



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020015243-2 A2



(22) Data do Depósito: 27/07/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 08/02/2022

(54) **Título:** NANOPARTÍCULAS ORGANOFILIZADAS DE GLIBENCLAMIDA E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES COM APLICAÇÃO FARMACÊUTICA: LIBERAÇÃO IN VITRO, BIOCOMPATIBILIDADE E NANOTOXICIDADE EM MODELO ANIMAL DIABÉTICO

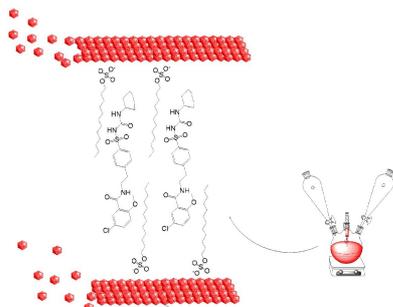
(51) **Int. Cl.:** B82B 1/00; A61K 31/64; A61K 9/14; A61P 3/10.

(52) **CPC:** B82B 1/00; A61K 31/64; A61K 9/143; A61P 3/10.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** JOSÉ LAMARTINE SOARES SOBRINHO; AMANDA DAMASCENO LEÃO; ALMIR GONÇALVES WANDERLEY; TERESINHA GONÇALVES DA SILVA; JABSON HERBER PROFIRO DE OLIVEIRA; MÔNICA FELTS DE LA ROCA SOARES; JULIANO RIBEIRO DA SILVA; KAROLAINE MARTINS DA SILVA SANTOS; KAYQUE ALMEIDA DOS SANTOS; KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS.

(57) **Resumo:** NANOPARTÍCULAS ORGANOFILIZADAS DE GLIBENCLAMIDA E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES COM APLICAÇÃO FARMACÊUTICA: LIBERAÇÃO IN VITRO, BIOCOMPATIBILIDADE E NANOTOXICIDADE EM MODELO ANIMAL DIABÉTICO. A presente patente de invenção descreve o desenvolvimento de nanopartículas (NP) contendo Hidróxidos Duplos em Lamelares (HDL) organomodificados por dodecilsulfato de sódio carregando glibenclamida (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 em única etapa (one-pote), as NP foram caracterizadas difratometricamente, espectroscopicamente, termicamente, avaliadas quanto ao perfil de co-liberação de GLIB e zinco e quanto a compatibilidade celular através de WST-1 em fibroblastos (24h). Além disso, a eficácia e nanotoxicidade foram avaliadas através de 30 dias de tratamento de ratos Wistar induzidos ao diabetes com streptozotocina. 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. Os dados difratométricos mostraram adsorubilização de GLIB ( $d = 14,03 \text{ \AA}$ ) e revestimento de NP com Eudragit L100®. A organofilização do HDL e a intercalação da GLIB reduziram a área superficial (SBET 23,58 m<sup>2</sup>/g) e observou-se mudança no potencial zeta (-35,5) em relação ao HDL primitivo (...).



**NANOPARTÍCULAS ORGANOFILIZADAS DE GLIBENCLAMIDA E  
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES COM APLICAÇÃO FARMACÊUTICA:  
LIBERAÇÃO *IN VITRO*, BIOCAMPATIBILIDADE E NANOTOXICIDADE EM  
MODELO ANIMAL DIABÉTICO**

→ **Campo da invenção**

1. A presente patente de produto descreve a obtenção e uso de nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares organofilizados com dodecil sulfato de sódio carreando o fármaco glibenclamida para o tratamento do diabetes mellitus II. As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação em meio orgânico e revestidas com Eudragit L100® para tornarem-se gastrorresistentes. As caracterizações foram realizadas através da difratometria de raio X, infravermelho médio, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, potencial zeta, tamanho hidrodinâmico, área superficial, tamanho e distribuição de poros. As nanopartículas foram avaliadas quanto ao perfil e cinética de liberação da glibenclamida através do ensaio de liberação *in vitro* nos meios simulado intestinal e estomacal, assim como avaliadas quanto à liberação do zinco da matriz das nanopartículas. A avaliação da toxicidade celular foi realizada em linhagens de fibroblastos e a avaliação da toxicidade crônica e eficácia foi realizada em ratos wistar diabéticos tratados com as nanopartículas durante 30 dias.

→ **Fundamentos da invenção**

2. Entre o vasto número de transportadoras já utilizadas, matrizes inorgânicas como Hidroxidos Duplos em Camadas (HDL) têm sido cada vez mais utilizadas devido às suas vantagens estruturais. (Kura et al., 2015; Kumar et al., 2013; Onoue et al., 2012; Ambrogi et al., 2009) Os

LDH apresentam organização estrutural semelhante à brucita, são formados por lamelas com carga positiva que têm a capacidade de ampliar a distância entre eles para acomodar moléculas como drogas, pesticidas, corantes, vitaminas e ácidos nucléicos. Além disso, a biocompatibilidade da HDL como administração de medicamentos vem sendo avaliada nos últimos anos e mostrou resultados promissores para aplicações biomédicas (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; Chakrabort et al., 2012).

3. As lamelas são constituídas por cátions e ânions dispostos em estruturas octaédricas, nas quais os cátions di- ou trivalentes ocupam o centro do octaedro e os hidroxilos nos vértices. A presença e a proporção dos cátions trivalentes em relação aos cátions divalentes ( $M2 + / M3 +$ ) influenciam a densidade da carga superficial, permitindo o empilhamento das lamelas e a adsorção de moléculas de água (Frondel et al., 1970; Hwang et al., 2018).

4. Entre as vantagens de transportar moléculas de HDL estão o aumento da estabilidade térmica, o aumento da taxa de dissolução e o controle da cinética de liberação das moléculas. (Leão et al., 2020; Capsoni et al., 2018; Rives et al., 2013; Aguzzi et al., 2007) No entanto, em formulações para administração oral, os sistemas de liberação contendo HDL precisam ser protegidos da degradação ácida no meio ambiente, à medida que os íons que formam sua estrutura se decompõem antes de atingir o local de absorção intestinal (Parello, Rojas, Giacomelli, 2010; Ambrogi et al., 2009; Li, Evans, Duan, 2004).

5. Modificações na superfície do HDL podem ser utilizadas como estratégia para facilitar sua interação com moléculas hidrofóbicas, como fármacos de baixa solubilidade e polímeros. (Gohatre et al., 2017; Wang et al., 2005; Fengzhu, 2015; Kutlu et al., 2014; Farias et al., 2010) As modificações geralmente envolvem a inserção de espécies

aniônicas com uma cauda hidrofóbica na superfície, como como dodecilsulfato de sódio, ácido láurico (Fengzhu, 2015; Lee, Choi, Kim, 2010; Ohare, 2012; Ding et al., 2008; Chen, Feng, Qu, 2004; Wang et al., 1998) e estearato. (Nogueira et al., 2011) Promover maior espaçamento entre as lamelas, o que facilita a entrada de moléculas volumosas e / ou promove a esfoliação da LDH (Chao-Fan et al, 2015; 2013; ZHAO et al., 2011; WANG et al., 2005).

6. A adsorção do surfactante modifica a superfície do HDL e favorece a adsorção de moléculas da solução pela qual eles não seriam adsorvidos na ausência do surfactante, fenômeno denominado adsolubilização (Zhang et al., 2017; Cursino et al., 2015; Wu; Harwell; O'Rear, 1987) A glibenclamida (GLIB) é uma sulfonilureia de segunda geração amplamente utilizada no tratamento do diabetes mellitus tipo II (DM II), mas sua baixa solubilidade aquosa compromete sua absorção após a administração oral (Kallepu, Nekkanti, 2015; Nioppas, Daftisions, 2002; Jonsson, et al., 2000) dessa forma, são necessárias estratégias para melhorar sua taxa de dissolução (Leão et al., 2019b; Leão et al., 2019c;) Desta forma, foram desenvolvidas nanopartículas (NP) de GLIB e HDL organofilizados como estratégia para incrementar a taxa de dissolução da GLIB e melhorar sua biodisponibilidade, estabilidade coloidal, liberação prolongada da GLIB.

7. No entanto, nanopartículas 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. (Nel et al., 2009) Desta forma, avaliar a nanotoxicidade é uma etapa essencial para o desenvolvimento de um novo Drug Delivery nanoestruturado.

8. 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  $\beta$ . (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  $\beta$  com leve comprometimento da secreção de insulina, semelhante ao diabetes tipo II (Srinivasan, 2005; Reed et al, 2000).

9. Neste trabalho, o dodecilsulfato de sódio (SDS) foi utilizado para organizar o HDL e auxiliar na adsolubilização do GLIB, permitindo liberação controlada e melhoria da sua taxa de dissolução. Nanopartículas (NP) foram obtidas em uma única reação de coprecipitação e em uma panela, tornando o método mais simples e barato. Além disso, os NP foram revestidos com Eudragit L100® (ED) para gastroproteção, caracterizada difrattometricamente, espectroscopicamente e termicamente, avaliada quanto ao perfil de co-liberação de GLIB e zinco e compatibilidade celular através de WST-1 em células BALB 3T3 (24 h).

10. Desta forma, a avaliação da eficácia e nanotoxicidade das NP de glibenclamida e Hidróxidos duplos lamelares foi realizada através do tratamento (30 dias) de ratos Wistar induzidos à 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.

#### → Breve descrição das figuras

11. A Figura 1 representa a síntese para obtenção das nanopartículas em uma única etapa.

12. A Figura 2 contém a difratometria de raio x das nanopartículas de GLIB, S1 (ZnAl), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).

13. A Figura 16 contém as distâncias interplanares dos HDL.

14. A Figura 17 contém a descrição dos eventos termogravimétricos das nanopartículas e eudragit L 100. Nota: T0.05 é a temperatura na qual ocorre uma perda de 5% da massa inicial (temperatura inicial). T0.1 é a temperatura na qual ocorre a perda de 10% da massa inicial e T0.15 é a temperatura na qual ocorre a perda de 15% da massa inicial. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).

15. A Figura 3 contém os dados térmicos para S1-S6, GLIB, SDS e Eudragit sob atmosfera de N<sub>2</sub>. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).

16. A Figura 4 contém a representação da organização da HDL, S1, S3, S4, S5 e S6. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido).

17. A Figura 18 contempla informações sobre o PDI e tamanho hidrodinâmico de NP. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB).

18. A Figura 5 contém a caracterização da superfície de NP em (a) isotermas de adsorção-dessorção de N<sub>2</sub> para NP pelo B.E.T. e (b) Distribuição da área de poros para NP por B.J.H. S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB).

19. A Figura 6 contém os espectros de infravermelho para S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido), GLIB (gliburida) e ED (Eudragit L100).

20. A Figura 19 contém a 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).

21. A Figura 7 contém a liberação de GLIB de S3 (ZnAl-SDS-GLIB) e S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido) no meio intestinal simulado (pH 7,4).

22. A Figura 20 contém os modelos e equações cinéticos aplicados à liberação de GLIB do NP.

23. A Figura 8 demonstra a viabilidade celular de NP em fibroblastos BALB / 3T3 (CCL-163, ATCC). S1 (ZnAl), S2 (ZnAl-SDS), S3 (ZnAl-SDS-GLIB), S4 (ZnAl revestido), S5 (ZnAl-SDS revestido), S6 (ZnAl-SDS-GLIB revestido), GLIB (gliburide) e C + corresponde ao controle positivo.

