-pot*;
- Realizar o revestimento das nanopartículas para torná-las gastrorresistentes;
- Caracterizar as nanopartículas difratometricamente, termicamente, espectroscopicamente, assim como sua estabilidade coloidal e propriedades de superfície;

- Realizar a co-liberação do zinco e da glibenclamida nos meios simulados gástrico e intestinal e avaliar o modelo cinético de liberação da glibenclamida;
- Comprovar a biocompatibilidade das nanopartículas através do ensaio de citotoxicidade em fibroblastos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico: $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , KOH e dodecilsulfato de sódio (DSS) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Eudragit L100® (ED) da Evonik, NaOH da Scharlau, HCl 35% da LabKem, metanol e etanol P.A. da Merck® e glibenclamida foram obtidas da Fragon®. A água purificada foi obtida por osmose reversa com um sistema MilliQ (Millipore®).

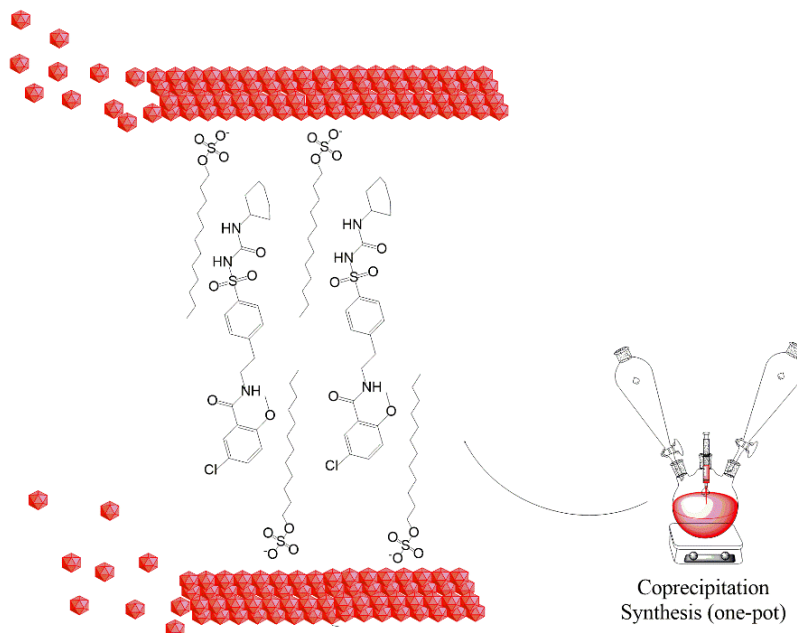
A síntese e modificação dos HDL foram realizadas de acordo com o método de coprecipitação a pH constante desenvolvido por Miyata (1975), com pequenas alterações para imobilização da GLIB (LEÃO et al., 2019b).

A síntese dos HDL foi realizada em solução metanólica (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio e agitação mecânica. O sistema de síntese consistiu em um balão de três bocas acoplado a dois funis de adição e um eletrodo de pH (eletrodo de solução orgânica). O balão continha DSS ($5,18 \times 10^{-3}$ mol) solubilizado em metanol e os funis continham KOH (0,2 mol) em um dos funis e solução salina de ZnCl_2 anidro ($6,03 \times 10^{-3}$ mol) e $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($3,01 \times 10^{-3}$ mol) no outro funil. As soluções foram adicionadas gota a gota ao balão até que fosse atingido o pH $7,5 \pm 0,5$ para a síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl-DSS}$ (codificado como S2). A taxa de fluxo de todos os reagentes foi de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e o volume de 100 mL. Para a síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ (chamado S1), a solução metanólica não continha DSS.

Para a síntese de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl-DSS-GLIB}$ (chamado S3) o sistema de síntese foi o mesmo de S1 e S2, com alteração das soluções utilizadas: metanol (50 mL) com DSS ($9,27 \times 10^{-4}$ mol) e GLIB ($9,27 \times 10^{-4}$ mol) solubilizados no balão e KOH (0,2 mol), ZnCl_2 anidro ($1,85 \times 10^{-3}$ mol), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($9,27 \times 10^{-4}$ mol) gotejados dos funis de adição. Nas condições experimentais em que as sínteses foram realizadas (pH 7,5), a GLIB é encontrada na forma aniônica (REMKO, M., 2009; LEÃO et al, 2019b). Após a síntese, o sistema foi agitado por 12 h, centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos com água (3 vezes, para remover o excesso de cloreto), solução salina tamponada com fosfato (PBS 3 vezes, para remover o excesso de DSS) e metanol (6 vezes, para

remover o excesso de fármaco), seco em estufa a 50°C e caracterizado. A figura 20 contém a representação da etapa de síntese dos HDL:

Figura 20-Representação das sínteses em *one-pot*.



3.1 REVESTIMENTO DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

O revestimento dos HDL com Eudragit L100® (ED) foi realizado para protegê-los do meio ácido. Em um protocolo típico, agitou-se 500 mg de HDL modificado em 10 mL da solução etanólica de ED a 70°C e em 500 rpm por 2h. Em seguida, a suspensão foi vertida em água e agitada a 500 rpm, o produto resultante foi filtrado e seco a 70°C. (Duan et al. 2004; Del Arco, 2010) S1, S2 e S3 revestidos foram codificados como S4, S5 e S6, respectivamente.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

Os padrões de difração de raios X (DRX) foram registrados no Philips PW1710 com o goniômetro vertical do tipo PW1820/00 e um gerador do tipo Enraf Nonius FR590 operando a 40Kv e 30 mA. Foi utilizada uma lâmpada de cobre com monocromador de grafite ($K_{\alpha 1}=1,54$). Os difratogramas foram obtidos na faixa (2θ) 2° a 50° a uma taxa de 0,02°/s. As amostras foram viradas durante a medição para obter perfis de pico ideais para análise, bem como para minimizar o efeito de orientações preferenciais. Eles foram depositados em base de cristal orientada (placa de silício) para evitar ruídos de fundo. A análise matemática foi realizada no

software HighScore Plus (Versão 152 3.0d). As distâncias (hkl) para o plano (003) foram obtidas pela equação de Bragg (demonstrada no capítulo III).

A área superficial (S_{BET}) foi determinada a partir das isotermas de adsorção-dessorção de 77K N_2 calculada usando o método B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller) na faixa de pressão relativa (P/P_0) 0- 1. O volume, diâmetro médio dos poros e a distribuição foi estimada usando o método B.J.H (Barret-Joyner- Halenda) obtido em um analisador de área de superfície e tamanho de poro modelo ASAP 2420 da Micrometrics (área de superfície acelerada e sistema de porosimetria) do CETENE (Centro de Tecnologia do Nordeste).

A análise do potencial zeta (ζ) e do tamanho hidrodinâmico (d) foram realizados no instrumento Zetasizer Nano ZSP Malvern® através do espalhamento dinâmico de luz (DLS).

A espectroscopia no infravermelho médio foi realizada por reflectância total atenuada/ transformada de Fourier (ATR/FT-IR) usando um acessório Gladi-ATR com cristal de diamante (Pike, Madison, WI, EUA), leitura na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

A análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 ml/min, taxa de aquecimento de 10°C/min e temperatura na faixa de 25 a 700°C.

3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE) E *DRUG LOADING* (DL)

A carga (Eq. 3) e eficiência de encapsulamento (Eq. 4) da GLIB foram determinadas por espectrofotometria UV-vis a λ_{max} 300 nm. A concentração foi calculada por análise de regressão de acordo com a curva padrão obtida a partir da solução padrão de GLIB. (HUANG et al., 2018)

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{quantidade total de GLIB encapsulada}}{\text{quantidade total de NP}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

$$\text{Eficiência de encpsulamento (\%)} = \frac{\text{quantidade total de GLIB} - \text{quantidade de GLIB}}{\text{quantidade total de GLIB}} \times 100$$

(equação 4)

3.4 VIABILIDADE CELULAR (WST-1)

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* das NP foi avaliado usando fibroblastos BALB/3T3 (CCL-163, ATCC). A linhagem celular foi cultivada em meio DMEM- *Dulbecco modification of Minimum Essential Media* (89%) suplementado com SFB- soro fetal bovino (10%) e antibióticos (penicilina 10.000UI/mL, estreptomicina 10.000µg/mL, 1%). As células foram semeadas em placas de 24 poços com 0,5 ml de meio de cultura (20.000 células / poço) e cultivadas por 24h (37°C, 95% de UR, 5% de CO₂) para obter confluência. Após 24h, as NP foram colocadas em contato com as células e incubada por 24h (37°C, 95% RH, 5% CO₂). O controle positivo utilizado foram células sem NP. Os testes foram realizados em triplicata.

Para realizar o ensaio, o pó foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Os tubos contendo as amostras foram fechados com encapsulador para garantir sua integridade durante a esterilização.

Devido à não solubilização do pó no meio suplementado com DMEM e PBS, o protocolo WST- 1 foi realizado com as amostras em *TransferWell* (poços com perfuração que permitem o contato contínuo das amostras de suspensão com as células), a concentração final das amostras foi de 100µg/mL.

Após 24h de incubação, os *TransferWell* foram removidos dos poços. Cada poço foi lavado com 500µl de DMEM (sem suplementos). A placa foi agitada brevemente e incubada por 2h (37°C, 95% RH, 5% CO₂), depois a placa foi lida com absorvância medida a 450nm (Leitor de Microplacas UV Bio-Rad Modelo 205, EUA). A viabilidade celular foi calculada como:

$$viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{exp}}{Abs_{controle\ negativo}} * 100 \text{ (equação 5)}$$

3.5 ESTUDOS DE CO-LIBERAÇÃO *IN VITRO* PARA GLIB E ZN²⁺

Para estudos de liberação *in vitro* da GLIB, pesou-se quantidade de S3 e S6 equivalente a 5mg de GLIB (dose terapêutica). O teste foi realizado em dissolutor, em triplicata, em condição *sink* a 37±0,5°C utilizando o aparato de dissolução II a 75 rpm e 300 mL de meio. Os meios de liberação foram tampão fosfato pH 7,4 para simular o pH intestinal e ácido clorídrico a pH 1,2 para simular o meio ácido, sem adição de surfactantes. Alíquotas de 1mL foram

retiradas do meio de liberação e as amostras foram filtradas em unidade filtrante de 0,45µm. A osmolalidade dos meios foi medida usando um osmômetro microprocessador PZL-1000.

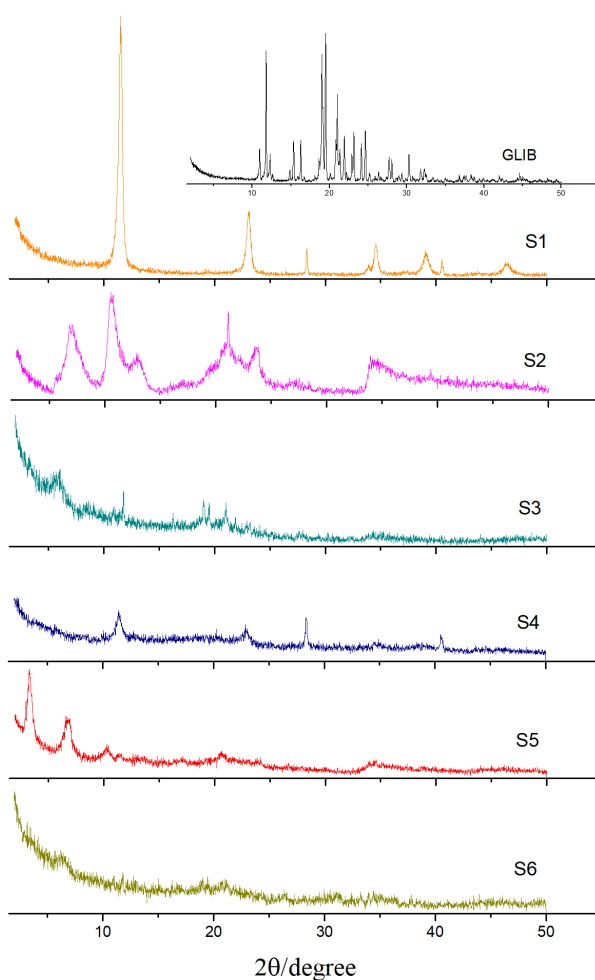
A quantidade de GLIB liberada foi quantificada usando cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna C-8 (4,6 x 250 mm², 5µm, Discovery). Utilizou-se a fase móvel em solução de ácido fosfórico a 0,05% de metanol (80:20, v/v) e a taxa de fluxo foi de 1ml/min. O comprimento de onda do detector UV foi de 254 nm. (GUAN et al., 2014). Os resultados foram expressos como média ± DP (n =3) com $r^2 = 0,999$. Os cálculos cinéticos foram realizados usando o software Microsoft Excel® 2007 e o suplemento DDSolver® (ZHANG et al., 2010).

Para estudos de liberação *in vitro* de Zn, as NP S3 e S6 foram preparadas e submetidas às mesmas condições do ensaio de dissolução para mimetizar também as condições fisiológicas no trato gastrointestinal. As alíquotas foram analisadas em triplicata por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) e as concentrações foram obtidas por comparação com a curva padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de difração de raios X (figura 21) mostram a mudança no espaçamento interlamelar para S1 (d = 7,771Å) em relação aos outros HDL.

Figura 21- DRX de NP e GLIB. S1 (ZnAl), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).



As NP revestidas possuem os picos característicos de HDL mostrados por S1, S2 e S3; a manutenção desses picos indica que o revestimento preserva a estrutura das nanopartículas, porém a intensidade de cristalização das NP S4, S5 e S6 foi reduzida devido ao revestimento com ED. Essa redução na intensidade era esperada, como já relatado na literatura, para o revestimento de outros sistemas nanoestruturados (FRANCO, DE MARCO, 2020; EBADI et al., 2019; YUDAV, MISHRA, MISHRA, 2012).

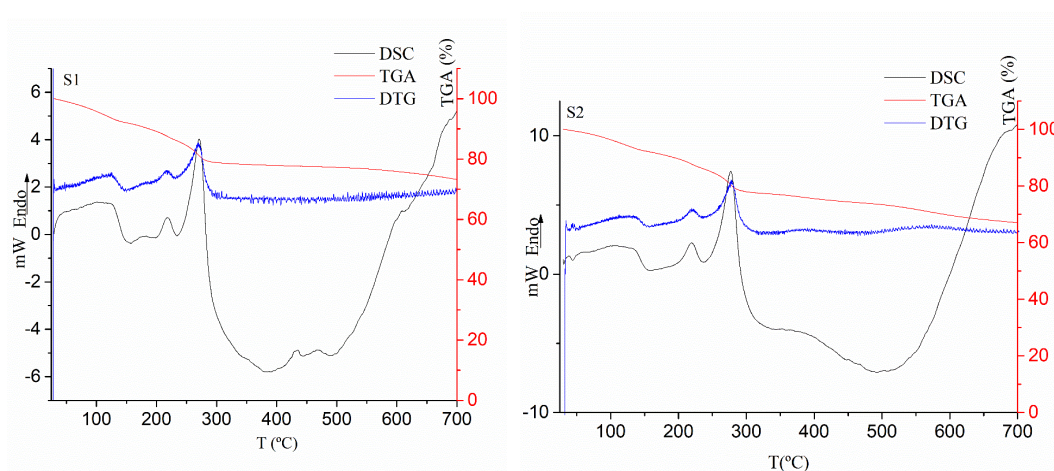
Também é possível observar a presença de picos correspondentes a GLIB em S3 e S6 (11,8°, 16,4°, 19°) indicando a presença de GLIB na superfície do NP e corroborados pelos dados de potencial zeta e dissolução (SULEIMAN, NAJIB, 1989)

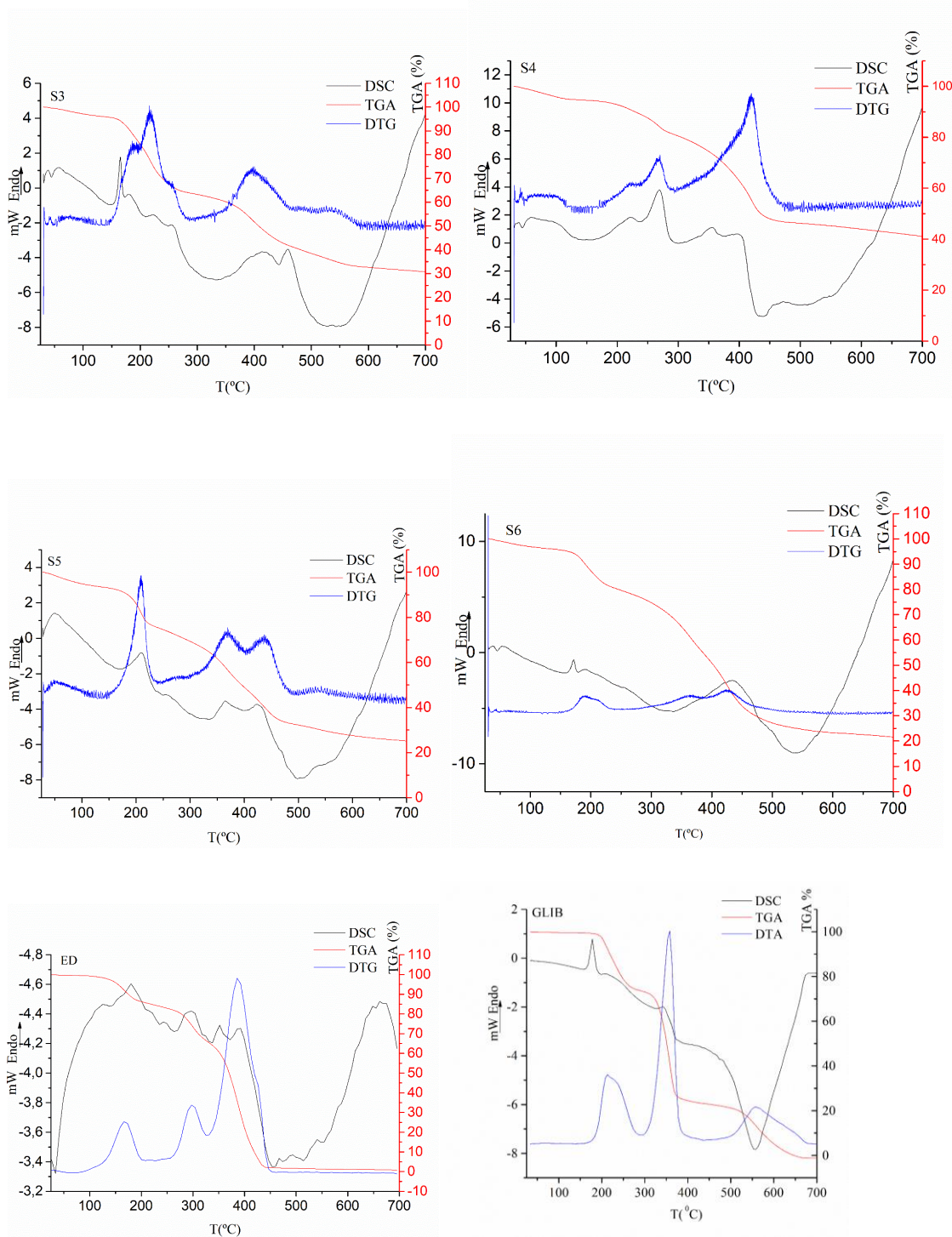
O aumento do espaço interlamelar em S2 ($d = 12,7\text{\AA}$) em comparação com S1 mostra intercalação com DSS, e o aumento do espaço interlamelar em S3 em comparação com S2 mostra intercalação do DSS e GLIB ($d = 14,03\text{\AA}$). Em estudos anteriores, a NP HDL não modificado contendo GLIB não mostrou capacidade intercalante de GLIB, que é um fármaco hidrofóbico e volumoso, apenas adsorção nas lamelas de HDL (LEÃO et al., 2019b, FENGZHU et al., 2015, LEE, CHOI, KIM, 2010), no entanto, observa-se aqui que a organofilização de S3 permitiu a intercalação de GLIB através da adsolubilização com DSS.

S6 apresentou distância interplanar semelhante a S3 ($d = 13,6\text{\AA}$), indicando também que o ED permaneceu na superfície que cobria as NP. No entanto, S5 mostrou $d = 26,42\text{\AA}$ enquanto S2 mostrou $d = 12,7\text{\AA}$ indicando a entrada do ED nos domínios interplanares e formando um nanocompósito intercalado (Ding et al., 2008). A análise dos perfis difratométricos de S3, S5 e S6 revelou que a presença de GLIB intercalada em S5 impedia a entrada de ED, ao contrário de S6, em que a presença de DSS e a ausência de GLIB facilitou a entrada de cadeias de ED.

A análise térmica das NP (Figura 22) mostrou um primeiro evento térmico da temperatura ambiente até 120°C correspondente à remoção da água adsorvida e da água de hidratação. Após o processo de desidratação, os eventos térmicos ocorridos a 200°C e 370°C corresponderam à perda de hidroxilas lamelares que normalmente ocorre em dois estágios, como relatado por Kameda et. al. (2010).

Figura 22-Dados térmicos para S1-S6, GLIB, DDS e Eudragit L100® sob atmosfera de N_2 . S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DDS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido) e S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).





As perdas de massa finais entre 500°C e 600°C para todos os HDL corresponderam ao último estágio de degradação do cloreto intercalado e hidroxilas das lamelas levando ao colapso total da estrutura lamelar e formação de óxidos mistos, como espinélio (MgAl_2O_4) e óxido de magnésio (MgO) (CONSTANTINO, 1995). Para os HDL sintetizados com GLIB (S3, S6), as

perdas de massa entre 500°C e 600°C também foram relacionadas à decomposição da GLIB. A tabela 18 resume as perdas de massa de acordo com o tempo para todos os sistemas.

A fusão da GLIB foi observada por DSC a 172-173°C, após a fusão a linha de base não retornou ao platô inicial, mas eventos exotérmicos com perda de massa ocorreram posteriormente, evidenciando sua decomposição em T_{onset} de 190°C e eventos exotérmicos com picos no dTG a 350°C e 600°C. (RODRÍGUEZ et al., 2004; BRITISH, 1980).

Tabela 18-Descrição dos eventos termogravimétricos das NP e Eudragit L100®.

NP	$T_{\text{onset 0.05}}$	$T_{\text{onset 0.1}}$	$T_{\text{onset 0.15}}$	Resíduo %
Eudragit L100®	151	173.3	204	1.91
S1	110	181	248	73
S4	119	225	263	41
S2	116	184	245	68
S5	97	182	201	23
S3	163	180.3	195	30
S6	165	191	209	21

Nota: $T_{0.05}$ é a temperatura na qual ocorre uma perda de 5% da massa inicial (temperatura de início). $T_{0.1}$ é a temperatura na qual ocorre a perda de 10% da massa inicial e $T_{0.15}$ é a temperatura na qual ocorre a perda de 15% da massa inicial. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).

