



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
CENTRO DE FORMAÇÃO INTERDISCIPLINAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, AMBIENTE E  
QUALIDADE DE VIDA**

**DAYLANE RODRIGUES DE SOUSA**

**INTERCALAÇÃO DO CIPROFLOXACINO EM HIDRÓXIDO DUPLO  
LAMELAR: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN*  
*VITRO***

**Santarém – PA  
2018**

**DAYLANE RODRIGUES DE SOUSA**

**INTERCALAÇÃO DO CIPROFLOXACINO EM HIDRÓXIDO DUPLO  
LAMELAR: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN*  
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida da Universidade Federal do Oeste do Pará, na área de concentração: Biodiversidade, Saúde e Sustentabilidade, na área de concentração: Biodiversidade, Saúde e Sustentabilidade, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Apolo Miranda Figueira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos

**Santarém – PA  
2018**

**DAYLANE RODRIGUES DE SOUSA**

**INTERCALAÇÃO DO CIPROFLOXACINO EM HIDRÓXIDO DUPLO  
LAMELAR: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN*  
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida da Universidade Federal do Oeste do Pará, na área de concentração: Biodiversidade, Saúde e Sustentabilidade, na área de concentração: Biodiversidade, Saúde e Sustentabilidade, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Santarém, 13 de Novembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Apolo Miranda Figueira, UFOPA

Prof. Dr. Adriano Cesar Rabelo, UFOPA

Prof. Dr. Nelson de Sousa Amorim, UFOPA

Prof. Dr. Luiz Kleber Carvalho de Souza, UFAM

Conceito: Aprovada

**Santarém – PA  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

S725i Sousa, Daylane Rodrigues de  
Intercalação do ciprofloxacino em hidróxido duplo lamelar: caracterização e estudo de liberação *in vitro*. / Daylane Rodrigues de Sousa. – Santarém, 2018.  
109 p. : il.  
Inclui bibliografias.

Orientador: Bruno Apolo Miranda Figueira  
Coorientador: Gabriela Bianchi dos Santos  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida.

1. Hidróxido duplo lamelar. 2. Antibiótico. I. Figueira, Bruno Apolo Miranda, *orient.* II. Santos, Gabriela Bianchi dos, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 615.7922

---

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

Dedico este trabalho à minha filha Maria Júlia, que me acompanhou, desde o ventre, durante todo o mestrado, dando um sentido especial à minha vida e me fortalecendo durante esta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero primeiramente agradecer a Deus por concluir mais esta etapa. Ao meu orientador Dr. Bruno Apolo, por me conceder a oportunidade de me orientar em um trabalho de pesquisa, no qual estou muito orgulhosa em ter desenvolvido e ainda estar desenvolvendo. Mas além disso, pela dedicação, paciência, apoio, compreensão e orientação ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Agradecer à minha família, que sempre me apoiou, me deu os melhores ensinamentos para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje e pelos esforços por eles realizados para a minha educação, principalmente minha mãe Eliene e em memória a minha avó Dalva. Ao meu marido José Jeosafá por todo companheirismo e por não ter medido esforços para que eu concluísse esta pesquisa com êxito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado. Ao programa de pós-graduação Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida.

Agradecer ao Laboratório de Síntese de Novos Materiais (IEG-UFOPA), Laboratório de Microbiologia (ISCO-UFOPA), Laboratório de Farmacotécnica (ISCO-UFOPA) e ao departamento de química da Universidade Federal do Pará, pelo espaço e material cedido para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL) vêm recebendo grande atenção no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, devido à capacidade que esses sólidos inorgânicos apresentam de intercalar na sua região interlamelar substâncias biologicamente ativas. Os HDL podem ser sintetizados em laboratório por rotas simples e de baixo custo, que permitem a síntese de sólidos de alta pureza. Existe uma grande preocupação com relação aos antibióticos, devido ao aumento da incidência de microrganismos resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente para antibioticoterapia. A liberação controlada de fármacos mediada por nanopartículas permite melhorar o índice terapêutico, diminuir a dose e a frequência de administração, aumentar a entrada do fármaco no meio intracelular, uma melhor acumulação no órgão alvo e limitação de efeitos secundários. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolvimento de processo de síntese de uma matriz lamelar para a intercalação de um antibacteriano ciprofloxacino (CIP) e testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) *in vitro*. Para isso, foi realizado, a síntese por rota mecanoquímica de  $Zn^{2+}$  e  $Al^{3+}$ , que originou a matriz ZnAlHDL. A intercalação do CIP foi realizada pelo método da reconstrução para obter um composto de intercalação (ZnAlHDL/CIP). Os materiais obtidos foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho (IV) e ramam, termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (HR-TEM). O acompanhamento do processo de liberação do antibiótico, ocorreu através de TSA por Àgar-difusão em discos e poços, determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e realização do ensaio *time-kill*. Ao se fazer o estudo da influência da razão para a obtenção do HDL, verificou-se que a razão de 1,85 apresentou uma estrutura com padrão DRX característico de material lamelar, boa cristalinidade e espaçamento basal de 7,57 Å. Os espectros de IV e Raman indicaram as bandas associadas aos constituintes desejados no HDL sintetizado. A análise térmica demonstrou que ZnAlHDL apresenta os quatro eventos de decomposição termal que constam na literatura. E os resultados obtidos pelo MEV e HR-TEM mostraram que os compostos apresentaram forte tendência a aglomeração. Após o método de reconstrução para intercalação do antibiótico, apresentou aumento do espaçamento basal e deslocamento do pico referente ao plano (003) para ângulos mais baixos ( $2\theta$ ), indicando êxito no processo. Durante a realização do TSA, ZnAlHDL demonstrou ser um bom carreador do ciprofloxacino. O nanohíbrido apresentou melhor índice terapêutico que o fármaco cloridrato de ciprofloxacino comercial (ATB/CDC). Os testes de liberação do fármaco comprovaram que o sistema de liberação do medicamento pelo ZnAlHDL/CIP é sustentada, com atividade permanente na difusão em poço por 96h. Em comparação ao ATB/CDC apresentou taxa específica de morte bacteriana  $0,364\text{ h}^{-1}$  (ATB/CIP) e  $0,291\text{ h}^{-1}$  (ZnAlHDL/CIP). Tempo de efeito bactericida mínimo eficaz de 22'40" e 17'46" de 24-120h. A contagem direta de células viáveis 0 a 120horas, comprova que houve inibição completa do crescimento bacteriano pelas amostras de ZnAlHDL/CIP e ATB/CDC. Pode-se concluir que o HDL é eficiente como carreador do fármaco.

**Palavras – Chave:** Hidróxido Duplo Lamelar. Síntese. Antibiótico. Liberação controlada.

## ABSTRACT

Layered double hydroxides (HDLs) have received great attention in the development of drug delivery systems because of the ability of these inorganic solids to interleave biologically active substances in their region. HDL can be synthesized in the laboratory by simple routes and low cost, which allow the synthesis of high purity solids. There is great concern about antibiotics due to the increased incidence of drug resistant microorganisms currently available for antibiotic therapy. Controlled drug delivery mediated by nanoparticles enables the improvement of therapeutic index, decrease in dose and frequency of administration, increase drug entry into the intracellular environment, better target organ accumulation and limitation of side effects. In this context, the present work aimed to develop the process of synthesis of a lamellar matrix for the intercalation of an antibacterial ciprofloxacin (CIP) and antimicrobial susceptibility tests (TSA) in vitro. For this, the synthesis by mechanochemical route of  $Zn^{2+}$  and  $Al^{3+}$ , which originated the ZnAlHDL matrix, was carried out. Intercalation of CIP was performed by the reconstruction method to obtain an intercalation compound (ZnAlHDL / CIP). The materials obtained were characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared (IR) and Raman spectroscopy, thermogravimetric (TG), differential thermal analysis (DTA), scanning electron microscopy (SEM) HAS). The follow-up of the antibiotic release process occurred through TSA by agar-diffusion in disks and wells, minimum inhibitory concentration (MIC) determination and time-kill assay. When the study of the influence of the ratio to obtain the HDL, the ratio of 1.85 showed a structure with DRX pattern characteristic of lamellar material, good crystallinity and basal spacing of 7.57 Å. The IR and Raman spectra indicated the bands associated with the desired constituents in the synthesized HDL. Thermal analysis showed that ZnAlHDL presents the four thermal decomposition events reported in the literature. And the results obtained by MEV and HR-TEM showed that the compounds presented a strong tendency to agglomeration. After the reconstruction method for antibiotic intercalation, there was an increase in basal spacing and displacement of the peak referring to plane (003) to lower angles ( $2\theta$ ), indicating success in the process. During TSA, ZnAlHDL was shown to be a good carrier of ciprofloxacin. Nanohybrid had a better therapeutic index than commercial ciprofloxacin hydrochloride (ATB / CDC). Drug release tests have shown that the drug release system by ZnAlHDL / CIP is sustained, with permanent activity in well diffusion for 96 hours. Compared to ATB / CDC, it had a specific bacterial death rate of 0.364 h<sup>-1</sup> (ATB / CIP) and 0.291 h<sup>-1</sup> (ZnAlHDL / CIP). Minimum effective bactericidal effect time of 22'40 "and 17'46" of 24-120h. Direct cell count from viable cells 0 to 120 hours, showed complete inhibition of bacterial growth by the ZnAlHDL / CIP and ATB / CDC samples. It can be concluded that HDL is efficient as a carrier of the drug.

**Keywords:** Layered Double Hydroxide. Synthesis. Antibiotic. Controlled release.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Descrição das vantagens e desvantagens inerentes ao uso de nanopartículas como agentes terapêuticos no tratamento de infecções bacterianas. ....	17
<b>Tabela 2</b> - Raio iônico de alguns cátions (Å).....	23
<b>Tabela 3</b> - Ânions intercalados em HDLs.....	26
<b>Tabela 4</b> - Lista de algumas indústrias que utilizam compostos do tipo hidrotalcita, marcas dos produtos e a que países elas pertencem. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Cronograma do desenvolvimento de antibióticos, resistência e resposta global.....	40
<b>Tabela 6</b> - Classificação de algumas quinolonas de acordo com as suas respectivas gerações.....	43
<b>Tabela 7</b> - Sensibilidade das bactérias ao ciprofloxacino – disco-difusão. ....	50
<b>Tabela 8</b> - Sensibilidade das bactérias as formas farmacêuticas de CIP – difusão em poço. ....	52
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros da amostra sintetizada em diferentes razões. ....	62
<b>Tabela 10</b> - Parâmetros da amostra ZnAlHDL, obtidos a partir dos padrões DRX, em diferentes tratamentos térmicos por 1 h. ....	66
<b>Tabela 11</b> - Parâmetros da amostra ZnAlHDL e ZnAlHDAL/CIP .....	70
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros da amostra ZnAlHDL/CIP, obtidos a partir dos padrões DRX, em diferentes tratamentos térmicos por 1 h. ....	71
<b>Tabela 13</b> - Parâmetros da amostra ZnAlHDAL/CIP com variação do tempo de síntese.....	74
<b>Tabela 14</b> - Comparação estatística entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas técnicas de disco-difusão e difusão em poço. ....	76
<b>Tabela 15</b> - Comparação estatística entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) x tempo obtidas pelas técnicas de difusão em poço .....	83
<b>Tabela 16</b> - Avaliação do crescimento e morte bacteriana. ....	86
<b>Tabela 17</b> - Valores absolutos de concentração de células bacterianas de <i>Escherichia coli</i> .....	87

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do HDL. ....	22
Figura 2 - Combinações que formam HDL, relatada em patentes e literatura. ....	24
Figura 3 - Representação do método de esfoliação na intercalação do ibuprofeno em HDL .....	31
Figura 4 - Representação simplificada do método de reconstrução.....	32
Figura 5 - Possíveis aplicações do HDL.....	34
Figura 6 - Curva hipotética mostrando a concentração do fármaco em função do tempo. ....	37
Figura 7 - Estrutura da molécula de ciprofloxacino .....	44
Figura 8 - Mecanismo de ação das fluoroquinolonas. ....	44
Figura 9 - Representação esquemática da formação do ZnAIHDL. ....	47
Figura 10 - Ilustração do processo de intercalação do ZnAIHDL com ciprofloxacino. ....	48
Figura 11 - Crescimento da bactéria na placa e seu halo de inibição. ....	49
Figura 12 - Representação esquemática da técnica de difusão poço. ....	51
Figura 13 - Representação esquemática da técnica de microdiluição em placa. ....	53
Figura 14 - Padrões de DRX de: (a) ZnAIHDL1.65; (b) ZnAIHDL1.75; (c) ZnAIHDL1.85; (d) ZnAIHDL 1.95; (e) ZnAIHDL2.00; (f) ZnAIHDL 2.10 e (g) ZnAIHDL 2.2. ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AN</b>	Ágar Nutriente
<b>ATB/CDC</b>	Cloridrato de ciprofloxacino
<b>ATR</b>	Refletância Total Atenuada
<b>BHI</b>	Caldo infusão de cérebro coração
<b>CMB</b>	Concentração Mínima Bactericida
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>C.V.E.C</b>	Crescimento do inóculo bacteriano
<b>DDS</b>	Drug Delivery Systems
<b>D.O</b>	Densidade Óptica
<b>DRX</b>	Difratometria de raios-X
<b>EDS</b>	Espectro de Soma de Mapas
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>HDL</b>	Hidroxido Duplo Lamelar
<b>HR-TEM</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão com Alta Resolução
<b>IEG</b>	Instituto de Engenharia e Geociências
<b>ISCO</b>	Instituto de Saúde Coletiva
<b>IV-FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>LSCNM</b>	Laboratório de Síntese e Caracterização de Novos Materiais
<b>MDR</b>	Multiresistentes
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PDF</b>	International Center for Diffraction Data
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TG-DTA</b>	Análise térmica
<b>TSA</b>	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
<b>UFOPA</b>	Universidade Federal do Oeste do Pará

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.2 JUSTIFICATIVA .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 BREVE HISTÓRICO .....	19
3.2 NOMENCLATURA .....	21
3.3 ESTRUTURA .....	21
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	25
3.5 PROPRIEDADES .....	26
<b>3.5.1 Estabilidade térmica</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5.2 Porosidade e área superficial</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5.3 Capacidade de troca iônica</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5.4 Efeito memória</b> .....	<b>28</b>
3.6 ROTAS DE OBTENÇÃO .....	28
<b>3.6.1 Síntese por coprecipitação</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6.2 Síntese por sal-óxido</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6.3 Síntese por sol-gel</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.4 Síntese hidrotérmica</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.5 Síntese eletroquímica</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.6 Síntese por troca iônica</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.7 Método por esfoliação</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6.8 Síntese por reconstrução</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6.9 Método mecanoquímico</b> .....	<b>33</b>
3.8 APLICAÇÕES .....	34
<b>3.8.1 Aplicação na área da saúde</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8.2 Aplicação na indústria farmacêutica (liberação de drogas)</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8.3 Antibióticos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.8.4 Molécula de ciprofloxacino</b> .....	<b>42</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>

4.1 ROTAS SINTÉTICAS .....	47
4.1.1 Síntese de HDL no sistema ZnAl-Cl pela rota mecanoquímica .....	47
4.1.2 Síntese de intercalação do HDL com ciprofloxacino .....	47
4.2 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO ZnAlHDL-CIP .....	48
4.2.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) - preparo do inóculo bacteriano .....	48
4.2.2 Método de disco-difusão .....	49
4.2.3 Método de difusão em poço .....	50
4.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	52
4.2.5 Teste de liberação controlada.....	54
4.2.6 Ensaio <i>time-kill</i> .....	54
4.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	56
4.3.1 Difração de raios X (DRX).....	56
4.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-FTIR) .....	57
4.3.3 Espectroscopia Raman.....	57
4.3.4 Análise termogravimétrica e diferencial (TG-DTA).....	58
4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
4.3.6 Microscopia Eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM) ....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	59
5.1. HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR DE ZNAL-CL .....	59
5.1.1 Influência da razão $Zn^{2+}/Al^{3+}$ .....	59
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (IV-FTIR)62	
5.1.3 Espectroscopia de Raman.....	64
5.1.4 Análise térmica .....	64
5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
5.1.6 Microscopia Eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM) ....	67
5.1.7 Composição química .....	68
5.2 INTERCALAÇÃO DO CIPROFLOXACINO NO ZnAlHDL PELO MÉTODO DE RECONSTRUÇÃO.....	69
5.2.1 Caracterização do material intercalado por DRX .....	69
5.3 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO ZnAlHDL-CIP .....	74
5.3.1 Análise comparativa dos métodos de disco-difusão e difusão em poço..	74

<b>5.3.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).....</b>	<b>78</b>
<b>5.3.3 Liberação Controlada de ZnAIHDL/CIP pelo método de difusão em poço</b>	<b>81</b>
<b>5.3.4 Ensaio time-kill.....</b>	<b>84</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais híbridos é um campo de pesquisa que vem crescendo, pois combina o conhecimento tradicional com novas abordagens e modernas tecnologias, com objetivo de atender à crescente demanda por novos materiais multifuncionais que possam ter aplicações em diversas áreas do conhecimento, tais como na agricultura, meio ambiente, física, química, biologia, bioquímica, medicina entre outras. Vários trabalhos tratam da utilização de nanopartículas (NPs) na composição deste material como cápsulas de armazenamento ou carreadores de espécies, usando diversos sistemas para liberação (AMBROGI et al., 2001; BARAHUIE et al., 2014; GUNAWAN e XU, 2008; ROMÁN et al., 2012; XU et al., 2006; CUNHA et al., 2010; MINGOS, 2006).