24. A Figura 9 demonstra os 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.

25. A Figura 10 demonstra a glicemia após administração diária de NP HDL+GLIB (5mg/Kg/v.o.), glibenclamida (5mg/Kg/v.o.), HDL ou veículo. Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. (n = 6/grupo). \*Estatisticamente diferente das nanopartículas vazias.

26. A Figura 11 demonstra o 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/grupo). \*Estatisticamente diferente do controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

27. A Figura 12 demonstra o 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/grupo). \*Estatisticamente diferente do Controle normoglicêmico (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

28. A Figura 21 mostra o 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. Análise de Variância ANOVA seguido do pós- teste Tukey, comparando os grupos tratados entre si, e comparando os grupos com o grupo controle, sendo considerando uma diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

29. A Figura 22 mostra o 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. Análise de Variância ANOVA seguido do pós- teste Tukey, comparando os grupos tratados entre si, e comparando os grupos com o grupo controle, sendo considerando uma diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

30. A Figura 23 mostra o 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.

31. A Figura 13 mostra os 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). As setas indicam alterações nas ilhotas pancreáticas.

32. A Figura 14 mostra os 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).

33. A Figura 15 mostra os 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). As setas indicam leve aumento do espaço da cápsula de Bowman.

→ **Descrição da invenção**

34. Esta patente de produto descreve a obtenção de nanopartículas gastrorresistentes constituídas por hidróxidos duplos lamelares modificados com dodecil sulfato de sódio carreando glibenclamida obtidas pelo método de co-precipitação e revestidas com Eudragit L100®. Além disso, a patente também contempla todas as caracterizações físico-químicas das nanopartículas que comprovam a sua formação, como difratometria de raio x, infravermelho médio, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial, tamanho hidrodinâmico, potencial zeta, área superficial, tamanho de poro, drug loading, além da liberação in vitro de zinco e glibenclamida em meios simulado intestinal e estomacal, avaliação da biocompatibilidade celular em linhagens de fibroblastos e a avaliação da nanotoxicidade e eficácia in vivo através da indução do diabetes mellitus em ratos wistar com estreptozotocina, sendo avaliados os aspectos clínicos (glicemia, consumo de água, ração, massa corporal) e os aspectos bioquímicos, hematológicos e histológicos dos animais.

→ **Exemplos de concretizações da invenção**

• **Reagentes**

35. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico:  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnCl_2$ , KOH e dodecilsulfato de sódio foram obtidos da Sigma-Aldrich, Eudragit L100® (ED) da Evonik, NaOH da Scharlau, HCl 35% da LabKem, metanol e etanol P.A. (Padrão Analítico) da Merck® e

glibenclamida foi obtida da Fragon®. A água desionizada foi obtida por processo de osmose reversa com um sistema MilliQ (Millipore®).

- Síntese HDL e HDL modificado

36. A síntese de LDH e LDH modificada foi realizada com base no método de co-precipitação a pH constante desenvolvido por Miyata (1975), com alterações no método de modificação de LDH e imobilização de GLIB (Leão et al., 2019b).

37. A síntese foi realizada em solução de metanol (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. O sistema utilizado consistia em um balão de três tubulações acoplado a funis de adição e um eletrodo de pH (eletrodo de solução orgânica). O balão continha SDS ( $5,18 \times 10^{-3}$  mol) solubilizado em metanol, em um dos funis foi adicionado KOH (0,2 mol) e no outro a solução salina contendo ZnCl<sub>2</sub> anidro ( $6,03 \times 10^{-3}$  mol) e AlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O ( $3,01 \times 10^{-3}$  mol). As soluções foram adicionadas gota a gota ao balão até que se atingisse pH  $7,5 \pm 0,5$  para a síntese de Zn<sub>2</sub>Al-Cl-SDS (chamada S2). As taxas de fluxo de todos os reagentes foram de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> e o volume dos reagentes foi de 100 mL. Para a síntese de Zn<sub>2</sub>Al-Cl (chamado S1), a solução metanólica não continha SDS.

38. Para a síntese de Zn<sub>2</sub>Al-Cl-SDS-GLIB (chamado S3), as soluções utilizadas foram solubilizadas em SDS ( $9,27 \times 10^{-4}$ mol) em metanol (50 mL), KOH (0,2 mol), ZnCl<sub>2</sub> anidro ( $1,85 \times 10^{-3}$ mol) , AlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O ( $9,27 \times 10^{-4}$ mol) e GLIB ( $9,27 \times 10^{-4}$ mol). Após a síntese, o sistema foi agitado por 12 h, centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos com água (3 vezes), solução salina tamponada com fosfato (PBS 3 vezes) e metanol (6 vezes), seco em estufa a 50 ° C e caracterizado. Lavagens com água foram realizadas para remover o excesso de cloreto, o PBS remove o excesso de SDS e as lavagens com metanol para remover o excesso de droga que não interagiu com as lamelas.

- HDL modificado revestido

39. O revestimento de superfície de HDL com ED foi realizado para protegê-los da condição ácida. Para o revestimento, 500 mg de LDH modificado foram agitados a 500 rpm em 10 mL de solução etanólica ED a 70 ° C por 2 h. Em seguida, a suspensão foi vertida em água e agitada a 500 rpm, o produto resultante foi filtrado e seco a 70 ° C. Após o revestimento dos sistemas S1, S2 e S3, foram denominados S4, S5 e S6. (Duan et al. 2004; Del Arco, 2010) A Figura 1 mostra o diagrama das sínteses e em uma panela com a etapa de revestimento.

- Difração de raio X

40. 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 os 40 Kv e 30 mA. Foi utilizada uma lâmpada de cobre com monocromador de grafite ( $K\alpha_1 = 1,54$ ), os difratogramas foram obtidos em  $(2\theta)$  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 da orientação preferencial. Eles foram depositados em base de cristal orientada (placa de silício) para evitar ruídos de fundo, para realizar a análise matemática foi utilizado o software "HighScore Plus: Versão 3.0d". As distâncias ( $d_{hkl}$ ) para o avião (003) foram obtidas através da equação de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin(\theta) \text{ (equação 1),}$$

onde ( $\lambda$ ) corresponde ao comprimento de onda e ( $d$ ) corresponde ao espaçamento interlamelar. A área de superfície (SBET) e as isotermas do sistema foram determinadas a partir dos dados de adsorção-desorção de 77K N2 e calculados usando o método BET (Brunauer-Emmett-Teller) na faixa de pressão relativa ( $P / P_0$ ) 0 - 1. Volume, diâmetro médio dos poros e distribuição foram estimadas usando o BJH

(Barret-Joyner-Halenda), obtido em um analisador de área de superfície e tamanho de poro do modelo Micrometrics ASAP 2420 (Sistema de Área de Superfície Acelerada e Porosimetria) do CETENE (Northeast Technology Center).

41. A análise do potencial zeta e do tamanho hidrodinâmico foi realizada no instrumento Zetasizer Nano ZSP Malvern®. O diâmetro aparente hidrodinâmico (d) e o potencial zeta ( $\zeta$ ) do LDH foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

42. A espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier foi realizada por refletância total atenuada / espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (ATR / FT-IR) usando um acessório Gladi-ATR com cristal de diamante (Pike, madison, WI, EUA) com uma leitura na faixa de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . A análise termogravimétrica e a calorimetria diferencial de varredura foram realizadas em atmosfera de nitrogênio, com vazão de 50ml / min, taxa de aquecimento de 10°C / min e faixa de temperatura de 25 a 700°C.

- Eficiente de encapsulamento (EE) e carga de drogas (DL)

43. O carregamento de drogas foi calculado usando a Eq. (2) e a Eq eficiente de encapsulamento (3) do GLIB foram determinadas por espectrofotometria UV-vis a  $\lambda_{\text{max}} = 300\text{nm}$ , a concentração foi calculada por análise de regressão de acordo com a curva padrão obtida de uma série de solução padrão de GLIB (Huang et al., 2018).

$$\text{Capacidade de carreamento da GLIB (\%)} = \frac{\text{total encapsulated GLIB amount}}{\text{total amount of NP}} \times 100$$

(equação 2)

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{\text{total GLIB amount} - \text{free drug amount}}{\text{total GLIB amount}} \times 100$$

(equação 3)

- Viabilidade celular (WST-1)

44. De acordo com a International Standard Organization (ISO 10993), o ensaio de citotoxicidade in vitro é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. A citocompatibilidade in vitro da LDH modificada e revestida foi avaliada usando fibroblastos BALB / 3T3 (CCL-163, ATCC). A linhagem celular foi cultivada em meio DMEM (89%) suplementado com SFB (10%) e antibióticos (penicilina 10.000 UI / mL, estreptomicina 10.000 µg / 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 24 h (37 ° C, 95% de UR, 5% de CO<sub>2</sub>) para obter confluência. Após 24h, os sistemas foram colocados em contato com as células e incubados por 24h (37 ° C, 95% RH, 5% CO<sub>2</sub>). O controle positivo utilizado foi de células sem sistemas. A experiência foi realizada em triplicado.

45. Para realizar o ensaio, as amostras foram autoclavadas 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 das amostras no meio suplementado com DMEM e PBS, o protocolo WST-1 foi realizado com as amostras TransferWell (poços com perfuração que permitem o contato contínuo das amostras em suspensão com as células), a concentração final das amostras foi de 100 µg / mL.

46. Após 24 h de incubação, a transferência do poço foi removida dos poços. Cada poço foi lavado com 500 mL de DMEM (sem suplementos). A placa foi agitada brevemente e incubada por 2 h (37 ° C, 95% RH, 5% CO<sub>2</sub>), depois a placa foi lida com absorvância medida a 450 nm (Leitor de Microplacas UV Bio-Rad Modelo 680, EUA). A viabilidade celular foi calculada como:

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Abs_{exp}}{Abs_{negative\ control}} * 100 \text{ (equação 4).}$$

- Estudos de *co-release in vitro* para GLIB e Zn<sup>2+</sup>

47. Para estudos de liberação *in vitro* do GLIB, pesou-se uma quantidade de S3 e S6 equivalente a 5 mg de GLIB. O teste foi realizado em dissolutor, em triplicado, em pia e os parâmetros utilizados foram os prescritos pela farmacopeia: temperatura de  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , aparelho de dissolução II, agitação de 75 rpm, 300 mL de meio (tampão fosfato pH 7,4 a simular o pH intestinal) e ácido clorídrico a pH 1,2 para simular o meio ácido, sem adição de surfactantes. Alíquotas de 1 mL foram tomadas para o meio ácido e o meio básico e as amostras foram filtradas na unidade de filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . A determinação da osmolaridade do meio foi realizada no osmômetro do microprocessador PZL-1000, usando os padrões 100, 1000 e 2000 mOsm / kg.

48. A leitura foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna C-8 ( $4,6 \times 250 \text{ mm}^2$ ,  $5 \mu\text{m}$ , Discovery). Foi utilizada a solução de metanol-ácido fosfórico a 0,05% (80:20, v / v) como fase móvel e a taxa de fluxo foi de 1 ml / min. O comprimento de onda do detector de UV era 254 nm. (Guan et al., 2014). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP. (n = 3) com  $r^2 = 0,999$ .

49. Para estudos de liberação *in vitro* das amostras de Zn, S3 e S6 foram preparadas e submetidas às mesmas condições do ensaio de dissolução para imitar também as condições fisiológicas no trato gastrointestinal e determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (AAS). As alíquotas foram analisadas em triplicado e as concentrações foram obtidas por comparação com a curva padrão. Os cálculos cinéticos foram realizados usando o software Microsoft Excel® 2007 e o suplemento DDSolver® (Zhang et al., 2010).

- Animais

50. 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 (CEEA) da UFPE.