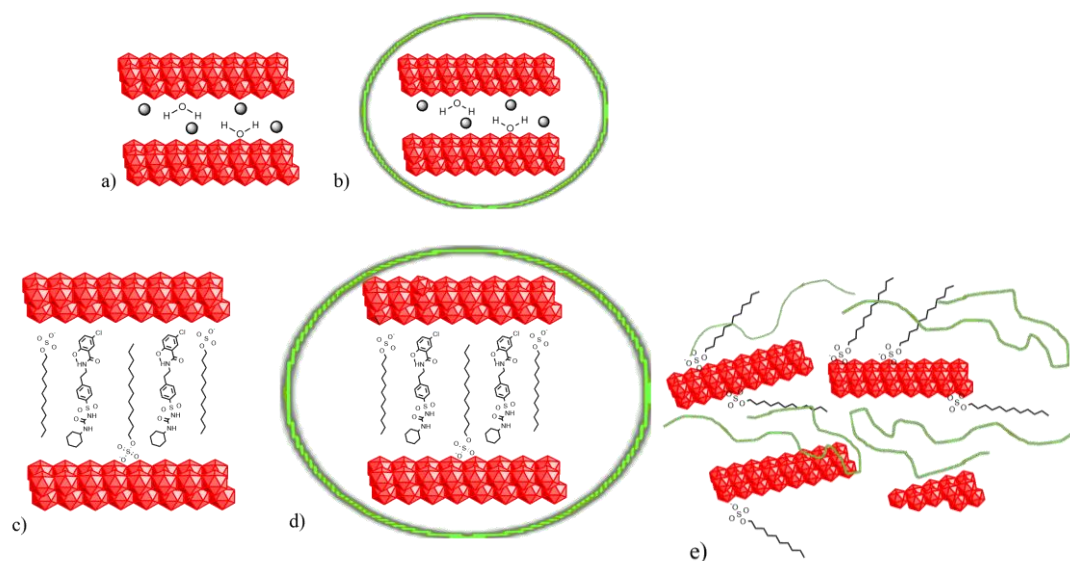
As NP revestidas S4 e S6 apresentaram um atraso no $T_{\text{onset 0,05}}$ comparado aos sistemas não revestidos S1 e S3, respectivamente, indicando que o revestimento com ED atrasou a perda de água adsorvida na superfície das NP.

Esperava-se que a NP S5 apresentasse estabilidade térmica em comparação com outras NP HDL, pois é um nanocompósito, no entanto, os dados de TGA/DTG mostraram decomposição precoce de S5 ($T_{\text{onset 0,05}}$ 97°C) em relação aos demais HDL indicando a presença de domínios esfoliados no S5 que expõem o DSS e ED

Esses dados foram corroborados pela comparação entre S2 e S5, pois ambos possuem DSS, S2 apresentou valores de perda de massa mais baixos para $T_{\text{onset 5\%}}$, $T_{\text{onset 10\%}}$ e $T_{\text{onset 15\%}}$ que S5 porque o DDS está intercalado no HDL, apresentando assim maior estabilidade térmica do que S5 devido à proteção dos domínios interlamelares. Além disso, os valores de perda de massa da NP S2 foram muito próximos dos valores de S1 corroborando para intercalação. Todos os dados da análise térmica corroboraram os dados apresentados no DRX para adsolubilização da GLIB em S3 e S6, intercalação de DSS em S2 e obtenção de um compósito esfoliado/intercalado em S5 (figura 23).

O ED tem menor percentual de perda de massa devido à sua natureza orgânica (1,91%), para os outros sistemas, a quantidade de resíduos diminuíram com o aumento da quantidade de compostos orgânicos, S1 (73%) e S4 (41%), S2 (68%) e S5 (23%), S3 (30%) e S6 (21%).

Figura 23- Representação da organização do HDL, S1, S3, S4, S5 e S6. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DDS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido).



Os dados para ζ e o tamanho hidrodinâmico das NP HDL são mostrados na tabela 18. O tamanho das NP é importante para a avaliação da citotoxicidade, perfil de liberação de fármacos e estabilidade coloidal do sistema (ZHANG, ZHENG, LI, 2014; WHANG et al., 2012; CHI, OH, CHOY, 2008). O tamanho pode ser controlado por fatores envolvidos na síntese de HDL, como temperatura, tipo de base e ânion interlamelar, como esses fatores afetam a supersaturação, a precipitação, a nucleação e a orientação do crescimento cristalino (LEO et al., 2019a; ROJAS et al., 2015; ZHANG et. al., 2014; XU et al., 2006; OH, HWANG, CHOY, 2002; CONSTATINO et al., 1998; RANDOLPH, LARSON, 1988). O ânion entre os domínios dos intercalares é um fator importante para o empilhamento das camadas e tamanho das partículas de HDL; S1 foi maior que S2 devido à influência do DSS que induziu a redução do tamanho da NP HDL, orientando o crescimento de cristais durante a etapa de síntese (tabela 19) (ROJAS, GIACOMELLI, 2015; Li et al, 2011; CONSTANTINO et al., 1998). Além disso, o DSS contribuiu para a estabilidade de S2 gerando repulsão eletrostática e estérica entre as NP (ROJAS, GIACOMELLI, 2015; LI et al, 2011).

Os dados do potencial zeta indicaram a estabilidade das NP S3 e S6 e ausência de agregação, de acordo com a Sociedade Americana de Ensaios e Materiais (ASTM) suspensões coloidais com potencial zeta positivo ou negativo entre 30 e 40 mV indicam estabilidade moderada, enquanto valores absolutos acima de 40mV estão associados a altas estabilidade (Krishnamoorthy et al., 2013). A estabilidade também foi confirmada pelo tamanho hidrodinâmico das NP entre 250 e 700 nm, menor que o relatado para HDL agrupados (10 μ m) (Rojas,Giacominelli, 2015; Dong et al., 2015; Dong et al., 2014; Ambrogi et al., 2008; Oh et al., 2002; Xu et al., 2006). A presença de DSS mudou o ζ de S2 para valores negativos, indicando que, além de aumentar o espaço interlamelar da NP o DSS excedeu a capacidade de intercalação do HDL e também interagiu eletrostaticamente com a superfície externa modulando a carga e a hidrofobicidade dos HDL (ROJAS et al., 2014; CHEN et al., 2013, ROJAS et al., 2011; XU et al., 2008; ROJAS et al., 2004).

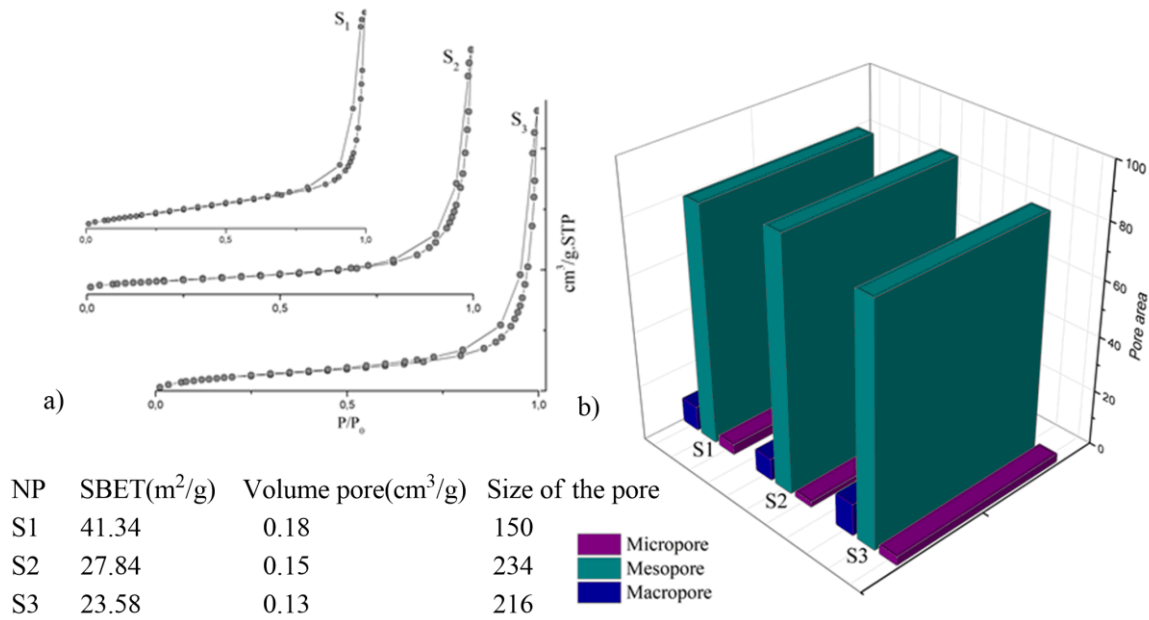
Tabela 19-Tamanho, PDI e tamanho hidrodinâmico de NP S1 (ZnAl), S2 (ZnAL-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB).

amostras	tamanho(nm)	PDI	zeta(ζ)	amostras	tamanho(nm)	PDI	zeta(ζ)
S₁	688.8	0.311	+14	S₆	641.4	0.693	-37
S₂	251.6	0.529	-13.9	GLIB	-	-	-21.2
S₃	469	0.417	-35.5	DSS	-	-	-29.2

Os valores para S3 (ζ = -35,5) em comparação a S2 (ζ = -13,9) indicaram a presença de GLIB também associada à superfície do HDL resultando em uma soma de cargas negativas na superfície da NP. Assim, a funcionalização do HDL foi revelada como uma abordagem apropriada para produzir NP com maior estabilidade coloidal e funcionalidade aprimorada (ROJAS, GIACOMELLI, 2015; LI et al, 2011). A carga de GLIB foi de 400 μ g.mg (40% $\pm$ 5%) com EE% de 87% $\pm$ 5%.

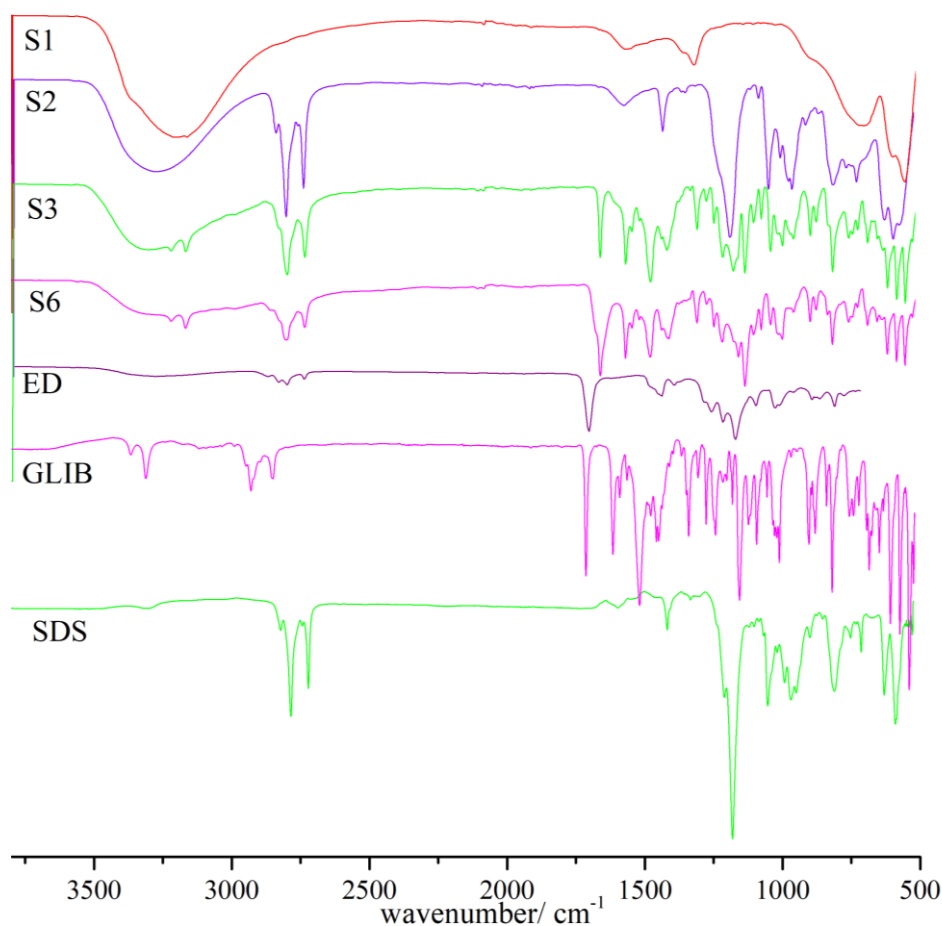
Isotermas obtidas pelo método B.E.T. (figura 24a) foram do tipo IV e a histerese do tipo H3 segundo a classificação IUPAC característica para estruturas mesoporosas (tamanho de poro entre 20-500Å). Os dados de distribuição do tamanho dos poros (figura 24b) foram corroborados com dados das isotermas. Além disso, observamos uma redução na área superficial (S_{BET}) e volume de poros de todas as NP comparadas a S1 comprovando a interação das lamelas com DSS em S2, DSS, GLIB em S3 e a organização estrutural apresentada no DRX.

Figura 24- Caracterização da superfície de NP em (a) isotermas de adsorção-dessorção de N₂ para NP por B.E.T. e (b) distribuição da área dos poros por B.J.H. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB).



Nos espectros de infravermelho (figura 25) de S1, a presença da banda entre 3.000 e 3.600 cm^{-1} corresponde as hidroxilas das lamelas e à água de hidratação. Em 700-800 cm^{-1} apareceram bandas típicas de HDL-Cl, referentes a ligações de cloreto, conforme relatado por Klopogge (2005).

Figura 25-Espectros de infravermelho para S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl- DSS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido), GLIB (glibenclamida) e ED (Eudragit L100®).



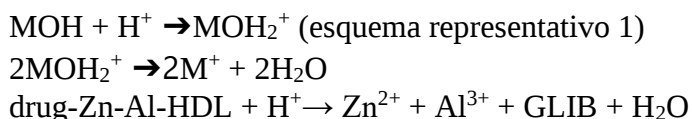
A banda de absorção próxima à região de 1.630 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular das moléculas de água. (Kim et al., 2014) As bandas referentes ao perfil aniônico do DSS no HDL foram caracterizadas (S2, S3, S6) em 2.924 e 2.852 cm^{-1} . Foram observados os trechos antissimétricos e simétricos $-\text{CH}_2-$, trecho antissimétrico de $-\text{CH}_3$ a 2.955 cm^{-1} e simétrico em 2.849 cm^{-1} . A 1.077 cm^{-1} foi observada a vibração de $-\text{SO}_2$ com flexão fora do plano. Essas bandas relacionadas ao DSS provam que o HDL sintetizado foi modificado. (VIANA, SILVA, PIMENTEL, 2012; LEE, CHOI, KIM, 2010)

Para S3 a banda entre 3.000 cm^{-1} e 3.600 cm^{-1} correspondente às hidroxilas das lamelas e à água de hidratação se sobrepõem parcialmente às bandas correspondentes a $-\text{NH}$ de uréia e $-\text{NH}$ da amida da GLIB a 3.366 cm^{-1} e 3.318 cm^{-1} , respectivamente. Os deslocamentos em 1.619 cm^{-1} e 1.714 cm^{-1} correspondem aos grupos $\text{C}=\text{O}$ da uréia e amida da GLIB em a banda em

1.529 cm^{-1} correspondente à flexão da uréia, conforme relatado por Mudgal & Pacholi (2012). O grupo éter apresentou fortes bandas de absorção em 1.240 cm^{-1} e 1.015 cm^{-1} correspondendo aos valores encontrados na literatura para a GLIB. (ABDEL, WAHAB, 1966) Os sinais 2.924 e 2.852 cm^{-1} correspondem aos estiramentos antissimétrico e simétrico de $-\text{CH}_2-$ da GLIB e DSS. (SPERLINE, SONG, FREISER, 1997)

A Figura 25 mostra as principais bandas do ED, o estiramento da carbonila em 1.723 cm^{-1} e da ligação C-O a 1.143 cm^{-1} . A presença de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ foi evidenciado pelos dobramentos em 1.439 cm^{-1} e 1.483 cm^{-1} , respectivamente, e estiramento em 2.949 cm^{-1} . (LI et al., 2004) Para os sistemas revestidos foi observada a presença da carbonila do grupo éster do ED em 1.715 cm^{-1} para S4, 1.701 cm^{-1} para S5 e 1.716 cm^{-1} para S6 revestido. Além disso, foram observados os sinais de 1.161 cm^{-1} correspondentes ao $\nu\text{C-O}$ do éster no revestimento do S4.

Para o teste de dissolução *in vitro*, observa-se que em meio ácido (pH 1,2/146 mOsmol.Kg-1) ocorre a desestruturação do HDL. Os cátions H^+ presentes no meio protonam as hidroxilas dos HDL gerando polarização e enfraquecimento das ligações metálicas (esquema representativo 1). Essas ligações são enfraquecidas até romperem-se provocando a ruptura das camadas dos HDL com a dissolução de suas unidades octaédricas e a liberação de cátions, ânions e GLIB intercalada. (SONGKHUM et al., 2018; IMRAN et al., 2016; FURRER, STUMM, 1986)



Assim, era esperado que a quantidade de GLIB liberada a partir das NP S3 fosse próxima a 100% em meio ácido. No entanto, a solubilidade da GLIB depende do pH e o trato gastrointestinal afeta sua dissolução; em meio simulado gástrico sua solubilidade é baixa porque é um ácido fraco ($\text{pK}_a 5,3 \pm 0,1$), portanto a GLIB foi liberada de S3 mas pouco solubilizada. A fração solubilizada de GLIB estava abaixo da capacidade de detecção do HPLC impossibilitando sua quantificação. Assim, para avaliar a eficácia do revestimento ED, os dados de liberação de zinco foram usados para provar a progressão do intemperismo da NP e da gastroproteção em S6 (KHAN et al., 2018; LUCIO et al., 2017; GUAN, 2014; ROJAS et al., 2014; KASIM et al., 2004; TAKLA, 1981; HADJÚ et al., 1969).

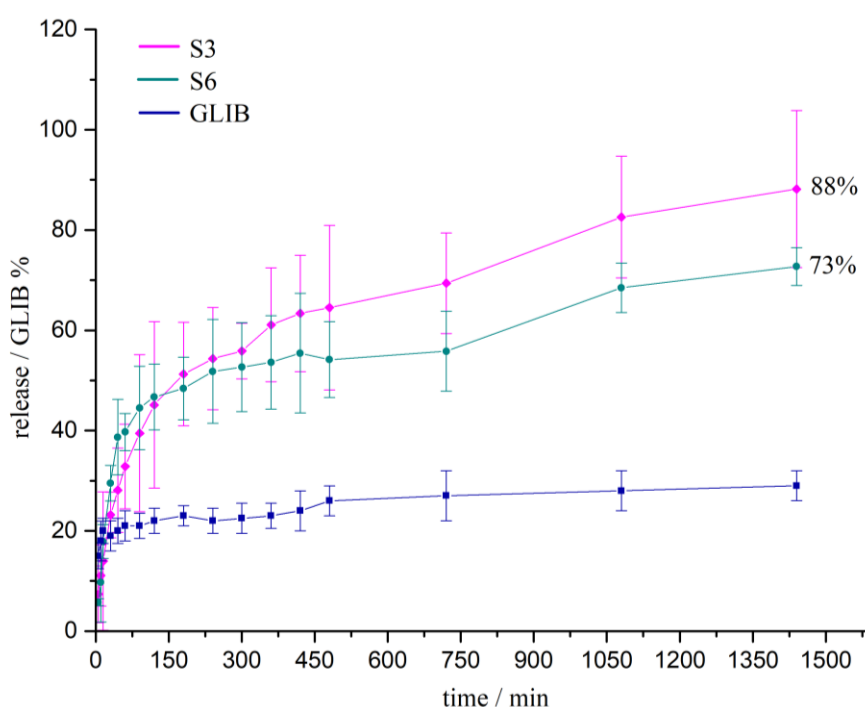
Observou-se que o revestimento com ED reduziu a quantidade de íons de zinco liberados (tabela 20), isso ocorre porque polímeros acrílicos, como ED, possuem aglomerados de ácido carboxílico que permanecem intactos em meio ácido, permitindo a gastroproteção de S6 que liberou uma quantidade muito menor de zinco (2,96 ppm) em comparação a quantidade liberada por S3 (20,23ppm) (SHAFIGHA, HAMIDPOURA, FURRERB, 2019; KHAN et al., 2018; ROJAS et al., 2011; ARINAITWE et al., 2009; ROJAS et al., 2004; KURENKOV et al., 2001; FURRER, STUMM, 1986).

Tabela 20-Determinação de zinco no meio gástrico simulado (pH 1,2) por absorção atômica com chama para S3 (ZnAl-SDS-GLIB) e S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).

tempo(min)	S6 (ppm% $\pm$ 0.002)	S3 (ppm% $\pm$ 0.002)
5	1.04	7.98
10	1.64	8.73
15	1.78	13.56
60	2.76	18.37
120	2.96	20.23

No ambiente intestinal, as NP HDL foram mais estáveis porque a estrutura lamelar é mantida em pH acima de 7 e pode atuar modulando a liberação do fármaco. Os perfis de liberação de S3 e S6 são apresentados na figura 26.

Figura 26- Liberação da GLIB de S3 (ZnAl-DSS-GLIB) e S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido) no meio simulado intestinal (pH 7,4).



A GLIB mostrou um máximo de 20% de dissolução, enquanto NP S3 e S6 tiveram uma maior taxa de dissolução (Figura 26), indicando que NP HDL são promissores para o desenvolvimento de *drug delivery* para fármacos com baixa solubilidade. (LEÃO et al., 2019b; CAPSONI et al., 2018; AMBROGI et al., 2003)

A liberação da GLIB das NP começou nos primeiros minutos (Figura 26), essa fase inicial pode ser atribuída às moléculas adsorvidas fora da estrutura lamelar que estão interagindo fracamente com as cadeias hidrofóbicas do DSS e as camadas positivas da lamela conforme observado nos dados do potencial zeta (Ha, Xantos, 2011; Rojas et al., 2011,2004; Xu et al., 2008).

Posteriormente, houve uma liberação lenta e sustentada de GLIB que ocorreu através da troca entre os ânions OH^- , HPO_4^- , HPO_3^{2-} presentes no meio simulado intestinal e GLIB intercalada em S3 e S6 através do mecanismo de troca iônica. Os íons fosfato são capazes de trocar ânions intercalados em HDL devido à sua alta afinidade pelas lamelas; esse processo ocorre lentamente, durante a primeira hora S3 libera 33% da GLIB, após 8h libera 64,5% e atinge 88,16% após 24 horas. Para S6 40% da GLIB foi liberada durante a primeira hora, 54% após 8h e 73% após 24h (ROJAS et al., 2012, PERIOLI et al., 2011, BASHI et al., 2010, HUSSIN et al., 2009, AMBROGI et al., 2008, YANG et al., 2007, AMBROGI et al., 2002).

A liberação seqüencial e gradual da GLIB pode ser favorável ao tratamento do diabetes mellitus tipo II, pois o estágio de liberação rápida permite a administração do medicamento em um curto período, enquanto o passo lento permite a manutenção da dose por um longo período reduzindo o número de doses administradas ao paciente (GU et al., 2012, GUNAWAN, XU, 2008).

A porcentagem de GLIB liberada não atingiu 100% em nenhum dos sistemas devido às características da troca iônica, em que os ânions das lamelas internas não podem ser completamente trocados em 24 horas. (NEJATI, REZVANI, 2012; XIA et al., 2008, RIVES, 2013, FOGG, DUNN, O'HARE, 1998)

Observa-se também uma diferenciação nos percentuais de GLIB liberados pelas NP revestidas e não revestido com ED. Em $\text{pH} > 6$ ocorre a solubilização do ED, portanto, em meio intestinal ($\text{pH} 7,4/ 103\text{mOsmol.Kg}^{-1}$) o revestimento S6 é perdido e a GLIB intercalada pode ser trocada ionicamente pelos íons fosfato do meio. No entanto, a solubilização de ED é acompanhada pela dissociação de $-\text{COOH}$ em COO^- , a presença dessa carga pode favorecer a

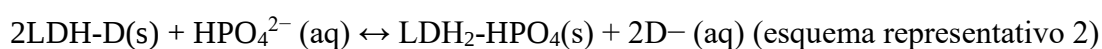
interação entre moléculas ED e lamelas positivas das NP HDL. A presença de ED ionizado pode formar um microambiente negativo em torno das NP e inibir a saída por difusão da GLIB, resultando em uma pequena diferença entre as porcentagens de liberação de S6 (54% em 8h / 73% em 24h) e S3 (64,5% em 8h / 88,16% em 24h). (SHAFIGHA, HAMIDPOURA, FURRERB, 2019; KHAN et al., 2018; ARINAITWE et al., 2009; AMBROGI et al., 2008; KURENKOV et al., 2001; FURRER, STUMM, 1986)

A cinética de liberação foi avaliada usando as equações de Higuchi, Bhaskar, primeira ordem, ordem zero, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin, e são apresentados na tabela 21.