A arquitetura específica dos materiais híbridos proporciona um efeito sinérgico entre as contrapartes orgânica e inorgânica, que origina compostos com propriedades físicas ou químicas distintas de seus componentes isolados. Estes compostos representam não só uma alternativa criativa para se pesquisar novos materiais, como também permitem o desenvolvimento de aplicações industriais inovadoras (SANCHEZ et al., 2005; MAMMERI et al., 2005; BENICIO et al., 2015).

Entre os materiais utilizados, os chamados hidróxidos duplos lamelares (HDL), também conhecidos muitas vezes, de sistemas do tipo hidrotalcite ou argilas aniônicas, ganham destaque por suas características. Uma das vantagens do HDL é o grande número de possíveis composições e combinações metal-aníons que podem ser obtidas (CAVANI et al., 1991; EVANS e SLADE, 2006; KHAN e O'HARE, 2002; RIVES, 2001b; KUTHATI et al., 2015).

Nos últimos anos tornou-se crescente os estudos relacionados a áreas da biomédicina, com um enfoque especial na liberação controlada de fármacos a partir do desenvolvimento de materiais híbridos em vista de conferir maior segurança, eficácia e minimizando os efeitos colaterais na administração de drogas (SOARES-SOBRINHO et al., 2007; CUNHA et al., 2010; MINGOS, 2006). A liberação controlada de fármacos (*drug delivery systems*, DDS) é a liberação lenta e gradativa de um fármaco, controlando a absorção deste pelo organismo e aumentando seu tempo de ação (ALCANTARA et al., 2010; KEVADIYA et al., 2014).

A utilização de NPs inorgânicas como carreadores de fármacos visa melhorar tanto as propriedades biofarmacêuticas (estabilidade, solubilidade e administração)

dos compostos intercalados. Aliada a esses fatores, a utilização de novas formulações que sejam de fácil obtenção e que diminuam os efeitos adversos inerentes às classes de fármacos mais comumente utilizadas são de grande interesse para a comunidade científica e para a população (CUNHA, 2010; XU et al., 2006; SANVICENS e MARCO, 2008).

Existe uma grande preocupação com relação aos antibióticos, pois seu espectro de ação está ameaçado, devido a um crescente aumento de casos de resistência a estes fármacos. Sendo que estes são uma classe de fármacos indispensável para a saúde, pois sem a eficácia terapêutica dos antimicrobianos haveria decréscimo na expectativa de vida que se conquistou ao longo de décadas. O agravante a esta situação crítica é que não há novas classes de antibióticos sendo introduzidos pela indústria farmacêutica para combater as bactérias multirresistentes já existentes (BRITO e CORDEIRO, 2012; GUPTA et al., 2016).

O uso da nanotecnologia encontra-se, assim, entre as estratégias mais promissoras para ultrapassar a resistência antimicrobiana, bem como as limitações da terapêutica convencional. Neste contexto, devido às suas características únicas as NPs podem ser usadas estrategicamente com atividade antimicrobiana ou como veículos transportadores de antibióticos (BEYTH et al., 2015; GUPTA et al., 2016; PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013)

## 1.2 JUSTIFICATIVA

As infecções bacterianas são, ainda, uma das maiores causas de morbidade e mortalidade na atualidade, causando cerca de 300 milhões de casos críticos todos os anos (BEYTH et al., 2015; GUPTA et al., 2016). Apesar de terem sido desenvolvidas diversas gerações de antibióticos, a resistência antimicrobiana tem se tornado um problema de saúde pública potencialmente ameaçador, devido ao abuso e uso incorreto de antibióticos. Deste modo, o aumento de bactérias multi-resistentes (MDR) a antibióticos convencionais e de infecções associadas à formação de biofilmes, bem como a diminuição de antibióticos aprovados recentemente, tornaram urgente a necessidade de desenvolver estratégias alternativas para o combate a resistências (BEYTH et al., 2015; GUPTA et al., 2016; ZAZO et al., 2016).

As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies



diferentes. São consideradas microrganismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes. A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (GUIMARÃES et al., 2010; FERNANDES et al., 2009).

Adicionalmente, as limitações da terapêutica convencional como a biodisponibilidade limitada, solubilidade reduzida, acumulação inespecífica do fármaco, difícil transporte através da membrana de modo a alcançar microrganismos intracelulares e ainda rápida degradação, requerem que novas soluções sejam descobertas (ZHANG et al., 2010; HUH e KWON, 2011). A Tabela 1 descreve as potenciais vantagens da utilização de ambos os tipos de NPs como agentes antibacterianos.

Tabela 1 - Descrição das vantagens e desvantagens inerentes ao uso de nanopartículas como agentes terapêuticos no tratamento de infecções bacterianas.

<b>NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Entrega do fármaco ao local da infecção por estímulos (pH, temperatura, químicos)	Acumulação de NPs administrados por via intravenosa
Diminuição dos efeitos secundários associados ao antibiótico	Elevada exposição ao fármaco no local de entrega
Diminuição da resistência antimicrobiana	Citotoxicidade (pulmões, rins, fígado, cérebro, etc)
Aumento do tempo de semivida do fármaco	
Liberação controlada do fármaco	
Maior solubilidade	

Fonte: (Adaptação de HUH e KWON, 2011).

Pode-se concluir que o combate a infecções e a terapia com o auxílio de NPs é vantajosa por estas conseguem direcionar o fármaco ao local da infecção com uma maior biodisponibilidade do que a terapia convencional, o que contribui para uma diminuição dos efeitos secundários dos antibióticos e proteção bactérias que são benéficas ao organismo humano (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016; ZAZO et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de processo de síntese de uma matriz lamelar para a intercalação de medicamento com atividade antibacteriana.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Síntese por rota mecanoquímica simples de hidróxido duplo lamelar no sistema Zn/Al-Cl;
- Intercalação do antibiótico ciprofloxacino no HDL;
- Caracterização do produto sintético lamelar por difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia de Infravermelho (IV-FTIR) e Raman, Análise termogravimétrica e diferencial (TG-DTA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão com alta resolução (HR-TEM);
- Caracterização do HDL intercalado com fármaco o ciprofloxacino por DRX;
- Estudo *in vitro* do processo de liberação do ciprofloxacino intercalado no HDL. .

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BREVE HISTÓRICO

Na busca de novos materiais a partir de matérias-primas naturais, renováveis ou não, desde a antiguidade, a natureza tem sido a fonte de elementos, de onde o homem retira materiais para colaborar com a sua sobrevivência. Diante disso, pode-se observar a retirada de argilas e argilominerais, que estão presentes na constituição de solos e rochas, podendo encontrá-los em toda extensão superficial da terra. Esses materiais podem ser utilizados com vários propósitos e objetivos, sendo que historicamente já eram empregados em olarias para confecção de cerâmicas (RIBEIRO, 2008; SACHS, 1993).

O composto HDL também é denominado como “composto do tipo hidrotalcita” (do inglês: *hydrotalcite-like compounds*), nome dado as argilas aniônicas naturais (CARDOSO, 2006; RAJAMATHI et al., 2001). Ressaltando que a hidrotalcita é uma argila aniônica natural, encontrada em depósitos de águas subterrâneas ou como intempérie de produto de óxidos primários (CREPALDI e VALIM, 1998; GUIMARAES et al., 2000).

A mineralogia reporta minerais da classe das argilas aniônicas desde o início do século passado. Os principais relatos datam de 1926 (Kurnakov e Chernykh); 1930 (Aminoff e Broomè); 1933 (Read e Dixon) e 1941 (FrondeU). Porém, o primeiro relato da existência desses materiais ocorreu na Suécia em 1842, com a descoberta de um mineral branco que podia ser facilmente macerado resultando em um pó semelhante ao talco, o que deu origem ao nome hidrotalcita (CAVANI et al., 1991; DE ROY et al., 1991).

Os HDLs sintéticos foram preparados pela primeira vez por Feitknet em 1933 através de precipitação controlada de soluções aquosas contendo cátions metálicos com uma base, técnica que mistura os sais metálicos diluídos com a solução básica, denominada "*Doppelschichtstrukturen*", que significa estrutura de folha dupla. Entretanto, demorou para ser publicada a estrutura real da hidrotalcita, pelo fato destes materiais apresentarem propriedade não estequiométrica e da dificuldade para a obtenção de cristais suficientemente grandes para o estudo em monocristal (CAVANI et al., 1991; REICHLE, 1997). Após isto, outros métodos de preparação foram descobertos o que fez com que os HDLs passassem a serem produzidos em

grande escala, possibilitando extensas aplicações (BARAHUIE et al., 2014; MINGOS, 2006).

A hidrotalcita é um mineral hidratado contendo Mg, Al e  $\text{CO}_3^{2-}$  em sua fórmula geral. Sua fórmula,  $\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{16} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , foi apresentado pela primeira vez por Manasse, em 1951 (apud WANG, 2012). Esses compostos podem ser sintetizados em laboratório, ou até mesmo em escala industrial por inúmeros métodos, podendo produzir uma grande variedade de compostos (CAVANI et al., 1991; REICHLE, 1986).

A caracterização da estrutura dos HDLs foi elaborada por Allmann (1968) e Taylor (1969), que estudaram monocristais de piroaurita e esjorgrenita. São minerais similares em suas características estruturais, mas que podem ser diferenciadas por DRX (PALMER et al., 2009; FROST e ERICKSON., 2005). Um dos mais antigos materiais constituídos de componentes orgânicos e inorgânicos originou-se da indústria de tintas, onde se adicionavam pigmentos inorgânicos ( $\text{TiO}_2$ ) em misturas orgânicas, embora nessa época o termo “híbrido orgânico-inorgânico” ainda não fosse mencionado (JUDEINSTEIN e SANCHEZ, 1996).

O desenvolvimento científico e tecnológico que ocorreu durante o século XX permitiu o entendimento das razões para o uso e das propriedades das argilas e argilominerais (KIBBE, 2000; CARRETERO, 2002; HOYO, 2007). A primeira patente mencionada para compostos do tipo hidrotalcita surgiu em 1970. O material produzido por precipitação apresentava boa atividade catalítica para reações de hidrogenação. No mesmo período a empresa Bayer AG<sup>®</sup> iniciava a produção de  $\text{MgAl-CO}_3$ - HDL como antiácido e patenteou este material com o nome comercial de Talcid<sup>®</sup>. Atualmente outras empresas farmacêuticas produzem este mesmo material com a mesma finalidade (TRONTO, 2006a).

Um outro exemplo ocorreu em 1987, pesquisadores da Toyota<sup>®</sup> foram pioneiros a terem sucesso no desenvolvimento de materiais híbridos formados por sólidos inorgânicos e polímeros para aplicações estruturais em veículos. Obtiveram um nanocompósito combinando o polímero poliamida-6 e a argila montmorilonita organofílica que resultou numa patente, sendo este material empregado até os dias de hoje. Este compósito apresenta menor permeabilidade a gases e melhoria nas propriedades mecânicas e térmicas, além de aumentar a resistência à tração em cerca de 55%. Desde então, os trabalhos têm-se voltado para a obtenção e otimização dos nanocompósitos, com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas (BOTAN et al., 2011; LEBARON et al., 1999; USUKI et al., 1993).

Outras patentes têm sido registradas fazendo o uso dos HDLs (O'HARE e ASHLEY 2004; PARK et al., 2015). Patentes relatando o uso dos HDLs para liberação sustentada, por exemplo, de bisfosfonatos para o tratamento de osteoporose, dos HDLs contendo íons Fe(III) nas lamelas para tratamento de deficiência de ferro no organismo (SLAGHEK et al., 2007) e recentemente HDL para aplicação em cosmético (TRONTO et al., 2013b; STOCKEL, 2006).

Na atualidade existe um crescente interesse pelos HDLs, principalmente devido à grande versatilidade que estes materiais apresentam depois de intercalados ou funcionalizados, permitindo assim a aplicação destes em diversos campos da pesquisa e tecnologia (BOTAN, 2012; NOGUEIRA et al., 2012).

### 3.2 NOMENCLATURA

Existe uma grande variedade de nomenclaturas utilizadas para designar os HDLs (naturais ou sintéticos): argilas aniônicas, compostos do tipo hidrotalcita, compostos do tipo piroaurita, sais duplos lamelares, hidróxidos metálicos mistos, dentre outros (CREPALDI e VALIM, 1998; TRONTO, 2006; CAVANI et al., 1991).

O termo HDL tem sido mais utilizado nos últimos anos, e como os HDLs sintéticos não apresentam composições bem definidas, fica inviável a nomeação destes como argilominerais naturais (hidrotalcita, piroaurita, manasseita), tornando HDL o termo mais adequado (TRONTO, 2006).

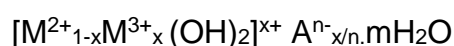
### 3.3 ESTRUTURA

Os HDLs são sólidos lamelares inorgânicos utilizados nas ciências química e farmacêutica como estabilizadores de fármacos e polímeros (MAI e YU, 2006; LEROUX et al., 2004), catalisadores (BRITO et al., 2009), moduladores de liberação de substâncias biologicamente ativas (GUNAWAN e XU, 2008; AMBROGI et al., 2001; YANG et al., 2003a), agentes adsorventes (PSHINKO, 2013), entre outras.

Para entender melhor a estrutura dos HDLs, é importante iniciar pela estrutura da Brucita. A brucita é composta por um mineral de  $Mg(OH)_2$ , na qual os cátions de magnésio estão localizados no centro dos octaedros, que possuem em seus vértices ânions hidroxila. Estes octaedros compartilham suas arestas formando camadas planas e neutras, que são mantidas juntas por ligações de hidrogênio. Quando, nesse tipo de

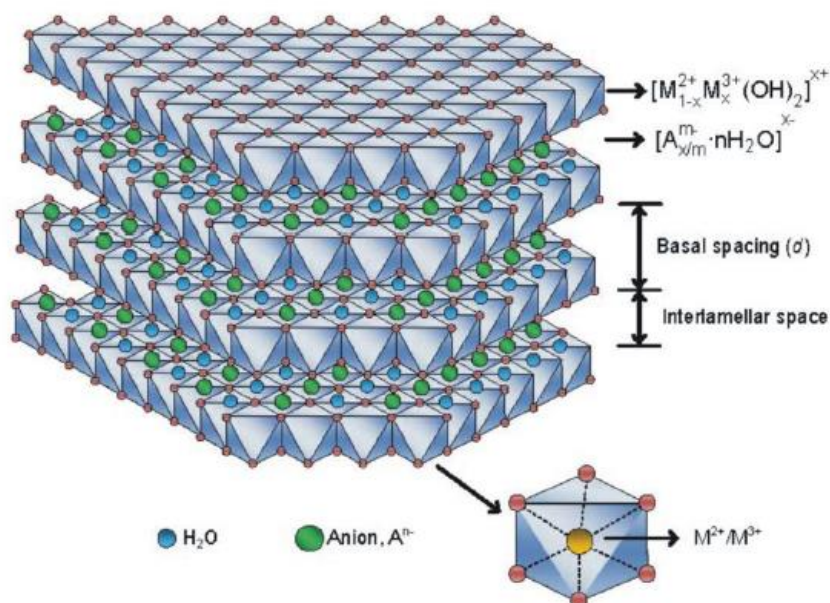
estrutura, cátions bivalentes são isomorficamente substituídos por cátions trivalentes, a lamela passa a apresentar uma carga residual positiva. Para que o sistema adquira a eletroneutralidade é necessária a presença de ânions entre as lamelas, que juntamente com moléculas de água promovem o empilhamento das camadas do hidróxido duplo com um domínio interlamelar pouco ordenado. Neste caso, as lamelas são mantidas juntas não apenas por ligações de hidrogênio, como no caso da brucita, mas pela atração eletrostática entre as lamelas positivamente carregadas e os ânions interlamelares (CAVANI et al., 1991; VACCARI, 1998).

Os diferentes octaedros compartilham lados para formar uma camada plana e infinita, como mostrado na Figura 1 (WYPYCH e ARÍZAGA, 2005). A estrutura formada pelo empilhamento de camadas positivamente carregadas com ânions ocupando o domínio interlamelar é comum a todos os HDLs, podendo ser representada pela seguinte fórmula (VACCARI, 1998):



Onde  $M^{+3}$  e  $M^{+2}$  representam cátions metálicos tri e divalentes, respectivamente, passíveis de ocuparem sítios octaédricos; e  $A^{n-}$  representa um ânion de compensação e  $x$  representa a razão molar (CONCEIÇÃO et al., 2007; SUAREZ et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do HDL.



Fonte: (BORDONAL, 2016).