- Indução do diabetes *mellitus*

51. O DM foi induzido em ratos Wistar pela administração de injeção única de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg) dissolvida em tampão citrato 0,1M (pH 4,5) pela via intravenosa. Os animais foram submetidos ao jejum de 12 h com livre acesso à água e divididos em cinco grupos (n=6). A glicemia de todos os animais foi aferida antes da administração de STZ, utilizando um glicosímetro On Call Plus® (Acon Biotech Co., Ltda). 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.

- Tratamento

52. 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 HDL-GLIB);
- Grupo IV: Diabético tratado por via oral com nanopartículas revestidas de hidróxidos duplos lamelares (HDL);
- Grupo V: Diabético tratado por via oral com GLIB.

53. Para o teste de tolerância à glicose, a GLIB e as NP foram suspensas em água na dose equivalente a  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  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. (Owolabi e Omogbai, 2013) As administrações foram realizadas após um período de 12 h de jejum.

54. 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*

55. Os animais dos grupos II-IV receberam tratamento diário (30 dias) com suas respectivas formulações na dose equivalente a 5 mg.kg<sup>-1</sup> 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 (MALONE, 1977).

56. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 12 h 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

57. Os parâmetros hematológicos foram determinados no analisador hematológico automático (Micro-60, 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

58. 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  $-20^\circ C$  até serem determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina e Gama glutamil transferase (GGT). As dosagens foram feitas usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim® (COSTA-SILVA et al., 2008).

- Análise histológica

59. A necropsia 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).

60. 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  $\mu m$ . As lâminas histológicas foram coloridas com

hematoxilina-eosina (HE) e a análise histológica dos órgãos foi feita utilizando um sistema de captura de imagens Nikon/Motic®/ImageJ.

- Análise estatística

61. 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% ( $p < 0.05$ ).

→ **Resultados e discussão**

62. Os padrões de difração de raios-X (Figuras 2 e 16) mostram a alteração no espaçamento interlamelar para S1 em relação aos outros LDH.

63. S4 não mostrou alteração no espaçamento interlamelar, demonstrando que o revestimento com ED foi realizado. O aumento do espaço interlamelar em S3 mostra intercalação com SDS e GLIB ( $d = 14,03\text{Å}$ ). Em estudos anteriores, a HDL NP pristina contendo GLIB não mostrou capacidade intercalante de GLIB, que é um medicamento hidrofóbico e volumoso, apenas adsorção em lamelas de HDL (Leão et al., 2019b), no entanto, observa-se aqui que a organofilização da HDL (S6) permitiu intercalação de GLIB por adsolubilização com SDS.

64. S6 apresentou distância interplanar semelhante a S3 ( $d = 13,6\text{Å}$ ), indicando também que DE permaneceu na superfície cobrindo o PN. No entanto, S5 mostrou  $d = 26,42\text{Å}$  indicando a entrada de cadeias ED nos domínios intercalares e formando um nanocompósito intercalado (Ding et al., 2008). Ao analisar os perfis difratométricos de S3, S5 e S6, observa-se que a presença de GLIB intercalada em S3 impediu a entrada

de Eudragit L100®, diferentemente de S2, em que a presença de SDS e a ausência de GLIB facilita a entrada de cadeias Eudragit L100®.

65. Na análise térmica do NP (Figura 3), observa-se que o primeiro evento de calor do TG ocorre da temperatura ambiente até aproximadamente 120 ° C, correspondendo à remoção da água adsorvida e da água de hidratação. Após o processo de desidratação, os eventos térmicos que ocorrem correspondem à perda de hidroxilos lamelares, que normalmente ocorrem em dois estágios, conforme relatado por Kameda et. al. (2010). É possível observar os picos de DSC a 200 ° C e 370 ° C.

66. As perdas de massa finais entre 500 ° C e 600 ° C para todos os LDH correspondem ao último estágio de degradação do cloreto intercalado e dos hidroxilos das lamelas, levando ao colapso total da estrutura lamelar e à formação de óxidos mistos, como o espinélio (MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) e / ou óxido de magnésio (MgO) (Constantino, 1995). Para o LDH sintetizado com GLIB (S3, S6), as perdas de massa entre 500 ° C e 600 ° C também são adicionadas à decomposição do GLIB. Na Figura 17 estão as perdas de massa de acordo com o tempo de todos os sistemas.

67. Ainda para GLIB, observa-se pelo DSC a fusão a 172-173 ° C (Rodríguez et al., 2004; British, 1980). É possível observar que após a fusão da droga, a linha de base não volta ao platô inicial, mas eventos exotérmicos com perda de massa ocorrem posteriormente, evidenciando sua decomposição Tonset de 190 ° C e eventos exotérmicos com picos no dTG a 350 ° C e 600 ° C.

68. Os sistemas submetidos ao revestimento S4 e S6 apresentaram um atraso no Tonset 0,05 em comparação com os sistemas não revestidos S1 e S3, respectivamente, porque o revestimento com Eudragit®L100 atrasa a perda de água adsorvida na superfície do LDH.

69. Para S5, esperava-se ter estabilidade térmica em comparação com outros HDL, pois é um nanocompósito intercalado. Entretanto, os

dados de TGA / DTG mostram decomposição precoce do S5 (Tonset 0,05% 97°C) em relação ao outro HDL, indicando a presença de domínios esfoliados no S5, que expõem o SDS e DE, que são compostos orgânicos. Além disso, os dados do DSC mostram que a transição vítrea ED (Tg) não foi melhorada em S5; se as cadeias poliméricas fossem intercaladas, as lamelas HDL dificultariam seu movimento e o aumento da Tg seria observado.

70. Esses dados são corroborados pela comparação entre S2 e S5, pois ambos possuem SDS, mas S2 apresenta menores valores de perda de massa para amígdala 5%, Tonset 10% e Tonset15% que S5, porque o SDS é intercalado no LDH, apresentando maior estabilidade térmica. que S5 devido à proteção dos domínios entre camadas. Além disso, os valores de perda de massa de S2 estão muito próximos dos valores de S1 corroborando para a intercalação. Todos os dados da análise térmica corroboram a data apresentada no DRX para a adsolubilização do GLIB em S3 e S6, a intercalação SDS em S2 e a obtenção de um composto esfoliado / intercalado em S5 (Figura 4).

71. A decomposição térmica de ED sozinha (Figura 3) em atmosfera inerte corresponde à sua despolimerização para a formação de MMA. Como mostra a derivada (dTGA), o processo ocorre em três etapas, que correspondem à despolimerização iniciada pelos segmentos cabeça-cabeça, à despolimerização iniciada nas extremidades insaturadas e à despolimerização aleatória, com perda de massa de 15% no primeiro passo. O Eudragit® L100 é o menor percentual de perda de massa devido à sua natureza orgânica (1,91%) e o Zn2Al-Cl apresenta o maior percentual de resíduos (73%). Para os outros sistemas, a quantidade de resíduos diminui à medida que a quantidade de compostos orgânicos aumenta, como S1 (73%) e S4 (41%), S2 (68%) e S5 (23%), S3 (30%) e S6 (21%).

72. Para avaliar a nanopartícula (NP), alguns aspectos são importantes, o tamanho é importante para a avaliação da citotoxicidade, perfil de liberação de drogas e estabilidade coloidal do sistema (Zhang, Zheng, Li, 2014; Whang et al., 2012; Chi, Oh, Choy 2008). Controlados por fatores envolvidos na síntese de HDL, como temperatura, tipo de base e ânion interlamelar, pois esses fatores afetam a supersaturação, precipitação, nucleação e 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 ) Os dados para  $\zeta$  e o tamanho hidrodinâmico do LDH NP estão na Figura 18.

73. O ânion entre os domínios intercamadas é um fator importante para o empilhamento das camadas e tamanho das partículas de LDH, S1 é maior que o outro S2 devido à influência do SDS, que induz a redução do tamanho do NP HDL, orientando o crescimento de cristais durante a etapa de síntese (Figura 18). (Rojas, Giacomelli, 2015; Li et al., 2011; Constantino et al., 1998) Além disso, o SDS contribui para a estabilidade do S2 ao gerar repulsão eletrostática e estérica entre NP (Rojas, Giacomelli, 2015; Li et al, 2011).

74. Os dados de potencial zeta mostram a estabilidade de NP S3 e S6 e a ausência de agregação de acordo com o padrão da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) para estabilidade de suspensões coloidais com potencial zeta positivo ou negativo entre 30 e 40 mV indicativo de uma substância com estabilidade moderada, enquanto valores absolutos acima de 40mV estão associados a alta estabilidade. (Krishnamoorthy et al., 2013) Essa estabilidade é confirmada pelo tamanho hidrodinâmico do NP entre 250 e 700nm, menor do que o relatado para o HDL agrupado (10 $\mu$ m) (Rojas, Giacominielli, 2015; Dong et al., 2015; Dong et al., 2014; Ambrogi et al., 2008; Oh et al., 2002; Xu et al., 2006).

75. O SDS muda S2  $\zeta$  para negativo, indicando que, além de aumentar o espaço interlamelar do LDH-NP, o SDS excede a capacidade de intercalação do HDL e também interage eletrostaticamente com sua superfície, modulando a carga e a hidrofobicidade das matrizes do LDH. (Rojas et al., 2014; Chen et al., 2013, Rojas et al., 2011; Xu et al., 2008; Rojas et al., 2004).

76. A medida de  $\zeta$  para S3 ( $\zeta = -35,5$ ) em comparação com S2 ( $\zeta = -13,9$ ) indica a presença de GLIB também associada à superfície do LDH, resultando em uma soma de cargas negativas na superfície do NP. Assim, a funcionalização do HDL parece uma abordagem apropriada para produzir NP com maior estabilidade coloidal e funcionalidade aprimorada. (Rojas, Giacomelli, 2015; Li et al, 2011).

77. A leitura da amostra mostrou carga de droga de 400  $\mu\text{g.mg}$  ( $40\% \pm 5\%$ ) e EE% de  $87,3\% \pm 5\%$ . Isotermas (Figura 5a) obtidas pelo B.E.T. foram tipo IV e histerese H3, de acordo com a classificação IUPAC, característica de estruturas mesoporosas (tamanho do poro 20-500Å), os dados de distribuição do tamanho do poro (Figura 5b) corroboram com os dados isotérmicos. Além disso, observamos uma redução na área de superfície (SBET) e volume de poros de todos os NP em relação ao S1, comprovando a interação das lamelas com SDS em S2 e SDS e GLIB em S3 e organização estrutural apresentada no DRX.

78. Nos espectros de infravermelho (Figura 6) de S1, a presença da banda é observada entre 3.000 e 3.600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo ao hidroxil das lamelas e água de hidratação. A 700-800  $\text{cm}^{-1}$  aparecem bandas típicas de HDL-Cl, referentes a ligações de cloretos, conforme relatado por Kloprogge (2005). A banda de absorção próxima à região de 1.630  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à deformação angular das moléculas de água. (KIM et al., 2014).

79. As bandas que se referem ao perfil de ânion SDS no HDL são caracterizadas (S2, S3, S6) em 2,924 e 2,852  $\text{cm}^{-1}$ , trechos

antissimétricos e simétricos -CH<sub>2</sub>-, trecho antissimétrico de -CH<sub>3</sub> em 2,955 cm<sup>-1</sup> e 2,849cm simétricos- 1 são observados. A 1,077 cm<sup>-1</sup> à vibração de flexão fora do plano do SO<sub>2</sub>. Essas bandas relacionadas ao SDS provam que o LDH sintetizado foi modificado. (Viana, Silva, Pimentel, 2012; Lee, Choi, Kim, 2010).