Tabela 21- Modelos e equações cinéticos aplicados à liberação de GLIB das NP.

Modelo cinético	Equação	R ² S3	R ² S6
Zero order	$Q = Q_0 - k_0 t$	1	1
Higuchi	$M_t/M_\infty = kt^{0,5}$	0,9833	0,9905
Hixson-Crowell	$(1 - M_t/M_\infty)^{1/3} = 1 - kt$	0,9698	0,9912
Bhaskar	$Lg(1 - M_t/M_\infty) = -k_B t^{0,65}$	0,9429	0,8623
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = kt^n$	0,8965	0,8696
First order	$\ln Q_t = -kt + \ln Q_0$	0,7424	0,7293
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$	0,754	0,5065

A cinética de liberação da GLIB pode ser explicada globalmente através de modelos de difusão-dissolução. Os bons valores para o modelo Higuchi indicam que ele ajusta-se bem aos dados de liberação, demonstrando a significância do processo de difusão da matriz no controle da taxa de liberação da GLIB. (KHAN et al., 2018; AMBROGI et al., 2008) A troca iônica é um processo influenciado pela difusão, que ocorre inicialmente no exterior do HDL e, posteriormente, no domínio intercalar, tornando o processo lento. (ROJAS et al., 2014; ROJAS et al., 2012; BERBER et al., 2010; ATWOOD et al., 1996) Isso pode ser descrito pelo esquema representativo 2:



Buscando um modelo mais próximo das matrizes argilominerais, o modelo de Bhaskar foi desenvolvido para descrever a difusão de moléculas a partir de matrizes inorgânicas insolúveis e, portanto, mais adequada ao processo de troca iônica. (Bhaskar et al., 1986) Esta equação procura avaliar se a difusão através da partícula (intrapartícula) é a etapa limitante da liberação e está sujeita a um controle estrito da matriz. (PERIOLI et al., 2011; NGAWHIRUNPAT et al., 2010; ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2006; BHASKAR et al., 1986) O modelo de Baskhar apresentou um bom ajuste para a liberação da GLIB, no entanto,

apresentou um valor de correlação menor que o modelo de ordem zero. Estes resultados mostram a importância da matriz no controle cinético da liberação, mas provam que a dissolução da GLIB é mais importante.

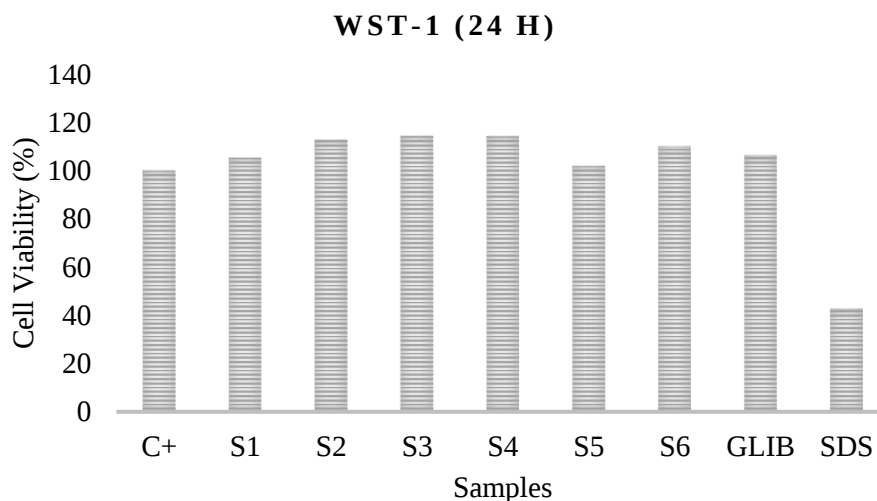
No modelo de ordem zero, a matriz não desagrega e libera lentamente o fármaco, descreve a liberação de fármacos com baixa solubilidade e K_0 constante, sendo considerado o método ideal para obter ação farmacológica prolongada. (COSTA, LOBO, 2001; VARELAS, DIXON, STEINER, 1995) Quando ocorre a troca de íons, os ânions GLIB se difundem através das camadas de HDL (intrapartícula) e da solução ao redor das NP HDL no meio. No entanto, a baixa solubilidade da GLIB atua como um passo limitante para sua difusão, tornando o modelo de ordem zero o mais adequado para explicar sua cinética de liberação.

A falta de ajuste adequado para o modelo de primeira ordem confirma que a liberação da GLIB não depende de sua concentração na matriz e sua difusão não é passiva. (ZHANG et al., 2014; PERIOLI et al., 2011)

Assim, os dados experimentais foram ajustados adequadamente para o modelo de ordem zero, mostrando a maior influência da solubilidade da GLIB em comparação com o controle da matriz e da difusão, sugerindo que para fármacos de baixa solubilidade (SCB II e IV) a taxa de dissolução do fármaco possui uma influência maior na cinética de liberação do que a taxa de troca iônica do HDL. (ROJAS et al., 2014; ROJAS et al., 2012; PERIOLI et al., 2011; AMBROGI et al., 2002)

Nos ensaios de citotoxicidade, as NP foram considerados não tóxicos para fibroblastos na concentração de 100µg/mL demonstrando a biocompatibilidade de todos os HDL sintetizados. (figura 27).

Figura 27- Viabilidade celular de NP em fibroblastos BALB / 3T3 (CCL-163, ATCC). S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-DSS), S3 (ZnAl-DSS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-DSS-GLIB revestido), GLIB (glibenclamida) e C + corresponde ao controle positivo.



A tabela 22 contém os resultados da estabilidade coloidal das NP realizada durante 6 meses, comprovando a manutenção da sua estabilidade durante este período.

Tabela 22- Estabilidade coloidal das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (HDL) organomodificados carreando glibenclamida (S6).

Tempo (meses)	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão (pDI)	Potencial zeta (mV)
0	641 ± 10,0	0,693 ± 0,021	-37 ± 0,48
3	639 ± 8,3	0,695 ± 0,009	-36,8 ± 0,95
6	635 ± 10,8	0,696 ± 0,010	-36,3 ± 0,14

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- NP biocompatíveis de HDL Zn_2Al organomodificados podem ser obtidas por síntese *one-pot* pelo método de coprecipitação tornando o método mais simples e mais barato em comparação com os métodos em múltiplas etapas.
- Os dados de DRX mostraram adsolubilização da GLIB em S3 e S6 devido ao aumento do espaço interlamelar e à hidrofobização promovida pelo DSS, além disso os dados de DRX juntamente com os dados de TGA/DTG e DSC corroboraram para o revestimento das NP S4 e S6 por ED e obtenção de nanocompósitos esfoliados/intercalados para S5;

- Organofilização de HDL e intercalação de GLIB reduziram a área de superfície (S_{BET} 23,58 m² / g) e tamanho de NP (469 nm). Além disso, a mudança no potencial zeta em relação ao HDL primitivo (S_{BET} 41,34 m²/g, 688,8nm e +14ζ) indicando que a funcionalização parece uma abordagem apropriada para produzir NP com maior estabilidade coloidal e funcionalidade aprimorada;
- Os dados de liberação de zinco da matriz HDL (2,96% ± 0,002 ppm) mostraram a eficácia do revestimento em meio ácido (pH 1,2) e os dados de liberação do GLIB mostraram cinética de liberação de ordem zero com liberação no meio intestinal simulado;
- Todas as NP foram consideradas biocompatíveis no ensaio WST-1 em cepas de fibroblastos BALB 3T3, tornando essas NP promissoras terapeuticamente para a liberação prolongada da GLIB.

5.5 ARTIGO V: NANOTOXICIDADE E EFICÁCIA DAS NANOPARTICULAS ORGANOMODIFICADAS DE GLIBENCLAMIDA E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES EM MODELO ANIMAL DIABÉTICO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

A avaliação da segurança dos nanomateriais requer uma abordagem multidisciplinar envolvendo os aspectos químicos, físicos e biotecnológicos. As nanopartículas (NP) apresentam padrões de toxicidade distintos em comparação aos sistemas micro e macroparticulados, pois a redução do tamanho gera o aumento significativo da área superficial e origina interações complexas em ambientes fisiológicos (KUMARI, LUQMAN, MEENAN, 2020).

Devido a capacidade de penetração e translocação celular, as NP podem ocasionar citotoxicidade em decorrência do estresse oxidativo e/ou lesão em organelas, além dos efeitos da tensão interfacial, cargas eletrostáticas, forças de van der Waals e interação estérica ao ligarem-se a componentes celulares e causarem a morte celular. Desta forma, avaliar a nanotoxicidade é uma etapa essencial para o desenvolvimento de um novo Drug Delivery nanoestruturado para comprovar a sua viabilidade e contribuir com as futuras avaliações de segurança e risco do novo medicamento em desenvolvimento (ERKEKOGLU, KOCERGUMUSEL, 2018; BUZEA, PACHECO, ROBBIE, 2007).

Comparado ao grande número de estudos de biossegurança *in vitro* dos HDL, a avaliação minuciosa da sua biossegurança *in vivo* permanece pouco explorada e necessita de grandes esforços, o primeiro estudo que forneceu informações toxicológicas *in vivo* de nanopartículas de HDL foi relatado pelo grupo Choy em 2004 (KWAK et al., 2004) e pesquisas mais recentes mostram que HDL com tamanho de partícula de 100 nm injetados por via intravenosa em ratos não apresentaram nenhum efeito no peso corporal nas doses de até 200 mg.kg⁻¹ (CAO et al., 2019).

Estudos toxicológicos realizados em ratos de laboratório apresentam boa correlação e valor de predição para a espécie humana. Dentre os modelos diabéticos que podem ser utilizados para a avaliação da nanotoxicidade, os modelos com estreptozotocina são amplamente utilizados para induzir de forma reprodutível o DM através da morte das células β (SZKUDELSKI, 2001). Em doses elevadas, a STZ prejudica gravemente a secreção de insulina, imitando o tipo 1, enquanto em baixas doses induz uma destruição gradual das células β com leve comprometimento da secreção de insulina, semelhante ao diabetes tipo II (MURKHERJEE et al., 2020; SRINIVASAN, 2005; REED et al, 2000). Embora as doses de STZ possam variar muito entre sexo, doses de STZ > 65mg/kg são consideradas doses elevadas, 40-55 mg/kg são moderadas e <35 mg / kg são doses baixas (GHASEMI et al., 2014).

Desta forma, a avaliação da eficácia e nanotoxicidade das NP da GLIB e HDL foi realizada através do tratamento (30 dias) de ratos Wistar induzidos ao diabetes com STZ. Os parâmetros clínicos como polidipsia, polifagia, massa corporal e glicemia foram monitorados ao longo de todo o tratamento e os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos foram avaliados ao fim do tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a nanotoxicidade das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares organomodificados e glibenclamida durante o tratamento de ratos *wistar* diabéticos por 30 dias através do monitoramento dos parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir diabetes mellitus através da administração de estreptozotocina em ratos *wistar* machos;
- Realizar o tratamento dos ratos diabéticos durante 30 dias através da administração de nanopartículas gastrorresistentes de hidróxidos duplos lamelares organomodificados carreando glibenclamida e comparar frente aos animais tratados com glibenclamida, hidróxidos duplos lamelares, animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados;
- Monitorar os parâmetros clínicos: glicemia, massa corporal, consumo de ração e água ao longo de todo o tratamento;
- Realizar a avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e determinação da massa dos órgãos (fígado, rins e pâncreas) ao fim do tratamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar (2-3 meses de idade) provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. Os animais receberam água e dieta (Presence[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro), exaustão de ar, temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade. Todos os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE e estavam de acordo com o guia para estudos de toxicidade crônica da OECD (test. n.452 OECD, 2018).

Indução do Diabetes Mellitus

A glicemia de todos os animais foi aferida antes da administração de STZ utilizando um glicosímetro On Call Plus[®] (Acon Biotech Co., Ltda). O DM foi induzido em ratos Wistar pela administração de injeção única de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg) dissolvida em tampão citrato 0,1mol/L (pH 4,5) por via intraperitoneal. O preparo da solução de STZ foi realizado minutos antes da administração em ambiente com luz infravermelho e protegida com papel alumínio devido sua fotoinstabilidade (FURMAN, 2015; GHASEMI et al., 2014).

Os animais foram submetidos ao jejum de 12h com livre acesso à água e divididos em cinco grupos (n=6). Após três dias da indução, os animais com glicemia de jejum superior a

200 mg/dL e mostrando sinais de poliúria e polidipsia foram considerados diabéticos e incluídos no estudo. A glicemia de jejum foi a utilizada por ser menos variável que a glicemia sem jejum (GHEIBI et al., 2017).

Tratamento

Após a confirmação do diabetes, os animais foram distribuídos randomicamente em cinco grupos (n = 6):

Grupo I – Animais normoglicêmicos;

Grupo II - Diabético não tratado (Controle diabético);

Grupo III - Diabético tratado por via oral com nanopartículas revestidas de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida (NP S6 ou NP HDL-GLIB);

Grupo IV - Diabético tratado por via oral com nanopartículas revestidas de hidróxidos duplos lamelares sem glibenclamida (HDL ou NP S4);

Grupo V - Diabético tratado por via oral com GLIB.

Para o teste de controle glicêmico para as 12h iniciais, a GLIB e as NP foram suspensas em água na dose equivalente a 5 mg.kg⁻¹ de GLIB administradas por via oral (gavagem) utilizando uma sonda endogástrica, enquanto os animais normoglicêmicos (Grupo I) e diabéticos não tratados (Grupo II) receberam o veículo sozinho. As administrações foram realizadas após um período de 12h de jejum. A dose equivalente a 5 mg.kg⁻¹ de GLIB foi utilizada por ser a menor dose utilizada na prática clínica (GONÇALVES et al., 2019).

Para a determinação da glicemia, foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos animais em intervalos pré-determinados (0,5; 1; 2; 4; 6; 12 h após a administração das formulações).

Avaliação toxicológica das nanopartículas *in vivo*

Os animais dos grupos II-IV receberam tratamento diário (30 dias) com suas respectivas formulações na dose equivalente a 5 mg.kg⁻¹ administradas por via oral (gavagem) utilizando uma sonda endogástrica. Os animais normoglicêmicos (Grupo I) e DNT (Grupo V) receberam o veículo sozinho. A massa corporal e glicemia foram registrados semanalmente e a ingestão de alimentos e água foram registrados diariamente, assim como sinais clínicos de toxicidade e mortalidade (MURKHERJEE et al., 2020).

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 12h com água *ad libitum* e em seguida anestesiados com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg, i.p.). Após a

anestesia, procedeu-se a coleta de sangue por punção da veia cava inferior. O sangue foi coletado em dois tubos: o tubo 1 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um anticoagulante para parâmetros hematológicos e o tubo 2 sem anticoagulante, para parâmetros bioquímicos.

Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram determinados no contador hematológico ABX Pentra XL 80 Details – HORIBA sendo determinados os parâmetros de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hemantimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (RDW - red cell distribution width) e volume plaquetário médio (VPM). A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos) foi realizada com May-Grünwald-Giemsa, em cada caso 100 células foram contadas.

Parâmetros Bioquímicos

Para a determinação bioquímica, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a $1480 \times g$ durante 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -20°C até serem determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicerídeos. As dosagens foram realizadas no METROLAB 2300 – WIENER usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim®.

Análise Histológica

A necrópsia foi realizada em todos os animais para avaliar as características externas macroscópicas do fígado, rins e pâncreas. Os órgãos foram cuidadosamente removidos e pesados individualmente e as massas expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100g de massa corporal, respectivamente).

Para o exame histológico, os órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas, seguidas de lavagem em água e imersão em álcool a 70% até a realização da análise. Os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5 μm . As lâminas histológicas foram coloridas com hematoxilina-eosina (HE) e a

análise histológica das seções do pâncreas, fígado e rim foi feita usando um sistema de microscopia automática ZEN blue edition Axio zeiss®.

Análise estatística

Os valores dos grupos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). Diferenças significativas nos valores médios foram avaliadas por *teste t de Student*. As diferenças entre os grupos foram verificadas através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism® 6.0. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

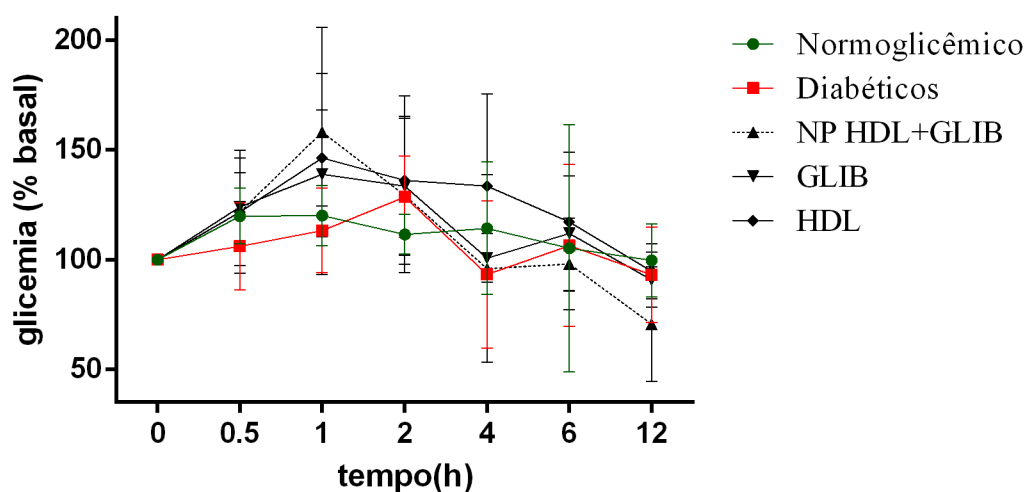
Taxa de Sucesso da Indução

A taxa de sucesso do modelo diabético refere-se à porcentagem de ratos diabéticos que foram efetivamente induzidos ao DM. Neste experimento, utilizando-se a dose de 50 mg/kg de STZ, foi obtido uma taxa de 80% de sucesso na indução. Além disso, não foi observada reversão do estado diabético em nenhum animal.

Avaliação dos Parâmetros Clínicos

A resposta glicêmica das nanopartículas foi examinada durante as primeiras 12h após a primeira dose do tratamento (figura 28).

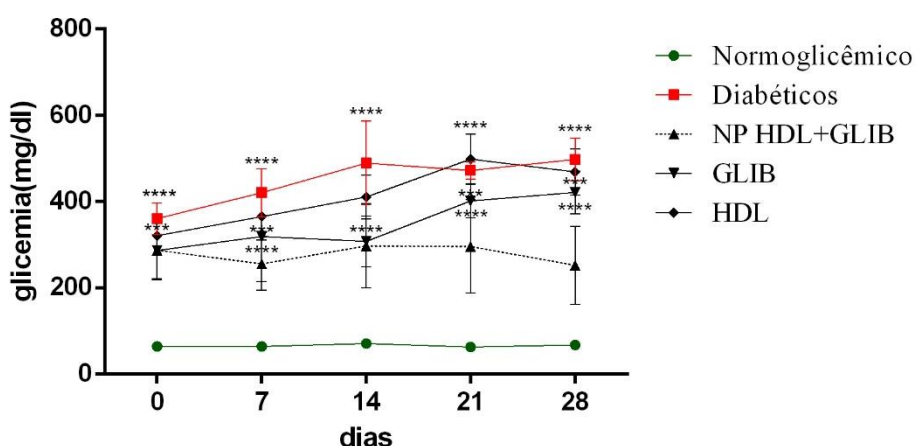
Figura 28-Níveis de glicemia de ratos diabéticos recebendo NP HDL+GLIB (5mg/Kg/v.o.), glibenclamida (5mg/Kg/v.o.), HDL ou veículo. Os dados representam as médias $\pm$ e.p.m. (n=6/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle diabético não tratado.



Apesar da aparente redução da glicemia provocada por NP HDL+GLIB e GLIB, estatisticamente não houve diferença entre os perfis glicêmicos durante as 12h através da Análise de Variância (ANOVA). As NP HDL+GLIB apresentaram concordância com os resultados obtidos pela liberação *in vitro* mostrada no capítulo V, a qual apresentou liberação modificada em razão dos eventos da troca iônica entre os ânions OH^- , HPO_4^- , HPO_3^{2-} presentes no meio intestinal e GLIB intercalada nas NP. Na liberação *in vitro*, durante as primeiras 12h de administração 50% da GLIB ainda deveria ser liberada para atingir a concentração terapêutica. Estes dados foram corroborados pelos resultados *in vivo* apresentados na figura 28, pois não foi possível observar redução significativa da glicemia neste intervalo de tempo (12h).

No entanto, a redução contínua da glicemia provocada pelas NP HDL+GLIB tornou-se significativa ao longo das 4 semanas de tratamento como demonstrado na figura 29. Estes dados também confirmam os resultados obtidos para a liberação *in vitro*, a qual apresentou liberação gradual com cinética de ordem zero. Esta liberação sequencial da GLIB pode ser favorável ao tratamento do diabetes mellitus tipo II, pois permite a manutenção da dose por um longo período reduzindo a toxicidade do fármaco, o número de doses administradas ao paciente e, conseqüentemente contribuindo para a adesão ao tratamento (GU et al., 2012, GUNAWAN, XU, 2008).

Figura 29-Glicemia após administração diária de NP HDL+GLIB (5mg/Kg/v.o.), glibenclamida (5mg/Kg/v.o.), HDL ou veículo durante 30 dias de experimento. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).



Os grupos tratados com NP HDL+GLIB e GLIB apresentaram significativa distinção no controle da glicemia já a partir da primeira semana de tratamento. No início, o grupo NP HDL+GLIB apresentava 287,16 mg/dl e ao fim do tratamento 111 mg/dl, enquanto o grupo GLIB apresentava 286,5 mg/dl no início do tratamento e 421,5 mg/dl ao fim do tratamento,

mostrando que as NP HDL+GLIB reduziram os índices glicêmicos quando comparadas ao grupo tratado com a GLIB.