Nos HDLs, o domínio interlamelar corresponde à região entre as camadas inorgânicas adjacentes. Estudos realizados por Roy et al., (1992), mostram que o domínio interlamelar apresenta uma natureza desordenada. Isso pode ser demonstrado pelas características físicas dos HDLs, como propriedades de troca iônica, mudanças no estado de hidratação e propriedades elétricas. Devido a estas propriedades, alguns autores consideram o domínio interlamelar como um estado quase líquido (CREPALDI e VALIM, 1997).

Várias combinações de cátions di e trivalentes são utilizadas para a síntese de HDL, por diferentes autores, variando também os métodos de síntese. Os cátions metálicos utilizados para estas sínteses de HDL devem possuir coordenação octaédrica e raio iônico na faixa de 0,50 – 0,74 Å, para que ocorra a formação da estrutura, semelhante à hidrotalcita natural (SUAREZ et al., 2004; CONCEIÇÃO et al., 2007). Para fazer parte da estrutura dos HDLs, os cátions metálicos  $M^{2+}$  e  $M^{3+}$  devem ser acomodados no centro dos octaedros formados pelos grupos hidroxila. Na Tabela 2 estão listados os valores de raios iônicos de alguns cátions di e trivalentes (CAVANI et al., 1991; INTISSAN et al., 2002; MORPURGO et al., 1996).

Tabela 2 - Raio iônico de alguns cátions (Å)

	<b>Be</b>	<b>Mg</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cd</b>	<b>Ca</b>
<b>M<sup>2+</sup></b>	0,30	0,65	0,69	0,72	0,74	0,74	0,76	0,80	0,97	0,98
<b>M<sup>3+</sup></b>	<b>Al</b>	<b>Ga</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>	<b>V</b>	<b>Ti</b>	<b>In</b>
	0,50	0,62	0,62	0,63	0,64	0,66	0,69	0,74	0,76	0,81

Fonte: (CARDOSO, 2006).

No caso do cátion  $Be^{2+}$ , seu raio é muito pequeno para se coordenar octaedricamente, de forma a resultar em lamelas do tipo da brucita. Já os cátions  $Ca^{2+}$  e o  $Ca^{2+}$  apresentam raios iônicos muito grandes para se acomodar na coordenação octaédrica. Todos os cátions metálicos divalentes a partir do  $Mg^{2+}$  até o  $Mn^{2+}$  podem formar HDLs com exceção do  $Cu^{2+}$ , que forma HDLs somente quando outro cátion divalente, contido na Tabela 2, estiver presente. Todos os cátions trivalentes, exceto  $V^{3+}$  e  $Ti^{3+}$ , podem formar HDLs (CAVANI et al., 1991; INTISSAN et al., 2002; MORPURGO et al., 1996).

A razão entre os cátions pode variar numa faixa de 1 a 8, a redução nesta razão implica no aumento da densidade de carga na lamela, uma vez que cada cátion trivalente é responsável pela carga positiva. Esse aumento da densidade de carga

resulta em um aumento na quantidade de ânion intercalado, sendo que, para cada cátion trivalente, deve ser intercalada uma quantidade equivalente de carga aniônica. Dessa maneira, uma das propriedades que a redução na densidade de carga na lamela proporciona é a capacidade de troca iônica. De maneira contrária, o aumento da razão resulta na redução da densidade de carga e, conseqüentemente, na redução da quantidade de ânions intercalados. Nesse caso, os ânions podem estar suficientemente espaçados (MARTIN e PINNAVAIA, 1986; MARANGONI, 2005a; MORPUGO et al., 1996).

A partir da fórmula geral, podem-se prever diversas combinações de cátions que podem formar HDL (Figura 2), sendo de extrema importância associar cátions com valores de raio iônico próximos (LIU, et al., 2006; SUN, et al., 2008).

Figura 2 - Combinações que formam HDL, relatada em patentes e literatura.

		$M^{2+}, M^+$												
		Mg	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ca	Sr	Be	Cd	Pb	Mn	Li
$M^{3+}$	Al													
	Cr													
	Fe													
	Co													
	Ni													
	Bi													
	Sb													
	Ga													
	In													
	V													
	Cr													
	Y													
	La													
$M^{4+}$	Ti													
	Sn													
$M^{6+}$	Mo													

Fonte: (BASU et al., 2014).

O HDL não precisa necessariamente ser constituído de apenas dois cátions metálicos. Morpurgo et al., (1996) sintetizaram vários HDLs formados pelos cátions divalentes de cobre, zinco e cobalto, com o alumínio trivalente. Em 1997, Crepaldi e Valim sintetizaram um HDL contendo uma mistura de magnésio e zinco como cátions divalentes e o alumínio como cátion trivalente (TOKIWA et al., 2009).



Na preparação do HDL, um fator de grande importância é a capacidade de estabilização da estrutura lamelar pelo ânion interlamelar. Quanto maior a capacidade de estabilização mais facilmente o HDL se formará. Não existem limitações para a intercalação, inúmeras espécies de natureza aniônica podem compensar as cargas positivas geradas pela substituição dos cátions das lamelas. As reações de intercalação são, usualmente, reversíveis e são também transformações pseudomórficas, uma vez que a integridade da estrutura cristalina “hospedeira” é mantida (COELHO e SANTOS, 2007; LYON et al., 2017).

### 3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A argila pode ser definida como materiais naturais, terrosos, de granulação fina (geralmente partículas com diâmetro inferior a  $2\ \mu\text{m}$ ) e formados por reações químicas entre silicatos hidratados de alumínio, ferro e magnésio, esta é a definição generalista e bem aceita por profissionais que trabalham com este material. Estes produtos naturais geralmente apresentam plasticidade em meio úmido e endurecimento depois de seco (SANTOS, 1989; MEYER et al., 2010).

Uma argila pode ser composta por um único argilomineral ou por uma mistura de vários deles. Além disso, as argilas podem ainda conter na sua constituição matéria orgânica, partículas de quartzo, pirita, sais solúveis, calcita, minerais amorfos e minerais residuais (BARBOSA et al., 2006). Além disso, usa-se o termo “material híbrido”, quando um desses compostos é inorgânico e o outro orgânico. Esta, no entanto, é apenas uma das definições, sendo que existem definições mais específicas. Uma destas classifica os materiais híbridos em duas classes quanto à interação entre as espécies orgânicas e inorgânicas:

Classe I: materiais híbridos que apresentam interações químicas fracas entre as duas fases, tais como interações de ligações de hidrogênio, Van der Waals ou interações eletrostáticas fracas;

Classe II: materiais híbridos que apresentam interações químicas fortes entre os componentes, tais como ligações covalentes e iônicas.

Vale ressaltar, que a fronteira que divide as duas classes é bastante tênue, ocorrendo materiais que apresentam características comuns às duas categorias (SILVA, 2010; KAUL et al., 2017).

Na literatura existem estudos de síntese de HDLs com os mais variados tipos de ânions, dentre eles estão haletos, tensoativos, carboxilatos e biomoléculas. A Tabela 3 apresenta alguns ânions que já foram intercalados nos HDLs.

Tabela 3 - Ânions intercalados em HDLs.

<b>Ânions</b>	<b>Tipos</b>
<b>Haletos</b>	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup>
<b>Oxo-ânions</b>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Cr <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , silicatos
<b>Ânions complexos</b>	[Fe(CN <sub>6</sub> ) <sup>-4</sup> ], [NiCl <sub>4</sub> ] <sup>-2</sup> , [IrCl <sub>6</sub> ] <sup>-2</sup> , [PtCl <sub>6</sub> ] <sup>-2</sup>
<b>Polioxo-metalatos</b>	Vanadatos, molibidatos, tungstatos
<b>Carboxilatos</b>	Tereftalatos e benzoatos
<b>Tensoativos</b>	Dodecil-sulfato, octil-sulfato, dodecilbenzeno-sulfonato
<b>Fosfatos e fosfonatos</b>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> PO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>
<b>Polímeros aniônicos</b>	Poli (acrilato) e Poli (estireno-sulfonato)
<b>Macrocielos</b>	Ftalocianinas e porfirinas
<b>Biomoléculas</b>	Peptídeos, ATP e DNA
<b>Compostos lamelares</b>	(Mg <sub>2</sub> Al(OH) <sub>6</sub> ) <sup>+</sup> [Mg <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub> /Si <sub>3</sub> AlO <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>

Fonte: (TRONTO, 2006).

Segundo Silva (2010), os ânions que podem ser intercalados, compensando a carga residual positiva das lamelas dos HDL, são muito variados e sua natureza é quase ilimitada. Porém, não é fácil a obtenção de tais materiais de forma pura e cristalina. Principalmente pelo fato de ser difícil evitar a contaminação de carbonato proveniente da atmosfera quando são preparados ânions diferentes. Isto se deve a capacidade do ânion a ser intercalado de estabilizar a estrutura lamelar. Quanto maior esta capacidade mais facilmente o HDL se formará (EDENHARTER E BREU, 2015).

### 3.5 PROPRIEDADES

Devido às diferentes composições e à variedade de métodos pelos quais podem ser produzidos, os HDLs apresentam um grande número de propriedades. Dentre as quais pode-se citar: estabilidade térmica, porosidade, área superficial, capacidade de troca iônica e efeito memória.

### 3.5.1 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica é uma das principais propriedades dos materiais sólidos. A decomposição térmica dos HDLs pode acontecer em quatro estágios (CREPALDI e VALIM, 1997; RODRIGUES, 2007):

I. No primeiro estágio de decomposição térmica, ocorre a eliminação das moléculas de água adsorvidas. As moléculas de água adsorvidas são eliminadas, geralmente, em uma faixa de temperatura que vai da temperatura ambiente até 100 °C.

II. No segundo estágio de decomposição térmica, ocorre a eliminação da água de hidratação. As moléculas de água de hidratação são eliminadas entre 100 e 200 °C.

III. A decomposição de grande parte dos grupos hidroxila, presentes nas folhas inorgânicas, e a perda do ânion interlamelar correspondem ao terceiro estágio. Os grupos hidroxila são eliminados por condensação, com a formação de moléculas de água. Esta etapa ocorre em temperaturas entre 300 e 500 °C.

III. Acima de 500 °C ocorre o quarto estágio com o colapso da estrutura lamelar, geralmente com a formação de um óxido ou um óxi-hidróxido. A decomposição de grupos hidroxila residuais ocorre em temperaturas na faixa de 600 a 700 °C.

A temperatura exata na qual ocorre cada estágio de decomposição térmica depende de alguns fatores, como a cristalinidade do HDL, a natureza dos cátions  $M^{(II)}$  e  $M^{(III)}$ , a relação entre eles e do ânion interlamelar.

### 3.5.2 Porosidade e área superficial

A área superficial está relacionada aos métodos e condições de síntese. Na literatura, os valores de área superficial específica para HDLs encontram-se na faixa de 50 a 80 m<sup>2</sup>/g, raramente ocorrem valores acima de 80m<sup>2</sup>/g. Nos HDLs intercalados com ânions orgânicos, geralmente, encontram-se valores de área superficial específica menores que os observados naqueles intercalados com ânions inorgânicos. Isso se deve à adsorção dos ânions orgânicos nos poros que se encontram na superfície dos cristalitos do HDL. A porosidade dos HDLs pode variar da faixa de microporos a de mesoporos (TRONTO, 2006; ANIRUDHAN e SUCHITHRA, 2008).

### 3.5.3 Capacidade de troca iônica

A capacidade de troca iônica é muito importante, pois possibilita a síntese de novos compostos. Esta propriedade depende da razão entre os cátions  $M^{(II)}/M^{(III)}$ , o que determina a densidade de carga da lamela do HDL e da cristalinidade do material. A capacidade relativa dos ânions em estabilizar a estrutura lamelar também deve ser considerada (TRONTO, 2006; RODRIGUES, 2007).

Quanto mais fraca for a interação do ânion com a lamela do HDL maior será a facilidade de troca iônica. Os HDLs contendo ânions carbonatos não são eficientes para a troca iônica, pois estes tornam as lamelas bastante estáveis, enquanto os que contem nitrato ou cloreto são bem adequados para esta finalidade (HOURI et al., 1999; PUTTASWAMY e KAMATH, 1997).

### 3.5.4 Efeito memória

Descreve a propriedade de regeneração da estrutura lamelar, característica apenas em HDL dos sistemas Mg-Al e Zn-Al intercalados com ânions que se decompõem termicamente (PUTTASWAMY e KAMATH, 1997).

O efeito memória consiste na reconstrução da estrutura do HDL a partir dos óxidos mistos de cátions divalentes e trivalentes (obtidos após calcinação do) em água ou em uma solução contendo o ânion que se deseja intercalar. Desde que os óxidos duplos lamelares possuam a capacidade de regenerar ou reconstruir a estrutura lamelar do precursor (RODRIGUES, 2007; VACCARI, 1998).

De forma geral, os HDLs possuem de quatro a cinco ciclos de regeneração-reutilização com níveis de remoções viáveis e adequadas (ANIRUDHAN e SUCHITHRA, 2008). Sendo que, após sucessivos ciclos, ocorre a redução do ordenamento estrutural e conseqüentemente redução da capacidade de adsorção e intercalação de ânions pelo composto produzido (CREPALDI et al., 2002).

## 3.6 ROTAS DE OBTENÇÃO

Os HDLs foram inicialmente descobertos como minerais existentes naturalmente, porém existem várias técnicas de síntese capaz de produzir HDL em laboratório a baixo custo (MINGOS, 2006). O método mais utilizado é o de

coprecipitação, porém vários aperfeiçoamentos deste método já foram realizados com objetivo de obter melhores resultados (MINGOS, 2006; WANG, 2012).

Entretanto, quando a síntese é realizada, inúmeros fatores devem ser considerados e controlados para que o produto final (HDL) tenha as propriedades requeridas. Dentre estes fatores, os mais importantes e com influência direta, são o grau de substituição de cátions divalentes por trivalentes, o pH da síntese, a natureza de cátions e ânions, a atmosfera utilizada durante a reação, concentração das soluções, velocidade de adição das soluções, pH final da suspensão obtida e temperatura utilizada durante a reação (MARANGONI, 2009b; RIVES, 2001b).

### **3.6.1 Síntese por coprecipitação**

De modo geral, o método da coprecipitação, envolve a mistura de uma solução básica e uma solução de sais de metal misto, iniciando o processo de nucleação, seguida pelo processo de crescimento dos cristais (CREPALDI e VALIM, 1998; WANG, 2012). Para garantir que dois ou mais cátions precipitem simultaneamente, é necessário que esta seja conduzida sob condições de supersaturação. Isto pode ser conseguido mantendo um valor de pH superior ou igual àquela em que as formas dos hidróxidos são mais solúveis (CAVANI et al., 1991). Um procedimento usando tratamento hidrotérmal após a coprecipitação é frequentemente necessário para aumentar o rendimento ou o ordenamento cristalino dos materiais amorfos ou mal cristalizado (REICHEL et al 1997; KIM et al., 2013).

### **3.6.2 Síntese por sal-óxido**

Este método consiste em fazer reagir uma suspensão de óxido do metal divalente com uma solução do sal formado pelo cátion trivalente e uma solução do ânion a ser intercalado. Este método foi empregado para a síntese de HDL dos sistemas Zn-Cr-Cl, Zn-Cr-NO<sub>3</sub>, Zn-Al-Cl, Zn-Al-NO<sub>3</sub>, apresentando bons resultados, porém possui limitações, uma vez que o óxido do cátion divalente necessita sofrer hidrólise lenta e o ânion que será intercalado deve formar um sal solúvel com o cátion trivalente e ser estável em meio ácido (CREPALDI e VALIM, 1998; BENÍCIO et al., 2015).

### **3.6.3 Síntese por sol-gel**

Neste método ocorre a reação de uma solução alcoólica, por exemplo o etóxido de magnésio, dissolvida em HCl com uma solução contendo tri-sec-butóxido de alumínio. A mistura é aquecida sob refluxo e agitada até a formação do gel. Os materiais preparados por este método apresentam tamanho de poros controlados e elevada área superficial específica. O método sol-gel apresenta a grande vantagem de produzir materiais mais puros (TRONTO, 2006a; LOPEZ et al., 1996; MORAIS, 2002).

### **3.6.4 Síntese hidrotérmica**

Esta síntese é sempre realizada em altas pressões e altas temperaturas e utiliza os cátions bivalente e trivalente sob a forma dos seus óxidos. São utilizadas as suspensões dos óxidos e uma solução do ácido, ou anidrido, cuja base conjugada se quer intercalar. Porém, não é muito empregada, devido a maior complexidade de preparação em relação a outros métodos (CREPALDI e VALIM, 1998; TRONTO, 2006).

### **3.6.5 Síntese eletroquímica**

Este método baseia-se na redução catódica de nitratos de metais, como por exemplo, soluções de nitrato de níquel e de nitrato do metal trivalente são colocadas em contato com um eletrodo de níquel metálico, sendo que o nitrato se reduz a nitrito levando à formação de hidroxila e precipitando o hidróxido duplo lamelar na superfície do eletrodo (CREPALDI e VALIM, 1998; CREPALDI et al., 1998; RIVES et al., 2000).