80. Para S3 a presença de uma banda entre 3.000 cm<sup>-1</sup> e 3.600 cm<sup>-1</sup> correspondente aos hidroxilos das lamelas de HDL e à água de hidratação, esta banda cobre parcialmente as bandas correspondentes aos trechos -NH de uréia e -NH da amida do GLIB em 3.366 cm<sup>-1</sup> e 3.318 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Nos deslocamentos de 1.619 cm<sup>-1</sup> e 1.714 cm<sup>-1</sup> correspondentes aos grupos C = O da uréia e amida do GLIB a 1.529 cm<sup>-1</sup>, a banda correspondente à flexão da uréia, conforme relatado por Mudgal & Pacholi (2012). O grupo éter mostra fortes bandas de absorção em 1.240cm<sup>-1</sup> e 1.015cm<sup>-1</sup>, correspondentes aos valores encontrados na literatura para a droga. (Abdel, Wahab, 1966) Em 2.924 e 2.852cm<sup>-1</sup>, os trechos antissimétricos e simétricos -CH<sub>2</sub>-, trecho antissimétrico de -CH<sub>3</sub> a 2.955cm<sup>-1</sup> e 2.849cm<sup>-1</sup> simétrico com intensidade crescente, pois são derivados do SDS e NH- da GLIB. (Sperline, Song, Freiser, 1997).

81. A Figura 6 mostra as principais bandas de ED, esticando o carbonil a 1,723 cm<sup>-1</sup> e o grupo C-O a 1,143 cm<sup>-1</sup>. A presença de -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub> é demonstrada por dobras a 1,439 cm<sup>-1</sup> e 1,483 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, e alongamento a 2949 cm<sup>-1</sup>. (Li et al., 2004) Para sistemas revestidos, observa-se a presença do trecho carbonil do grupo éster ED em 1,715 cm<sup>-1</sup> para S4, 1,701 cm<sup>-1</sup> para S5 e 1,716 cm<sup>-1</sup> para S6 revestido. Além disso, são observados os sinais de 1,161 cm<sup>-1</sup> do vC-O do éster no S4 revestido.

82. Para o teste de dissolução in vitro, observa-se que em meio ácido (pH 1,2 / 146mOsmol.Kg<sup>-1</sup>) ocorre intemperismo HDL. Os cátions H<sup>+</sup> presentes no ambiente protonam os hidroxilos do HDL, gerando polarização e enfraquecimento das ligações metálicas. Essas ligações

são enfraquecidas até se romperem, desencadeando a ruptura das camadas de HDL com a dissolução de suas unidades octaédricas e a liberação de cátions e ânions presentes em sua estrutura e GLIB intercalado. (Songkhum et al., 2018; Imran et al., 2016; Furrer, Stumm, 1986) (Songkhum et al., 2018; Imran et al., 2016; Furrer, Stumm, 1986).

83. Assim, era esperado que a quantidade de GLIB liberada a partir de NP S3 fosse próxima de 100% em meio ácido. No entanto, a solubilidade do GLIB é dependente do pH e o trato gastrointestinal afeta sua dissolução; no meio gástrico simulado, sua solubilidade é prejudicada por ser um ácido fraco (constante de dissociação  $5,3 \pm 0,1$ ), portanto o GLIB é liberado do S3, mas pouco solubilizado. A fração solubilizada de GLIB está abaixo da capacidade de detecção por HPLC, impossibilitando sua quantificação.

84. Assim, para avaliar a eficácia do revestimento ED, os dados de liberação atômica de zinco por absorção atômica da chama (Figura 19) foram usados para provar a progressão do intemperismo S3 e da gastroproteção 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).

85. Os dados da Figura 19 mostram que o revestimento com ED influencia a quantidade de íons de zinco liberados pelo NP-LDH. Isso ocorre porque polímeros acrílicos, como ED, possuem aglomerados de ácido carboxílico que permanecem intactos em meios ácidos, permitindo assim a gastroproteção de S6 liberando uma quantidade muito menor de 120min após 120min. zinco (2,96 ppm) em comparação com a quantidade liberada por S3 (20,23 ppm). (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).

86. No ambiente intestinal, o HDL é estável porque a estrutura lamelar é mantida em um pH acima de 7 e pode atuar modulando a

liberação do medicamento. Na Figura 7, os perfis de liberação de S3 e S6 podem ser observados.

87. Observa-se que o GLIB inicia sua liberação nos primeiros minutos (Figura 7), essa fase inicial pode ser atribuída às moléculas adsorvidas fora da estrutura lamelar que estão interagindo fracamente com as cadeias hidrofóbicas da SDS e com as camadas positivas da lamela, como observado em dados zeta potenciais. (Ha, Xantos, 2011; Rojas et al., 2011; Xu et al., 2008; Rojas et al., 2004).

88. Posteriormente, há uma liberação lenta e sustentada de GLIB que ocorre através da troca entre os ânions OH<sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> presentes no meio intestinal simulado e GL3 intercalado S3 e S6 através do mecanismo de troca iônica. Os íons fosfato são capazes de trocar drogas intercaladas com HDL por causa de sua alta afinidade pelas lamelas, esse processo ocorre lentamente, durante o qual durante a primeira hora o S3 libera 33% do GLIB, após 8h libera 64,5% e alcança a liberação. 88,16% após 24 horas. Para S6, 40% do GLIB é liberado 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).

89. A liberação sequencial e gradual do GLIB é favorável ao tratamento do DM II, pois o estágio de liberação rápida permite a administração do medicamento em um curto período de tempo, 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).

90. A porcentagem de GLIB liberado não atinge 100% em nenhum dos sistemas devido às características de troca iônica, onde os ânions das lamelas internas não podem ser completamente trocados por 24 horas. (Nejati, Rezvani, 2012; Xia et al., 2008, Rives, 2001, Fogg, Dunn, O'Hare, 1998) No entanto, em trabalhos anteriores em grupo, GLIB foi

associado a LDH primitiva, apresentando 100% de liberação, este percentual foi alcançada porque o GLIB não estava nos domínios intercamadas, mas adsorvido à superfície do LDH. (Leão et al., 2009b).

91. Observe também uma diferenciação nas porcentagens de GLIB liberadas entre NP revestido e não revestido com ED. Em  $\text{pH} > 6$  ocorre a solubilização do ED, portanto no meio intestinal simulado ( $\text{pH} 7,4 / 103\text{mOsmol.Kg}^{-1}$ ) o revestimento S6 é perdido e o GLIB intercalado pode ser trocado ionicamente pelos íons fosfato no meio. No entanto, a solubilização de ED é acompanhada pela dissociação de  $\text{COOH}$  em  $\text{COO}^-$ , a presença dessa carga pode favorecer a interação entre moléculas de ED e lamelas positivas para HDL. A presença de ED ionizado pode formar um microambiente negativo em torno de NP e inibir a saída de difusão de GLIB, resultando em uma pequena diferença entre as porcentagens de liberação de S6 (54% às 8h / 73% às 24h) e S3 (64,5% nas 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).

92. A cinética de liberação foi avaliada utilizando as equações de Higuchi, Bhaskar, primeira ordem, ordem zero, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e os coeficientes de correlação apresentados na Figura 20.

93. A cinética de liberação GLIB pode ser explicada globalmente através de modelos de difusão-dissolução. Bons valores para o modelo de Higuchi mostram que ele se ajusta bem aos dados de liberação, demonstrando a importância do processo de difusão da matriz no controle da taxa de liberação de 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 intercamada, tornando o processo lento. (Rojas et al., 2014; Rojas et al., 2012; Berber et al., 2010; Atwood et al., 1996).

94. Buscando um modelo mais próximo das matrizes de argila, o modelo de Bhaskar foi desenvolvido para descrever a difusão de drogas a partir de matrizes inorgânicas insolúveis e, portanto, mais adequadas 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 rígido controle matricial. (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 de 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 do GLIB é mais importante.

95. No modelo de ordem zero, a matriz não desagrega e libera lentamente o medicamento, descreve a liberação de medicamentos com baixa solubilidade e  $K_0$  constante, sendo considerado o método ideal para obter ação farmacológica prolongada. (Costa, Lobo, 2001; Varelas, Dixon, Steiner, 1995) À medida que ocorre a troca iônica, os ânions GLIB se difundem através das camadas de HDL (intrapartícula) e solução ao redor de NP-LDH no meio. No entanto, a baixa solubilidade do GLIB atua como um passo limitante para sua difusão, tornando o modelo de ordem zero o mais adequado para explicar sua cinética de liberação.

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

97. Assim, os dados experimentais foram ajustados adequadamente para o modelo de ordem zero, mostrando a maior influência da solubilidade do GLIB em comparação com o controle de matriz e difusão, sugerindo que para os medicamentos de baixa solubilidade (SCB II e IV), a taxa de dissolução do fármaco tem maior

influência na cinética de liberação do que a taxa de troca iônica do HDL. (Rojas et al., 2014; Rojas et al., 2012; Periolo et al., 2011; Ambrogi et al., 2002) Os NP foram considerados não tóxicos para macrófagos na concentração de 100µg/mL, demonstrando biocompatibilidade de todos os HDL. (Figura 8).

→ **Taxa de sucesso da indução**

98. 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**

99. A resposta glicêmica das nanopartículas foi examinada por administração oral em ratos diabéticos em jejum de 12h (Figura 9). 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). A avaliação da liberação *in vitro* das NP HDL+GLIB realizada anteriormente (Leão et al., 2020) mostrou liberação prolongada com cinética de zero ordem e liberação da GLIB de cerca de 50% após 12h e de 80% após 24h. Desta forma, durante as primeiras 12h de administração 50% da GLIB ainda precisa ser liberada para atingir a concentração terapêutica, não sendo possível observar redução significativa da glicemia neste período de tempo. 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 10.

100. Na Figura 10 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.

101. Além disso, 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 do tratamento 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 comparado ao grupo tratado com a GLIB. Estes resultados comprovam a capacidade das NP HDL+GLIB de melhorarem a taxa de dissolução da glibenclamida permitindo que maiores percentuais se tornem 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 a possibilidade de ocorrência de subdose ao longo do tratamento, demonstrando a eficácia das NP HDL+GLIB e seu potencial como novo sistema de liberação modificada para o tratamento do DM II.

102. 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 11 observa-se que os animais

diabéticos apresentam perda contínua de massa corporal ao longo do período de tratamento até atingirem 10% de perda final.

103. 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 normoglicêmico. 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  $\beta$  e, conseqüentemente, também aumentam a captação celular de glicose. (Tabesh et al., 2019; Sola et al., 2015).

104. Na Figura 12 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.

105. 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 da glicemia.

106. 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 12 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).

107. 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, ração e a perda da massa corporal 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 os 30 dias de tratamento e apresentaram respostas mais efetivas do que o grupo tratado com a GLIB.

→ **Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos**

108. A análise do perfil hematológico (Figura 21) 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.

109. A Figura 22 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).

110. 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 (Figura 23). No entanto, ao analisar os dados observa-se que

estes parâmetros não apresentaram alteração com significância que aponte 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**

111. As massas absoluta e relativa dos tecidos de todos os grupos são apresentadas na Figura 23. 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).

112. Os resultados são concordantes com os obtidos para o acompanhamento da massa corporal, 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  $\beta$  e, conseqüentemente, a captação celular de glicose (SOLA et al., 2015).

113. 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 13-15. Observa-se na Figura 13(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.