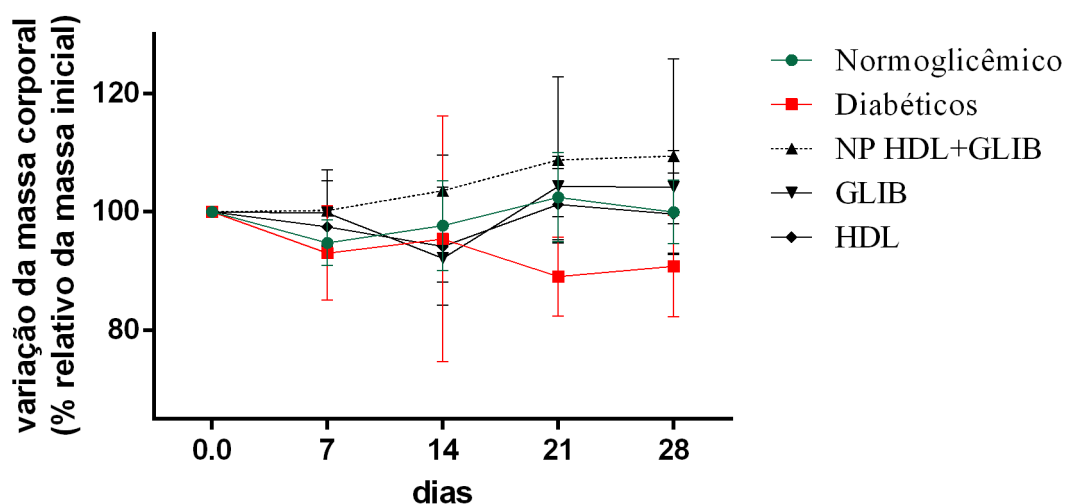
Observa-se que as NP HDL+GLIB conseguiram normalizar a glicemia dos animais, estes resultados comprovam a sua capacidade em melhorar a taxa de dissolução da GLIB permitindo que maiores percentuais tornem-se solúveis e, conseqüentemente, absorvidos para gerar redução da glicemia. Além disso, a liberação prolongada de NP HDL+GLIB também impede oscilações plasmáticas na concentração do fármaco, reduzindo os riscos de hipoglicemia (toxicidade mais comum das sulfoniluréias) e a possibilidade de ocorrência de subdose ao longo do tratamento, demonstrando sua eficácia e potencial como novo sistema de liberação modificada para o tratamento do DM II. (KLEIN-SCHWARTZ, STASSINOS, ISBISTER, 2015)

Na figura 29 também observa-se o progressivo aumento da glicemia no grupo diabético (DNT) ao longo das 4 semanas de tratamento, passando de 360,6 mg/dl no início do tratamento para 498 mg/dl ao fim da 4ª semana de tratamento. O grupo tratado com HDL também apresentou aumento da glicemia ao longo das 4 semanas, passando de 321 mg/dl para 468 mg/dl, mostrando que o HDL não apresentou efeitos diretos sobre os índices glicêmicos durante o período do estudo. Não existem, até o momento, estudos de sistemas contendo HDL em modelo diabético, desta forma estes resultados permitem afirmar que HDL do tipo zinco e alumínio não geram influência sobre o metabolismo glicêmico ao longo do período de 30 dias de administração diária em ratos *wistar*.

O DM II é uma síndrome metabólica que promove alteração no armazenamento e consumo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Animais diabéticos apresentam redução da massa corporal em consequência dos níveis insuficientes de insulina e desregulação dos eventos de gliconeogênese e neoglicogênese com perda da massa muscular. (TABESH et al., 2019) Na figura 30 observa-se que os animais diabéticos apresentam perda contínua de massa corporal ao longo do período de tratamento até atingirem 10% de perda final.

Os animais normoglicêmicos apresentaram aumento de massa corporal em níveis considerados normais para a faixa etária, enquanto os grupos GLIB e NP HDL+GLIB apresentaram ganho de massa superior ao grupo DNT. Este ganho é esperado para hipoglicemiantes orais da classe das sulfonilureias, como a GLIB, em consequência do seu mecanismo de ação, pois aumentam a liberação de insulina das células β e, conseqüentemente, também aumentam a captação celular de glicose (TABESH et al., 2019; SOLA et al., 2015).

Figura 30- Efeito das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida administradas por via oral na variação da massa corporal (g) em ratos Wistar machos tratados durante 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). *Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$)



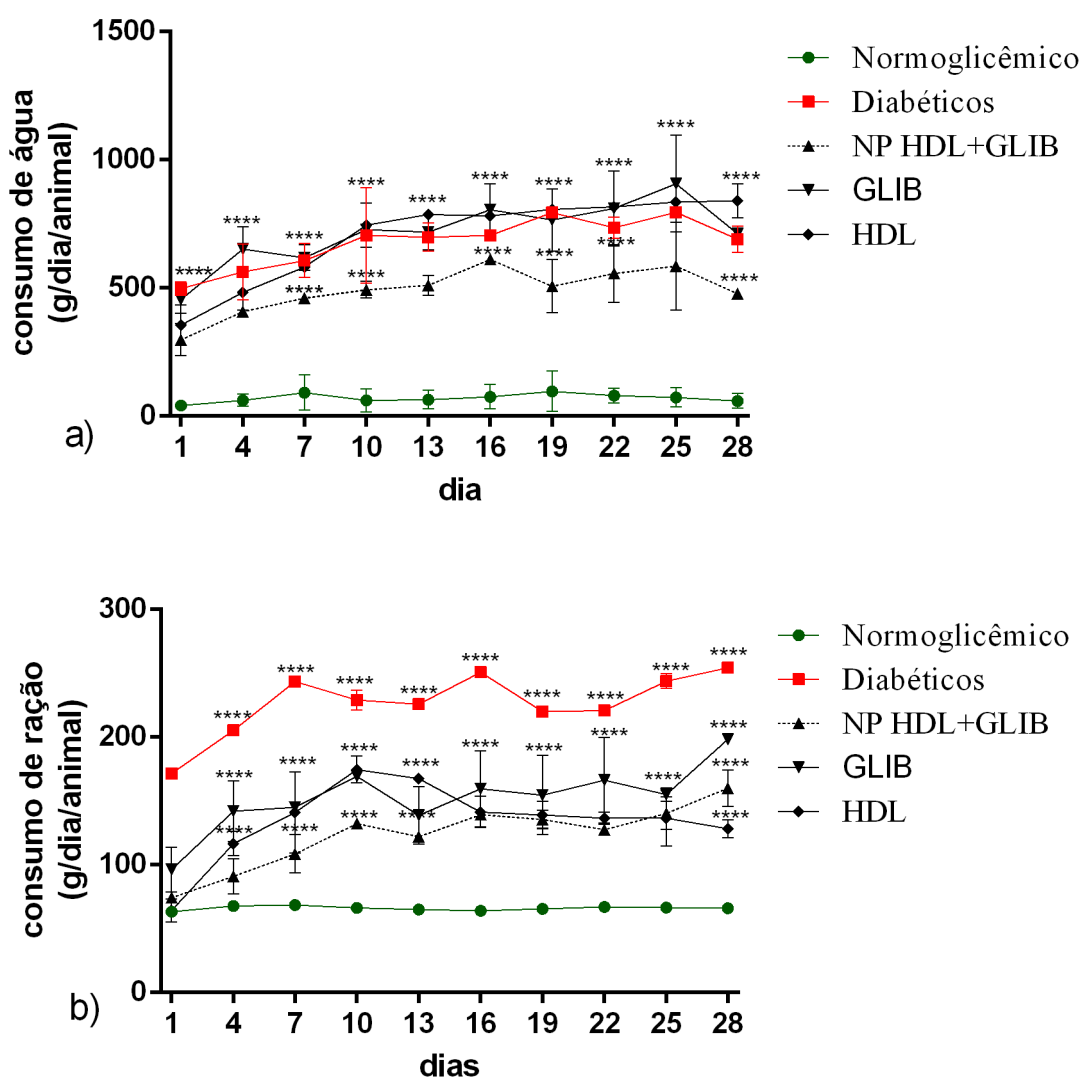
Na figura 31 (b) observa-se para o grupo DNT consumo de ração superior ao grupo normoglicêmico indicando polifagia, a qual surge em consequência da redução dos níveis de insulina e redução da sensibilidade celular à sua ação e redução da entrada de glicose nas células e de ATP, acionando o sistema nervoso central e aumentando o apetite.

Observa-se que os demais grupos também apresentam consumo de ração superior ao grupo normoglicêmico, no entanto, o grupo NP HDL+GLIB apresentou menores níveis de consumo, indicando que as NP conseguiram melhorar a taxa de dissolução e absorção da GLIB combatendo de forma mais eficaz os efeitos da hiperglicemia, corroborando com os resultados obtidos no monitoramento glicêmico, pois sua redução glicêmica foi suficiente para interferir na osmolaridade plasmática dos animais e gerar melhora nos sinais clínicos.

Em pacientes diabéticos o aumento da glicemia gera aumento da osmolaridade plasmática ativando quimiorreceptores hipotalâmicos do centro da sede, e resultando como resposta a polidipsia. (ZARIC et al. 2019) Observa-se na figura 31 (a) que o grupo DNT, grupo tratado com HDL e grupo tratado com GLIB apresentaram as maiores taxa de consumo de água ao longo de todo o tratamento (700-800 ml) e estatisticamente distintos do grupo normoglicêmico (80ml).

O grupo tratado com NP HDL+GLIB também apresentou polidipsia em relação ao grupo normoglicêmico, no entanto, o consumo de água foi inferior aos grupos tratados com GLIB, HDL e DNT, cerca de 500 ml. Esta redução no consumo de água e ração do grupo tratado com NP HDL+ GLIB com respostas mais significativas do que o grupo tratado com GLIB indicam que as NP HDL+GLIB não causaram sinais clínicos de nanotoxicidade durante o tratamento e apresentaram respostas mais efetivas do que o grupo tratado com a GLIB.

Figura 31-Efeito das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares e glibenclamida administrada por via oral no consumo de água (a) e ração (b) em ratos Wistar machos tratados durante 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). *Estatisticamente diferente do Controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).



Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise do perfil hematológico (tabela 23) do sangue coletado dos animais após o final do experimento de toxicidade crônica não mostrou significância estatística que apontasse toxicidade. Apenas observou-se uma discreta alteração nas plaquetas, porém essa discreta alteração não é relevante para inferir toxicidade.

Tabela 23-Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre os parâmetros hematológicos de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo).

PARÂMETROS	NORMO	DNT	HDL	NP NANO+GLIB	GLIB
Eritrócitos(10^6 /mm³)	7,81 $\pm$ 0,15	7,66 $\pm$ 0,23	7,70 $\pm$ 0,28	7,30 $\pm$ 1,13	7,14 $\pm$ 1,03
Hemoglobina (g/dL)	15,60 $\pm$ 0,68	14,85 $\pm$ 0,51	15,30 $\pm$ 0,57	14,35 $\pm$ 2,13	14,85 $\pm$ 1,24
Hematócrito (%)	45,88 $\pm$ 2,41	40,88 $\pm$ 1,19	40,90 $\pm$ 0,57	39,46 $\pm$ 4,58	40,18 $\pm$ 2,06
VCM (fl)	58,7 $\pm$ 2,1	53,4 $\pm$ 0,3	53,1 $\pm$ 1,2	52,0 $\pm$ 0,7	57,4 $\pm$ 9,8
HCM (pg)	20,0 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0	19,7 $\pm$ 0,3	21,1 $\pm$ 2,5
CHCM (g/dL)	34,0 $\pm$ 1,4	36,3 $\pm$ 0,8	37,4 $\pm$ 0,9	37,8 $\pm$ 0,3	36,9 $\pm$ 1,8
RDW (fl)	34,6 $\pm$ 1,9	31,6 $\pm$ 1,0	29,1 $\pm$ 0	27,9 $\pm$ 1,1	28,8 $\pm$ 0,9
Leucócitos (10^6/ mm³)	8,10 $\pm$ 1,73	10,02 $\pm$ 2,59	7,20 $\pm$ 0,28	6,52 $\pm$ 0,92	6,93 $\pm$ 0,70
Neutrófilo (%)	17 $\pm$ 5	12 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
Linfócito (%)	77 $\pm$ 5	82 $\pm$ 2	79 $\pm$ 1	80 $\pm$ 2	82 $\pm$ 2
Monócito (%)	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
Eosinófilos (%)	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0
Plaquetas (10^3/μL)	614 $\pm$ 33	179 $\pm$ 42	342 $\pm$ 13	341 $\pm$ 87	307 $\pm$ 79
VPM (fl)	7,9 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,7

Análise de Variância ANOVA seguido por Newman-Keuls, comparando os grupos tratados entre si, e comparando os grupos com o grupo controle, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

A tabela 24 apresenta os valores séricos dos parâmetros bioquímicos dosados após o tratamento dos animais. A dosagem destes parâmetros buscou principalmente verificar a toxicidade hepática e renal. Como o fígado é o principal órgão de desintoxicação e um importante local de metabolismo, é vulnerável a consequências adversas como resultado da exposição às toxinas das formas extrínseca e intrínseca. Quando as células hepáticas estão

danificadas, as enzimas hepáticas são aumentadas no fígado e liberadas na corrente sanguínea (REMYA, 2017).

Tabela 24-Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo).

PARÂMETROS	NORMO	DNT	HDL	NP NANO+GLIB	GLIB
Glicose (mg/dL)	119 $\pm$ 22	374 $\pm$ 26	206 $\pm$ 35	111 $\pm$ 25***	421,35 $\pm$ 35
TGO/AST (mg/dL)	91 $\pm$ 42	338 $\pm$ 79	239 $\pm$ 53	265 $\pm$ 63	238 $\pm$ 47
TGP/ALT (mg/dL)	33 $\pm$ 12	229 $\pm$ 59	157 $\pm$ 38	200 $\pm$ 63	204 $\pm$ 38
Triglicerídeos (mg/dL)	101 $\pm$ 9	105 $\pm$ 48	89 $\pm$ 64**	122 $\pm$ 31	183 $\pm$ 38
Colesterol (mg/dL)	108 $\pm$ 12	105 $\pm$ 18	94 $\pm$ 15	96 $\pm$ 11	124 $\pm$ 21
Uréia (mg/dL)	49 $\pm$ 7	143 $\pm$ 36	117 $\pm$ 24**	113 $\pm$ 39	191 $\pm$ 45
Ácido úrico (mg/dL)	3,85 $\pm$ 0,71	3,95 $\pm$ 0,23	5,63 $\pm$ 2,42	3,60 $\pm$ 0,51	4,33 $\pm$ 0,63
Creatinina (mg/dL)	0,70 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,09	0,52 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,16

Análise de Variância ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$), comparando os grupos tratados entre si, e comparando os grupos com o grupo controle, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

A indução do diabetes pela SZT leva a alterações metabólicas em decorrência do dano à integridade estrutural, como demonstrado através da comparação entre os parâmetros dos grupos normoglicêmico e DNT (tabela 24). No entanto, ao analisar os dados observa-se que estes parâmetros não apresentaram alteração com significância que apontassem a toxicidade das nanopartículas nos diversos órgãos e sistemas avaliados, tampouco apresentaram sinais de toxicidade, observa-se apenas uma pequena alteração nos triglicerídeos e na uréia, os quais apresentam valores mais baixos nos animais do grupo HDL do que nos animais do grupo GLIB.

Análise histológica

As massas absoluta e relativa dos tecidos de todos os grupos são apresentadas na tabela 25.

Tabela 25- Efeito das nanopartículas revestidas de Hidróxidos Duplos Lamelares organomodificados e glibenclamida (S6) por via oral sobre a massa relativa (%) e absoluta (g) de ratos wistar administradas por 30 dias consecutivos. NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo). (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TECIDO	NORM	DNT	HDL	NP	GLIB
	NANO+GLIB				
Fígado (g)	11,4 $\pm$ 1,4*	8,7 $\pm$ 0,7*	10,5 $\pm$ 0,8*	10,3 $\pm$ 0,12*	11,2 $\pm$ 0,7*
Fígado (%)	3,6 $\pm$ 0,04*	2,3 $\pm$ 0,01*	4 $\pm$ 0,03*	3,7 $\pm$ 0,01*	4,1 $\pm$ 0,03*
Rim (g)	3,2 $\pm$ 0,3*	2,3 $\pm$ 0,26*	3,1 $\pm$ 0,3*	3,05 $\pm$ 0,02*	3,2 $\pm$ 0,36*
Rim (%)	1,01 $\pm$ 0,01*	0,6 $\pm$ 0,04*	1,15 $\pm$ 0,01*	1,0 $\pm$ 0,08*	1,03 $\pm$ 0,01*
Pâncreas (g)	1,04 $\pm$ 0,13*	0,81 $\pm$ 0,20*	0,93 $\pm$ 0,1*	0,75 $\pm$ 0,20*	0,932 $\pm$ 0,1*
Pâncreas (%)	0,308 $\pm$ 0,03*	0,20 $\pm$ 0,04*	0,33 $\pm$ 0,04*	0,22 $\pm$ 0,09*	0,33 $\pm$ 0,04*

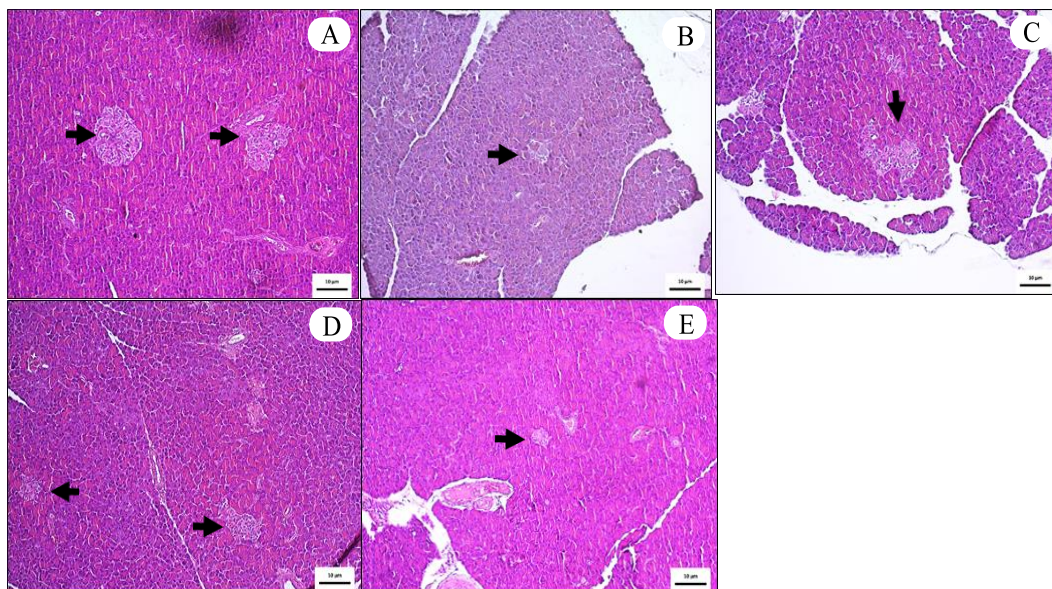
Foram observadas diferenças significativas entre as massas dos órgãos analisados (fígado, rins e pâncreas) dos animais diabéticos de todos os grupos, tratados e não tratados, quando comparados com o grupo normoglicêmico, pois o DM II é uma síndrome metabólica que promove alteração no armazenamento e consumo de carboidratos, lipídeos e proteínas, com desregulação dos eventos de gliconeogênese e neoglicogênese (TABESH et al., 2019).

Os resultados são concordantes com os obtidos para o acompanhamento da massa corporal (figura 30), pois os grupos tratados com GLIB e NP HDL+GLIB apresentaram ganho de massa corporal em relação ao grupo DNT devido o mecanismo de ação da GLIB, a qual aumenta a liberação de insulina das células β e, conseqüentemente, a captação celular de glicose (SOLA et al., 2015).

A análise macroscópica externa dos órgãos dos animais não mostrou alterações significativas na cor ou textura em todos os grupos. A análise microscópica pode ser observada nas figuras 32-34.

Figura 32- Cortes histológicos dos pâncreas (HE, ampliação 100x) de ratos *Wistar* machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E).

NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). As setas indicam alterações nas ilhotas pancreáticas.



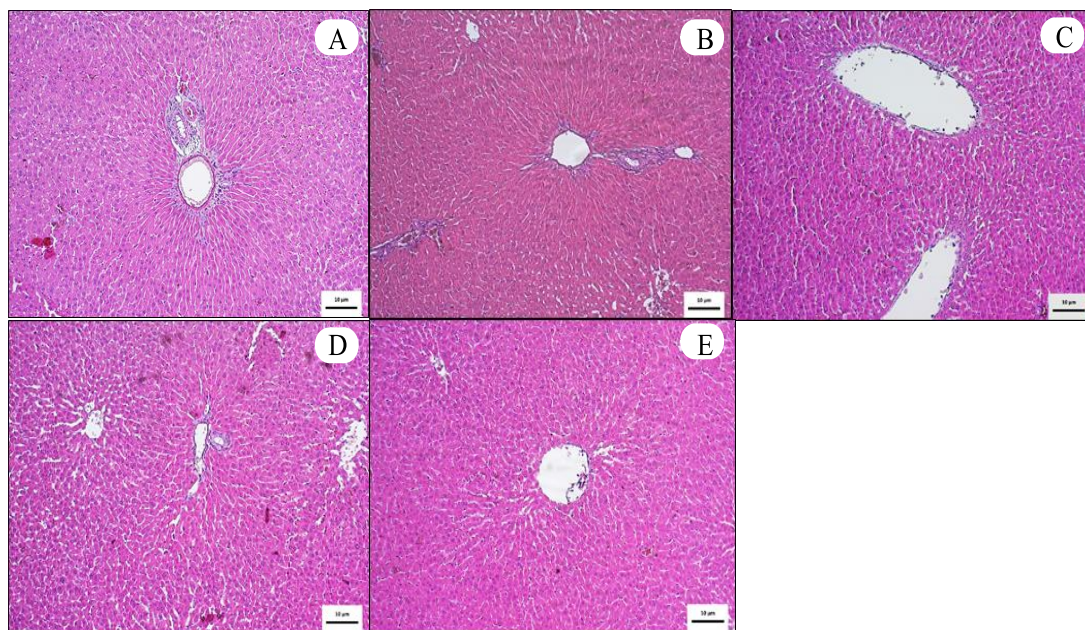
Observa-se na figura 32(B-D) ilhotas pancreáticas com alterações reativas e degenerativas, diminuídas em número e tamanho, com alterações atípicas nucleares em relação ao grupo normoglicêmico, estas alterações são em consequência do dano celular causado pela STZ na indução do DM II.

A análise histológica do fígado grupo DNT (figura 33B) apresenta leve infiltrado inflamatório e os grupos GLIB, HDL e HDL+GLIB (figura 33 A, C-E) não apresentaram alterações estruturais em comparação ao grupo normoglicêmico. A metabolização da GLIB é realizada pelo fígado através de reações oxidativas do CYP450, pelas CYP3A4, CYP2C9 e 2C19 originando metabólitos ativos como 4-trans-hidroxíciclo-hexil gliburida(M1), 3-cis-hidroxíciclo-hexil gliburida(M2), 4-cis-(M2a), 3-trans-(M3), 2-trans- (M4) hidroxíciclo gliburida e gliburida etil-hidroxi (M5).