### **3.6.6 Síntese por troca iônica**

O método de troca aniônica simples pode ser conduzido de duas formas distintas. Existe a troca aniônica em solução no qual um HDL precursor, geralmente contendo ânions interlamelares cloretos ou nitratos, é colocado em contato com uma solução concentrada do ânion que se quer substituir no HDL. O ânion substituinte deve ser melhor estabilizante do domínio interlamelar e estar em maior proporção que

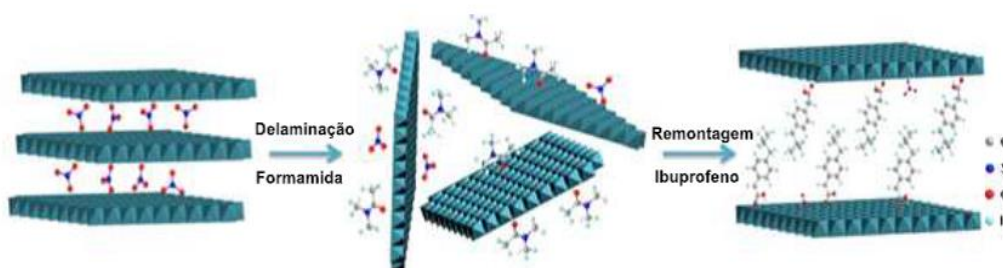
o ânion do material precursor, deslocando o equilíbrio em favor da troca. A principal desvantagem é a baixa eficiência de troca e a existência de impurezas resultantes do ânion precursor (REICHLE, 1986; DE ROY, 1992).

A troca aniônica em meio ácido se dá utilizando o HDL precursor contendo um ânion interlamelar capaz de sofrer um ataque ácido. Para isto é necessário suspender o HDL precursor e adicionar sobre esta suspensão uma solução do ácido cuja base conjugada se deseja intercalar. O pH da solução do ácido deve ser suficientemente baixo para protonar o ânion e substituí-lo, mas não para destruir a estrutura das lamelas e o precursor deve ter ânions suscetíveis a ataque ácido (carbonato ou carboxilado). Este método é muito eficiente, entretanto o ataque ácido pode provocar destruição parcial das lamelas. Ânions orgânicos também podem ser intercalados por este método, desde que sejam estáveis em meio ácido (CREPALDI et al., 1998; RIVES et al., 2000; BISH, 1980).

### 3.6.7 Método por esfoliação

Esse método vem sendo utilizado para a intercalação de biomoléculas, produção de catalisadores específicos, sensores, eletrodos, entre outros. Neste método, os HDLs são delaminados em algumas nanofolhas por tratamento em um solvente apropriado. Obtendo assim nanofolhas que são misturadas com ânions orgânicos para reempilhar as estruturas dos HDL. Um exemplo encontrado na literatura é a intercalação do ibuprofeno por esfoliação em HDL de MgAl, como mostra a Figura 3 (LU et al., 2013; CASTRO, 2009; MA et al., 2006).

Figura 3 - Representação do método de esfoliação na intercalação do ibuprofeno em HDL



Fonte: (LU et al., 2013)

Em geral é um método relativamente menos utilizado, porém apresenta algumas vantagens, por exemplo, a reação de hibridação ocorre rapidamente e a intercalação de moléculas de tamanho grandes é possível (KIM et al., 2013).

### 3.6.8 Síntese por reconstrução

A síntese por reconstrução, esta associada a uma propriedade do HDL, o efeito memória. Após a calcinação relativamente leve, a estrutura em camadas colapsa, porém, as estruturas dos HDLs podem ser regeneradas após a exposição a soluções aquosas ou a solução dos ânions orgânicos, como representado na Figura 4. As temperaturas dependerão dos metais  $M^{II}$  e  $M^{III}$  e dos ânions presentes na estrutura do HDL (MEYER et al., 2010; CUNHA, et al., 2010).



Fonte: (VIEIRA, 2009).

A reconstrução é atraente, pois é um processo simples e a área superficial obtida é relativamente alta. A hidrotalcita sofre transformação de fase para óxido metálico misturado ou óxido metálico em camadas, via desidratação sequencial, desidroxilação e descarbonatação, quando calcinada a uma temperatura adequada. Deformação cristalina parcial da folha de brucita, produz uma estrutura com aumento da área superficial específica. Assim, a reconstrução é amplamente explorada, pois facilita a eliminação massiva de ânions ou a incorporação de grandes biomoléculas. Porém, apesar da ampla utilização desse processo, ainda não há compreensão sobre quais propriedades físico-químicas do HDL afetam a área de superfície específica e o que acontece com as partículas dentro da estrutura durante a reconstrução (TARUTANI et al., 2015; FENG et al., 2014; PAHALAGEDARA et al., 2014).



### 3.6.9 Método mecanoquímico

A rota mecanoquímica costumava ser usada como método de modificação de material para obter partículas altamente dispersas e de alta energia de superfície. Esta abordagem ofereceu uma alternativa para a síntese e intercalação de HDL. Três diferentes processos mecanoquímicos foram explorados para sintetizar HDL: 1) moagem de um único passo; 2) mecano-hidrotermal; 3) dois passos moagem (moagem seca e úmida) (SALMONES et al., 2008; BUGATTI et al., 2013; WANG et al., 2013; KHUSNUTDINOV e ISUPOV, 2008; TONGAMP et al., 2008; IWASAKI et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ZENG et al., 2014).

A intercalação mecanoquímica de HDL podem ser fabricados pelas três maneiras a seguir: 1) líquido assistido: moagem de HDL com composto de intercalação; 2) moagem da matéria-prima com composto de intercalação e, em seguida, tratamento hidrotermal na fase líquida; 3) moagem de matérias primas amorfas com composto de intercalação e água, no segundo passo processo de moagem (KHUSNUTDINOV e ISUPOV, 2008; TONGAMP et al., 2008; IWASAKI et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ZENG et al., 2014).

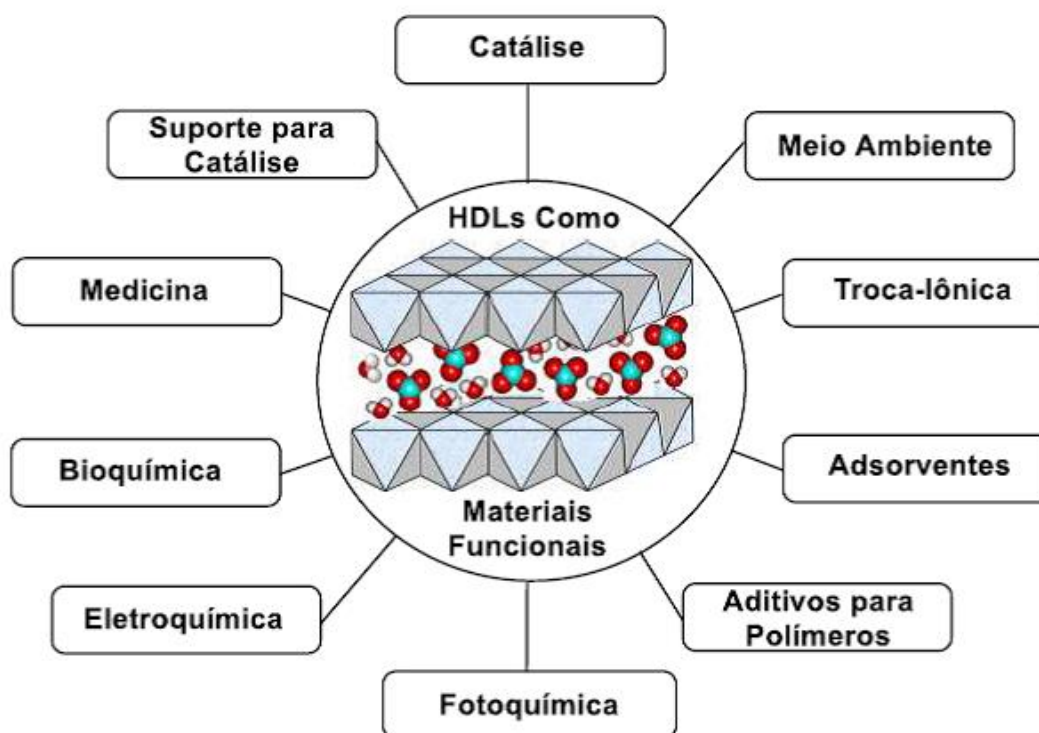
Esta rota se caracteriza como uma das formas mais simples de obtenção de HDL, com a vantagem de reduzir ao máximo o descarte de reagentes poluentes ao meio ambiente, como por exemplo, hidróxido de sódio. Um dos primeiros relatos desta rota, foi reportado por Chitrakar et al. (2007), que desenvolveu um processo de síntese sem o emprego de solvente, pois ao fazer um levantamento constatou que para se chegar ao HDL os métodos já existentes utilizavam uma solução alcalina para controlar o pH ou por vezes o material acabava por ser contaminado com CO<sub>2</sub>. Deste modo, conseguiu sintetizar Zn-Al-HDL (Cl), misturando mecanoquimicamente em relações molares Zn / Al de 2 e 3, moídas, e autoclavado a 150 °C em vasos de aço inoxidável revestidos com teflon (50 cm<sup>3</sup>) durante 1 dia. Rota que difere das demais, por se tratar de um procedimento manual.

Essa abordagem demonstra potenciais para superar as dificuldades relacionado à operação da solução, como as diferentes taxas de precipitação com regulação do pH. Pesquisas recentes sugerem que a síntese mecanoquímica será de grande importância na fabricação de HDL com novo elemento combinações e inserção de novas espécies de compostos no HDL (IWASAKI et al., 2012; ZHANG et al., 2012; ZHANG e LI, 2017; ZENG et al., 2014; PAVEL et al., 2017; QU et al., 2017).

### 3.8 APLICAÇÕES

Devido à facilidade em sintetizar HDLs a um custo relativamente baixo, um grande número de HDLs contendo uma ampla variedade de cátions tem sido sintetizado e aplicado em diversas áreas. Na figura 5 constam exemplos de aplicabilidades (ORTHMAN et al., 2003; AMBROGI et al., 2001).

Figura 5 - Possíveis aplicações do HDL



Fonte: (adaptação de MINGOS, 2006).

Devido sua ampla aplicação, o HDL é de grande interesse para a ciência da nanotecnologia como: catálise (CAVANI et al., 1991; LEI et al., 2011), fotoquímica (MUSUMECI et al., 2010), indústria farmacêutica (LI et al., 2004; PERIOLI et al., 2011), como adsorventes (PAVAN et al., 1999), eletrodos modificados (AY et al., 2008; YIN et al., 2009), pigmentos (LAGUNA et al., 2007) e aplicação no tratamento bucal (PERIOLI et al., 2013). Para o uso no meio ambiente, estudos apresentam os HDL intercalados como regulador de crescimento vegetal (HUSSEIN et al., 2002), no tratamento de água (ELKHATTABI et al., 2013; ZHANG et al., 2012) e com herbicidas (CARDOSO et al., 2006). Além disso, têm-se aplicações como retardadores de chama

(WANG et al., 2010), agente anticorrosivo (YANG et al., 2013), como sensores e eletrodos (LU e ZHAO, 2010; ZHANG et al., 2014).

### **3.8.1 Aplicação na área da saúde**

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem impactado nas diferentes áreas de pesquisa. Tal é o caso da biologia e da medicina. A convergência da nanotecnologia com outras disciplinas, como ciências dos materiais, biologia molecular, ciências farmacêuticas e medicina, resultou em uma revolução tecnológica que gera visualmente maior impacto sobre o futuro, devido as aplicações potenciais no diagnóstico e tratamento de enfermidades, a associação de muitas áreas em busca do mesmo objetivo, houve então a necessidade de identificação, classificação ou nomeação. Nasce então o conceito de nanomedicina. Em poucos anos, o termo "nanomedicina" ganhou grande popularidade, mas também foi acompanhado por um pouco de confusão e problemas de interpretação, razão pela qual a organização European Science Foundation, após intensos debates, estabeleceu a seguinte definição: nanomedicina é a aplicação de nanotecnologia para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e, portanto, a compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na origem e no curso de uma determinada doença, esta definição abrange as três principais áreas que a nanotecnologia deve satisfazer para fins médicos (DUNCAN e GASPAR, 2011; ROJAS-AGUIRRE et al., 2016).

1. Liberação de drogas e engenharia de tecidos: esta área se concentra no desenvolvimento de biomateriais nanoestruturados para construir sistemas que transportam e distribuem drogas de maneira controlada, ou combinando-se com a biologia celular, eles podem ser usados no campo da medicina regenerativa para reparar ou substituir tecidos ou órgãos danificados.
2. Diagnóstico: este ramo da nanomedicina, foca no uso de nanodispositivos com a finalidade de identificar uma patologia a nível celular ou molecular, por meio de nanosistemas de imagens ou nanobiosensores, os quais contém um componente biológico, capaz de detectar em tempo real e com alta sensibilidade.
3. Terapia e diagnóstico: aqui, procura-se projetar e aplicar nanomateriais que identifiquem a patologia e liberem moléculas terapêuticas simultaneamente e de maneira controlada (DUNCAN E GASPAR, 2011; AGRAHARI et al., 2017).

### 3.8.2 Aplicação na indústria farmacêutica (liberação de drogas)

Estudos do século XX realizados por Paul Ehrlich, bacteriólogo alemão, pai da quimioterapia, desenvolveram a “bala mágica”, que objetivava o tratamento contra a sífilis a partir de um preparado à base de arsênico, conhecido como neosalvarsan. Ideias primordiais sobre a possibilidade da ligação de um fármaco a um transportador que exibisse sua atividade terapêutica principalmente no tecido-alvo, e desde então, muitas pesquisas se voltaram para essa área (EHRlich, 1906; ROJAS-AGUIRRE et al., 2016).

A aplicação do HDL na área farmacêutica é de grande relevância, pois a liberação tradicional de fármacos preferida é via oral, uma vez que oferece aos pacientes menos dor na administração, melhor conveniência, maiores probabilidades de este aderir ao tratamento. Porém, está associada a uma série de desvantagens, relacionada à sua distribuição pelo organismo devido as suas propriedades físicas, como a solubilidade e coeficiente de partição e carga, podendo ocasionar uma atividade indesejada do mesmo, possibilitando que o fármaco possa alcançar zonas que não pertençam ao seu intervalo terapêutico, que o mesmo seja inativado, ou mesmo que sua ação seja indesejada ou nociva; resultando em efeitos colaterais sistêmicos (SÁEZ, 2003; PESSANHA et al., 2012; BU et al., 2015).

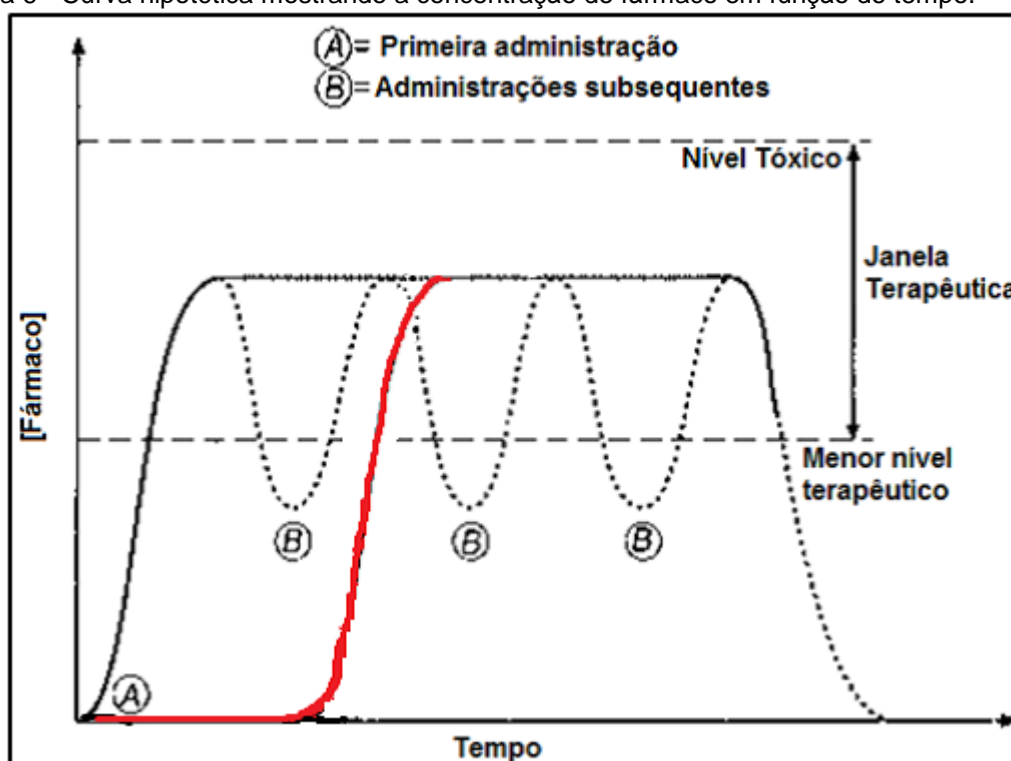
Busca-se modificar de forma eficiente a cinética e o local da liberação de um fármaco, pois nos sistemas de liberação convencional, o fármaco é liberado requerendo a administração de várias doses diárias. Isto acarreta altas concentrações do fármaco no sangue podendo chegar a níveis tóxicos, aumentando os efeitos colaterais do mesmo no organismo. Já a liberação controlada de fármacos implica a liberação do princípio ativo de forma gradativa no organismo, diminuindo a administração diária e minimizando os efeitos colaterais (CUNHA et al., 2010; GENNARO, 2004; AZEVEDO 2002).