114. A análise histológica do fígado grupo DNT (Figura 14B) apresenta leve infiltrado inflamatório e os grupos GLIB, HDL e HDL+GLIB (Figura 14A, 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-hidroxiciclo-hexil gliburida(M1), 3-cis-hidroxiciclo-hexil gliburida(M2), 4-cis-(M2a), 3-trans-(M3), 2-trans- (M4) hidroxiciclo gliburida e gliburida etil-hidroxi (M5).

115. 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.

116. 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 15B-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.

→ **Conclusões**

117. Através da caracterização realizada, concluiu-se que era possível obter NP biocompatível de HDL Zn<sub>2</sub>Al organomodificado pela síntese de um vaso e um vaso pelo método de coprecipitação, tornando o método de obtenção mais simples e barato. Dados de DRX mostraram adsorção de GLIB em S3 e S6 devido ao aumento do espaço interlamelar e à hidrofobização promovida pelo SDS. Além disso, os dados de DRX juntamente com os dados de TGA / DTG e DSC corroboraram para o revestimento de S4 e S6 NP por ED e obtenção de nanocompósitos esfoliados / intercalados para S5.

118. Os dados de liberação no meio intestinal simulado mostraram alteração da cinética de liberação de GLIB devido à troca iônica entre GLIB intercalado e ânions de fosfato intestinal. No entanto, a baixa solubilidade do GLIB atuou como um passo limitante para sua difusão, tornando o modelo de ordem zero o mais adequado para explicar sua cinética de liberação.

119. O ensaio WST-1 realizado em fibroblastos comprovou a biocompatibilidade de todos as NP. Além disso, 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.

120. 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**

121. Alexandre, M., Dubois, P., 2000. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng.* 28, 1-63.
122. Abellan, G., Coronado, E., Martí-Gastaldo, C., Pinilla-Cienfuegos, E., Ribera A., 2010. Hexagonal nanosheets from the exfoliation of Ni<sup>2+</sup>-Fe<sup>3+</sup> LDHs: a route towards layered multifunctional materials. *Journal of Materials Chemistry*. DOI: 10.1039/c0jm01447.
123. Azeredo, H.M.C., 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 42 (2009) 1240-1253.
124. Basu, D., Das, A., Stöckelhuber, K.W., Wagenknecht, U., Heinrich, G., 2013. Advances in Layered Double Hydroxide (LDH)-based Elastomer Composites. *Progress in Polymer Science*, 2013.
125. Bao, C., Zhang, H., Wilkie, C.A., Bi, S., Tang, X.T., Wu, J., Yang, J., 2016. On the dispersion systems of graphene-like two-dimensional materials: From fundamental laws to engineering guidelines. *Carbon*, 107, 774.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.06.097>.
126. Barik, S., Badamali, S.K., Behera, L., Jena, P.K., 2018. Mg-Al LDH reinforced PMMA nanocomposites: a potential material for packaging industry, *Composite Interfaces*, Volume 25, Issue 4, 3 April 2018, Pages 369-380. DOI:10.1080/09276440.2018.1439628.
127. Barik, S., Lingaraj Behera, L., Badamali, S.K., 2016. Assessment of thermal and antimicrobial properties of PAN/Zn-Al

layered double hydroxide nanocomposites. *Composite Interfaces*, DOI: 10.1080/09276440.2017.1245024.

128. Beyer, G. J., 2005. Flame Retardancy of Nanocomposites - from Research to Technical Products *Fire Sci.*, 23. <https://doi.org/10.1177/0734904105048591>.

129. Carvalho, H.W.P., F. Leroux, V. Briois, C. V. Santilli, S. H. Pulcinelli. 2018, Thermal stability of PMMA-LDH nanocomposites: decoupling the physical barrier, radical trapping, and charring contributions using XAS/WAXS/Raman time-resolved experiments.

130. Carvalho, H.W.P., Santilli, C.V., Briois, V., Pulcinelli, S.H., 2013. Polymer-clay nanocomposites thermal stability: experimental evidence of the radical trapping effect. *RSC Adv.*, 2013, 3, 2283.

131. Chen, W., Li, F., Qu, B., 2004. Preparation of Nanocomposites by Exfoliation of ZnAl Layered Double Hydroxides in Nonpolar LLDPE Solution. *J. Mater. Chem.* 2004, 16, 3368-370. <https://doi.org/10.1021/cm0303484>.

132. Cheng, F., Cao, Q., Guan, Y., Cheng, H., Wang, X., Miller, J.D., 2013. FTIR analysis of water structure and its influence on the flotation of arcanite (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and epsomite (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

133. Chrissafis, K., Bikiaris, D., 2011. Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part I: An overview on thermal decomposition of addition polymers. *Thermochim. Acta*, 2011, 523, 1. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.06.010>.

134. Chowdhury, P.R.; Bhattacharyya, K.G., 2009. Synthesis and characterization of Co/Ti layered double hydroxide and its application as a photocatalyst for degradation of aqueous Congo Red. *RSC Advances*. DOI: 10.1039/C5RA19106H.

135. Chung, J. H.; Simmons, A.; Poole-Warren, L. A., 2011. Non-degradable polymer nanocomposites for drug delivery. p. 765-778. doi: 10.1517/17425247.2011.574123.

136. Deleon, V. H., Nguyena, T.D., Narb, M., D'Souza, N.A., Golden, T.D. Polymer nanocomposites for improved drug delivery efficiency., 2012. *Materials Chemistry and Physics*, v. 132, n. 2-3, p. 409-415, 2012. doi:10.1016/j.matchemphys.2011.11.046.
137. Demir, M. M.; Memesa, M., Castignolles, P., Wegner, G., 2006. PMMA / Zinc Oxide Nanocomposites Prepared by In-Situ Bulk Polymerization a. p. 763-770.  
<https://doi.org/10.1002/marc.200500870>.
138. De Vietro, N., Conte, A., Incoronato, A.L., Del Nobile, M.A., Fracassi, F., 2017. Aerosol-assisted low pressure plasma deposition of antimicrobial hybrid organic-inorganic Cu composite thin films for food packaging applications. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 41, 130-134. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.02.010.
139. Ding, Y., Gui, Z., Zhu, J., Hu, Y., Wang, Z., 2008. Exfoliated poly(methyl methacrylate)/MgFe-layered double hydroxide nanocomposites with small inorganic loading and enhanced properties. *Materials Research Bulletin* 43, 3212-3220.
140. Forano, C., Hibino, T., Leroux, F., Taviot-Gueho, C., 2006. Layered double hydroxides. In: Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G. (Eds.), *Handbook of Clay Science*. Elsevier Ltd, pp. 1021-1095.
141. Gilman, J.W., 1999. Flammability and Thermal Stability Studies of Polymer Layered-Silicate (Clay) Nanocomposites. *App. Clay Sci.*, 15, 31-49. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-1317\(99\)00019-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-1317(99)00019-8).
142. Hammani, S.; Barhoum, A.; Bechelany, M., 2018. Fabrication of PMMA/ZnO nanocomposite: effect of high nanoparticles loading on the optical and thermal properties. *Journal of Materials Science*, v. 53, n. 3, p. 1911-1921.
143. Johnson, D.W., Gallagher, P.K., 1972. Comparison of dynamic with isothermal techniques for the study of solid state

decomposition kinetics. *J. Phys. Chem.* 76, 1474-1479.

<https://doi.org/10.1021/j100654a019>.

144. Kashiwagi, T., Inaba, A., Brown, J.E., Hatada, K., Kitayama, T., Masuda, E. Effects of weak 14.

145. Miyata, S. The syntheses of hydrotalcite-like physico-chemical properties i : the systems  $Mg^{2+}-Al^{3+}-NO_3^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-ClO_4^-$ ,  $Ni^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$  and  $Zn^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ , 1975. *Clays and Clay Minerals*, v. 23, p. 369-375.

146. Miyata, S., Okada, A., 1977. 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*, Vol. 25, pp. 14-18. Pergamon Press 1977. Printed in Great Britain.

147. Leão, A.D., de França, L.M., Cunha, C.N.L.C., Marinho F.A., Soares M.F.L., Soares-Sobrinho J.L., 2019a. In-line monitoring of layered double hydroxide synthesis and insights on formation mechanism and kinetics. *Applied Clay Science*, 179, 105130. DOI: 10.1016/j.clay.2019.1051.

148. 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., 2019b. Hybrid systems of glibenclamide and layered double hydroxides for solubility enhancement for the treatment of diabetes mellitus II. *Appl. clay science*, 105218. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105218>.

149. Lee, C., Kwun, O.C., Kang, H.T., 1985. Characterization Korean Clays and Pottery by Neutron Activation Analysis (I). Characterization of Korean Porcelainsherd. *Bull Korean Chem. Soc.* vol. 7, n.1. 1986.

150. Liu, J., Huang, X., Li, Y., Sulieman, K.M., He, X., Sun, F. 2006. Facile and Large-Scale Production of ZnO/Zn-Al Layered Double

Hydroxide Hierarchical Heterostructures. *Physical Chemistry* 110, 21865-21872.

151. Liufu, S. C.; Xiao, H. N.; Li, Y. P., 2005. Thermal analysis and degradation mechanism of polyacrylate/ZnO nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, v. 87, n. 1, p. 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.07.011>.

152. Li, B., Hu, Y., Liu, J., Chen, Z., Fan, W., 2003. Preparation of poly (methyl methacrylate)/LDH nanocomposite by exfoliation-adsorption process. *Colloid and Polymer Science*. October 2003, Volume 281, Issue 10, pp 998-1001.

153. Manzi-Nshuti, C., Chenb, D., Sub, S., Wilkie, C.A., 2009. The effects of intralayer metal composition of layered double hydroxides on glass transition, dispersion, thermal and fire properties of their PMMA nanocomposites. *Thermochimica Acta* 495 (2009) 63-.

154. Manzi-Nshuti, C., Wang, D., Hossenlopp, J.H., Wilkie, C.A., 2009. The role of the trivalent metal in an LDH: Synthesis, characterization and fire properties of thermally stable PMMA/LDH systems. *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 705-711.

155. Mayo-Pedrosa, M.; Alvarez-Lorenzo, C.; Laci'K, I.; Martinez-Pacheco, R.; Concheiro, A., 2007. Sustained Release Pellets Based on Poly (N-Isopropyl Acrylamide ): Matrix and In Situ Photopolymerization-Coated Systems. v. 96, n. 1, p. 93-105. DOI 10.1002/jps.20708.

156. Nyambo, C., Songtipya, P., Manias, E., Jimenez-Gasco, M.M., Wilkie, C.A., 2008. Effect of MgAl-layered double hydroxide exchanged with linear alkyl carboxylates on fire-retardancy of PMMA and PS. *Journal of Materials Chemistry*. DOI: 10.1039/b806531d.

157. Nogueira, T., Botan, R., Wypych, F., Lona, L., 2011. 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. DOI: 10.1016/j.compositesa.2011.04.006.

158. Noshirvania, N., Ghanbarzadeha, B., Mokarrama, R.R., Prado, M.H., B.R.; Bartoli, J.R., 2018. Synthesis and characterization of PMMA and organic modified montmorillonites nanocomposites via in situ polymerization assisted by sonication. V. 160, August 2018, p. 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.02.035>.

159. Shah, S.A., Sohail, M., Minhas, M.U., Rehman, N., Khan, S., Hussain, Z., Mudassir, Mahmood, A., Kousar, M., Mahmood, A., 2019. pH-responsive CAP-co-poly(methacrylic acid)-based hydrogel as an efficient platform for controlled gastrointestinal delivery: fabrication, characterization, in vitro and in vivo toxicity evaluation. Drug Delivery and Translational Research.