A lesão hepática induzida por fármacos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das aminotransferases (ALT e AST), ou colestático, o que levaria ao aumento de bilirrubinas (particularmente da direta). No entanto, os resultados da bioquímica dos grupos tratados não apresentaram alteração dentro dos valores de referência em comparação ao grupo

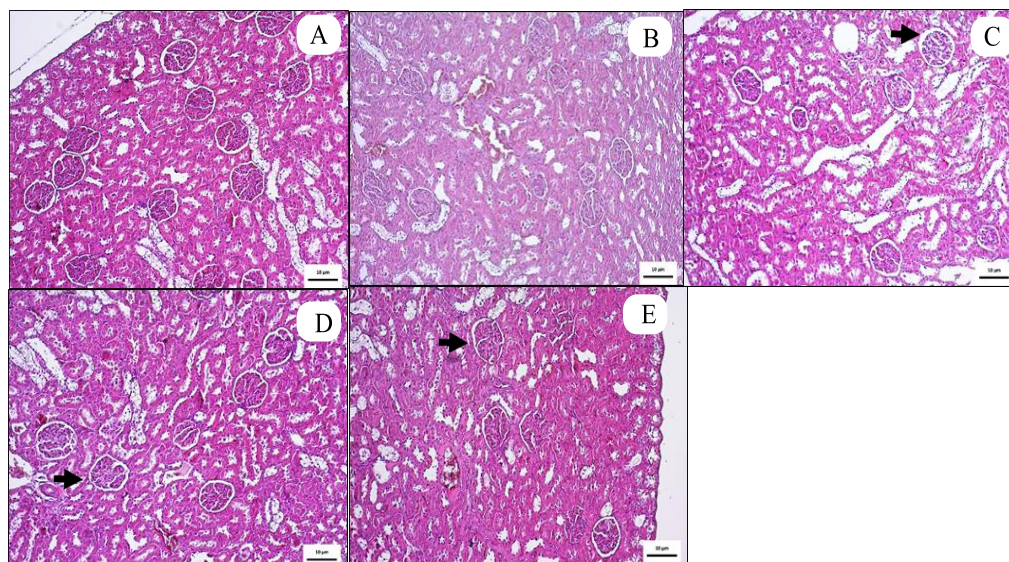
controle normoglicêmico. Desta forma, os dados histológicos corroboraram com os dados bioquímicos para a ausência de hepatotoxicidade das nanopartículas.

Figura 33- Cortes histológicos do fígado (HE, ampliação 100x) de ratos *Wistar* machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E). NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n = 6/grupo).



Os metabólitos da GLIB são excretados por via urinária e biliar, aproximadamente 50% da dose são excretadas na urina e 50% por via biliar (HARRIGAN, NATHAN, BEATTIE, 2001). A análise do tecido renal demonstrou ausência de nefrite ou necrose tubular renal, sendo observado apenas discreto aumento do espaço da cápsula de Bowman em todos os grupos (figuras 34 B-E) em relação ao grupo controle normoglicêmico. Este aumento foi independente do tipo de tratamento, indicando que a formulação, por si só, não apresentou nefrotoxicidade, além disso, não foram observados sinais de efeitos adversos sobre os marcadores usuais de toxicidade renal (creatinina e ureia), indicando que o tratamento com as NP não causou danos significativos indicadores de toxicidade.

Figura 34- Cortes histológicos dos rins (HE, ampliação 100x) de ratos *Wistar* machos tratados oralmente por 30 dias. Grupo Normoglicêmico(A); grupo diabético não tratado(B), grupo tratado com HDL (C), grupo tratado com GLIB(D), grupo tratado com HDL+GLIB(E). NP: nanopartícula; HDL: hidróxidos duplos lamelares; GLIB: glibenclamida. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 6$ /grupo). As setas indicam leve aumento do espaço da cápsula de Bowman.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Através dos resultados obtidos pode-se concluir que a taxa de sucesso da indução do DM II em ratos *wistar* com STZ (50mg/Kg) foi de 80%;
- O monitoramento da glicemia durante as primeiras 12h após a administração da primeira dose das NP HDL-GLIB (S6) e o monitoramento da glicemia ao longo das 4 semanas de tratamento foram concordantes com os resultados *in vitro* obtidos para a liberação da GLIB. Estes resultados indicam a capacidade da matriz HDL controlar a liberação da GLIB ao longo do tempo, manter sua concentração dentro da faixa terapêutica e permitir o controle glicêmico mais efetivo que a GLIB não veiculada em NP em consequência da melhora da sua taxa de dissolução;
- Os parâmetros clínicos de polidipsia, polifagia e massa corporal não indicaram sinais de toxicidade para as nanopartículas e corroboram com os dados do controle glicêmico dos animais com redução da polidipsia;
- Os resultados bioquímicos e hematológicos também não apresentaram alterações significativas que indicassem nanotoxicidade;

- As análises das massas dos rins, fígado e pâncreas foram concordantes com os resultados da massa corporal, com o grupo DNT apresentando maior redução e os grupos os grupos tratados com GLIB e NP HDL+GLIB apresentaram ganho de massa corporal devido o mecanismo das sulfoniuréias;
- A análise histológica não apresentou nenhuma alteração hepática ao longo do tratamento de 30 dias com as nanopartículas em comparação ao grupo normoglicêmico. Foi observada pequeno aumento do espaço de Bowman nos animais tratados, no entanto, sem relevância clínica. Estes dados juntamente com os dados da hematologia e bioquímica confirmam ausência de sinais de nanotoxicidade indicando que as NP de HDL organomodificados (S6) apresentam-se como potencial sistema de liberação controlada para o tratamento do DM II.

6 CONCLUSÃO FINAL DA TESE

- Observa-se que a análise das patentes juntamente com a análise das publicações de artigos (combinação de DT e revisão sistemática) aponta o grande número de estudos envolvendo DDS, aplicação de técnicas e uso de diversos materiais dentro das universidades para minimizar o problema da solubilidade da GLIB;
- A prospecção de patentes mostrou-se uma importante ferramenta para a compreensão de tendências de mercado, através dela pode-se constatar que apenas um pequeno percentual dos pedidos totais de patentes realmente realiza testes com a GLIB e no entanto, as reivindicações englobam outras classes de medicamentos para tratamento do DM II;
- Observou-se que os trabalhos envolvendo DDS e GLIB seguem uma perspectiva comum aos demais sistemas de DDS, eles não conseguem seguir para a etapa de pesquisa clínica porque as indústrias farmacêuticas, que geralmente financiam esta etapa, são as responsáveis por selecionar os projetos mais alinhados a sua política de crescimento e de retorno financeiro, não os centros de pesquisas que inicialmente desenvolveram os estudos.

- Pode-se concluir que a utilização da sonda de infravermelho com faixa de leitura no infravermelho próximo foi capaz de monitorar a síntese de HDL pelo método de coprecipitação em meio orgânico e permitir o controle *in line* da sua formação;
- Através dos dados quimiométricos e testes de T Hotelin e Q2 do monitoramento foi possível verificar a reprodutibilidade do método de coprecipitação para a possível produção industrial de HDL;
- Foi possível propor um modelo cinético de segunda ordem para as sínteses, além disso, foi possível observar que a taxa de formação de $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ foi superior ao de $\text{Mg}_2\text{Al-Cl}$, além de inferir que os mecanismos que governavam a formação de HDL envolviam supersaturação, nucleação, precipitação e redissolução em duas etapas;
- Pode-se concluir que a combinação de técnicas foi adequada para controlar e avaliar o processo de síntese de HDL pelo método de coprecipitação em meio orgânico e identificar seus pontos críticos.
- Nanopartículas biocompatíveis de HDL Zn_2Al organomodificado podem ser obtidas por síntese *one-pote* pelo método de coprecipitação tornando o método mais simples e mais barato em comparação com os métodos em múltiplas etapas.
- Observou-se a adsorubilização da GLIB nas nanopartículas devido ao aumento do espaço interlamelar e à hidrofobização promovida pelo dodecil sulfato de sódio;
- Observou-se que dados de DRX juntamente com os dados de TGA/DTG e DSC corroboraram para o revestimento das nanopartículas pelo Eudragit L100® e obtenção de nanocompósitos esfoliados/intercalados;
- Observou-se que a organofilização de HDL e intercalação de GLIB reduziram a área de superfície ($\text{SBET } 23,58 \text{ m}^2/\text{g}$) e tamanho das NP (469 nm). Além disso, a mudança no potencial zeta em relação ao HDL primitivo ($\text{SBET } 41,34 \text{ m}^2/\text{g}$, 688,8nm e +14ζ) indicou que a funcionalização parece uma abordagem apropriada para produzir NP com maior estabilidade coloidal e funcionalidade aprimorada;
- Os dados de liberação de zinco da matriz HDL ($2,96\% \pm 0,002 \text{ ppm}$) mostraram a eficácia do revestimento em meio ácido (pH 1,2) e os dados de liberação do GLIB

mostraram cinética de liberação de ordem zero com liberação no meio intestinal simulado;

- Além disso, o ensaio WST-1 realizado nos fibroblastos comprovou a biocompatibilidade, mostrando que as NP de HDL Zn₂Al organomodificadas através de síntese *one-pote* são promissoras para a liberação prolongada da GLIB.
- Nos ensaios *in vivo* em modelo animal diabético observou-se que glicemia durante as primeiras 12h e o monitoramento da glicemia ao longo das 4 semanas de tratamento foram concordantes com os resultados *in vitro* obtidos para a liberação da GLIB, indicando a capacidade das nanopartículas controlarem a liberação da GLIB, manterem sua concentração dentro da faixa terapêutica e permitir o controle glicêmico em consequência da melhora da sua taxa de dissolução;
- Os parâmetros clínicos de polidipsia, polifagia e massa corporal não indicaram sinais de toxicidade para as nanopartículas e corroboram com os dados do controle glicêmico dos animais com redução da polidipsia;
- Os resultados bioquímicos e hematológicos também não apresentaram alterações significativas que indicassem nanotoxicidade;
- As análises das massas dos rins, fígado e pâncreas foram concordantes com os resultados da massa corporal, com o grupo DNT apresentando maior redução e os grupos os grupos tratados com GLIB e NP HDL+GLIB apresentaram ganho de massa corporal devido o mecanismo das sulfoniurêias;
- A análise histológica não apresentou nenhuma alteração hepática ao longo do tratamento de 30 dias com as nanopartículas em comparação ao grupo normoglicêmico. Foi observada pequeno aumento do espaço de Bowman nos animais tratados, no entanto, sem relevância clínica. Estes dados juntamente com os dados da hematologia e bioquímica confirmam ausência de sinais de nanotoxicidade indicando que as NP de HDL organomodificados (S6) apresentam-se como potencial sistema de liberação controlada para o tratamento do DM II.

REFERÊNCIAS

- AALDERING, L.J., LEKER, J., SONG, C.H. Analysis of technological knowledge stock and prediction of its future development potential: The case of lithium-ion batteries. **J Clean Prod.** 223:301–11, 2019.
- ABDEL-WAHAB, M.F., EL-KINAWY, S.A., FARID, N.A., EL-SHINNAWY, A.M. Infrared Study of New Sulfonylurea Derivatives and Sulfonamides. **Analytical Chem.**, 38, v. 3, 508-510, 1966. DOI: 10.1021/ac60235a041
- ADACHI-PAGANO, M.; FORANO, C.; BESSE, J.-P. Delamination of layered double hydroxides by use of surfactants. **Chemical Communications**, n. 1, p. 91–92, 2000.
- ADV, R. S. C. RSC Advances Clay nanocomposites as engineered drug delivery systems. **RSC Advances**, v. 6, p. 50002–50016, 2016
- AGRAWAL, U.; GUPTA, M.; JADON, R.S.; SHARMA, R.; VYAS, S.P. Multifunctional nanomedicines: potentials and prospects. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, n. 5, p. 479-497, 2013.
- AGUZZI, C., CEREZO, P., VISERAS, C., CARAMELLA C. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. **Applied Clay Science**, 36, 22–36, 2007. doi:10.1016/j.clay.2006.06.015.
- AHMAD, R., HUSSEIN, M.Z., KADIR, W.R.W.A., SARIJO, S.H., HIN, T.Y.Y. Evaluation of Controlled-Release Property and Phytotoxicity Effect of Insect Pheromone Zinc-Layered Hydroxide Nanohybrid Intercalated with Hexenoic Acid. **J. Agric. Food Chem.** 63, 51, 10893-10902, 2015.
- AIZENBERG, J., BLACK, A.J., WHITESIDES, G.M. Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. **Lett. Nat.** 398, 495–498, 1999.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L.K., FAROKHZAD, O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, **Mol. Pharm.** 5 (4), 505–515, 2008.
- ALLADA, R., NAVROTSKY, A., BARBECO, H.T., CASEY, W.H. Thermochemistry and aqueous solubilities of hydrotalcite-like solids. **Science**. 296 (5568), 721–723, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1069797>.

- ALLADA, R.K., PLESS, J.D., NENOFF, T.M., NAVROTSKY, A. Thermochemistry of hydrotalcite-like phases intercalated with CO_3^{2-} , NO_3^- , Cl^- , I^- and ReO_4 . **Chem. Mater.** 17 (9), 2455–2459, 2005. <https://doi.org/10.1021/cm047813x>.
- ALANSI, A. M., ALKAYALI, W.Z., GUNAIBIT, M.H.A., QAHTAN, T.F., SALEH, T.A. Synthesis of exfoliated polystyrene/anionic clay MgAl-layered double hydroxide: structural and thermal properties. **RSC Adv.**, v. 5, n. 87, p. 71441–71448, 2015.
- ALAWI, M. A., HAMDAN, I.I., SALLAM, A.A., HESHMEH, N.A. Solubility enhancement of glibenclamide in choline – tryptophan ionic liquid : Preparation , characterization and mechanism of solubilization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 629–634, 2015.
- ALBERTINI, B., DI SABATINO, M., MELEGARI, C., PASSERINI, N. Formulation of spray congealed microparticles with self-emulsifying ability for enhanced glibenclamide dissolution performance. **J Microencapsul.** 32(2), 181-92, 2015.doi: 10.3109/02652048.2014.985341
- ALMARSSON, Ö., PETERSON, M.L., ZAWOROTKO, M. The A to Z of pharmaceutical cocrystals: A decade of fast-moving new science and patents. **Pharm Pat Anal.** 1(3):313–27, 2012. Available from: <https://doi.org/10.4155/ppa.12.29>
- AL-SALAMEH, A., BUCHER, S., BAUDUCEAU, B., BENATTAR-ZIBI, L., BERRUT, G., BERTIN, B., EMMANUELLE CORRUBLE, E., DANCHIN, N., DERUMEAUX, G., DOUCET, J., FALISSARD, B., FORETTE, F., HANON, O., OURABAH, R., PASQUIER, F., PINGET, M., BECQUEMONT, L., RINGA, V. Sex Differences in the Occurrence of Major Clinical Events in Elderly People with Type 2 Diabetes Mellitus Followed up in the General Practice. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. DOI: 10.1055/a-0662-5923
- ALTUNTAS, S., DERELI, T., KUSIAK, A. Forecasting technology success based on patent data. **Technol Forecast Soc Change**. 96:202–14, 2015.
- AMBROGI, L., PERIOLI, V., CIARNELLI, M., NOCCHETTI, C. Rossi. Effect of gliclazide immobilization into layered double hydroxide on drug release. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 73, 285-291, 2009. doi: 10.1016/j.ejpb.2009.06.007.
- AMBROGI, V., PERIOLI, L., RICCI, M., PULCINI, L., NOCCHETTI, M., GIOVAGNOLI, S., ROSSI, C. Eudragit® and hydrotalcite-like anionic clay composite system for diclofenac colonic delivery. **Microporous and Mesoporous Materials** 115, 405–415, 2008.

AMBROGI, V., FARDELLA, G., GRANDOLINI, G., NOCCHETTI, M., PERIOLI, L. Effect of Hydrotalcite-Like Compounds on the Aqueous Solubility of Some Poorly Water-Soluble Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 92(7), 1407-1418, 2003.

AMBROGI, V., FARDELLA, G., GRANDOLINI, G., PERIOLI, L., TIRALTI M.C. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents, II: uptake of diclofenac for a controlled release formulation. **AAPS Pharm SciTech**. 3:77–82, 2002.

AMBROGI V., FARDELLA, G., GRANDOLINI, G., PERIOLI, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents. I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. **Int J Pharm** 220:23–32, 2001.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Zeta potential of colloids in water and waste water. ASTM Standard D 4187–82, 1985.

ANDERSSON, M.P., OLSSON, M.H., STIPP, S.L. Predicting the pKa and stability of organic acids and bases at an oil-water interface. **Langmuir** 30 (22), 6437–6445, 2014. <https://doi.org/10.1021/la5008318>. Epub 2014 May 23.

ANUP, P.T., GAZIT, O.Z. Fundamental Insights into the Nucleation and Growth of Mg–Al Layered Double Hydroxides Nanoparticles at Low Temperature. **Cryst. Growth Des.** 2016, 16, 12, 6709-6713. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01272>

ARINAITWE E, PAWLIK M. A method for measuring the degree of anionicity of polyacrylamide-based flocculants. **Int J Mineral Process.** 91, 50–54, 2009.

ATWOOD, J.L., LEHN, J.M., ALBERTI, G., BEIN, T. Solid-State Supramolecular Chemistry: Two-and Three-Dimensional Inorganic Networks: Volume 7 (Comprehensive Supramolecular Chemistry). Oxford: Pergamon Press; 1996.

BASHI, A.M., HADDAWI S.M., AL-YASARI A.H. Kinetics study and controlled release of synthesized phenoxy herbicides-based nanocomposites from 2,4-dichloro- and 2,4,5-trichlorophenoxy acetates with Zn/Al layered double hydroxide interlamellae. **Iraq Nat J Chem.** 38:279–292, 2010.

BAKSHI, P., SADHUKHAN, S., MAITI, S. Design of modified xanthan mini-matrices for monitoring oral discharge of highly soluble Soluplus® – glibenclamide dispersion. **Mater. Sci. Eng. C** 54, 169–175, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.014>.

- BALL, J.W., NORDSTROM, D.K. User's manual with revised thermodynamic data base and test cases for calculating speciation of major, trace and redox elements in natural waters. In: U.S.G.S. **Open-File Report**, pp. 90–129, 1991.
- BARAHUIE, F., HUSSEIN, M.Z., FAKURAZI, S., ZAINAL, Z. Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 7750–7786, 2014.
- BARI, A., CHELLA, N., SANKA, K., SHASTRI, N.R., DIWAN, P.V. Improved anti-diabetic activity of glibenclamide using oral self-nano emulsifying powder. [J. Microencapsul.](#) 32(1):54-60, 2015. doi: 10.3109/02652048.2014.944950.
- BARTH, A. A deep analysis of chemical structure-based patent searching in the Derwent index space. **World Pat Inf.** 2018;53:49–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0172219017301072>
- BATYCKY, R. P.; GRANDOLFI, G.; PLUNKETT, S.; LIPP, M. M.; WRIGHT, J. Pharmaceutical composition useful for oral drug delivery comprises amorphous hollow particles containing poorly soluble agents embedded within the walls of the particles. **USA n°WO2003043603-A1**, 58p., 1981-04-13, 1983-12-13. 2001
- BAYS, H.E., COHEN, D.E. Rationale and design of a prospective clinical trial program to evaluate the glucose-lowering effects of colesevelam HCl in patients with type 2 diabetes mellitus. **Curr Med Res Opin.** 12;23(7):1673–84, 2007.
- BHATTACHARYA, S., SAHA, C. Intellectual property rights: An overview and implications in pharmaceutical industry. **J Adv Pharm Technol Res.** 2(2):88, 2012.
- BEGHI, R., GIOVENZANA, V., TUGNOLO, A., GUIDETTI, R. Application of visible/near infrared spectroscopy to quality control of fresh fruits and vegetables in large-scale mass distribution channels: a preliminary test on carrots and tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** [Vol. ,98, Issue7](#), 2729-2734 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8768>
- 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. **Pharm Res.** 27, 2394–2401, 2010.
- BHASKAR, R., MURTHY, R.S.R., MIGLANI, B.D., VISWANATHAN, K. Novel method to evaluate diffusion controlled release of drug from resinate. **Int J Pharm.** 28, 59–66, 1986.

BRANNON-PEPPAS, L., BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 56 (11), 1649–1659, 2004.

BRITISH PHARMACOPEA. H.M. Statonere Office, London, 210, 773, 1980.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION (BSI). Terminology for nanomaterials. 2007. ISBN 9780580613210

BO, S., CICCONE, G., GRASSI, G., [GANCIA, R.](#), [ROSATO, R.](#), [MERLETTI, F.](#), [PAGANO, G.F.](#) [Patients with type 2 diabetes had higher rates of hospitalization than the general population.](#) **J Clin Epidemiol**, 57, 1196-1201, 2004.

BOCLAIR, J.W., BRATERMAN, P.S. Layered double hydroxide stability. 1. Relative stabilities of layered double hydroxides and their simple counterparts. **Chem. Mater.** 11 (2), 298–302, 1999. <https://doi.org/10.1021/cm980523u>.

BOCLAIR, J.W., BRATERMAN, P.S., JIANG, J., LOU, S., YARBERRE, F. Layered double hydroxide stability. 2. Formation of Cr (III) -containing layered double hydroxides directly from solution. **Chem. Mater.** 11 (2), 303–307, 1999.

BREITZMAN, A., THOMAS, P. The Emerging Clusters Model: A tool for identifying emerging technologies across multiple patent systems. **Res Policy**. 44(1):195–205, 2015.

BRO, R., SMILDE, A.K. Principal component analysis. **Anal. Methods**. n 6, 2812–2831, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>.

BROWN, L.D., GARDNER, J.C. Using citation analysis to Assess the Impact of Journals and Articles on Contemporary Accounting. **Journal of Accounting Research**. Vol. 23, No. 1, pp. 84-109, 1985.

BURLOV, A. S., KOSHCHIENKO, Y.V., KISKIN, M.A., NIKOLAEVSKII, S.A., Synthesis, structural and optical properties of 1-alkyl-2-(2'-tosylaminophenyl)-5-nitrobenzimidazoles and their zinc(II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1104, p. 7–13, 2016.

BUTLER D. Translational research: Crossing the valley of death. **Nature**. 11;453(7197):840–2, 2008.

BUZEA, C., PACHECO, I., ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. v 2(4), 17-71, 2007. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>

CAPSONI, D., QUINZENI, I., BRUNI, G., FRIULI, V., MAGGI, L., BINI, M. Improving the Carprofen Solubility: Synthesis of the Zn₂Al-LDH Hybrid Compound. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 107, 267-272, 2018. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.09.019>

CAO, Z., LI, B.L., SUN, L., LI, L., XU, Z.P., GU, Z. 2D Layered Double Hydroxide Nanoparticles: Recent Progress toward Preclinical/Clinical Nanomedicine. **Small Methods**, 1900343, 2019. DOI: 10.1002/smtd.201900343

CARJA, G., KAMESHIMA, Y., CIOBANU, G., CHIRIAC, H., OKADA, K.. New hybrid nanostructures based on oxacillin-hydrotalcite-like anionic clays and their textural properties. **Micron**, v. 40, n. 1, p. 147–150, 2009.

CAVE, G.; NICHOLSON, S. Use of glyburide having a defined particle size distribution in the treatment of type II diabetes. **USA n° Pat. US2001036479-A1**, 2000, 5p., 2000-01-14, 2001-11-01. 2003. DOI

<https://patents.google.com/patent/US20010036479A1/en?q=CAVE%2c+G.;+NICHOLSON%2c+S.+Use+of+glyburide+having+a+defined+particle+size+distribution+in+the+treatment+of+type+II+diabetes.+USA+Pat.+US2001036479-A1%2c+2000%2c+5p..>

CENSI, R., GIGLIOBIANCO, M.R., DUBBINI, A., MALAJ, L., DI MARTINO, P. New Nanometric Solid Dispersions of Glibenclamide in Neusilin ® UFL2. **AAPS PharmSciTech**. 17(5), 1204-12, 2015. doi: 10.1208/s12249-015-0457-z. 2015. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0457-z>

CHALK, J. B., PARTTERSON, M., SMITH, M. T., EDIE, M. J. Correlations between in vitro dissolution, in vivo bioavailability and hypoglycaemic effect of oral glibenclamide. **European Journal of Clinical Pharmacology**. 1986.

CHANG, S-H, FAN, C-Y. Identification of the technology life cycle of telematics: A patent-based analytical perspective. **Technol Forecast Soc Change**. 105:1–10, 2016.