Os sistemas de entrega são projetados para alterar a farmacocinética e a biodistribuição dos medicamentos associados ou para funcionar como reservatórios de medicamentos (ou seja, como sistemas de liberação sustentada) - ou ambos - e deve ter a capacidade de aumentar várias propriedades cruciais de drogas "livres", como melhorando sua solubilidade, estabilidade e especificidade *in vivo*, reduzindo ou eliminando danos nos tecidos, protegendo a droga ou aumentando sua eficácia (ALLEN e CULLIS, 2004; DE et al., 2008).

Fármacos de liberação controlada são todos aqueles que tem como objetivo fornecer uma dose terapêutica de uma droga para um local do corpo predeterminado, e manter esta concentração desejada, de modo controlado em velocidade e tempo apropriado, buscando também manter os níveis sanguíneos terapêuticos ótimos e evitar, a níveis plasmáticos, a problemática da toxicidade e/ou doses tóxicas. Desta forma, esse sistema permite que seja liberado gradativamente, a um ritmo ditado pelas necessidades do corpo, por um período específico de tratamento (CUNHA et al., 2010; PESSANHA et al., 2012; GENNARO, 2004; AZEVEDO 2002).

Segundo o livro de Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os tipos de liberação podem ser divididas em três modos: liberação convencional, prolongada ou sustentada, e liberação retardada ou adiada (Figura 6) (BRASIL, 2011).

Figura 6 - Curva hipotética mostrando a concentração do fármaco em função do tempo.



Sistema convencional (pontilhada); sistema de liberação prolonga ou sustentada (cheia); e sistema de liberação retardada ou adiada (vermelha) (BRASIL, 2011).

A liberação imediata, também chamada de convencional por outros autores, é o tipo de liberação de formas farmacêuticas que não são modificadas

intencionalmente por um desenho de formulação especial ou método de fabricação. Destina-se a liberar o fármaco, de modo que seja absorvido completamente e com rapidez pelo organismo, caracterizado pela formação de um pico plasmático, estes são representados pelos comprimidos (BRASIL, 2011; ANSEL et al., 2007; COLLETT e MORETON, 2005; VEIGA, 1988).

A liberação prolongada ou sustentada, é o tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que permite pelo menos uma redução na frequência de dose quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação imediata. É obtida por meio de um desenho de formulação especial ou método de fabricação. Mantem constante a concentração plasmática do fármaco por um período, geralmente, de 8 a 12 horas, intervalo de tempo maior que a forma imediata. Há uma prévia liberação de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração e subsequente a sustentação do efeito, através da liberação gradual e contínua do fármaco, por um tempo estendido (BRASIL, 2011; COLLETT e MORETON, 2005; LORDI, 2001).

Liberação retardada ou adiada, é o tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que apresenta uma liberação retardada do princípio ativo. As formas de liberação retardada prolongam o período de latência, ou seja, o intervalo de tempo entre a administração e a detecção do fármaco na corrente sanguínea. Dentre os objetivos da liberação retardada estão: (1) proteger a mucosa gástrica da ação irritante do fármaco; (2) proteger o fármaco da destruição pelo suco gástrico; (3) proteger fármacos melhor absorvidos em regiões definidas do intestino. Essas formas, que podem ser comprimidos ou cápsulas, geralmente, apresentam revestimentos gastro-resistentes, ou seja, revestimentos que permitem a passagem intacta do fármaco pelo estômago, portanto são denominadas de cápsulas ou comprimidos de “revestimento entérico” (MARANHO, 2000; BRASIL, 2011; ANSEL et al., 2007; SOARES, 1992).

Para isso a seleção de excipientes apropriados tem uma importância especial nas formulações farmacêuticas. Excipientes são substâncias auxiliares que estão presentes na formulação. Essas substâncias facilitam a administração do princípio ativo, melhoram a eficácia e asseguram um limite de estabilidade no uso pelo paciente. Em adição, devem possuir cheiro, gosto e coloração amenos. As argilas e argilominerais que satisfazem essas características foram inclusas no *Inactive Ingredients Guide* publicado por *Food and Drug Administration* dos EUA (WEINER e KOTKOSKIE, 1999; GIBSON, 2001).

A hidrotalcita sintética é produzida por diversas indústrias em vários países. A tabela 4 mostra uma lista das indústrias mais conhecidas que mencionam este tipo de substância em algum produto de seus catálogos e a quais países elas pertencem.

Tabela 4 - Lista de algumas indústrias que utilizam compostos do tipo hidrotalcita, marcas dos produtos e a que países elas pertencem.

<b>Marca</b>	<b>Empresa</b>	<b>País</b>
Talcid36	Bayer	Alemanha
Altacite Plus 37	Peckforton Pharmaceuticals	Reino Unido
Hydrotalcite41	Health Care Lab	China
Ultacid42	Sanofi-Aventis	Países Baixos
Actal43	Merck	Alemanha

Fonte: Adaptação de LIMA, 2017.

Portanto, as variedades de indústrias em diferentes países demonstram o reconhecimento do uso de hidróxidos duplos lamelares como componentes de seus produtos fabricados em escala industrial (LIMA, 2017; NALAWADE et al., 2009).

### **3.8.3 Antibióticos**

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (YANG et al., 2018; TENENBAUM et al., 2014).

Na tabela 5 há algumas datas de descobertas dos antibióticos e as bactérias das quais foram extraídas a substância.

Tabela 5 - Cronograma do desenvolvimento de antibióticos, resistência e resposta global.

<b>Ano</b>	<b>Antibiótico</b>
1928	Alexander Fleming descobre penicilina
1930	Prontosil, uma sulfonamida, é o primeiro antibacteriano comercialmente disponível
1940	Staphylococcus da penicilina-R identificados
1943	Florey e Chain eficientemente purificam e aumentam a produção de penicilina
1940-1962	Era de ouro da descoberta e produção de antibióticos
1950	Tetraciclina introduzida
1953	Eritromicina introduzida
1955	O uso de penicilina é restrito a prescrição apenas devido ao uso indevido generalizado
1959	Tetraciclina-R Shigella identificado
1960	metecilina introduzida
1962	Staphylococcus Methicillin-R identificados
1962	ácido nalidíxico introduzido (predecessor de fluoroquinolonas)
1965	Penicilina-R pneumococo identificado
1967	Gentamicina introduzida
1968	Streptococcus Eritromicina-R identificado
1972	introduzida vancomicina
1979	Enterococcus Gentamicina-R identificado
1985	Imipenem e ceftazidima introduzidos
1987	Enterobacteriaceae de Ceftazidime-R identificados
1988	Enterococcus Vancomicina-R identificados
1996	Levofloxacina introduzida
1996	pneumococo Levofloxacina-R identificado
1998	Enterobacteriaceae Imipenem-R identificado
2000	Linezolid introduzido
2000	XDR tuberculosis identificados
2001	Staphylococcus linezolid-R identificado
2001	OMS lança estratégia global para contenção da resistência antimicrobiana
2002	Staphylococcus Vancomicina-R identificados
2003	Daptomicina introduzida
2004-2005	PDR-Acinetobacter e Pseudomonas identificados
2008	NDM-1, o metalo-carbapenemase de Nova Delhi, observado em Enterobacteriaceae
2009	Ceftriaxona-R Neisseria gonorrhoeae e PDR-Enterobacteriaceae identificados
2010	Ceftaroline introduzido
2011	Staphylococcus Ceftaroline-R identificados
2013	Relatório do CDC sobre ameaças de resistência a antibióticos nos Estados Unidos
2014	OMS libera resistência antimicrobiana: Relatório Global sobre Vigilância
2015	WHO libera resistência aos antibióticos: pesquisa de conscientização pública em vários países
2015	WHO lança plano de ação global sobre resistência antimicrobiana

Fonte: (COSTA e SILVA JÚNIOR et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2010; MILANEZ et al., 2011).



Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivo e Gram negativo, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados  $\beta$ -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicilina). Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Este período é marcado pela modificação do mercado de antibióticos pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico (GUIMARÃES, 2010; FRANÇA et al., 2009).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural daptomicina pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2003. O derivado semi-sintético glicopeptídico dalbavancina encontra-se em fase III de triagens clínicas pelo FDA (ALIPOUR, 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (WALSH, 2003; XIONG et al., 2015).

A descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming em 1928 abriu a era moderna da inovação e desenvolvimento de antibióticos. Hoje, os antibióticos não são usados apenas como remédios para humanos, mas também são amplamente utilizados na pecuária e agricultura. Logo após a descoberta dos antibióticos, houve a identificação da resistência. Identificou-se a resistência do *Staphylococcus* à penicilina

mesmo antes da ampla produção do primeiro antibiótico em 1943. Pesquisas mostram que a diversidade genética requerida para este tipo de resistência não poderia ter surgido no período de tempo desde a introdução da penicilina. Esta descoberta indica que as bactérias provavelmente têm um efeito intrínseco, predileção por resistência armazenada dentro de seu genoma que tem avançado milhares de anos. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é, portanto, um processo natural e existiria com ou sem intervenção humana (NUNES, 2015; LI et al., 2012).

No entanto, desde a introdução da penicilina, a pressão de seleção do uso de antibióticos permite que esses mecanismos adaptativos bacterianos acelerem ainda mais a seleção de bactérias naturalmente resistentes ou mais virulentas. O uso inadequado de antibióticos em humanos, animais e à agricultura, exacerbou rapidamente a questão de resistência (NUNES, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

A resistência aos antibióticos é uma ameaça para os indivíduos, sistemas de saúde e veterinários, e indústrias agrícolas. O custo econômico total da resistência a antibióticos pode ser de US \$ 20 bilhões em excesso de custos diretos com planos de saúde, com custos adicionais para perda de produtividade de US \$ 35 bilhões. Estimativas do projeto do governo do Reino Unido sobre o custo da resistência a medicamentos gera em torno de US \$ 100 trilhões em todo o mundo até 2050, com um número de mortos de até 10 milhões por ano (KADOSAKI, 2012; GUIMARÃES, 2010).

Com o surgimento e propagação da resistência bacteriana, nanomateriais têm sido estudados como novos agentes antimicrobianos. A distribuição de fármacos mediada por nanopartículas permite melhorar o índice terapêutico. Este sistema de liberação de fármacos permite concentrações elevadas de fármaco no local de infecção e a presença de antígenos bacterianos induz uma resposta inflamatória. Este mecanismo promove significativamente a atividade antibacteriana (OLIVEIRA, 2014; DUCAN e GASPAR, 2011).

#### **3.8.4 Molécula de ciprofloxacino**

A classe das fluoroquinolonas é um grupo constituído por antimicrobianos sintéticos, ou seja, quimioterápicos, descoberto durante o desenvolvimento de um agente antimalárico, a partir de um composto chamado quinina. Estes quimioterápicos possuem ação bactericida e de amplo espectro, abrangendo tanto Gram positivos

quanto Gram negativos (ANDERSSON e MACGOWAN, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005). São classificadas baseadas em suas gerações, entretanto esta classificação é controversa entre diversos autores, mas seguindo a utilizada por LEE e KANATANI (1999) e BOLON (2011), representantes das quatro gerações podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Classificação de algumas quinolonas de acordo com as suas respectivas gerações.

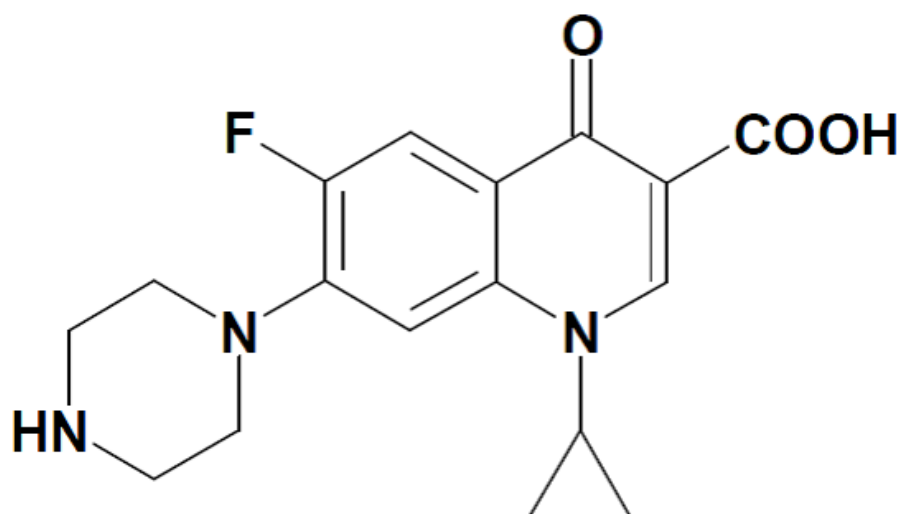
<b>Primeira Geração</b>	<b>Segunda Geração</b>	<b>Terceira Geração</b>	<b>Quarta Geração</b>
<b>Ácido Nalidíxico</b>	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
<b>Ácido Pipemídico</b>	Norfloxacina	Esparfloxacina	Trovafloxacina
	Ofloxacina	Grepafloxacina	Gemifloxacina
	Lomefloxacina		Gatifloxacina

Fonte: Adaptação de LEE e KANATANI (1999) e BOLON (2011)

As fluoroquinolonas foram introduzidas na clínica médica na década de 1980, assim chamadas devido ao acréscimo de uma molécula de flúor, na região do carbono -6, na fórmula química destes quimioterápicos. Segundo FALCÃO et al. (2003), as fluoroquinolonas são o terceiro grupo de antimicrobianos mais prescritos no Brasil. ROTSCHAFER et al. (2011) destacam seu elevado uso e eficiência em infecções do trato urinário e gastrointestinais.

Ciprofloxacina (Figura 7, desenvolvida pela Bayer, nome químico 1- ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7- (piperazin-1-il) -1,4- ácido di-hidroquinolino-3-carboxílico)- $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ , pertence a segunda geração de fluoroquinolona e exibe notável atividade antimicrobiana, excelentes propriedades farmacocinéticas e poucos efeitos colaterais, foram introduzidos na prática clínica para o tratamento de várias infecções bacterianas incluindo infecções respiratórias superiores e inferiores, e algumas infecções da pele, dos ossos, dos tecidos moles, bem como da pneumonia em torno de três décadas, e tem sido recomendada como os agentes de segunda linha da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento da tuberculose (TB), principalmente nos casos de resistência ou intolerância à terapia anti-TB de primeira linha (QUEIROZ et al., 2012; CUI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; LI et al., 2012).

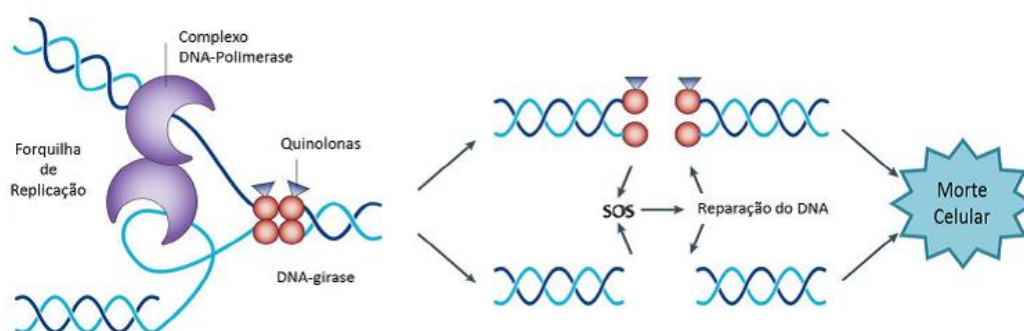
Figura 7 - Estrutura da molécula de ciprofloxacino



Fonte: ZHANGA et al, 2018.

As fluoroquinolonas agem inibindo a topoisomerase IV de bactérias Gram positivo e apresentam seletividade 1000 vezes maior para enzimas bacterianas em relação às enzimas correspondentes em células humanas. Em bactérias Gram negativo, o alvo das fluoroquinolonas é a topoisomerase II, também conhecida por DNA-girase, que apresenta as mesmas funções da topoisomerase IV. As DNA-topoisomerases mudam o número de ligações no DNA superenrolado através de quebras transitórias no DNA, que se torna topologicamente relaxado devido à quebra temporária em uma fita (tipo I) ou em ambas as fitas ao mesmo tempo (tipo II). Topoisomerases são essenciais para a viabilidade celular em células procarióticas e eucarióticas (BOLON, 2011; MEYAGUSKU, 2014) (Figura 8).

Figura 8 - Mecanismo de ação das fluoroquinolonas.



Fonte: (KOHANSKI et al., 2010).