160. SOARES SOBRINHO, J. L. ; LEÃO, A. D. ; SOARES, M. F. L. R. ; SILVA-FILHO, E. C. ; Oliveira, v.v. SISTEMAS HÍBRIDOS DE GLIBENCLAMIDA E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES PARA OTIMIZAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E COADMINISTRAÇÃO DE MICRONUTRIENTES FUNCIONAIS COM APLICAÇÃO FARMACÊUTICA. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201801668, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 15/08/2018 Instituição(ões) financiadora(s): CNPq; UFPE.

161. SOARES SOBRINHO, J. L. ; LEÃO, A. D. ; França, L.M. ; Oliveira, J.H.P ; SOARES, M. F. L. R. . MONITORAMENTO IN-LINE PARA CONTROLE DE PRODUÇÃO DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190139617. 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.

## REIVINDICAÇÕES

1) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, **caracterizadas por** associação de hidróxidos duplos lamelares (HDL) do tipo  $Zn_2Al-Cl$  organofilizados com dodecil sulfato de sódio (DDS) e adsolubilizados com glibenclamida (GLIB) formando nanopartículas biocompatíveis através do método de co-precipitação em meio orgânico e revestidos com Eudragit L100® para gastroproteção, com nanotoxicidade e eficácia terapêutica comprovada em modelo animal diabético.

2) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados na Reivindicação 1, **caracterizados por** gastrorresistência devido a associação com polímero pH-dependente como Eudragit L100®, e também compatíveis com a ausência do revestimento ou associação a outros polímeros, copolímeros, blendas polímeros e materiais que apresentem função de gastroproteção ou mucoadesividade.

3) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1 e 2, **caracterizados por** associação com DDS, GLIB e Eudragit L100®, além da possibilidade de adição de outros excipientes como surfactantes, aglutinantes, dispersantes, conservantes, corantes, edulcorantes, estabilizantes além de outros constituintes que se tornem necessários ou melhorem alguma propriedade da formulação.

4) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** preparação através do método de co-precipitação em meio orgânico na proporção 1:1 GLIB:HDL:DDS podendo também serem obtidos em outras proporções sem alteração de suas características físico-químicas e terapêuticas.

5) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** alteração do espaço interlamelar do HDL devido a presença da GLIB e/ou DDS e/ou Eudragit L100®.

6) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** mudanças na estabilidade térmica e características de área superficial e tamanho e distribuição de poros.

7) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** mudança do potencial zeta e tamanho hidrodinâmico em decorrência da organofilização e interação com a GLIB apresentando melhoria da estabilidade coloidal.

8) Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético,

citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** liberação prolongada com cinética de ordem zero para a GLIB.

**9)** Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** apresentarem possibilidade de associação a outros fármacos ou cátions na constituição do HDL.

**10)** Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** apresentarem biocompatibilidade celular em linhagem de fibroblastos, mas também apresentarem possibilidade de viabilidade em outros tipos celulares compatíveis com os ensaios de viabilidade.

**11)** Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** demonstrarem eficácia no tratamento de ratos *wistar* diabéticos com redução da glicemia de jejum, além de melhora de parâmetros clínicos como massa corporal, polidipsia e polifagia em relação aos animais diabéticos não tratados e tratados com a GLIB.

**12)** Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, citados nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizados por** apresentarem ausência de toxicidade nos ensaios bioquímicos, hematológicos e histológicos realizados ao fim do tratamento e apresentarem redução

significativa da glicemia ( $111\pm 25\text{mg/dL}$ ) em relação ao grupo diabético não tratado ( $374\pm 26\text{mg/dL}$ ) e diabético tratado com a GLIB ( $206\pm 35\text{mg/dL}$ ).

**13)** Nanopartículas organofilizadas de glibenclamida e hidróxidos duplos lamelares com aplicação farmacêutica: liberação *in vitro*, biocompatibilidade e nanotoxicidade em modelo animal diabético, **caracterizados por** aplicação no diabetes *mellitus* II, ou diabetes gestacional ou qualquer outra aplicação em que possa ser utilizada terapêuticamente.