CHAKRABORTI, M., JACKSON, J.K., PLACKETT, D., GILCHRIST, S.E., BURT, H.M. The application of layered double hydroxide clay (LDH)- poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics. **J Mater Sci: Mater Med**. 23, 1705–1713, 2012. DOI 10.1007/s10856-012-4638-y

CHEN, M., COOPER, H.M., ZHOU, J.Z., BARTLETT, P.F., XU, Z.P. Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery., **J. Colloid Interface Sci.** 390, 275–81, 2013.

CHIEN, H.H., CHANG, C.T., CHU, N.F., HSIEN, S.H., HUANG, Y.Y., LEE, I.T., LEE, W.J., TANG, I.J., SHEU, W.H.H. Effect of Glyburide—Metformin Combination Tablet in Patients with Type 2 Diabetes. [Journal of the Chinese Medical Association](#), Vol 70,11, Pag 473-480, 2007.

CHINEA, V. (USA). Hewlett-Packard Development Co LP. Vanessa Chinaea; Kevin Kane; Orlando Ruiz. Preparation of nanoparticles of bioactive agent comprises selecting solvent composition and deposition substrate; preparing solution of agent in solvent composition; applying solution to substrate as droplets and evaporating the solution. **USA n° USA Pat. US2005260274-A1**, 2001, 17p., 2001-06-07, 2005-11-24. 2010-08-03.

CHINEA, V., KANE, K., RUIZ, O. Preparation of deposited bioactive agent which is medicament, by preparing solution of bioactive agent in solvent composition, and applying solution to substrate as droplets where evaporation of solution produces bioactive agent particles. **USA n° US20050260273A1**, 2001-06-07, 2005-07-25. 2005-11-24.

CHO, N.H., SHAW, J.E., KARURANGA, S., HUANG, Y., FERNANDES, J.D., F. J.D., OHLROGGE, A.W., MALANDA, B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. [Diabetes Research and Clinical Practice](#). Volume 138, 271-281, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>

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

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, 2011b.

CHOI, S.-J.; OH, J.-M.; CHOY, J.-H. Biocompatible ceramic nanocarrier for drug delivery with high efficiency. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 117, n. 1365, p. 543–549, 2009.

CIRRI, M., ROGHI, A., VALLERI, M., MURA. P. Development and characterization of fast-dissolving tablet formulations of glyburide based on solid self-microemulsifying systems. **Eur J Pharm Biopharm.** 104, 19-29, 2016. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.04.008.

CLEMENS, K. K., MCARTHUR, E., DIXON, S.N., FLEET, J.L., HRAMIAK, I., GARG, A.X. The Hypoglycemic Risk of Glyburide (Glibenclamide) Compared with Modified-Release Gliclazide. **Canadian Journal of Diabetes**. 39(4):308-16, 2015. doi: 10.1016/j.jcjd.2015.01.001.

COLOMBELLI, A., KRAFFT, J., QUATRARO, F. The emergence of new technology-based sectors in European regions: A proximity-based analysis of nanotechnology. **Res Policy**. Dec;43(10):1681–96, 2014.

CONSTANTINO, U., MARMOTTINI, F., NOCCHETTI, M., VIVANI, R. [Preparation of MgAl LDHs Intercalated with Amines and Effect on Thermal Behavior for Poly\(vinyl chloride\)](#) **Eur. J. Inorg. Chem.** 1439, 1998.

CONSTANTINO, V.R.L. PINNAVAIA, T.J. Basic Properties of $Mg_{2+1-x}Al_{3+x}$ Layered Double Hydroxides Intercalated by Carbonate, Hydroxide, Chloride, and Sulfate Anions. **Inorganic Chemistry**, v. 34 (4), p. 883–892, 1995.

CONTEROSITO, E., CROCE, G., PALIN, L., PAGANO, C., PERIOLI, L., VITERBO, D., BOCACCELI, E., PAUL, G., MILANESO, M. Structural characterization and thermal and chemical stability of bioactive molecule-hydroxide (LDH) nanocomposites. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 15, n. 32, p. 13418–33, 2013.

CORNEJO, J., CELIS, R., PAVLOVIC, I., ULIBARRI, M.A. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Journal of fine particles*. **Clay Minerals**, 43, 155-469, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1180/claymin.2008.043.2.01>

COSTA, P., LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profile. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 13, 123–133, 2001.

COZZOLINO, D. State-of-the-art advantages and drawbacks on the application of vibrational spectroscopy to monitor alcoholic fermentation (beer and wine). **Appl. Spectrosc. Rev.** 51 (4), 302–317, 2016. <https://doi.org/10.1080/05704928.2015.1132721>.

CREPALDI, E.L., PAVAN, P.C., VALIM, J.B. Comparative study of the coprecipitation methods for the preparation of Layered double Hydroxides. **J. Braz. Chem. Soc.** 11, 64–70, 2000.

CUNHA, V.R.R., SOUZA, R.B., MARTINS, A.M.C.R.P.F., KOH, I.H.J. CONSTANTINO, V.R.L.C. Accessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: histological and microcirculation evaluation. **Sci Rep.** 6, 30547, 2016.

CUNHA, V. R. R., FERREIRA, A.M.C., CONSTANTINO, V.R.L. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Quim. Nov.**v. 33, n. 1, p. 159–171, 2010.

CURSINO, A. C. T., LISBOA, F.S., PYRRHO, A.S., SOUSA, V.P., WYPYCH, F. Layered double hydroxides intercalated with anionic surfactants/benzophenone as potential materials for sunscreens. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 88–95, 2013.

CURSINO, A. C. T., RIVES, V., CARLOS, L.D., ROCHAD, J., WYPYCH, F. Layered zinc hydroxide salts intercalated with anionic surfactants and adsolubilized with UV absorbing organic molecules. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1769–1780, 2015.

DAI, C.F., TIAN, D.Y., LI, S.P., XIAO-DONG LI, X.D. Methotrexate intercalated layered double hydroxides with the mediation of surfactants: Mechanism exploration and bioassay study. **Materials Science and Engineering C** 57, 272–278, 2015.

DEL ARCO, M., FERNANDEZ, A., MARTIN, C., RIVES, V. Solubility and release of fenbufen intercalated in Mg, Al and Mg, Al, Fe layered double hydroxides (LDH): The effect of Eudragit® S 100 covering. [Journal of Solid State Chemistry](#). 3002-3009, 2010.

DELGADO, R.R., VIDAURRE, M.A., PAULI, C.P., ULIBARRI, M.A., AVENA, M.J. Surface-charging behavior of Zn–Cr layered double hydroxide. **Journal of Colloid and Interface Science** 280, 431–441, 2004.

DE ROY, A., FORANO, C., BESSE, P. Layered double hydroxides: Synthesis and postsynthesis modification. In: Rives, V. (Ed.), *Layered Double Hydroxides: Present and Future*. Nova Science Publisher Inc, New York, pp. 1–37, 2001.

DEÁK, Á., CSAPÓ, E., JUHASZ, A., DÉKÁNY, I., KANOKÁV, L. Anti-ulcerant kynurenic acid molecules intercalated Mg / Al-layered double hydroxide and its release study. **Applied Clay Science**, v. 156, n. January, p. 28–35, 2018.

DÉKÂNY, I., BERGER, F., IMRIK, K., LAGALY, G. Hydrophobic layered double hydroxides (LDHs): Selective adsorbents for liquid mixtures. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 7, p. 681–688, 1997.

DIFFERDING, E. The Drug Discovery and Development Industry in India — Two Decades of Proprietary Small-Molecule R & D. **Chem. Med.Chem.** 786–818, 2017. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700043>

DING, Y., GUI, Z., ZHU, J., HU, Y., WANG, Z. Exfoliated poly(methyl methacrylate)/MgFe-layered double hydroxide nanocomposites with small inorganic loading and enhanced properties. **Materials Research Bulletin** 43, 3212–3220, 2008.

DONG, H., CHEN, M., RAHMAN, S., PAREKH, H.S., COOPER, H.M., XU, Z.P. Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery, **Appl. Clay Sci.** 100, 66–75, 2014.

DONG, H., PAREKH, H.P., XU, Z.P. Particle size- and number-dependent delivery to cells by layered double hydroxide nanoparticles., **J. Colloid Interface Sci.** 437, 10– 6, 2015.

DURÁN-LOBATO, M., MARTIN-BANDERAS, L., DURA, M. Comparative study of chitosan-and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids. **Journal of Nanoparticle Research.** 17(2), 1-17,2015.
<https://doi.org/10.1007/s11051-015-2875-y>

DWPI Reference Center [Internet]. [cited 2019 Sep 20]. Available from:
<https://clarivate.com/products/dwpi-reference-center/>

EBADI, M., SAIFULLAH, B., BUSKARAN, K., HUSSEIN, M.Z., FAKURAZI, S. Synthesis and properties of magnetic nanotheranostics coated with polyethylene glycol/5-fluorouracil/layered double hydroxide. **Int J Nanomedicine.** 2019; 14:6661-6678
<https://doi.org/10.2147/IJN.S214923>

ERKEKOGLU, P., KOCER-GUMUSEL, B. Toxicity assessment of nanopharmaceuticals. In: Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines. Editora William Andrew.565-595, 2018 ISBN 9780128136621.

ESSA, E. A. **ELKOTB**,F.E., **ELDIN**, E.E.Z., **MAGHRABY**, G.E. Development and evaluation of glibenclamide floating tablet with optimum release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology.** 27:28-36, 2015. DOI: [10.1016/j.jddst.2015.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.002)

ESSA, E.A., ELKOTB, F.E., ELDIN, E.E.Z., EL, G.M. Maghraby, Journal of Drug Delivery Science and Technology Development and evaluation of glibenclamide floating tablet with optimum release, **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 27, 28–36, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.002>

FARR, I., CARTAGENA, J. **Organic nanoparticles and associated methods.** USA n° US2007098802-A1. 7p., 2005.

FARIAS, T., MÉNORVAL, L.V., ZAJAC, J., RIVERA, A. Adsorbilization of drugs onto natural clinoptilolite modified by adsorption of cationic surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** 76, 421–426, 2010. DOI:10.1016/j.colsurfb.2009.11.018

FEARN, T., RICCIOLI, C., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO-GINEL, J.E. On the geometry of SNV and MSC. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96, 22–26, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2008.11.006>

FENGZHU, L.V., MENG, Z., LI, P., ZHANG, Y., LV, G., ZHANG, Q., ZHANG, Z., ZHANG, Z. Contribution of sodium dodecyl sulphate and sodium lauric acid in the one-pot synthesis of intercalated ZnAl-layered double hydroxides. **Bull. Mater. Sci.**, Vol. 38, No. 4, pp. 1079–1085, 2015.

FERENCZ, Z., [KUKOVECZ, A.](#), [KÓNYA, Z.](#), [SIPOS, P.](#), [PALINKO, I.](#) Optimisation of the synthesis parameters of mechanochemically prepared CaAl-layered double hydroxide. **Applied Clay Science**, v. 112–113, p. 94–99, 2015.

FERREIRA, M. G. S. Enhancement of Active Corrosion Protection via Combination of Inhibitor-Loaded. [Appl Mater Interfaces](#). 2010 May;2(5):1528-35. doi: 10.1021/am100174t.

FERRER-RIQUELME, A.J., 2009. Statistical Control of Measures and Processes. In: *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*. Elsevier.

FLOREZ, J.C. Precision Medicine in Diabetes: Is It Time?: Table 1. **Diabetes Care.** 39(7):1085–8, 2016.

FOGG, A.M., DUNN, J.S., O'HARE D. Formation of second-stage intermediates in anion-exchange intercalation reactions of the layered double hydroxide [LiAl₂(OH)₆] Cl. H₂O as observed by time-resolved, in situ x-ray diffraction. **Chem Mater.** 10, 356–360, 1998.

FORANO, C., HIBINO, T., LEROUX, F., TAVIOT-GUEHO, C. Layered double hydroxides. In: Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G. (Eds.), **Handbook of Clay Science**. Elsevier Ltd, pp. 1021–1095, 2006.

FRADKIN, J.E., HANLON, M.C., RODGERS, G.P. NIH Precision Medicine Initiative: Implications for Diabetes Research: Table 1. **Diabetes Care**.39(7):1080–4,2016.

FRANCO, P., DE MARCO, I. Eudragit: A Novel Carrier for Controlled Drug Delivery in Supercritical Antisolvent Coprecipitation. **Polymers** 2020, 12(1), 234; FOWLER, M.J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clin Diabetes**. 2008;26: 77–82.<https://doi.org/10.3390/polym12010234>

FRONDEL, C., GASTUCHE, M.C., BROWN, G., MORTLAND, M.M., TANABE, K. Solid Acids and Bases. Kodansha, Tokyo and Academic Press, New York, London (Chap. 4 and 5. 295), 1970.

FROST, R.L., ERICKSON, K.L. Near-infrared spectroscopy of stichtite, iowaite, desautelsite and arsenate exchanged takovite and hydrotalcite. **Spectrochim. Acta A** 61, 51–56, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.03.011>.

FROST, R.L., PALMER, S.J., REDDY, B.J. Near-infrared and mid-IR spectroscopy of selected humite minerals. **Vib. Spectrosc.** 44, 154–161, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.11.002>.

FROST, R.L., SPRATT, H.J., PALMER, S.J. Infrared and near-infrared spectroscopic study of synthetic hydrotalcites with variable divalent/trivalent cationic ratios. **Spectrochim. Acta** 72, 984–988, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.12.018>.

FU, L., YAN, L., WANG, G., HEN, H., JIN, L. Photoluminescence enhancement of silver nanoclusters assembled on the layered double hydroxides and their application to guanine detection. **Talanta**, 193, 161-167, 2019.

FURMAN, B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, **Curr. Protoc. Pharmacol.** 70, 1–20, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70.5.47>

FURRER, G., STUMM, W., 1986. The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of δ -Al₂O₃ and BeO. **Geochim. Cosmochim. Acta** 50, 1847–1860.

GALVÃO, T.L.P., NEVES, C.S., CAETANO, A.P.F., MAIA, F., MALHEIRO, E., FERREIRA, M.J., BASTOS, A.C., SALAK, A.N., GOMES, J.R.B., TEDIM, J., FERREIRA,

M.G.S. Control of Crystallite and Particle size in the Synthesis of Layered double Hydroxides : Macromolecular Insights and a complementary modeling tool. **Journal of Colloids and Interfaces Science** 468, 86–94, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.038>

GAO, L., PORTER, A.L., WANG, J., FANG, S., ZHANG, X., MA, T. Technology life cycle analysis method based on patent documents. **Technol Forecast Soc Change**. 80(3):398–407, 2013.

GAO, Y., WU, J., WANG, Q., WILKIE, A., HARE, D.O. Flame retardant polymer/layered double hydroxide nanocomposites. **J. Mater. Chem. A** 2, 10996–11017, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4ta01030b>.

GAUTSCHI, N., HOOGEVEST, P., KUENTZ, M. Amorphous drug dispersions with mono- and diacyl lecithin: on molecular categorization of their feasibility and UV dissolution imaging, **Int. J. Pharm.** 491 (1–2), 218–230, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.039>

GHASEMI, A., KHALIFI, S., JEDI, S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes, **Acta Physiol. Hung.** 101(4), 408–420, 2014. <http://dx.doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2> (review).

GHEIBI, S., BAKHTIARZADEH, F., JEDDI, S., FARROKHFALL, K., ZARDOOZ, H., GHASEMI, A. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats, **Nitric Oxide** 64 (2017) 39–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2017.01.003>.

GIESE, E., WINKELMAN, O., ROHN, S., FRISTCHE, J. Determining quality parameters of fish oils by means of ¹H nuclear magnetic resonance, mid-infrared, and near-infrared spectroscopy in combination with multivariate statistics. **Food Research International**.

GONÇALVES, L.M.D., MAESTRELLI, F., MANNELLI, L.C., GHELARDINI, C., ALMEIDA, A.J., MURA, P. Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 16,41-50, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.02.012>

GOVINDARAJAN, U.H., TRAPPEY, A.J.C., TRAPPEY, C. V. Intelligent collaborative patent mining using excessive topic generation. **Adv Eng Informatics**. 42:100955, 2019.

GROSS, J.L., AZEVEDO, M.J., SILVEIRO, S.P., CANANI, L.H., CARAMORI, M.L., ZELMANOVITZ, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care** **28**: 164-176,2005

GU, Z., THOMAS, A.C., XU, Z.P., CAMPBELL, J.H., LU, G.Q. In vitro sustained release of LMWH from MgAl-layered double hydroxide nanohybrids. **Chem Mater.** 20:3715–3722, 2008.

GUAN, J., HAN, J., ZHANG, D., CHU, C., LIU, H., SUN, J., HE, Z., ZHANG, T. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Increased dissolution rate and oral bioavailability of hydrophobic drug glyburide tablets produced using supercritical CO₂ silica dispersion technology, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 86 (3), 376–382, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.10.008>.

GUARIGUATA, L., WHITING, D.R., HAMBLETON, I., BEAGLEY, J., LINNENKAMP, U., SHAW, J.E. **Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. Diabetes Res Clin Pract**, 103 (2), pp. 137-149, 2014.

GUAN, J., HAN, J., ZHANG, D., CHU, C., LIU, H., SUN, J., HE, Z., ZHANG T. Increased dissolution rate and oral bioavailability of hydrophobic drug glyburide tablets produced using supercritical CO₂ silica dispersion technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 86, 376–382, 2014.

GUNAWAN, P., XU, R. Direct control of drug release behavior from layered double hydroxides through particle interactions. **J Pharm Sci.** 97, 4367–4378, 2008.

GUPTA, M.K., VANWERT, A., BOGNER, R.H. Formation of physically stable Amorphous drugs by milling with neusilin. **J Pharm Sci.**, 92 (3), 536–551, 2003.

GYANANI, V., SIDDALINGAPPA, B., BETAGERI, G.V. Evaluation of various processes for simultaneous complexation and granulation to incorporate drug – cyclodextrin complexes into solid dosage forms. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 1–8, 2015.
<https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1018273>.

HA, J.U, XANTOS, M. Drug release characteristics from nanoclay hybrids and their dispersions in organic polymers. **International Journal of Pharmaceutics** 414, 321– 331, 2011.

HADJÚ, P., KOHLER, K.F., SCHIMIDT, F.H., SPINGLER, H., Physico-chemical and analytical studies on HB 419, [Arzneimittelforschung](#),19(8):Suppl:1381-6, 1969.

HAWGOOD, S., HOOK-BARNARD, I.G., O'BRIEN, T.C., YAMAMOTO, K.R. Precision medicine: Beyond the inflection point. **Sci Transl Med.** 7(300),2015.

HARRIGAN, R.A., NATHAN, M.S., P. BEATTIE, Oral Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Pharmacology, Toxicity, and Treatment. **Annals of Emergency Medicine.** 38(1), 68–78. doi:10.1067/mem.2001.1143142001

HALAJNIA, A., OUSTAN,S., NAJAFI,N., KHATAE,A.R., LAKZIAN,A. Science The adsorption characteristics of nitrate on Mg – Fe and Mg – Al layered double hydroxides in a simulated soil solution. **Applied Clay.** v. 70, p. 28–36, 2012.

HANAOR, D., MICHELAZZI, M., LEONELLI, C., SORREL, C.C. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. **Journal of the European Ceramic Sociaty** 32, 235–244, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.015>.

HAYASHI, A., KUBOTA, M.,OKAMURA, M.,NAKAYAMA, H. Complex Formation with Layered Double Hydroxides for the Remediation of Hygroscopicity. [Chem Pharm Bull \(Tokyo\)](#),v. 63, n. 1, p. 13–17, 2015.

HICKEY, L., KLOPROGGE, J.T., FROST, R.L. The effects of various hydrothermal tratament on magnesium-aluminium hydrotalcites. **J. Mater. Sci.** 35, 4347–4355, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1004800822319>.

HIGASHI, K., HAYASHI, H., YAMAMOTO, K., MORIBE, K. The Effect of Drug and EUDRAGIT®S100 Miscibility in Solid Dispersions on the Drug and Polymer Dissolution Rate. [International Journal of Pharmaceutics](#). [Vol. 494, 1](#), Pag 9-16, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.007>

HIGUCHI, W. I., Diffusional models useful in biopharmaceutics drug release rate processes. **J. Pharm. Sci.**56, 315-324, 1967.

HIRD, T., ZOMER, E., OWEN, A., CHEN, L., MAGLIANO, D.J., LIEW, D. The impact of diabetes on productivity in China. [Diabetologia](#). Vol 62, pp1195-1203, 2019.

HIXSON, A.W., CROWELL, J.H. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. **Ind. Eng. Chem** 23 (8) 923-931, 1931.

- HOYO, C. DEL. Layered double hydroxides and human health : An overview. v. 36, p. 103–121, 2007. <https://clarivate.com/derwent/solutions/derwent-world-patent-index-dwpi/>
- HORNE, G.A., KINSTRIE, R., COPLAND, M. Novel drug therapies in myeloid leukemia: a patent review. **Pharm Pat Anal.** 4(3):187–205, 2015. Available from: <https://doi.org/10.4155/ppa.15.3>
- HOSSEININASAB, S., PASHAEI-ASL, R., KHANDAGHI, A.A., NASRABADI, H.T., NEJATI-KOSHKI, K., AKBARZADEH, A., JOO, S.W., HANIFEHPOUR, Y., DAVARAN, S. Synthesis, characterization, and in vitro studies of PLGA-PEG nanoparticles for oral insulin delivery, **Chem. Biol. Drug Des.** 84 (2014) 307–315.
- HU, C. Pharmacogenomics in type 2 diabetes management: towards personalized medicine. **J Transl Med.** ;10(S2):A19,2012.
- HUANG, W., TSUI, C.P., TANG, C.Y., GU L. Effects of Compositional Tailoring on Drug Delivery Behaviours of Silica Xerogel/Polymer Core-shell Composite Nanoparticles. **Scientific Reports** 8,13002, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-31070-9
- HUDCOVÁ, B., VESELSKÁ, V., FILIP, J., ČÍHALOVÁ, S., KOMÁREK, M. Highly effective Zn (II) and Pb(II) removal from aqueous solutions using Mg-Fe layered double hydroxides: Comprehensive adsorption modeling coupled with solid state analyses. **J. Clean. Prod.** 171, 944–953, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.104>.
- HUSSEIN, M.Z., JAAFAR, A.M., YAHAYA, A.H., ZAINAL, Z. The effect of single, binary and ternary anions of chloride, carbonate and phosphate on the release of 2, 4-dichlorophenoxyacetate intercalated into the Zn–Al- layered double hydroxide nanohybrid. **Nanoscale Res Lett.**4: 1351–1357, 2009.
- HWANG, J., KIM, H.M., SHIN, S., SUN, Y. Designing a High-Performance Lithium – Sulfur Batteries based on Layered double Hydroxides – Carbon Nanotubes Composite Cathode and a Dual-Functional Graphene – Polypropylene – Al₂O₃ Separator. **Adv. Funct. Mater.** 28, 1704294–1704306, 2018. <https://doi.org/10.1002/adfm.201704294>.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas (5th ed.), International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2011.

ISO 10993-1:2018. Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. ,2018. **Biological and clinical evaluation of medical devices.** [ISO/TC 194](https://www.iso.org/standard/68936.html).Edition:5. <https://www.iso.org/standard/68936.html>

JÁCOME-ACATITLA, G., TZOMPANTZI, F., LÓPEZ-GONZÁLEZ, R., GARCÍA-MENDOZA, C., ALVARO, J.M., GÓMEZ, R. Photodegradation of sodium naproxen and oxytetracycline hydrochloride in aqueous medium using as photocatalysts Mg-Al calcined hydrotalcites. **J. Photochem. Photobiol. A Chem.** 277, 82–89, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.12.014>

JANNIN, V., MUSAKHANIAN, J., MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Adv Drug Deliv Rev.** 60, 734–746, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.09.006>

JAUMOT, J., GARGALLO, R., DE JUAN, A., TAULER, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemom. Intell. Lab. Syst.** 76, 101–110, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.007>.