As fluoroquinolonas distribuem-se amplamente nos tecidos e líquidos corporais e nas células. Penetram bem em esputo, fluido de vesículas experimentais, fluido pleural e prostático. As fluoroquinolonas com meia-vida mais longa têm menor penetração tecidual e celular (NEU, 1988). As fluoroquinolonas fluoradas são rapidamente absorvidas após a administração por via oral, sua absorção é intermediária, sua biodisponibilidade, seguida da administração oral, é geralmente superior a 80%. A presença de alimentos no estômago retarda a absorção da droga e o pico de concentração sérica aparece mais tardiamente e encontra-se mais baixo. A absorção oral é ainda reduzida pela administração concomitante de antiácidos à base de hidróxido de alumínio ou de magnésio e por outras drogas que decrescem o peristaltismo ou retardam o tempo de esvaziamento gástrico (ANDRIOLE, 1990; MEYAGUSKU, 2014; FRANÇA e KUSTER, 2009; OLIVEIRA et al., 2016).

As fluoroquinolonas são eliminadas principalmente pelos rins e pelo fígado. A eliminação renal envolve filtração glomerular e secreção tubular ativa. Este último mecanismo de eliminação pode ser bloqueado pela probenecida para a maioria das quinolonas (BERGAN, 1988; NEU, 1988).

O desenvolvimento de resistência bacteriana também tem sido observado com as fluoroquinolonas mais recentes. A exposição a concentrações crescentes das fluoroquinolonas resulta em cepas altamente resistentes de muitas espécies (NEU, 1988). A resistência ao ciprofloxacino é frequente por mutação das topoisomerasas bacterianas e se desenvolve lentamente em várias etapas. Que ocorre devido a mutações espontâneas com uma frequência entre  $<10^{-9}$  e  $10^{-6}$  (DIAS et al., 2010; LOPES, 2009).

A resistência bacteriana pode ser atribuída a vários fatores como: uso excessivo, indiscriminado e abusivo de antimicrobianos; facilidade de acesso ao composto antimicrobiano; antibioticoterapia empírica inadequada; uso errôneo em tratamentos não-infecciosos; entre outros fatores. Assa extensa eficácia e o amplo espectro de ação das fluoroquinolonas contribuíram para o aumento da sua utilização e recomendação médica, e também para o aumento da resistência bacteriana (BOLON, 2011; COSTA e SILVA JÚNIOR et al., 2017).

Os efeitos colaterais mais comumente encontrados com o uso terapêutico das fluoroquinolonas constituem os relacionados com o trato gastrointestinal (3 a 6%) e incluem náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dispepsia e flatulência (OUTMAN & NIGHTNGALE, 1989). Os efeitos colaterais relacionados com o sistema nervoso

central (SNC) ocorrem em seguida (1 a 4%). Para uma avaliação racional da neurotoxicidade das quinolonas, é importante separar as reações leves sobre o SNC das reações consideradas graves ou severas, que requerem a interrupção da terapêutica. Muita precaução deve ser tomada com o uso das fluoroquinolonas em pacientes idosos, especialmente portadores de arteriosclerose, e aqueles com distúrbios neurológicos, incluindo: epilepsia, instabilidade mental preexistente, parkinsonismo, insuficiência vascular cerebral e nos pacientes com história de episódios psicóticos e de esquizofrenia. As convulsões têm sido raramente registradas. Gestantes não devem fazer uso durante a amamentação e também pacientes com história de hipersensibilidade a um dos quinolônicos (WOLFSON e HOOPER, 1985; REESE e BETS, 1990).

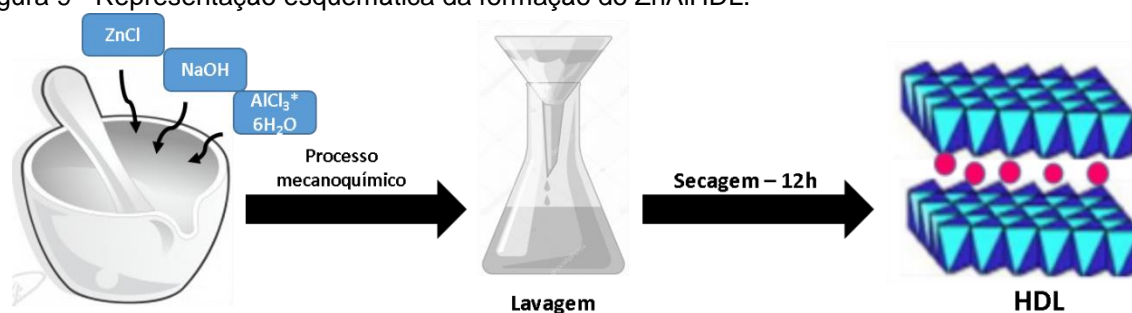
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ROTAS SINTÉTICAS

#### 4.1.1 Síntese de HDL no sistema ZnAl-Cl pela rota mecanoquímica

O HDL obtido neste trabalho utilizou o método mecanoquímico de modo análogo ao descrito por Ay et al (2009) com modificações (Figura 9). Para isto, 1,92 g de ZnCl (DINÂMICA®) foi adicionado para uma mistura de 2 g de NaOH (DINÂMICA®) e 1,88 g de AlCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O (LAFAN®) variando a razão molar (Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>), conforme a formula do HDL Zn<sub>0.67</sub>Al<sub>0.33</sub>(OH)<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0.65</sub>·xH<sub>2</sub>O. O produto final foi lavado com 300 mL água miliQ, secado a temperatura ambiente por 12 horas e codificado de acordo com a razão investigada. Resultando em ZnAlHDL1.65, ZnAlHDL1.75, ZnAlHDL 1.85, ZnAlHDL 1.95, ZnAlHDL 2.00, ZnAlHDL 2.10 e ZnAlHDL 2.2.

Figura 9 - Representação esquemática da formação do ZnAlHDL.

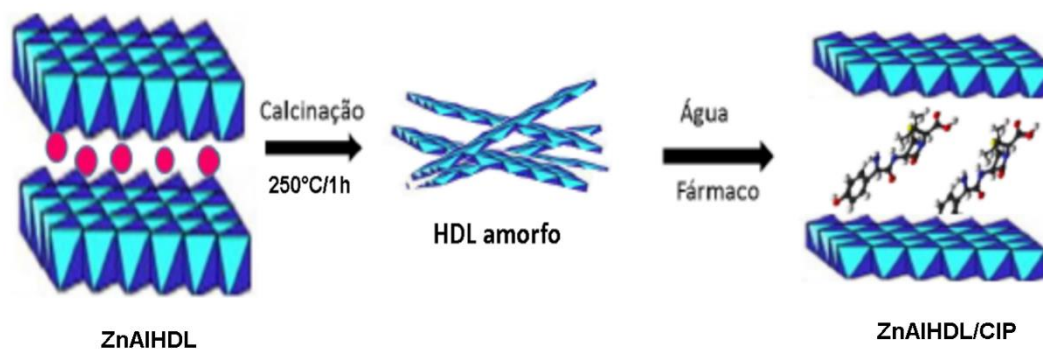


#### 4.1.2 Síntese de intercalação do HDL com ciprofloxacino

Para intercalação do antibiótico ciprofloxacino, utilizou-se o método de reconstrução descrito por Meyer et al., (2010) com algumas adaptações (Figura 10). Primeiramente realizou-se um estudo sobre o comportamento termal da amostra ZnAlHDL (item 5.1.4), para que assim fosse possível gerar o desordenamento da estrutura do material. Após esta pesquisa, foi realizado o aquecimento da amostra a 250°C por 1h, em estufa (NOVA ÉTICA®) e deixada em ar ambiente até esfriar. Em um erlenmeyer de 500ml, foi adicionada 1g da amostra ZnAlHDL amorfo, 500mg de ciprofloxacino (PHARMANOSTRA®) e 100ml de água miliQ, em um agitador

magnético a 1200 rpm (LUCADEMA®), durante 72 horas. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 3000g/10min (NOVATECNICA®), descartado sobrenadante, e o precipitado foi colocado para secar em estufa a 45°C (NOVA ÉTICA®). A amostra foi nomeada de ZnAlHDL/CIP.

Figura 10 - Ilustração do processo de intercalação do ZnAlHDL com ciprofloxacino.



## 4.2 ESTUDO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO ZnAlHDL-CIP

### 4.2.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) - preparo do inóculo bacteriano

Procedeu-se à triagem da atividade antimicrobiana de acordo com a recomendação da National Committee for Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2018). Foram utilizadas cepas padrões (*Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19429) mantidas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde Coletiva (ISCO) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Os microrganismos estavam armazenados em disco nutriente ágar inclinado (AN) e mantidos à temperatura de 4° C. Repicaram-se os microrganismos estocados em caldo infusão de cérebro coração (BHI) e procedeu-se a sua incubação a 37°C por 24 horas para a reativação. Após turvação do caldo BHI, realizou-se novo repique em AN e incubação a 37°C por 24 horas para a preparação das suspensões microbianas. As suspensões foram obtidas pela adição do inóculo bacteriano a 2,0 mL de solução de NaCl (FISCHER CHEMICAL®) 0,85M esterilizada ajustada a 0,5 na escala de MacFarland, com auxílio de um espectrofotômetro (SCIENTIFIC® - LGI-VS-

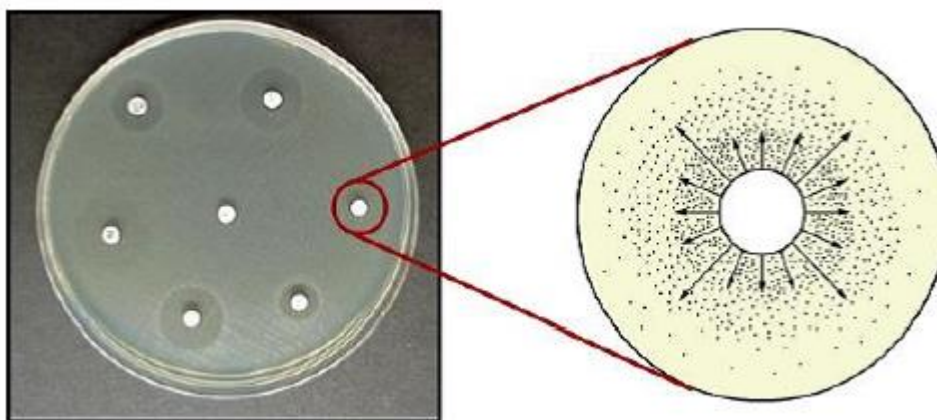


721N), correspondendo a absorvância de 0,284 D.O em comprimento de onda de 540 nm equivalente à  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

#### 4.2.2 Método de disco-difusão

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966, por Kirby e Bauer. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. No método de disco-difusão, discos de glass fiber filters com 6mm impregnado com uma concentração conhecida de um composto antimicrobiano é colocado na placa de ágar Mueller-Hinton (MH). O antimicrobiano se difunde no ágar de acordo com as propriedades de difusão, solubilidade e peso molecular do composto. Juntos, esses fatores resultam em valores de inibição únicos, formando halos de suscetibilidade do antimicrobiano (CLSI, 2018; SEJAS et al., 2003).

Figura 11 - Crescimento da bactéria na placa e seu halo de inibição.



Fonte: Adaptação CLSI, 2018.

Ao inocular a placa de MH com uma suspensão do agente patogênico, o crescimento do microrganismo ocorre simultaneamente com a difusão do composto antimicrobiano. O momento em que a bactéria atinge o seu crescimento na placa é demonstrado por um halo de inibição definido em torno do disco. A concentração do antimicrobiano na borda do halo é relacionada à concentração da droga no processo de difusão a partir do disco e sua interpretação leva em consideração a concentração de droga que define sensibilidade ou resistência microbiana, do ponto de vista clínico (SEJAS et al., 2003).

No teste de difusão em disco foram testados 100 µg das amostras testes diluídos em solução salina NaCl 0,85M com concentração de 10 mg/ml. Em discos de glass fiber filters (AXIVA®) 6 mm de diâmetro foi dispensado 10µl de ZnAlHDL/CIP e cloridrato de ciprofloxacino (PRATTIDONADUZZI®) - ATB/CDC correspondendo ≈ 33,3 e 65,3 µg de antibiótico, respectivamente. Foram utilizados discos somente com HDL como controle negativo e como controle positivo discos impregnados com a concentração padrão de 5 µg de ciprofloxacino (PHARMANOSTRA®). Todas as amostras foram feitas em triplicata, para e detecção da reprodutibilidade dos resultados. A sensibilidade das bactérias ao antibiótico a partir de seu halo de inibição foi avaliada segundo a tabela CLSI e classificado em sensível, intermediário ou resistente (Tabela 7) (CLSI, 2018).

Tabela 7 - Sensibilidade das bactérias ao ciprofloxacino – disco-difusão.

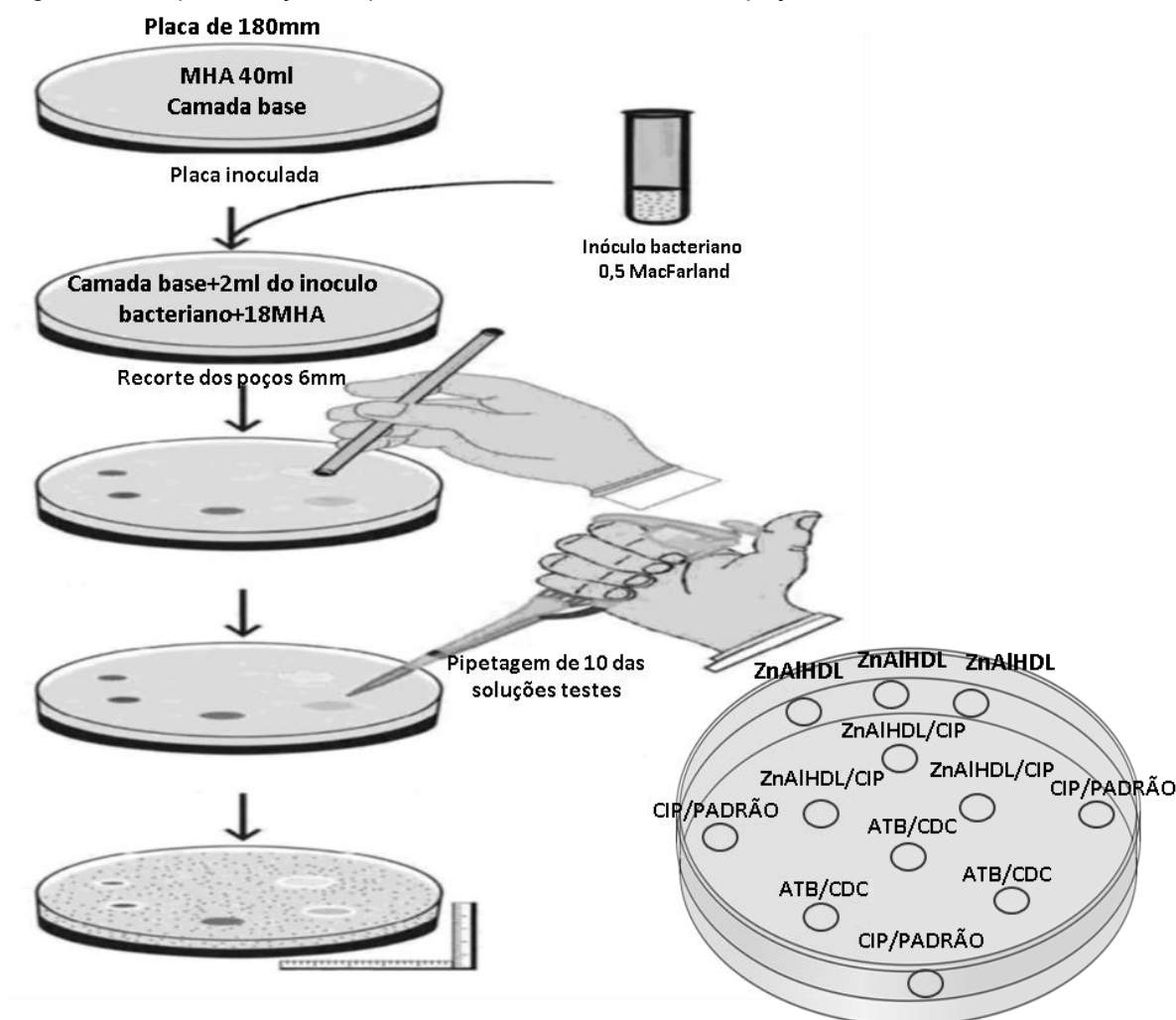
Agente	Código	Discos	Halos de Inibição (mm)		
			R*	I*	S*
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>CIP</b>	5µg	≤15	16-20	≥21

R\* resistente; I\* intermediário; e S\* sensível. Fonte: (CLSI, 2018).

#### 4.2.3 Método de difusão em poço

Baseia-se na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal que o crescimento do micro-organismo agregado se detenha em uma área circular ou “zona” ao redor do cilindro que contém a solução testada. O método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (transmitância ou absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados ao composto contido em um meio com a solução teste, sendo que a resposta do microorganismo é diretamente proporcional à concentração da substância (ESMERINO et al., 2004; CLSI, 2018; VIEIRA, 2013).

Figura 12 - Representação esquemática da técnica de difusão poço.