## FIGURAS

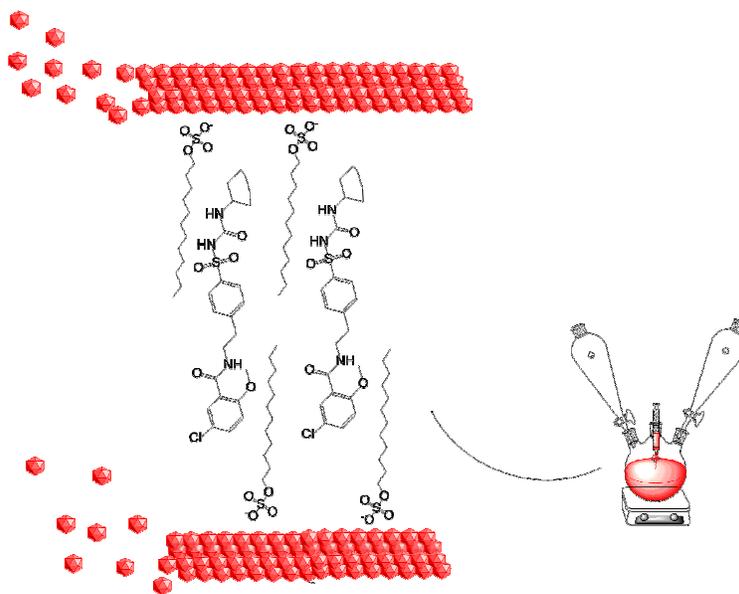


Figura 1

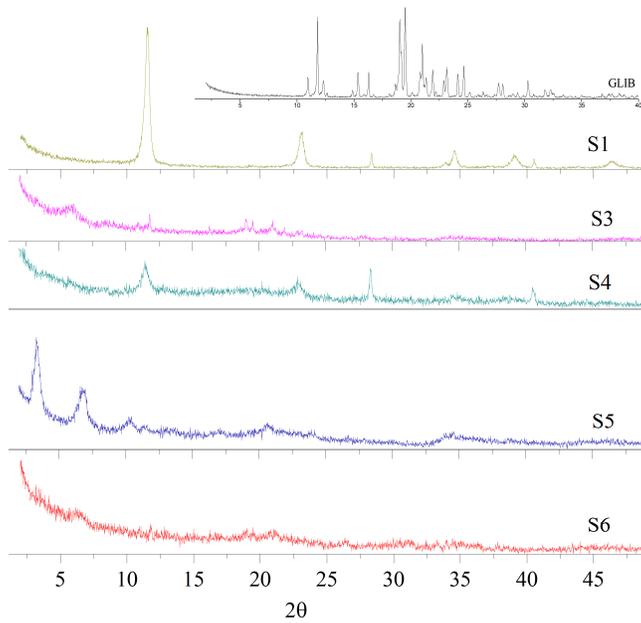


Figura 2

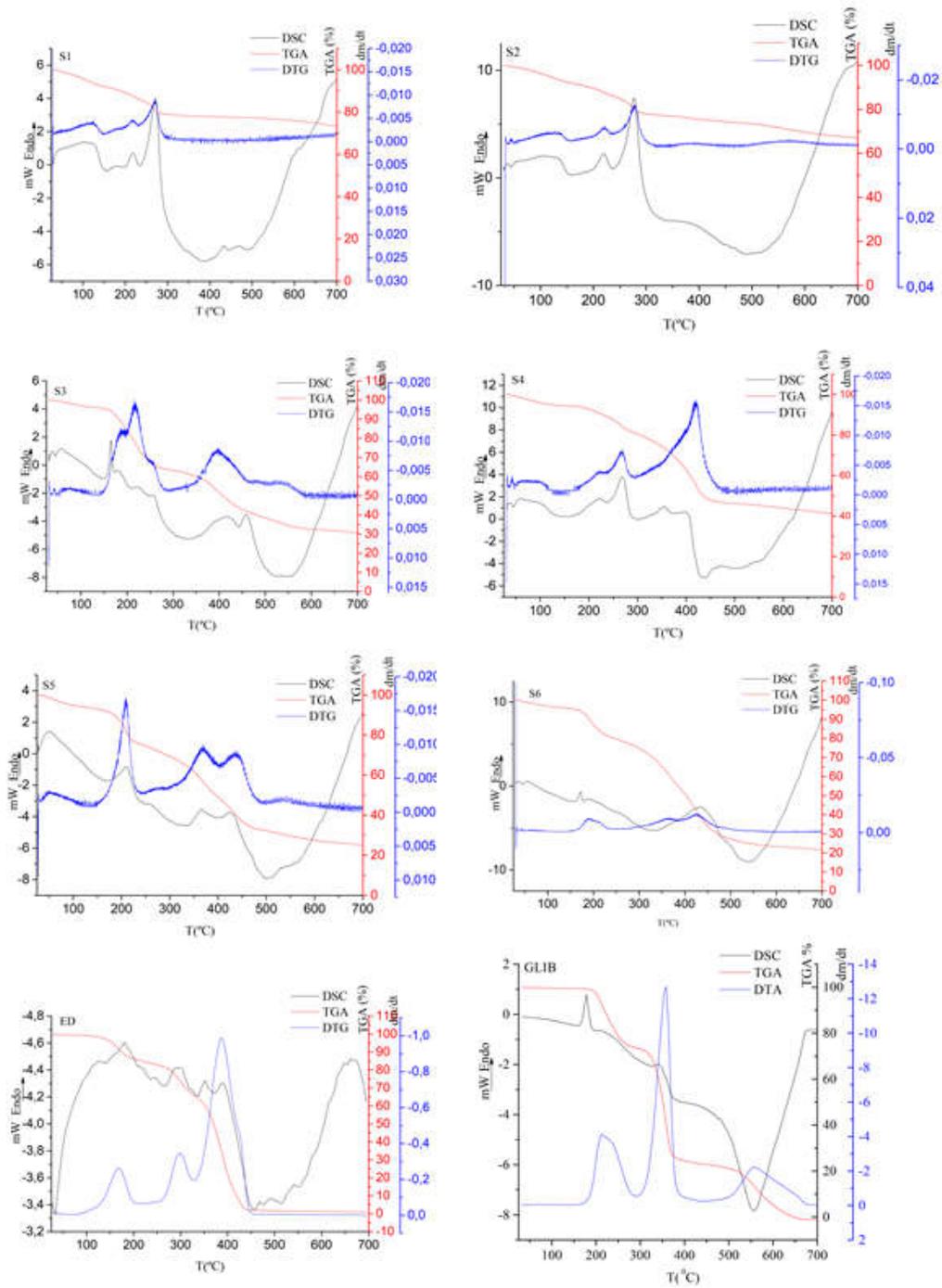


Figura 3

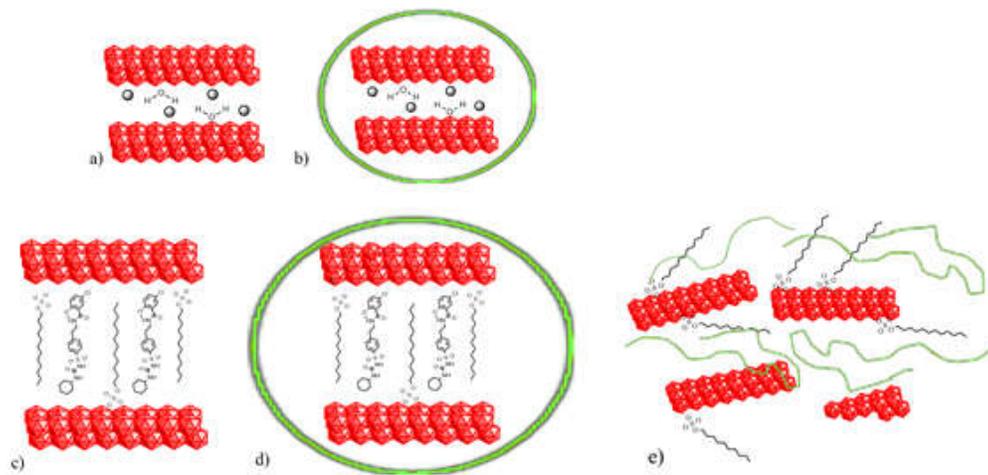


Figura 4

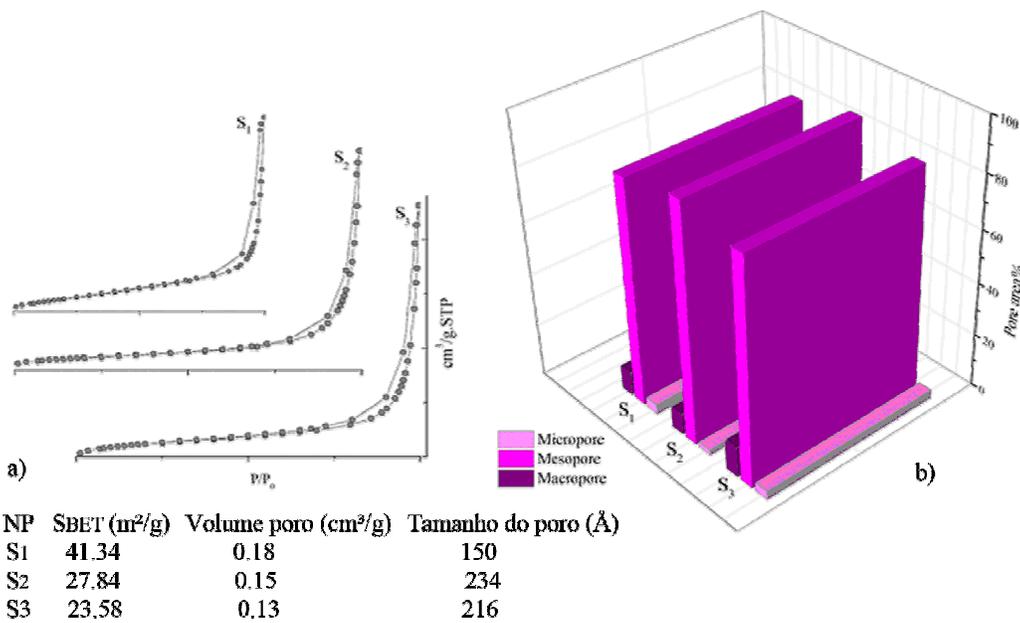


Figura 5

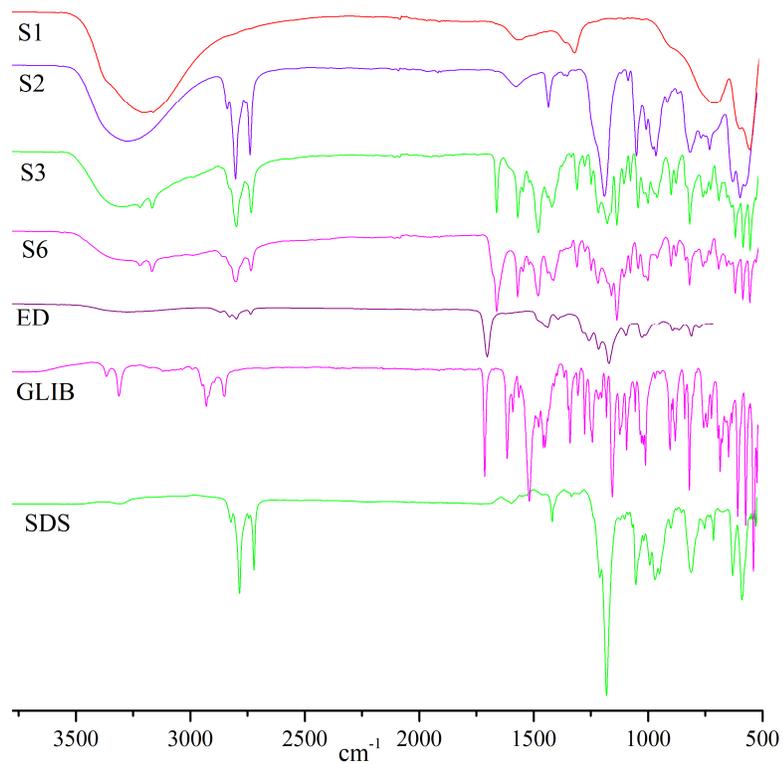


Figura 6

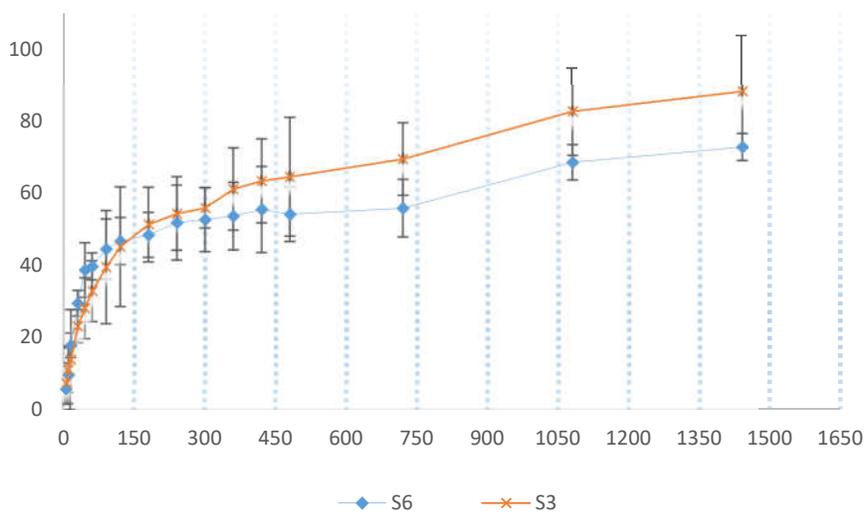


Figura 7

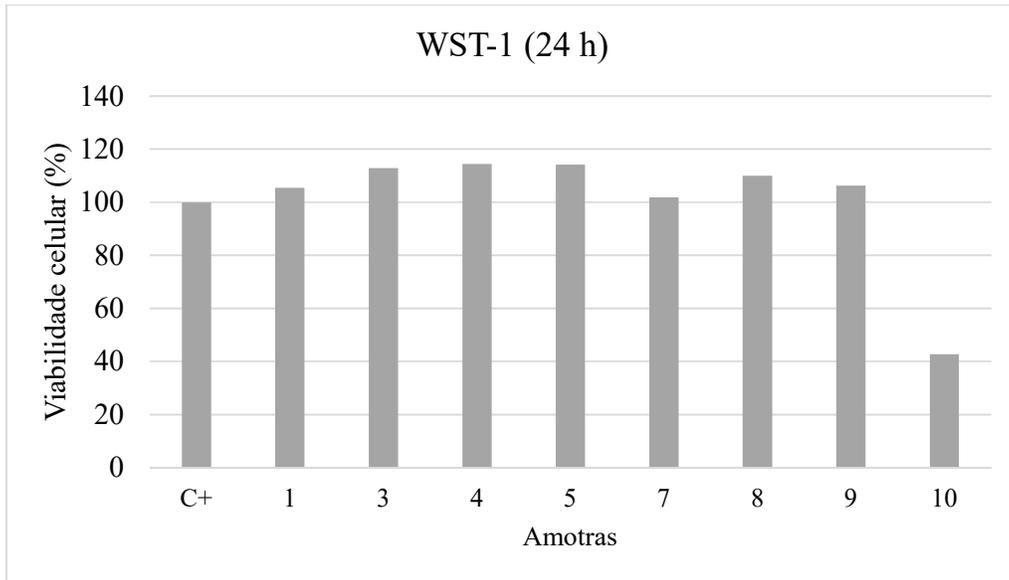


Figura 8

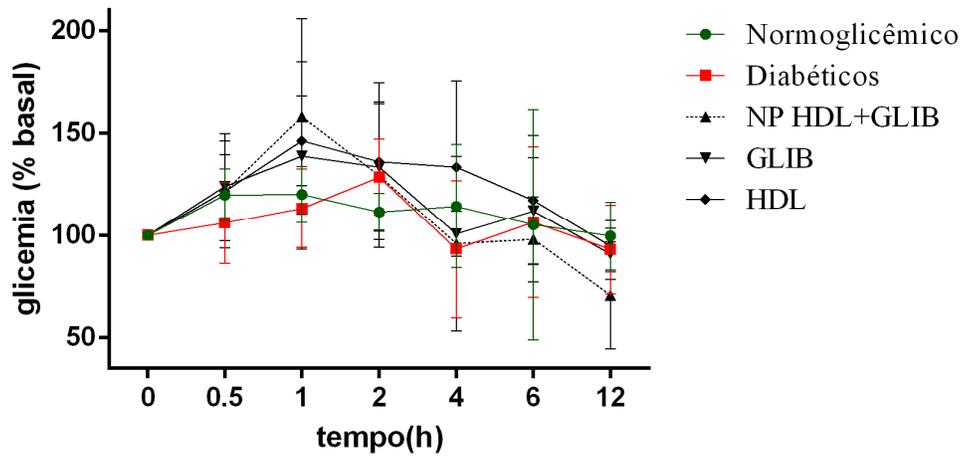


Figura 9

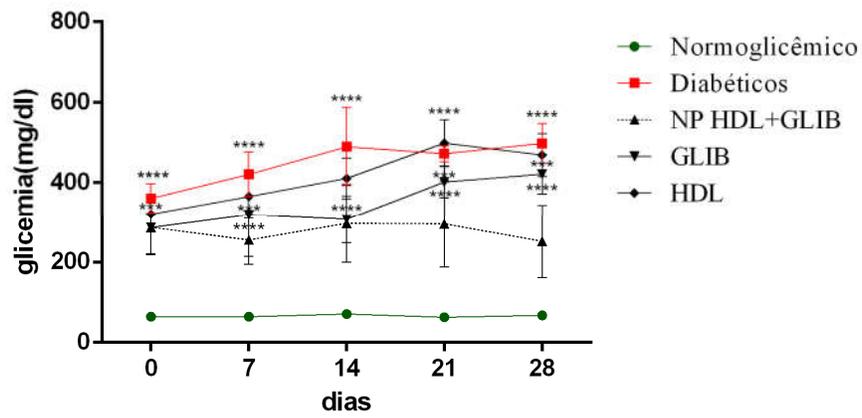


Figura 10

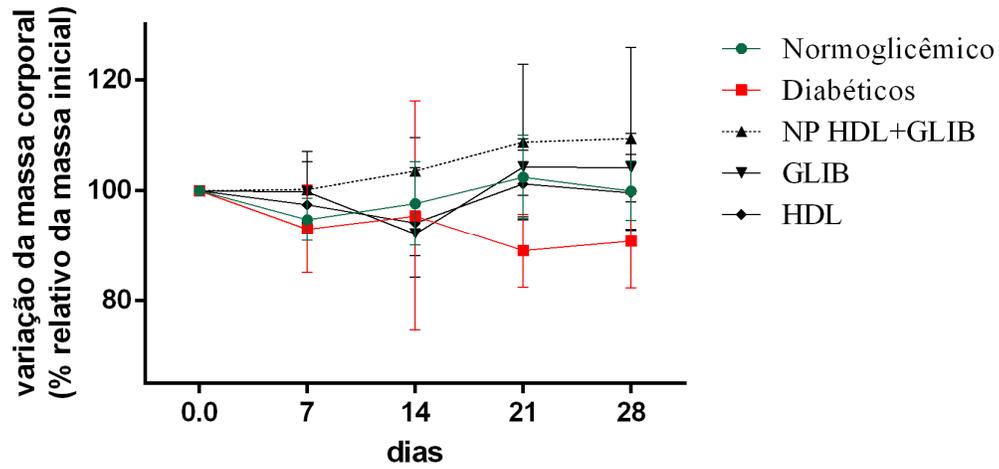


Figura 11

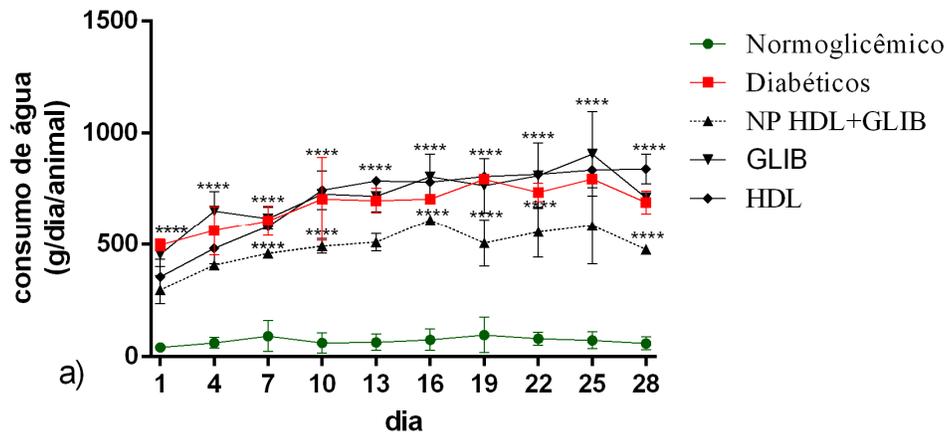


Figura 12

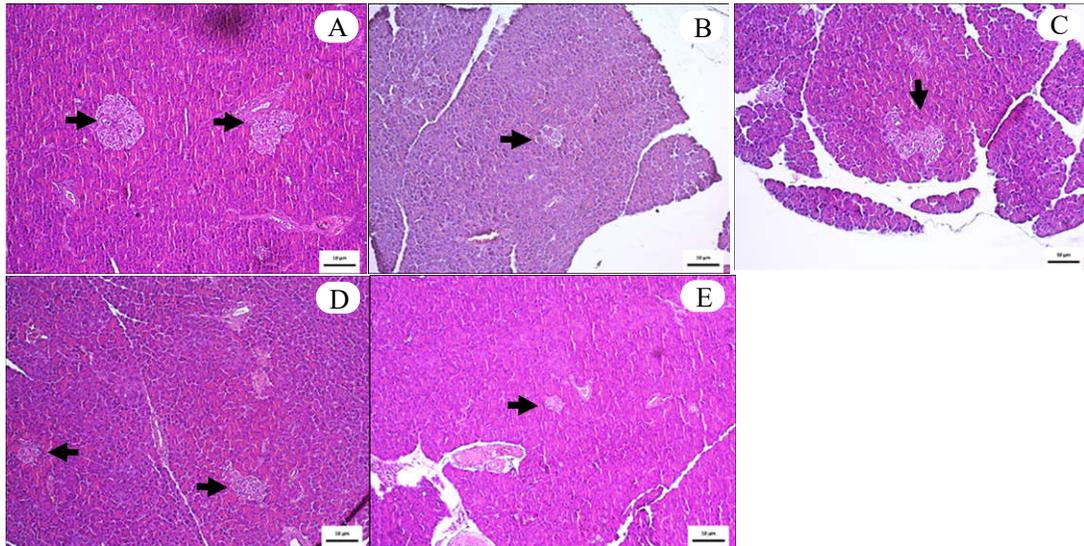


Figura 13

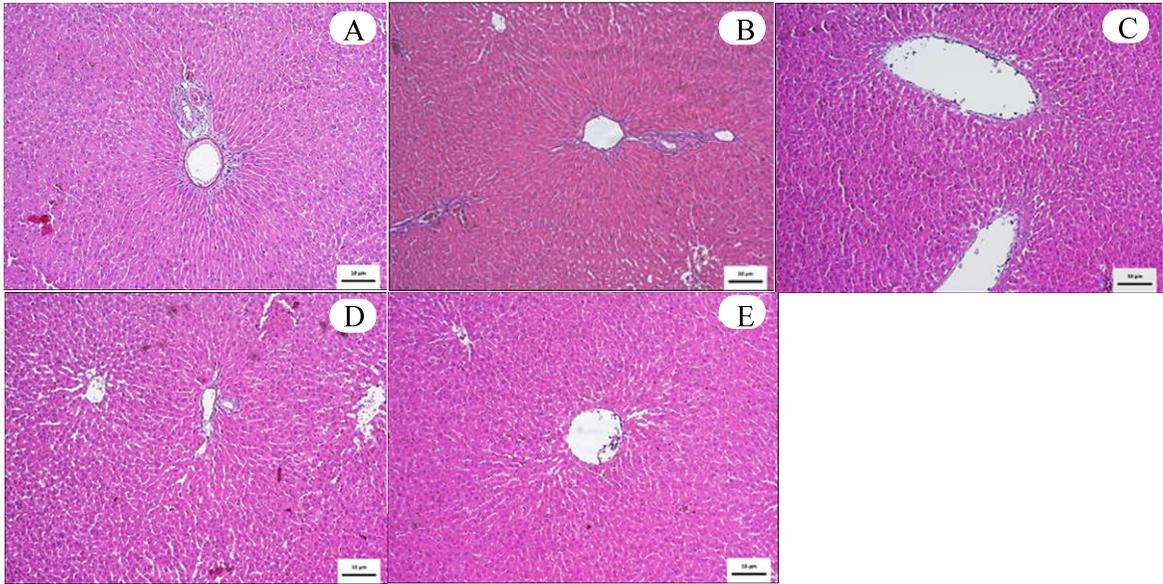


Figura 14

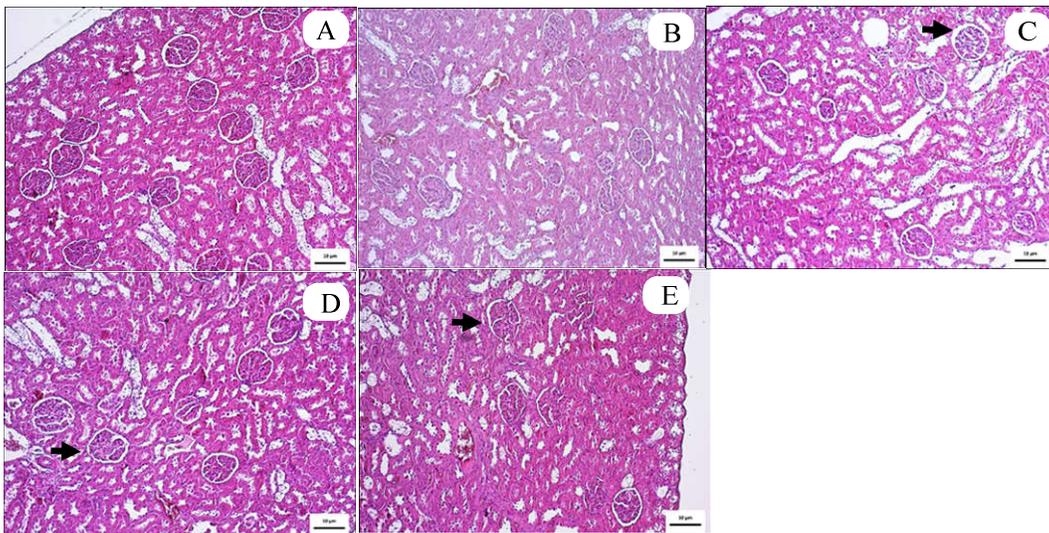


Figura 15

hkl (003)	2 $\theta$	d <sub>003</sub> (Å)
S1	11.46	7.771
S3	5.87	14.03
S4	11.47	7.705
S5	3.341	26.42
S6	6.48	13.623

Figura 16

NP	T <sub>onset</sub> 0.05	T <sub>onset</sub> 0.1	T <sub>onset</sub> 0.15	Residuo %
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

Figura 17

Amostra	tamanho (nm)	PDI	Zeta (ζ)	Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (ζ)
S <sub>1</sub>	688,8	0,311	+14	S <sub>6</sub>	641,4	0,693	-37
S <sub>2</sub>	251,6	0,529	-13,9	GLIB	-	-	-21,2
S <sub>3</sub>	469	0,417	-35,5	SDS	-	-	-29,2

Figura 18

Tempo(min)	S6 (ppm% ± 0.002)	S3 (ppm% ± 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

Figura 19

Modelo cinético	Equação	S3	S6
Ordem zero	$Q = Q_0 - k_0 t$	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
Primeira ordem	$\ln Q_t = -kt + \ln Q_0$	0,7424	0,7293
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$	0,754	0,5065

Figura 20

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