JÖNSSON, A., CHAN, J.C., RYDBERG, T., VAALER, S., HALLENGREN, B., COCKRAM, C.S. [CRITCHLEY J.A.](#), [MELANDER, A.](#) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenous glibenclamide in Caucasian and Chinese patients with type-2 diabetes. **Eur J. Clin Pharmacol**, 55 (2000), pp. 721-727.

JOSHI, S.R., GLSG, F. Diabetes care in India, *Ann. Glob. Health* 81 (6), 830–838, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.aogh.2016.01.002>

KALEPU, S., NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B.** 5, 442-453, 2015.

KAMALA, V. R. R. (French). Solid dosage form of an antidiabetic drug. French n°WO2006109175A2, 2005-04-11, 2006-04-10. 2007-02-08.

KAMEDA, T., FUBASAMI, Y., UCHIYAMA, N., YOSHIOKA, T. Elimination behavior of nitrogen oxides from a NO₃–-intercalated Mg–Al layered double hydroxide during thermal decomposition. **Thermochim Acta.** 499, 106–110, 2010.

KASIM, N.A., WHITEHOUSE, M., RAMACHANDRAN, C., BERMEJO, M., LENNERNÄS, H., HUSSAIN, A.S., JUNGINGER, E., STAVCHANSKY, S.A., MIDHA,

- K.K., SHAH, V.P., AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification, **Mol. Pharm.** 1 (1), 85–96, 2004.
- KATAOKA, K., HARADA, A., NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 47, 113–131, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1)
- KELKAR, C.P., SCHUTZ, A.A. Ni-, Mg- and Co-containing hydrotalcite-like materials with a sheet-like morphology: synthesis and characterization. **Microporous Materials** 10, 163–172, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0927-6513\(97\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0927-6513(97)00006-0).
- KHADKA, P., RO, J., KIM, H., KIM, I., KIM, J.T., KIM, H., CHO, J.M., YUM, G., LEE, J. Pharmaceutical particle technologies : an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability, **Asian J. Pharm. Sci.** 9 (6), 304–316, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>
- KHAMES, A., ABDELAZEEM, A.H., HABASH, M., TAHA, M.O. Preparation and in vitro characterization of glibenclamide-loaded alginate hexyl-amide beads: a novel drug delivery system to improve the dissolution rate. **Pharm Dev Technol.** 7450 (7), 881–890, 2014. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.836224>.
- KHAN, S.B., ALAMRY, K.A., ALYAHYAWI, N.A., ASIRI, A. M. Controlled release of organic–inorganic nanohybrid: cefadroxil intercalated Zn–al-layered double hydroxide. **International Journal of Nanomedicine**, 13, 3203–3222, 2018.
- KILLNER, M.H.M, ROHWEDDER, J.J.R., PASQUINI, C. A PLS regression model using NIR spectroscopy for on-line monitoring of the biodiesel production reaction.
- KIM, T.H., LEE, J.A., CHOI, S.J., OH, J.M. Polymer Coated CaAl-Layered Double Hydroxide. **Int J Mol Sci.** 5;15(12):22563-79, 2014. doi: 10.3390/ijms151222563.
- KIM, J.M, IM, D.M., JUN, S. Factor analysis and structural equation model for patent analysis: a case study of Apple's technology. **Technol Anal Strateg Manag.** 9;29(7):717–34, 2017.
- KLEIN-SCHWARTZ, W., STASSINOS, G.L., ISBISTER, G.K. Treatment of sulfonylurea and insulin overdose. **British Journal of Clinical Pharmacology.** 81:3, 496–504, 2015. DOI:10.1111/bcp.12822

KLOPROGGE, J. T.; FROST, R. A. Infrared emission spectroscopy of clay minerals. v. 13, p. 99–124, 2004.

KRISHNAMOORTHY, K., VEERAPANDIAN, M., YUN, K., KIM, S.J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. **Carbon**, 53,38–49, 2013.

KONNO, H., HANDA, T., ALONZO, D.E., TAYLOR, L.S. Effect of polymer type on the dissolution profile of amorphous solid dispersions containing felodipine. **Eur J Pharm Biopharm.** 70, 493–499, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.05.023>

KOJIMA, Y.; USUKI, A.; KAWASUMI, M. Synthesis of Nylon 6-Clay Hybrid by Montmorillonite Intercalated with ε-caprolactam. **Journal of Polymer Science**, v. 31, p. 983–986, 1993.

KORSMEYER, R.W., GURNY, R., DOELKER, E., BURI, P. AND PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.** 15, 25-35, 1983.

KOSTOFF, R.N. Citation analysis of research performer quality. **Scientometrics.** 53(1), 49–71, 2002. DOI: [10.1023/A:1014831920172](https://doi.org/10.1023/A:1014831920172)

KOSTOFF, R.N. Science and technology innovation. **Technovation** 19 (19), 593–604, 1999.

KOSTOFF, R.N., HENRY, J., EBERHART, H.J., TOOTHMAN, D.R. Database tomography for technical intelligence: a roadmap of the near-earth space science and technology literature. **Information Processing & Management.** 34 (I), 69–85, 1998.

KOSTOFF, R.N., RAY, D., EBERHART, H.J., HUMENIK, J.A Text mining using database tomography and bibliometrics. **Technological Forecasting and Social Change**.vol.68, Pag 223-253, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0040-1625\(01\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0040-1625(01)00133-0)

KOZEK, E., GÓRSKA, A., FROSS, K., MARCINOWSKA, A., CITKOWSKA, A., SIERADZKI, J. Chronic complications and risk factors in patients with type 1 diabetes mellitus–retrospective. **Analisis Przegl Lek**, 60 (12), 773–777, 2003.

KUMAR, B.S., SARASWATHI, R., KUMAR, K.V., JHA, S.K., VENKATES, D.P., DHANARAJ, S.A. Development and characterization of lecithin stabilized glibenclamide nanocrystals for enhanced solubility and drug delivery. **Drug Delivery**.7544 (3), 173–184, 2014. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.840690>

KUMAR, S., BHARGAVA, D., THAKKAR, A., AURORA, S. Drug carrier systems for solubility enhancement of BCS class II drugs: a critical review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, 30(3), 217–256, 2013(2013)DOI: [10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013005964](https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013005964)

KUMARI, A, YADAV, S.K., YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 75, 1–18, 2010.

KUMARI P., LUQMAN S., MEENA A. Nanomaterials: A Promising Tool for Drug Delivery. In: Daima H., PN N., Ranjan S., Dasgupta N., Lichtfouse E. (eds) *Nanoscience in Medicine Vol. 1. Environmental Chemistry for a Sustainable World*, vol 39. **Springer, Cham**. 2020. ISBN: 978-3-030-29206-5

KURA, A.U., SAIFULLAH, B., CHEAH, P.S., HUSSEIN, M.Z., AZMI, N., FAKURAZI, S. Acute oral toxicity and biodistribution study of zinc-aluminium-levodopa nanocomposite. **Nanoscale Research Letters**. Mar 1;10:105. doi: 10.1186/s11671-015-0742-5. eCollection 2015.

KURENKOV, V.F., HARTAN, H.G., LOBANOV, F.I. Alkaline hydrolysis of polyacrylamide. **Russ J Appl Chem.**, 74:543–554, 2001.

KUTLU, B., LEUTERITZ, A., BOLDT, R., JEHNICHEN, D., HEINRICH, G. Effects of LDH synthesis and modification on the exfoliation and introduction of a robust anion-exchange procedure. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 394–404, 2014.

KWAK, S.Y., KRIVEN, W.M., WALLIG, M.A., CHOY, J.H. Inorganic delivery vector for intravenous injection. **Biomaterials**.5995-6001,V.25, 2004.<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.056>

LAITINEN, R., LOBMANN, K., GROHGANZ, H., STRANCHAN, C., RADES, T. Amino Acids as Co-amorphous Excipients for Simvastatin and Glibenclamide: Physical Properties and Stability. **Mol Pharm.** 7;11(7):2381-9, 2014, <https://doi.org/10.1021/mp500107s>

LAMICHHANE, N., UDAYAKUMAR, T.S., D'SOUZA, W.D., SIMONE, C.B., RAGHAVAN, S.R., MAHMOOD, J. Liposomes: Clinical applications and potential for image-guided drug delivery. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 1–17, 2018.

LAZARIDIS, I., NADEL, D., ROLLEFSON, G., MERRETT, D.C., ROHLAND N, MALLICK S. Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East. **Nature**. 536(7617):419–24, 2016.

LEÃO, A.D., DE FRANÇA, L.M., CUNHA, C.N.L.C., MARINHO F.A., SOARES M.F.L., SOARES-SOBRINHO J.L. In-line monitoring of layered double hydroxide synthesis and insights on formation mechanism and kinetics. **Applied Clay Science**, 179, 105130, 2019a. DOI: 10.1016/j.clay.2019.105130

LEÃO, A. D., OLIVEIRA, V.V., MARINHO, F. A., WANDERLEY, A. L., AGUIAR, J. S., GONÇALVES, T. T., SOARES, M. F. L. R., SOARES-SOBRINHO, J. L. Hybrid systems of glibenclamide and layered double hydroxides for solubility enhancement for the treatment of diabetes mellitus II. **Appl. clay science**, 105218, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105218>

LEÃO, A.D., PROFIRO, J.H.O, NUNES, L.C.C., SILVA-FILHO, E.C., SOARES, M.F.R., SOARES-SOBRINHO, J.L. Strategies to improve glibenclamide dissolution: A review using database tomography. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. Volume 54, December 2019c, 101242 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101242>

LEE, W., KIM, E., CHOI, J., LEE, K.B. Kinetic Analysis of secondary Crystal Growth for Hydrotalcite Film Formation. **Cryst. Growth Des.** 15, 884–890, 2015. <https://doi.org/10.1021/cg5016737>

LEMLEY, M.A., Feldman R. Patent Licensing, Technology Transfer, and Innovation. **AmEcon Rev.** 106(5):188–92, 2016.

LEROUX, F.; ARANDA, P.; BESSE, J.-P.; RUIZ- HITZKY, E. Intercalation of poly (ethylene oxide) derivatives into layered double hydroxides. **Eur. J. Inorg. Chem.** 1242–1251, 2003.

LI, C., WEI, M., EVANS, D.G., DUAN, X. Layered double Hydroxide-based Nanomaterials as Highly Efficient Catalysts and Adsorbents. **Journal Small** 10 (22), 4469–4486, 2014. <https://doi.org/10.1002/sml.201401464>.

LI, B., HE, L., EVANS, D.G., DUAN, X. Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics** 287, 89–95, 2014. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.08.016

LI, Y., WANG, J., WIENTJES, M.G., AU, J.L-S. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. **Adv. Drug Delivery Rev.**, 64, 29–39, 2012.

LI, D., XU, X., XU, J., HOU, W. Poly(ethylene glycol) haired layered double hydroxides as biocompatible nanovehicles: Morphology and dispersity study, **Colloids Surfaces A**. 384, 585–591, 2011.

LIMA, E., VALENTE, J.S., MANUEL, S., CENTRAL, E. Method for Large-Scale production of Multimetallic Layered double Hydroxides: Formation Mechanism Discernment. **Chem. Mater.** 21, 5809–5818, 2009. <https://doi.org/10.1021/cm902377p>.

LIU, H., SHANG, K., LIU, W., LENG, D., LI, R., KONG, Y., ZHANG, T. Improved oral bioavailability of glyburide by a selfnanoemulsifying drug delivery system. **J Microencapsul.** 2048 (3), 277–283, 2014. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.843598>

LIU, J., HUANG, X., LI, Y., SULIEMAN, K.M., HE, X., SUN, F. Facile and Large-Scale production of ZnO/Zn-Al Layered double Hydroxide Hierarchical Heterostructures. **Phys. Chem.** 110, 21865–21872, 2006.

LOHITHASU, D.; HARSHA, I. N. S.; SWAROOP, K. K.; MADHU, G.; BHAGYALAKSHMI, S.; LAVANYA, K.; LOHITHASU, D. Formulation development and evaluation of glyburide beads for controlled release. **Der Pharmacia Lettre.** v. 5, n. 3, p. 170–177, 2013.

LOKERSE, W. J. M. et al. Development and evaluation of an isolated limb infusion model for investigation of drug delivery kinetics to solid tumors by thermosensitive liposomes and hyperthermia. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 282–289, 2018.

LOU, H., LIU, M., WANG, L., MISHRA, S.L., QU, W., JOHNSON, J., BRUNSON, E., ALMOAZEN, H. Development of a mini-tablet of Co-grinded prednisone – neusilin complex for pediatric use. **AAPS PharmSciTech.** 14 (3), 950–958, 2013. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9981-x>

LUCIO, D., MARTÍNEZ-OHÁRRIZA, M.C., JARASA, G., ARANAZB, P., GONZÁLEZ-NAVARRO, C.J., RADULESCUC, A., IRACHE, J.M. Optimization and evaluation of zein nanoparticles to improve the oral delivery of glibenclamide. In vivo study using *C. elegans*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 121, 104–112, 2017.

LUO, J., YING, K., BAI, J. SAVITZKY–GOLAY. Smoothing and differentiation filter for even number data. **Signal Process.** 85, 1429–1434, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.sigpro.2005.02.002>

LUKYANOV, A. N.; TORCHILIN, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1273–1289, 2004.

MADEJOVA, J., BUJDAK, J., PETIT, S., KOMADEL, P. Effects of chemical composition and temperature of heating on the infrared spectra of Li-saturated dioctahedral smectites. (I) Mid-infrared region. **Clay Miner.** 35, 739–751, 2000. <https://doi.org/10.1180/000985500547160>.

MADEJOVÁ, J., PENTRAK, M., PALKOVÁ, H., KOMADEL, P., Near-infrared spectroscopy : A powerful tool in studies of acid-treated clay minerals. **Vibrational Spectroscopy**. v. 49, p. 211–218, 2009.

MADVA, R M.D., KHOSROPOUR, H., KHOSRAVANI A, MIRAFSHAR, M., AZARIBENI, A., REZAPOUR, M. Patent-based technology life cycle analysis: The case of the petroleum industry. **Foresight STI Gov.** 10(4):72–9, 2016.

MAITI, S., MUKHERJEE, S. International Journal of Biological Macromolecules Controlled drug delivery attributes of co-polymer micelles and xanthan- O -carboxymethyl hydrogel particles, **Int. J. Biol. Macromol.** 70, 37–43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.015>

MAITI, S., MUKHERJEE, S., DATTA, R. International Journal of Biological Macromolecules Core – shell nano-biomaterials for controlled oral delivery and pharmacodynamic activity of glibenclamide, **Int. J. Biol. Macromol.** 70, 20–25, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.031>.

MALANDRINO, N., Smith, R.J. Personalized Medicine in Diabetes. *Clin Chem.* 1;57(2):231–40, 2011.

MARA L. PARELLO, RICARDO ROJAS, CARLA E. GIACOMELLI. Dissolution kinetics and mechanism of Mg–Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media. **Journal of Colloid and Interface Science** 351, 134–139, 2010.

MAZAHARIOUN, M., SAEDISOMEOLIA, A., JAVANBAKHT, M.H., KOOHDANI, F., ESHRAGHIAN, M.R., DJALALI, M. Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adiponectin levels and AdipoR gene expression in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Arch Med Sci.** 4:716–24, 2017.

MCCARTHY, M. Obama seeks \$213m to fund “precision medicine.” *BMJ*. 2015 Feb 2;350(feb02 25):h587–h587,2015.

MCGILL, M., FELTON, A.M. New global recommendations: a multidisciplinary approach to improving outcomes in diabetes. **Prim Care Diabetes**. pp. 49-55, 2007.

MEHNERT, W., MADER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Review**, abril, 47, 165-196, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)

MEI, X., XU, S., HU, T., PENG, L., GAO, R., LIANG, R., WEI, M., EVANS, D.G. Layered double hydroxide monolayers for controlled loading and targeted delivery of anticancer drugs. **Nano Research** 11,195 – 205, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1619-y>.

MERINO, J., FLOREZ, J.C. Precision medicine in diabetes: an opportunity for clinical translation. **Acad Sci**. 1411(1):140–52,2018.

MICHAEL, T., HELFGEN, B., HILS, P., LIETZOW, R., SCHABER, K. Micronization of pharmaceutical substances by rapid expansion of supercritical solutions (RESS): Experiments and Modeling. **Particle & particle system charact.** 19, 327–335, 2002.

MILLER, R.G., COSTACOU, T., ORCHARD, T.T. Risk Factor Modeling for Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes in the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) Study: A Comparison with the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC). **Diabetes**. 68(2): 409-419. <https://doi.org/10.2337/db18-0515>

MINNELLI, C., LAUDADIO, E., GALEAZZI, R., BARUCCA, G., VALENTINA NOTARSTEFANO, V., CANTARINI, M., ARMENI, T., MOBBILI, G. Encapsulation of a Neutral Molecule into a Cationic Clay Material: Structural Insight and Cytotoxicity of Resveratrol/Layered Double Hydroxide/BSA Nanocomposites. **Nanomaterials**, 10, 33,2020; doi:10.3390/nano10010033

MIYATA, S.; OKADA, A. Synthesis of hydrotalcite-like compounds and their physico - chemical properties-- the systems $Mg^{2+} Al^{3+} SO_4^{2-}$ and $Mg^{2+} -Al^{3+} - CrO_4^{2-}$. **Clays and Clay Minerals** v. 25, p. 14–18, 1977.

MIYATA, S. The syntheses of hydrotalcite-like physico-chemical properties i : the systems $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-NO}_3^-$, $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}^-$, $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-ClO}_4^-$, $\text{Ni}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}^-$ and $\text{Zn}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}^-$. **Clays and Clay Minerals**, v. 23, p. 369–375, 1975.

MOHAN, V., RADHA, V. Precision Diabetes Is Slowly Becoming a Reality. **Med Princ Pract.** 28(1):1–9, 2019.

MORA, M., LOPEZ, M.I., JIMENEZ-SANCHIDRIAN, C., RUIZ, J.R. MIR and NIR spectroscopy of sol–gel hydrotalcites with various trivalent cations. **J. Sol-Gel Sci. Technol.** 55, 59–65, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10971-010-2213-x>

MORA, M., LOPEZ, M.I., JIMÉNEZ-SANCHIDRIÁN, C., RUIZ, J.R. Study of organo-hybrid layered double hydroxides by medium and near infrared spectroscopy. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.** 78, 989–995, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.12.013>.

MOSER P. Patents and Innovation: Evidence from Economic History. **J Econ Perspect.** 27(1):23–44, 2013.

MURKHERJEE, S., MAYTI, S., GHOSJ, B., CHAKRABORTY, T., MONDAL, A., BISHAYEE, A. Assessment of the antidiabetic potentiality of glyburide loaded glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 55, 101451, 2020.

NANGOI, I.M., VAISS, V.S., SOUZA, W.F., CHIARO, S.S.X., LEITÃO, A. Theoretical studies of the interaction of terephthalate anion in MgAl-layered double hydroxides. **Appl. Clay Sci.** 107, 131–137, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.01.014>

NARASHIMHAN B., MALLAPRAGADA S.K., PEPPAS, N.A. Release kinetics, data interpretation, in: Encyclopedia of controlled drug delivery, Mathiowitz E. Ed., John Wiley and Sons, ISBN: 978-0-471-14828-9, 1999.

NAKAYAMA, H.; WADA, N.; TSUHAKO, M. Intercalation of amino acids and peptides into Mg-Al layered double hydroxide by reconstruction method. **Int. J. Pharm.** 269, 469–478, 2004.

NAZZAL, S., SMALYUKH II, O.D. LAVRETOVICH, M.A. KHAN. Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system

(SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of emulsion formation. **Int J Pharm.** 235, 247–265, 2002.

NEJATI K, REZVANI Z. Synthesis and characterisation of nanohybrids of olsalazine-intercalated Mg-Al layered double hydroxide. **J Exp Nanosci.** 7:412–425, 2012.

NEVES, C. Control of crystallite and particle size in the synthesis of layered double hydroxides: Macromolecular insights and a complementary modeling tool. **Journal of Colloid and Interface Science.** V. 468, Pag. 86-94, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.038>

NEWMAN, A., REUTZEL-EDENS, S.M., ZOGRA, G. Coamorphous Active Pharmaceutical Ingredient e Small Molecule Mixtures: Considerations in the Choice of Coformers for Enhancing Dissolution and Oral Bioavailability. **J Pharm Sci.** vol. 107, pp. 5–17, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.09.024>

NGAWHIRUNPAT, T., GOEGEBAKAN, E., DUANGJIT, S., AKKARAMONGKOLPORN, P., KUMPUGDEE-VOLLRATH, M. Controlled release of chlorpheniramine from resonates through surface coating with Eudragit® RS 100. **Int J Pharm. Pharm Sci.**, 2, 107–112, 2010.

NIOPAS, I., DAFTSIOS, A.C. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **J Pharm Biomed Anal**, 28, pp. 653-657, 2002.

NOGUEIRA, T., BOTAN, R., WYPYCH, F., LONA, L. Study of thermal and mechanical properties of PMMA/LDHs nanocomposites obtained by in situ bulk polymerization. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 42, n. 8, p. 1025–1030, 2011.

OH, J.M., CHOI, S.J., LEE, G.E., HAN, S.H., CHOY, J.H. Inorganic Drug-Delivery Nanovehicle Conjugated with Cancer-Cell-Specific Ligand, Adv. **Funct. Mater.** 19, 1617–1624, 2009.

OH, J.M., HWANG, S.H., CHOY, J.H. The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydrotalcite particles. **Solid State Ionics** 151,285, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-2738\(02\)00725-7](https://doi.org/10.1016/S0167-2738(02)00725-7)

OECD (2018), Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>.

OMDEO, K. G., AJAY, V. R., KRISHNAN K., ABITHA, V. K., NIKESH, S., SABU, T., MISHRA, S. Surface Modification of Synthesized Layered Double Hydroxide [LDH] for Methylene Blue Dye Removal in Textile Industry via Photocatalytic Activity under Visible Light. **Journal of Nano Research** ISSN: 1661-9897, Vol. 46, pp 135-147 2017.

ONOUÉ, S., Y. KOJO, Y. AOKI, 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 Metab Pharmacokinet**, 27, pp. 379-387, 2012.

OLFS, H.W., TORRES-DORANTE, L.O., ECKELT, R., KOSSLICK, H. Comparison of different synthesis routes for Mg-Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. **Appl. Clay Sci.** 43, 459–464, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.10.009>.

OSORIO, F.A., MOLINA, P., MATIACEVICH, S., ENRIONE, J., SKURTYS, O. Characteristics of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings, **Ital. Oral Surg.** 1, 287–293, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.045>

OUELLETTE, L.L. Do Patents Disclose Useful Information? Harv. **J Law Technol.** 25(2):545, 2012. Available from: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=1762793

PALMER, S.J., REDDY, B.J., FROST, R.L. Application of UV–Vis, near-infrared and midinfrared spectroscopy to the study of Mn-bearing humites. **Polyhedron**. 26, 524–533, 2007.

PANIAS, D., ASIMIDIS, P., PASPALIARIS, I. Solubility of boehmite in concentrated sodium hydroxide solutions: model development and assessment. **Hydrometallurgy**. 59, 15–29, 2001.