Fonte: Adaptação GELINSKI et al., 2007.

Em placas de Petri de 180 mm estéreis, verteu-se 40 mL de ágar MHA (SIGMA-ALDRICH®), obtendo-se assim a camada-base. Após a solidificação, adicionou-se 2,0 mL da suspensão bacteriana a 18,0 mL de MHA aquecidos a cerca de 45°C e vertidos sobre a camada-base. Em seguida, confeccionaram-se poços/orifícios de 6,0 mm de diâmetro em pontos equidistantes, colocando-se neles 100 μg de ZnAIHDL/CIP e/ou ATB/CDC ou 10 μL da solução fisiológica da amostra de 10mg/ml (Figura 12). Foram realizados controles com poços contendo solução de HDL na mesma concentração teste e CIP/PADRÃO na concentração teste de 5 μg. As placas foram pré-incubadas à temperatura ambiente durante duas horas e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, mensuraram-se as zonas de inibição com o auxílio de régua milimetrada, no que diz

respeito ao halo (diâmetro da área com ausência de desenvolvimento microbiano) (CLSI, 2018).

De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo foi utilizado o HDL em solução salina (Tabela 8) (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

Tabela 8 - Sensibilidade das bactérias as formas farmacêuticas de CIP – difusão em poço.

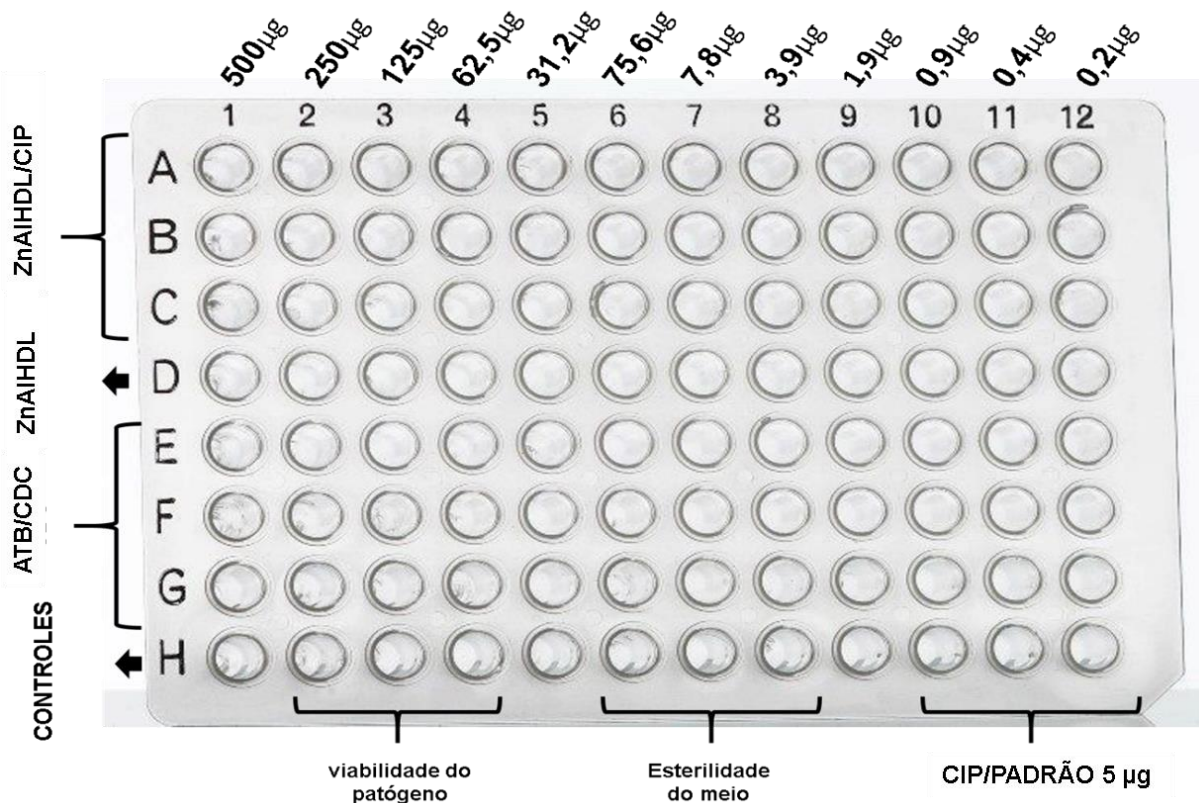
Agente	Halos de Inibição		
	R*	I*	S*
<b>Ciprofloxacino</b>	≤ CIP/PADRÃO	2 ≥ CIP/PADRÃO	≥ 3+CIP/PADRÃO

R\* resistente; I\* intermediário; e S\* sensível. Fonte: (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

#### 4.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, como preconizado pela CLSI (2018). A determinação da CMI, para cada microrganismo, foi realizada frente em placas de micro diluição com 96 poços (KASVI®), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). As colunas de 1 a 12 foram destinadas a diluição seriada, sendo as linhas A, B e C para a análise da ação do ZnAIHDL/CIP; a linha 4 foi utilizada para a análise do ZnAIHDL; as linhas 5, 6 e 7 foram utilizadas para o padrão ATB/CDC 500mg/cp (PRATI DONADUZZI®); e a linha 8 destinada aos controles: viabilidade do patógeno, esterilidade do meio, CIP/PADRÃO (TSA) (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática da técnica de microdiluição em placa.



Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100 µL das suspensões bacterianas ajustadas na escala 0,5 de MacFarland em caldo BHI. Em seguida, inseriu-se 100 µL da concentração inicial de 10 mg/mL na primeira coluna da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes foram obtidas após diluição seriada da ZnAIHDL/CIP, HDL/CDC e ATB/CDC na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 500 µg (Coluna 1) até 0,24 µg (Coluna 12), pela transferência de 100 µL do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da coluna 12, foram dispensados 100 µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total de cada poço. As microdiluições foram levadas para incubadora de microplacas termo-shaker (AGIMAXX AS-MD4AK1138E) por 24 horas. Após o período de incubação, o método colorimétrico com resazurina sódica (SIGMA®) 0,01% foi utilizado, aplicando-se 20 µL da solução em cada poço e esperando-se uma hora para realizar a leitura visual dos resultados. A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, tornando possível determinar a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores diluídos. É considerada o indicador mais utilizado em

condições de redução em meios de cultura. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), mostrado. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000; FUKUSHIMA et al., 2003).

Para a análise da atividade bactericida ou bacteriostática da CMI, foi realizado o subcultivo dos poços em placas de petri contendo MHA, incubadas em estufa a 37°C com leitura em 24 horas.

#### **4.2.5 Teste de liberação controlada**

Para observar a atividade antibacteriana do material intercalado com ciprofloxacino com propriedade de liberação controlada, foi utilizado o método descrito por Ryu et al., (2010), com adaptações. O método de difusão de poço (item 3.2.3) programado no tempo, 24, 48, 72 e 96 horas, foi realizado em solução de NaCl a 0,85M. ZnAIHDL, ATB/CDC e CIP/PADRÃO também foram empregados como controle (Figura 12). O processamento e análise dos dados foram realizados no software R Core Team (2017) 3.4.2, por meio da plataforma RStudio.

#### **4.2.6 Ensaio time-kill**

A técnica foi proposta por Hemmer e colaboradores em 1979. *Time-Kill* é um ensaio no qual é avaliada a evolução de uma população de microorganismos aeróbios num período de tempo específico, quando testado frente a agentes antimicrobianos (CLSI, 2018). O ensaio *time-Kill in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M26-A do CLSI e avaliado a partir da CMI determinada nos testes de microdiluição e duas vezes a CMI. Adicionalmente, foram feitos o controle de crescimento do inóculo bacteriano (C.V.E.C), controle de esterilidade do meio de cultura utilizado como branco da amostra e controle positivo com ATB/CDC na mesma concentração que o intercalado ZnAIHDL/CIP para *Escherichia coli*. Para realização dos experimentos, o foi padronizada uma suspensão com a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL).

O ensaio é realizado em tubos de ensaio adicionando-se 950µL de solução fisiológica, acrescidos de 50µL de ZnAIHDL/CIP e/ou ATB/CDC em seguida

homogeneizados. Após este procedimento 50µL desta solução (NaCl + substância-teste) são desprezados, e então é adicionado do pré-inóculo padronizado (50µL em cada tubo). Posteriormente, 100µL desse homogeneizado é adicionado em 900µL de caldo BHI e incubados em tempos de 0, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas e realizada a análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura microbiana no comprimento de onda de 600 nm. O controle de esterilidade do meio foi utilizado 1 mL de BHI puro e dar auto-zero para descontar a cor do mesmo (branco do teste). Logo que o pré-inóculo foi acrescentado ao meio, verificou-se a ABS inicial, que corresponde ao tempo zero na curva de crescimento do C.V.E.C. A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração celular. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a percentagem de luz não desviada (transmitância, T) é medida por recurso a um espectrofotómetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade ( $I_0$ ) da luz incidente e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular. A D.O da cultura corresponde à Absorvância, que é determinada com base na expressão  $D.O = \log (I_0/I)$ , onde  $I_0$  é a intensidade da luz incidente e  $I$  é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Este método é especialmente utilizado quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento ou para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da D.O. Contudo não permite distinguir entre células viáveis e células mortas.

Para a obtenção direta dos valores absolutos de concentração de células bacterianas, as amostras foram semeadas em placas de petri por Pour-plate ou disseminação (método em profundidade) em meio de chromocult coliform agar (MERCK®), meio diferencial para *Escherichia coli* possibilitando detectar uma contaminação microbiana. Transferiu-se 1 ml da cultura para placa de Petri vazia, verteu-se 10 – 20 ml do meio fundido (e resfriado a cerca de 45 – 50°C) sobre a cultura e homogeneizar suavemente com movimentos circulares. O plaqueamento ocorreu nos tempos pré-determinados para *Escherichia coli*. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação as colônias foram contadas manualmente, obtendo-se assim a concentração de UFC/mL. O processamento e análise dos dados

foram realizados no software Excel (2017), utilizando as equações para determinação dos parâmetros de crescimento, que são:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

Onde N= número final de células;  $N_0$ = número inicial de células; n= número de gerações.

$$n = \frac{\log(N) - \log(N_0)}{0,301}$$

$$G = t/n$$

onde G= tempo de geração t= tempo de crescimento n= determinado acima.

### 4.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 4.3.1 Difração de raios X (DRX)

O DRX corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. A formação de materiais cristalinos, assim como a medida das distâncias basais dos HDL pode ser determinada por meio da difração de raios X no pó (DRXP). O padrão de DRX de um HDL apresenta picos basais relacionados com a sequência de empilhamento das lamelas (CAVANI et al., 1991; DE ROY et al., 1992; FORANO et al., 2006). Os picos que não são basais, ditos como não harmônicos, estão relacionados com a estrutura das lamelas. Para os HDLs, a indexação dos picos de difração pode ser realizada por comparação com difratograma da hidrotalcita, existentes no banco de dados dos equipamentos de difração ou com uma série de outros HDLs descritos na literatura (ABNT, 1987).

As análises deste trabalho, foram realizadas na forma de pó em um equipamento da marca Bruker modelo D2 PHASER - disponível no Laboratório de Síntese e Caracterização de Novos Materiais (LSCNM) do Instituto de Engenharia e Geociências (IEG - UFOPA) - utilizando radiação de Cu ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), com passo de 0,02 corrente de 10 mA, voltagem de 30 kV, utilizando um detector Lynxeye (192 canais), fenda divergente de 0,2 mm, tempo de 0,3 s, anti-airscatteringscreen de 1 mm. Os espaçamentos basais das amostras foram calculados através da Lei de Bragg ( $n\lambda = 2d\sin\theta$ ), sendo n um número inteiro,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente (Cu), d é a distância entre os planos e  $\theta$  é o ângulo de incidência. As identificações dos minerais foram feitas com auxílio dos softwares X'pert e PDF



(Powder Diffraction), com banco de dados do ICDD (International Center for Diffraction Data).

#### **4.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-FTIR)**

A IV-FTIR se baseia na observação das ligações químicas. Apresentam frequências específicas às quais vibram, a níveis de energia bem definidos. Estas frequências de vibração são determinadas pela fórmula das moléculas, pelos seus níveis de energia e pela massa dos átomos que a constituem. De modo, que cada frequência da vibração pode ser associada a um tipo específico de ligação química, podendo assim, avaliar as principais interações nos mais diferentes materiais. As amostras deste estudo foram analisadas utilizando-se pastilhas prensadas a vácuo contendo 0,200 g de KBr e 0,0013 g de amostra pulverizada e um espectrômetro de absorção molecular na região IV-FTIR da Bruker, modelo Vertex 70.

#### **4.3.3 Espectroscopia Raman**

A espectroscopia de Raman permite a identificação de minerais de maneira rápida e sem preparação preliminar, bastando que eles possam ser colocados sob a lente objetiva de um microscópio óptico acoplado a um espectrômetro Raman. A identificação dos minerais é baseada em propriedades físicas intrínsecas à estrutura cristalográfica e à composição química, que permitem uma identificação segura, tanto em amostras de dimensões de vários centímetros, como em inclusões de poucos micrômetros na superfície da gema ou pouco abaixo dela (subsuperficiais).

Os espectros de Raman foram registrados usando um microscópio anexado a um espectrômetro de tripla grelha, o TG4000 de Yvon. A linha de 510,5 Nm de laser de íon de estado sólido foi usada como excitação e as fendas do espectrômetro foram estabelecidas para uma resolução de  $2\text{cm}^{-1}$ . Nenhum analisador foi usado para experiência de alta pressão. Então para atingir altas pressões, as amostras foram carregadas em um diamante célula bigorna II- Scope CAD (S) de Amax easyLab, com diamante de 0,4mm de culets. Uma gaxeta do aço inoxidável com uma espessura de 200, foi previamente recuada para 50um, e um furo de 100 foi perfurado no centro do recuo usando uma máquina de descarga elétrica de Amax easyLab. O Nujol serviu

com a mídia transmissora de pressão. As pressões foram medidas com base nas mudanças de fluorescência, nas linhas Ruby r1 e R2.

#### **4.3.4 Análise termogravimétrica e diferencial (TG-DTA)**

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada. Os resultados são obtidos na forma de curvas de decréscimo de massa (%) em função da temperatura (°C). As curvas de Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) foram obtidas num termoanalisador da Netsch de forno cilíndrico vertical. As análises foram feitas em um cadinho de platina, com aquecimento de 15°C/min, temperatura inicial e final variando de 25°C a 1100°C, respectivamente.

#### **4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para as análises de MEV, as amostras de HDLs são dispersas na forma de pó em um porta amostra de Al. Por não apresentarem condutividade elétrica suficiente para gerar boas imagens, antes da realização das medidas, uma cobertura de Au ou C é aplicada sobre as amostras que são depositadas no porta amostras. Neste estudo, foi utilizado um microscópio LEO-Zeiss, 430 Vp, em condições de análise utilizando imagens secundárias obtidas a 20 kV, com distância de trabalho de 11 mm.