Figura 21

PARÂMETROS	NORMO	DNT	HDL	NP NANO+GLIB	GLIB
Glicose (mg/dL)	119 ± 22	374 ± 26	206 ± 35	111 ± 25***	224 ± 35
TGO/AST (mg/dL)	91 ± 42	338 ± 79	239 ± 53	265 ± 63	238 ± 47
TGP/ALT (mg/dL)	33 ± 12	229 ± 59	157 ± 38	200 ± 63	204 ± 38
Triglicerídeos (mg/dL)	101 ± 9	105 ± 48	89 ± 64**	122 ± 31	183 ± 38
Colesterol (mg/dL)	108 ± 12	105 ± 18	94 ± 15	96 ± 11	124 ± 21
Uréia (mg/dL)	49 ± 7	143 ± 36	117 ± 24**	113 ± 39	191 ± 45
Ácido úrico (mg/dL)	3,85 ± 0,71	3,95 ± 0,23	5,63 ± 2,42	3,60 ± 0,51	4,33 ± 0,63
Creatinina (mg/dL)	0,70 ± 0,14	0,62 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,52 ± 0,10	0,73 ± 0,16

Figura 22

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

Figura 23

**RESUMO****NANOPARTÍCULAS ORGANOFILIZADAS DE GLIBENCLAMIDA E  
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES COM APLICAÇÃO FARMACÊUTICA:  
LIBERAÇÃO *IN VITRO*, BIOCAMPATIBILIDADE E NANOTOXICIDADE EM  
MODELO ANIMAL DIABÉTICO**

A presente patente de invenção descreve o desenvolvimento de nanopartículas contendo hidróxidos duplos lamelares organomodificados por dodecilssulfato de sódio carreando glibenclamida, apresentou-se como uma possível alternativa para aumentar a taxa de dissolução e promover sua liberação controlada. A síntese foi realizada através de coprecipitação em única etapa, as NP foram caracterizadas difratometricamente, espectroscopicamente, termicamente, avaliadas quanto ao perfil de co-liberação de GLIB e zinco e quanto a compatibilidade celular através de WST-1 em fibroblastos (24h). Além disso, a eficácia e nanotoxicidade foram avaliadas através de 30 dias de tratamento de ratos *Wistar* induzidos ao diabetes com streptozotocina. 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.