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. **Journal of Colloid and Interface Science**. 351, 134–139, 2010. doi:10.1016/j.jcis.2010.07.053

PATEL, N. R., PATEL, D.A., BHARADIA, P.D., PANDYA, V., MODI, D. Microsphere as a novel drug delivery. **Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)**, v. 2, n. 8, p. 992–997, 2011.

- PAULO C. PAVAN, EDUARDO L. CREPALDI, GILMAR DE A. GOMES, JOA~O B. VALIM. Adsorption of sodium dodecylsulfate on a hydrotalcite-like compound. Effect of temperature, pH and ionic strength. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 154, 399–410, 1999.
- PEEK, J., 2018. Middaugh, and C. Berkland. Nanotechnology in vaccine delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 60 (8) 915-928, 2008.
- PERIOLI, L., AMBROGI, V., DI NAUTA, L., NOCCHETTI M., ROSSI, C. Effects of hydrotalcite-like nanostructured compounds on biopharmaceutical properties and release of BCS class II drugs: the case of flurbiprofen. **Appl Clay Sci.** 51:407–413, 2011.
- PEPPAS, N.A., SAHLIN, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **Int. J. Pharm.** 57 (2) 169-172, 1989.
- POST, J.L., CRAWFORD, S.M. Uses of near-infrared spectra for the identification of clay minerals. **Appl. Clay Sci.** 95, 383–387, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.02.010>.
- POUTON, C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying ” drug delivery systems. **Eur J Pharm Sci.** 2, 93–98, 2000.
- PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K., MORADIYA, N.G., RANDERIA, N.P. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms, **Carbohydr. Polym.** 92 (2) (2013) 1685–1699, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>
- PRASAD, N., GARUD, N., GARUD, A. Improvement of in vitro release of glibenclamide using cyclodextrin inclusion complexation. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences.** 13 (1), 15–21, 2014. DOI: [10.3329/dujps.v13i1.21855](https://doi.org/10.3329/dujps.v13i1.21855)
- PRASAD, R.B., GROOP, L. Precision medicine in type 2 diabetes. **J Intern Med.** 285(1):40–8, 2019.
- PRATS-MONTALBÁN, J.M., DE JUAN, A., FERRER, A. Multivariate image analysis: A review with applications. **Chemom. Intell. Lab. Syst** 107, 1–23, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.03.002>.
- PROLIFERATION REAGENT WST1 PROTOCOL(Roche,Switzerland):
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cllprorobul.pdf>

- RASMUSSENA, K., RAUSCHERA, H., KEARNS, P., GONZÁLEZ, M., SINTES, J.R. Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 2019, 104, 74-83.
- RAZ, I., RIDDLE, M.C., ROSENSTOCK, J., BUSE, J.B., INZUCCHI, S.E., HOME, P.D. Personalized Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: Reflections from a Diabetes Care Editors' Expert Forum. **Diabetes Care**. 36(6):1779–88,2013.
- REARDON, S. Obama to seek \$215 million for precision-medicine plan. **Nature**. 2015
- REED, M.J., MESZAROS K., ENTES, L.J., CLAYPOOL, M.D., PINKETT, J.G., GADBOIS, T.M. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism** 49: 1390–1394, 2000. PMID: 11092499
- REDDY, PD., PRAKASH, A.S., SHAFI, S., SREE, R.U., REDDY, T.P., SWARNALATHA, D., PRASANTI, S. Formulation and evaluation of ethyl cellulose coated microcapsules of glibenclamide for controlled release. **Asian Journal of Chemistry**. 26 (3), 770–772, 2014.
- REDDY, S.S.K. Evolving to Personalized Medicine for Type 2 Diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** ;45(4):1011–20,2016.
- REMYA, N. S., SYAMA, S., SABAREESWARAN, A., & MOHANAN, P. V. Investigation of chronic toxicity of hydroxyapatite nanoparticles administered orally for one year in wistar rats. **Materials Science and Engineering: C**. v.76, p.518–527, 2017.
- REMKO, M. Theoretical study of molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some hypoglycemic agents. **J. Mol. Struct.** 2019, 897, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2008.11.021>
- REVERCHON, E., ADAMI, R., CARDEA, S., DELLA PORTA, G. Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications, **J. Supercrit. Fluids** 47, 484–492, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.001>
- REYMOND D, QUONIAM L. A new patent processing suite for academic and research purposes. **World Pat Inf.** 47:40–50, 2016
- RICH S.S., CEFALU, W.T. The Impact of Precision Medicine in Diabetes: A Multidimensional Perspective. **Diabetes Care**. 39(11):1854–7,2016.

RIVES, V.; ARCO, M.; MARTÍN, C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 1–2, p. 28–39, 2013.

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, A. F.; PALMA, M. A. M. Gestão da inovação e capacidade competitiva: uma análise não paramétrica no setor cerâmico de Campos dos Goytacazes. **Cerâmica**. 2012.

RODRIGUES, L. A. D. S.; FIGUEIRAS, A.; VEIGA, F.; FREITAS, R.M.; NUNES, L.C.C.; FILHO, E.C.S.; LEITE, C.M.S. The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 642–651, 2013.

ROJAS, R., GIACOMELLI, C.E. Size-tunable LDH–protein hybrids toward the optimization of drug nanocarriers. **J. Mater. Chem. B**, 2015, 3, 2778, 2015.

ROJAS, R., JIMENEZ-KAIRUZB, A.F., MANZOB, R.H., C.E. GIACOMELLI, C.E. Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** 463, 37–43, 2014.

ROJAS, R., PALENA, M.C., JIMENEZ-KAIRUZ, A.F., MANZO, R.H., GIACOMELLI, C.E. Modeling drug release from a layered double hydroxide–ibuprofen complex. **Appl Clay Sci.** 62, 15–20, 2012.

ROJAS, R., BRUNA, F., PAULI, C.P., ULIBARRI, M. A., GIACOMELLI, C.E. The effect of interlayer anion on the reactivity of Mg–Al layered double hydroxides: Improving and extending the customization capacity of anionic clays. **Journal of Colloid and Interface Science** 359, 136–141, 2011.

ROJAS, R., BARRIGA, C., [DE PAULI, C.P.](#), [AVENA, M.J.](#) Influence of carbonate intercalation in the surface-charging behavior of Zn–Cr layered double hydroxides. **Materials Chemistry and Physics**, 199, 303–308, 2010.

RUBERG, S.J., HARRELL, F.E., GAMALO-SIEBERS, M., LAVANGE, L., LEE, J.J., PRICE, K., PECK, C. Inference and Decision Making for 21st Century Drug Development and

Approval, **The American Statistician**, 73:sup1, 319-327, DOI:

10.1080/00031305.2019.1566091

RUSSELL, A.S., EDWARDS, J.D., TAYLOR, C.S. Solubility and Density of Hydrated Aluminas in NaOH Solutions. **Journal of Metals**. 7, 1123–1128, 1995.

SALA, M., DIAB,R., ELAISSARI,A., FESSI,H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018.

SENGUPTA, R. et al. A Short Review on Rubber / Clay Nanocomposites With Emphasis on Mechanical Properties. **Engineering**, v. 47, p. 21–25, 2007.

SHAFIGHA, M., HAMIDPOURA, M., FURRER, G. Zinc release from Zn-Mg-Fe(III)-LDH intercalated with nitrate, phosphate and carbonate: The effects of low molecular weight organic acids. **Applied Clay Science**, 170, 135-142, 2019.

SHAKEEL, F., HAQ, N., ALANAZI, F.K., ALSARRA, I.A. Effect of oils and surfactants on physicochemical characterization and in vitro dissolution of glibenclamide from self-emulsifying formulations, **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 24, 78–85, 2014b.

[https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50011-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50011-1)

SHAKEEL, F., HAQ, N., ALANAZI, F.K., ALSARRA, I.A. Self-nanoemulsifying performance of two grades of Lauroglycol (Lauroglycol-90 and Lauroglycol-FCC) in the presence of mixed nonionic surfactants. **Pharmaceutical Development and Technology**. 7450, 7, 799–805, 2014. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.829099>.

SHAKEEL, F., HAQ, N., ALANAZI, F.K., ALSARRA, I.A. Polymeric solid self-nanoemulsifying drug delivery system of glibenclamide using coffee husk as a low cost biosorbent, **Powder Technol.** 256, 352–360, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.02.028>

SINGH, M. D, MITAL, N., KAUR, G. Topical drug delivery systems: A patent review. **Expert Opin Ther Pat.** 1;26(2):213–28, 2016. Available from:

<https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131267>

SINHA, P., UBAIDULLA, U., KUMAR, A. International Journal of Biological Macromolecules Okra(Hibiscus esculentus) gum-alginate blend mucoadhesive beads for

controlled glibenclamide release, **Int. J. Biol. Macromol.** 72, 1069–1075, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.002>.

SJÖGREN, R., STRIDH, K., SKOTARE, T., TRYGG, J. Multivariate patent analysis—Using chemometrics to analyze collections of chemical and pharmaceutical patents. **J Chemom** .3041. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cem.3041>

SOLA, D., ROSSI, L., SCHIANCA, G.P.C., MAFFIOLI, P., MELLA, M.B.R., CORLIANO, F., FRA, G. P., BARTOLI, E., DEROSA, G. Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 2015; 11, 4: 840–848 DOI: 10.5114/aoms.2015.53304

SORIANO-TÁRRAGA, C., JIMÉNEZ-CONDE, J, GIRALT-STEINHAEUER, E., MOLA-CAMINAL, M., VIVANCO-HIDALGO, R.M., OIS, A., Epigenome-wide association study identifies TXNIP gene associated with type 2 diabetes mellitus and sustained hyperglycemia. **Hum Mol Genet.** 1;25(3):609–19, 2016.

SPERLINE, R. P.; SONG, Y.; FREISER, H. Temperature Dependent Structure of Adsorbed Sodium Dodecyl Sulfate at the Al₂O₃/Water Interface. **Langmuir**, v. 13, n. 14, p. 3727–3732, 1997.

SRINIVASAN, K., VISWANAD, B., ASRAT, L., KAUL, C.L., RAMARAO, P. Combination of high- fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening, **Pharmacol. Res.** 52,313–320, 2005.<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>

STEFFES, V. et al. Optimizing Cationic Liposome Composition for Hydrophobic Drug Loading and Delivery to Human Cancer Cells. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 629a, 2018.

STOLERMAN, E.S., FLOREZ, J.C. Genomics of type 2 diabetes mellitus: implications for the clinician. **Nat Rev Endocrinol.** 30;5(8):429–36,2009.

SULEIMAN, M.S., NAJIB, N.M. Isolation and physicochemical characterization of solid forms of glibenclamide. **Int. J. Pharm.** 50, 103–109, 1989. [https://doi.org/10.1016/0378-5775\(89\)90134-8](https://doi.org/10.1016/0378-5775(89)90134-8).

SUN, X., DEY, S.K. Insights into the Synthesis of Layered double Hydroxide (LDH) Nanoparticles: part 2. Formation Mechanisms of LDH. **Colloid Interface Sci** 458, 160–168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.025>.

SUN, X., NEUPERGER, E., DEY, S.K. Insights into the Synthesis of Layered double Hydroxide (LDH) Nanoparticles: part 1. Optimization and controlled synthesis of chloride-intercalated LDH. **J. Colloid Interface Sci.** 459, 264–272, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.073>

1016/j.jcis.2015.07.073

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.** 50: 536-546, 2001.

TABBAKHIAN, M., HASANZADEH, F., TAVAKOLI, N., , JAMSHIDIAN, Z. Dissolution enhancement of glibenclamide by solid dispersion: solvent evaporation versus a supercritical fluid-based solvent-antisolvent technique. **Research in pharmaceutical sciences.**v.9, 337, 2014.

TABESH, M., MAGLIANO, D.J., TANAMAS, S.K., SURMONT, F., BAHENDEKA, S., CHIANG, C., ELGART, J.F., GAGLIARDINO, J.J. KALRA, S. Diabetes management and treatment approaches outside of North America and West Europe in 2006 and 2015. *Acta Diabetologica.* 56:889–897, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-01284-4>

TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. **Chemom. Intell. Lab. Syst.** 30, 133–146, 1995. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X).

TAKLA, P.G. Analytical profiles of drugs substances. V 10.p 337-355.1981

THOMAS, M. C.; COOPER, M. E.; ZIMMET, P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nature reviews.** 2015.Disponível em:<://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en >. Acesso em: junho 2.

THONGNOPKOON, T., PUTTIPIATKHACHORN, S. New metastable form of glibenclamide prepared by redispersion from ternary solid dispersions containing polyvinylpyrrolidone-K30 and sodium lauryl sulfate, **Drug Dev. Ind. Pharm.** 00 (00), 1–10,2015. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1029938>

TRONTO, J., DOS REIS, M.J., SILVÉRIO, F., BALBO, V.R., MARCHETTI, J.M., VALIM, J.B. In vitro release of citrate anions intercalated in magnesium aluminium layered double hydroxides. **J Phys Chem Solid.**65:475–480, 2004.

TOYE, A.D.G. Genetics and functional genomics of type 2 diabetes mellitus. **Genome Biol.** 4(12):241,2003.

UEDA, K., HIGASHI, K., YAMAMOTO, K., MORIBE, K. Equilibrium State at Supersaturated Drug Concentration Achieved by Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate: Molecular Characterization Using ^1H NMR Technique. [Mol Pharm.](#) .2015. [https:// doi.org/10.1021/mp500588x](https://doi.org/10.1021/mp500588x).

UNNIKRISHNAN, R., ANJANA, R.M., MOHAN, V. Diabetes mellitus and its complications in India. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12(6), 357-70, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.53>.

UPADHYAY, P., KUMAR, J., KUMAR, A. International Journal of Biological Macromolecules Studies on biological macromolecules lipid-Gelucire based gastroretentive multiparticulate, *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 463–477, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.045>

VAGHELA, R., KULKARNI, P.K. The effect of nanonization on poorly water soluble glibenclamide using a liquid anti-solvent precipitation technique: aqueous solubility, in vitro and in vivo study. *RSC Adv.* 5, 81728–81738, 2015. [https:// doi.org/10.1039/C5RA12678A](https://doi.org/10.1039/C5RA12678A)

VAN, G.A., EISENKOT, R., Technology Transfer: From the Research Bench to Commercialization. *JACC Basic to Transl Sci.*2(1):85–97 2017.

VARELAS, C.G., DIXON, D.G., STEINER, C., 1995. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. *J. Control. Release* 34, 185–192.

VIANA, R. B.; DA SILVA, A. B. F.; PIMENTEL, A. S. Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. *Advances in Physical Chemistry*, v. 2012, 2012.

VISERAS, C. et al. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, v. 48, n. 3, p. 291–295, 2010.

VITORINO, C., CARVALHO, F.A., ALMEIDA, A.J., SOUSA, J.J., PAIS, A.A.C.C. Colloids and Surfaces B: biointerfaces the size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84 (1), 117–130, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.024>

VOKURKA, R.J. The relative importance of journals used in operations management research. *A citation analysis*, 14, 345–355, 1996. Vol, 106, Pag. 116-12 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.041>. Vol. 90, 11, Pag 3268-3273, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.025>

WANG, M.C., SHENG, G.D., QIU, Y.P. A novel manganese-oxide/biochar composite for efficient removal of lead (II) from aqueous solutions. **Enviroment science technology** 12, 1719–1726, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0538-7>.

WANG, Q., TAY, H.H., GUO, Z., CHEN, L., LIU, Y., CHANG, J., ZHONG, Z., LUO, J., BORGNA, A. Morphology and composition controllable synthesis of Mg–Al–CO₃ hydrotalcites by tuning the synthesis pH and the CO₂ capture capacity. **Appl. Clay Sci.** 55, 18–26, 2012.

WANG, Q., UNDRELL, J.P., GAO, Y., CAI, G., BUFFET, J.C., WILKIE, C.A., O'HARE, D. Synthesis of Flame-Retardant Polypropylene/LDH-Borate Nanocomposites. **Macromolecules**.v.46, n.15, pp 6145-6150, 2013. [dx.doi.org/10.1021/ma401133s](https://doi.org/10.1021/ma401133s)

WANG, Q.; HARE, D. O. Recent Advances in the Synthesis and Application of Layered Double Hydroxide (LDH) **Nanosheets**. 112, 7, 4124-4155, 2012.

WANG, B., ZHANG, H., EVANS D.G., DUAN, X. Surface modification of layered double hydroxides and incorporation of hydrophobic organic compounds. **Materials Chemistry and Physics**v. 92, p. 190–196, 2005.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. 27, 5, 1047-1053, 2004. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1047>

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030, **Diabetes Care**. 27 (2004) 1047–1053.

WONG, Y., COOPER, H.M., ZHANG,K., CHEN,M., BARTLET,P., XU,Z.P. Efficiency of layered double hydroxide nanoparticle-mediated delivery of siRNA is determined by nucleotide sequence. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, n. 1, p. 453–459, 2012.

WU, J.; HARWELL, J. H.; O'REAR, E. A. Two-Dimensional Reaction Solvents: Surfactant Bilayers in the Formation of Ultrathin Films. **Langmuir**, v. 3, n. 4, p. 531–537, 1987.

WU, J.; HARWELL, J. H.; O'REAR, E. A. Two-Dimensional Reaction Solvents: Surfactant Bilayers in the Formation of Ultrathin Films. **Langmuir**, v. 3, n. 4, p. 531–537, 1987.

- XIA, S., NI, Z., XU, Q., HU, B., HU, J. Layered double hydroxides as supports for intercalation and sustained release of antihypertensive drugs. **J Solid State Chem.** 181, 2610–2619, 2018.
- XU, Z.P., QING, G., LU, M. Hydrothermal Synthesis of Layered double Hydroxides (LDHs) from mixed MgO and Al₂O₃: LDH Formation Mechanism. **Chem. Mater.** 17, 1055–1062, 2005. <https://doi.org/10.1021/cm048085g>.
- XU, Z.P., STEVENSON, G., LU, C., LU, M. Dispersion and size Control of Layered double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. **J. Phys. Chem.** 110, 16923–16929, 2006. <https://doi.org/10.1021/jp062281o>.
- XU, Z.P., JIN, Y., LIU, S., HAO, Z.P., LU, G.Q. Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science** 326, 522–529, 2008.
- XU, Z.P., STEVENSON, G., LU, LU, G.Q.M., BARTLETT, P., GRAY, P. Stable suspension of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.** 128, 36, 2006. .
- YANG, J.H., HAN, Y.S., PARK, M., PARK, T., HWANG, S.J., CHOY, J.H. New inorganic-based drug delivery system of indole-3-acetic acid-layered metal hydroxide nanohybrids with controlled release rate. **Chem Mater.** 19, 2679–2685, 2007.
- YADAV, S.K., MISHRA, S., MISHRA, B. Eudragit-based nanosuspension of poorly water-soluble drug: formulation and in vitro-in vivo evaluation. **AAPS PharmSciTech.** 2012;13(4):1031–1044. doi:10.1208/s12249-012-9833-0
- YOREO, J.J. DE, VEKILOV, P.G. Principles of Crystal Nucleation and growth. **Rev. Mineral. Geochem.** 54, 57–93, 2003. <https://doi.org/10.2113/0540057>.
- YURIEV, E.; KONG, D. C. M.; ISKANDER, M. N. Investigation of structure-activity relationships in a series of glibenclamide analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 835–847, 2004.
- ZHANG, X.Q, ZENG, M.G., LI, S.P., LI, X.D. Methotrexate intercalated layered double hydroxides with different particle sizes: structural study and controlled release properties. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 117, 98–106, 2014.

ZHANG, H., ZOU, K., GUO, S., DUAN X. Nanostructural drug-inorganic clay composites: structure, thermal property and in vitro release of captopril- intercalated Mg–Al-layered double hydroxides. **J Solid State Chem.** 179, 1792–1801, 2006.

ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., ZOU, A., LI, W., YAO, C., XIE, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **AAPS J.** 2010, 12(3): 263–271, 2010.

ZHANG, H., ZOU, K., SUN, H., DUAN, X. A magnetic organic–inorganic composite: Synthesis and characterization of magnetic 5-aminosalicylic acid intercalated layered double hydroxides. **Journal of Solid State Chemistry** 178, 3485–3493, 2005.

ZHANG, P., QIAN, G., CHENG, H., YANG, J., SHI, H., FROST, R.L. Near-infrared and midinfrared investigations of Na-dodecylbenzenesulfate intercalated into hydrocalumite chloride (CaAl-LDH-Cl). **Spectrochimica Acta Part A:Molecular e Biomolecular Spectroscopy** 79, 548–553, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.031>.

ZHAO, Y., LI, F., ZHANG, R., EVANS, D.G., DUAN, X. Preparation of layered doublehydroxide nanomaterials with a uniform crystallite size using a new method involving separate nucleation and aging steps. **Chem. Mater.** 14, 4286–4291, 2002. <https://doi.org/10.1021/cm020370h>.

ZHAO, Q., CHANG,Z., LEI,X., SUN,X. Adsorption behavior of thiophene from aqueous solution on carbonate- and dodecylsulfate-intercalated ZnAl layered double hydroxides. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 17, p. 10253–10258, 2011.

ZHOU, Y., SUN, X., ZHONG, K., EVANS, D.G., LIN, Y., DUAN, X. Control of Surface Defects and Agglomeration Mechanism of Layered double Hydroxide Nanoparticles. **Ind. Eng. Chem. Res.** 51, 4215–4221, 2012. [dx.doi.org/10.1021/ie202302n](https://doi.org/10.1021/ie202302n).

ZHU, R., XU, T. Enhanced photocatalytic activity of Zn/Ti-LDH via Hybridizing with C60. **J. Mol. Catal. A Chem.** 427, 54–61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.05.011>.

APÊNDICE A- LISTA DE PUBLICAÇÕES

- ARTIGOS

ARTIGO I: Strategies to improve glibenclamide dissolution: a review using database tomography. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. (publicado).

ARTIGO II: OVERVIEW AND PERSPECTIVES FOR GLIBENCLAMIDE: AN ANALYSIS OF DRUG DELIVERY SYSTEMS DESCRIBED IN PATENTS. (SUBMETIDO).

ARTIGO III: In-line monitoring of layered double hydroxide synthesis and insights on formation mechanism and kinetics. *Applied Clay Science* (publicado)

ARTIGO IV: Solvent-free in-situ radical polymerization of the LDH-PMMA nanocomposites and thermal stability. (submetido)

ARTIGO V: One-pot synthesis of the organomodified layered double hydroxides - glibenclamide biocompatible nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (publicado)

ARTIGO VI: Nanotoxicity and effectiveness of organomodified nanoparticles of glibenclamide and Layered Double Hydroxides in a diabetic animal model.

- PATENTES

PATENTE I: "Monitoramento in-line para controle de produção de hidróxidos duplos lamelares por infravermelho próximo", instituição de registro: inpi - instituto nacional da propriedade industrial. depósito: 05/07/2019. instituição(ões) financiadora(s): coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior. (depositada)

PATENTE II: Polimerização *in situ* livre de solventes para a obtenção de nanocompósitos termoestáveis de hidróxidos duplos lamelares e polímero com aplicação farmacêutica. (em processo de depósito)

PATENTE III: Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético. (em processo de depósito)

- CAPÍTULOS DE LIVROS

CAPÍTULO I: Polimerização in situ do pmma monitorada por nir e caracterização estrutural. atena editora. (publicado)

CAPÍTULO II: Syntesis and structural characterization of sodium dodecyl sulfate (dds) modified layered double hydroxydes (HDL) as matrix for drug release. atena editora.