#### **4.3.6 Microscopia Eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM)**

A HR-TEM foi realizada, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em um equipamento TECNAI G2-20-FEI, com canhão termiônico de filamento de LaB6, sendo a tensão aplicada de 200 kV, com resolução de linha de 0,24 nm e de ponto 0,10 nm, aumento de 25x a 1.100.000x. A HR-TEM permite a análise de características microestruturais dos compostos produzidos, particularmente morfologia e propriedades estruturais, quando em alta resolução.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

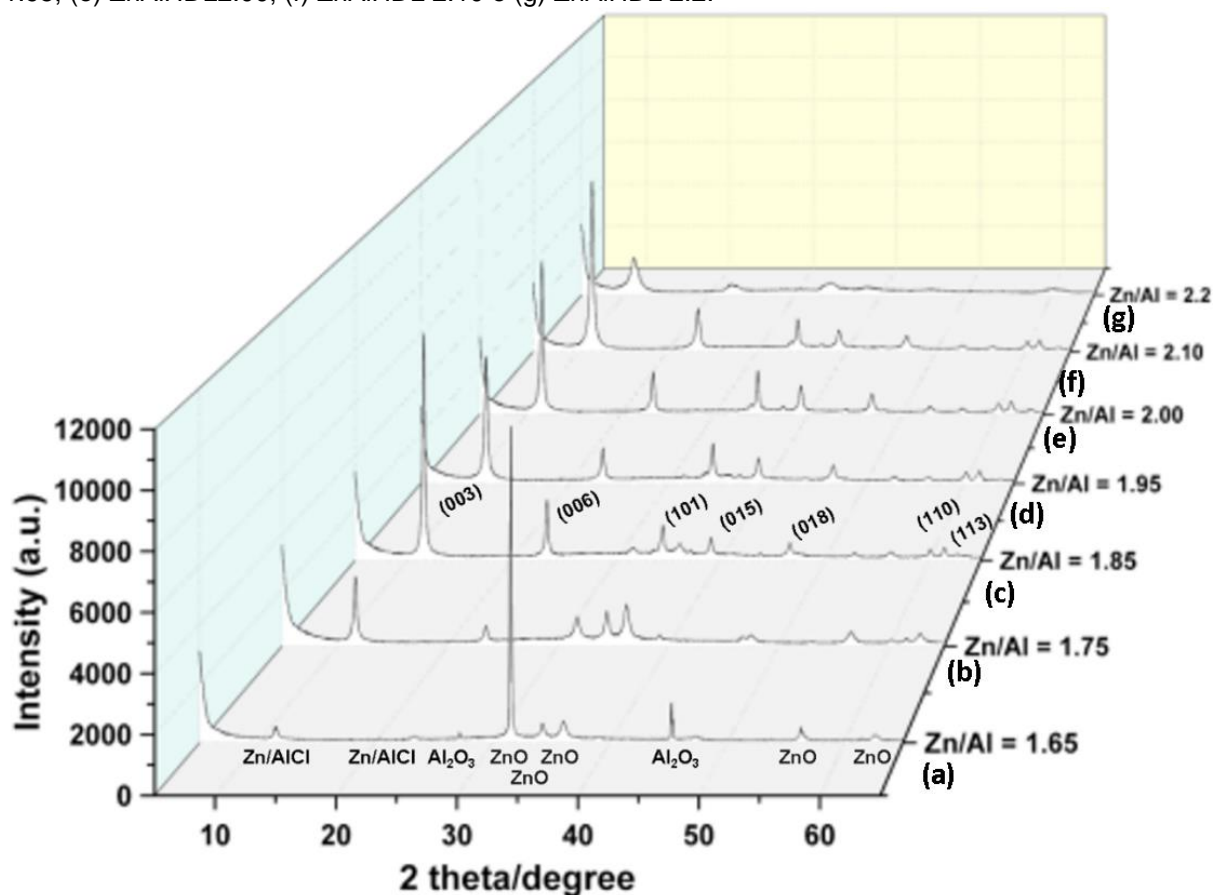
### 5.1. HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR DE ZNAL-CL

#### 5.1.1 Influência da razão $Zn^{2+}/Al^{3+}$

O HDL de ZnAl sintetizado, foi caracterizado inicialmente por DRX, afim de avaliar a obtenção do material. ZnAl-Cl-HDL formou uma nova estrutura com características cristalinas totalmente diferentes dos seus respectivos precursores de síntese, o cloreto de zinco e cloreto de alumínio. A Figura 14 apresenta os dados obtidos dos produtos sintéticos estudados inicialmente por DRX na razão  $Zn^{2+}:Al^{3+}$  de 1.65 a 2.2. Na Figura 14a, apresenta-se o padrão DRX da amostra ZnAlHDL 1.65, no qual se observa picos intensos em  $31,52; 34,24; 36; 47,33; 62,65^{\circ}$  ( $2\theta$ ) que correspondem aos planos (100), (002), (100), (102) e (103) de ZnO (PDF 01-079-0208). Adicionalmente, os picos em  $27,19; 45,25; 53,71; 56,28^{\circ}$  ( $2\theta$ ) são dos planos (111), (220), (311) e (222) da fase  $Al_2O_3$  (PDF 01-075-0278), enquanto que os picos em  $11,49$  e  $23,32^{\circ}$  ( $2\theta$ ) são dos planos (003) e (006) da fase de hidroxido duplo lamelar no sistema Zn-Al (PDF 00-048-1022). Na Figura 14b, que corresponde aos padro DRX da amostra com razão Zn:Al = 1.75 (ZnAlHDL1.75), identifica-se ainda a presença dos picos da fase ZnO. Também é possível observar picos adicionais do em  $33,70; 34,55; 37,26; 39; 43,85; 46,65; 52,85; 56,34; 60; 61,45$  e  $63,53^{\circ}$  ( $2\theta$ ), que são referentes aos planos (101), (012), (104), (015), (107), (018), (1 0 10), (0 1 11), (110), (113) e (1013). A fase lamelar de HDL Zn:Al foi obtida nas razões 1.85 a 2.2, que estão representadas nas figuras 14c a 14g. Os picos de HDL estão presentes em  $11,58; 23,32; 33,86; 39,11; 46,61; 60$  e  $61,43^{\circ}$  ( $2\theta$ ) que são referentes aos padrões DRX que exibem as reflexões características de HDL com picos basais planos para (003) e (006) e não basal para (1 0 1), (0 1 5), (0 1 8), (1 1 0) e (1 1 3). Estes resultados corroboram com o trabalho realizado por Ahmed et al. (2012), o qual utilizou o método de coprecipitação para preparar ZnAl-HDL variando a razão molar,  $Zn^{+2} / Al^{+3} = 6, 5, 4, 3$  e 2. Os padrões DRX mostraram picos característicos de Zn/Al-HDL, onde as proporções molares mostraram os planos (003), (006), (101), (110) e (113), demonstrando maior cristalinidade conforme a razão molar diminui. Qu et al., (2017), realizou a síntese no sistema Zn/Al- $CO_3$  via rota mecanoquímica, porém

contou com auxílio do moinho de bolas e um aparelho de agitação magnética (moagem a seco por 2 h para obter precursor e, em seguida, agitando em água por mais 4 h com relação molar de Zn/Al fixado em 2/1), que também obteve com êxito a síntese deste material, apresentando os planos padrão do HDL.

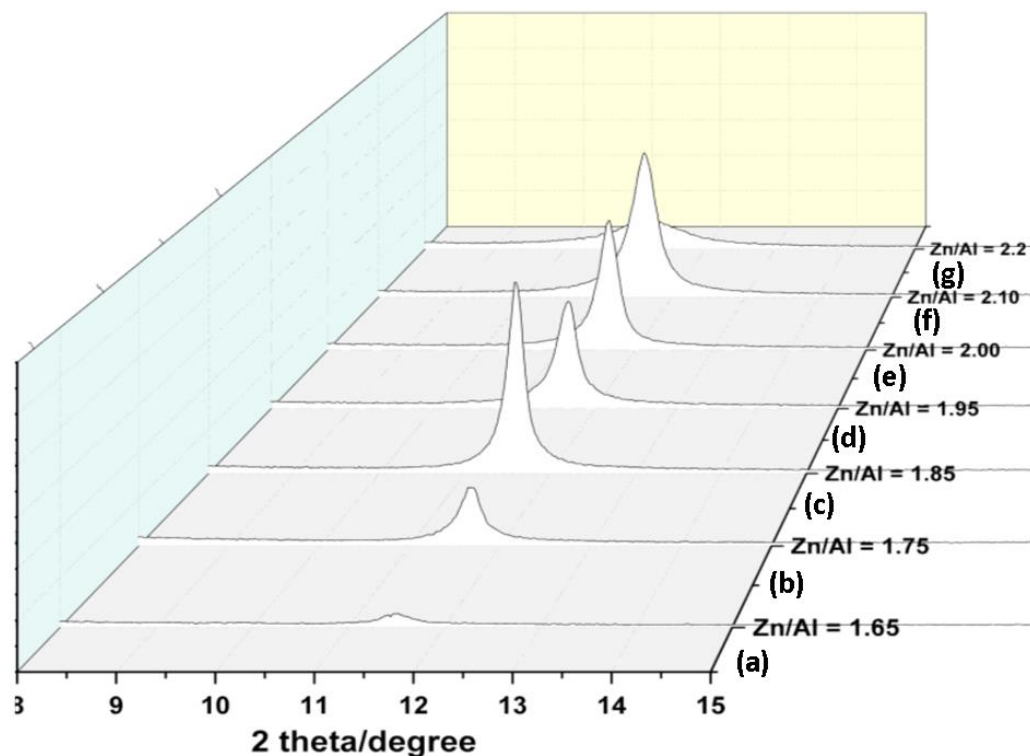
Figura 14 - Padrões de DRX de: (a) ZnAlHDL1.65; (b) ZnAlHDL1.75; (c) ZnAlHDL1.85; (d) ZnAlHDL 1.95; (e) ZnAlHDL2.00; (f) ZnAlHDL 2.10 e (g) ZnAlHDL 2.2.



Os difratogramas das amostras (ZnAlHDL 1.85, ZnAlHDL1.95, ZnAlHDL2.00, ZnAlHDL2.10 e ZnAlHDL2.2) que apresentam reflexões com maior intensidade, nitidez e simetria nos ângulos mais baixos (menores que  $35^\circ$ ) da posição  $2\theta$  correspondentes aos planos (003), (006) e (009) e, nos ângulos superiores a  $35^\circ$  (planos 101, 015, 018, 110, 113), os quais apresentam reflexões com maior assimetria, são característicos de materiais do tipo hidrotalcita. Na Figura 15 é mostrado em detalhe o perfil do pico referente ao plano (003), em que se observa uma maior intensidade e menor alargamento de meia altura a meia largura ( $FWHM = 0,15$ ) do HDL sintetizado na razão 1,85, o que sugere que a fase lamelar obtida nesta razão

se encontra em maior grau de cristalinidade e pureza de fase (SALCEDO et al., 2008; RAPHAEL 2010; SANCHES, 2011).

Figura 15 - Padrões de DRX do espaçamento basal de: (a) ZnAlHDL1.65; (b) ZnAlHDL1.75; (c) ZnAlHDL1.85; (d) ZnAlHDL 1.95; (e) ZnAlHDL2.00; (f) ZnAlHDL 2.10 e (g) ZnAlHDL 2.2.



Os padrões DRX dos compostos HDL, foram indexados com base em célula unitária romboédrica. O empilhamento das camadas HDL corresponde ao tipo 3R, em que o parâmetro  $c$  corresponde a três vezes o espaçamento  $d$  entre as camadas consecutivas,  $c = 3d_{003}$ . Esta posição é comumente utilizada para elucidar a estrutura dos compostos de HDL são os que correspondem à primeira posição (003). O ângulo de difração ( $2\theta$ ) desta posição (003) é usado para calcular, usando a equação de Bragg, o espaçamento basal ( $d_{003}$ ). O  $d_{003}$  inclui a contribuição das camadas e do espaço interlamelar para intercalação de ânions. Outro dado importante que pode ser obtido de  $d_{003}$  se refere espaço interlamelar (E.I), cujo valor pode ser calculado de  $d_{003} - 4.8$ , sendo 4.8 Å a altura teórica das camadas de ZnAl, espessura da folha do tipo brucita (COMPARELLI et al., 2005; RIVES 2002). Na tabela 9 constam os parâmetros das amostras sintetizadas.

Tabela 9 - Parâmetros da amostra sintetizada em diferentes razões.

Razão Zn <sup>2+</sup> /Al <sup>3+</sup>	a (Å)	c (Å)	d <sub>003</sub> (Å)	E.I
2,2	3,086	23,537	7,84	3,04
2,1	3,077	22,813	7,60	2,80
2	3,067	22,725	7,58	2,78
1,95	3,064	22,743	7,60	2,80
1,85	3,062	22,624	7,57	2,77
1,75	3,053	22,866	7,62	2,82
1,65	3,044	22,916	7,63	2,83

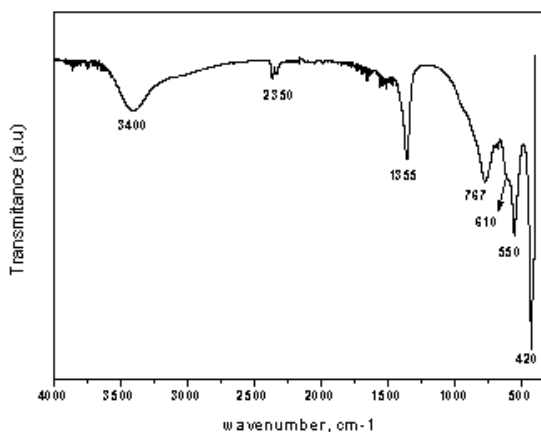
O valor do espaçamento basal apresentado para a amostra com razão 1.85 é característico da intercalação do ânion cloreto, conforme descrito na literatura (CHIU et al., 2011; CONSTANTINO et al., 2009). Dessa forma, através desses resultados a amostra utilizada para prosseguir as seguintes análises e o processo de intercalação do fármaco foi a que apresenta razão 1.85, nomeada de ZnAlHDL.

### 5.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (IV-FTIR)

A Figura 16 apresenta o espectro de absorção IV do ZnAlHDL obtido com maior grau de cristalinidade (razão 1.85), na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>. É possível constatar a presença de 7 bandas de vibração no espectro. Em 3400 cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda larga e forte correspondente à deformação axial de ligação O-H pertencente às hidroxilas e moléculas de água interlamelar. Em 2350 e 1355 cm<sup>-1</sup>, evidenciou-se vibrações correspondentes à íons carbonato, que podem ser provenientes do ar atmosférico residual, no ambiente da síntese. A banda identificada em 767 cm<sup>-1</sup> é resultante de deformações axiais entre metais e o oxigênio, ou seja, aos grupos Al-O e Zn-O. As bandas 610, 550 e 420 cm<sup>-1</sup> correspondem às ligações metálicas (Zn-Cl/Al-Cl). O espectro de absorção IV de ZnAl-HDL exibiu bandas de absorção características a esse tipo de material, correspondendo com dados previamente publicados na literatura para o composto, como no estudo realizado por Hajibeygi et al., (2015), onde ZnAl-HDL foi sintetizado por troca iônica, sendo observadas 6 bandas, em 3475, 2956, 2926, 2854, 1173 e 1037 cm<sup>-1</sup>, que irá apresentar diferença quanto ao resíduo da atmosfera, pois para síntese se utilizou ambiente inerte (gás nitrogênio). Outro resultado similar foi descrito por Mahjoubi et

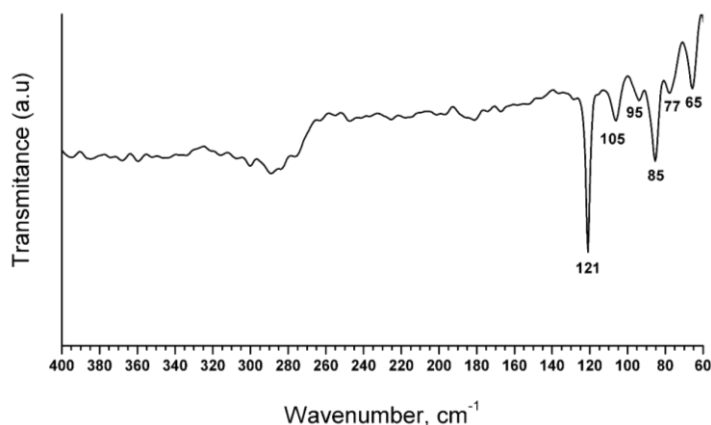
al., (2017), cujo HDL obtido pelo método da co-precipitação, apresentou bandas em 3400, 1630, 112, 790, 550 e 460  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando assim que os resultados são característicos de compostos HDL.

Figura 16 - Espectro IV-FTIR de ZnAlHDL (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).



Outra faixa espectral foi analisada, de 400 a 60 $\text{cm}^{-1}$ , como mostra a Figura 17. Existem poucas pesquisas que abordam movimentos atômicos de baixa frequência nestes materiais. As bandas identificadas nas regiões de 65, 77, 85, 95, 105 e 121  $\text{cm}^{-1}$ , segundo Kalinichev et al., (2010) podem corresponder a ligações de hidrogênio, consistindo em moléculas de água interlamelar e ions  $\text{Cl}^-$ , porém ainda não há estudos publicados que identifiquem com precisão a frequência de vibração destas moléculas.

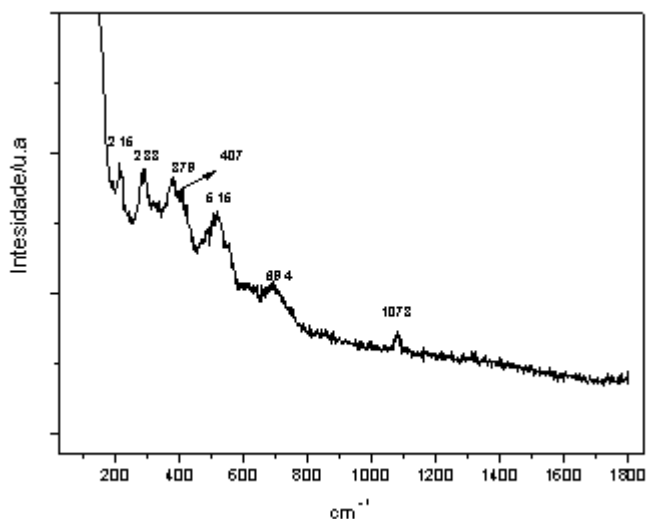
Figura 17 - Espectro IV-FTIR de ZnAlHDL (400-60 $\text{cm}^{-1}$ ).



### 5.1.3 Espectroscopia de Raman

Os espectros de Raman para a amostra ZnAlHDL são apresentados na Figura 18. Os espectros apresentam bandas na região de 215, 288 e 379  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde as ligações de Zn-O/Al-O. Na região 407  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a deformação de Zn-O-Zn/Al-O-Al ou alongamento de Zn-O/Al-O. Na região 515  $\text{cm}^{-1}$  a banda é referente a ligação Zn-O-Al que caracteriza o material HDL. As bandas 696 e 1078  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao ion  $\text{Cl}^-$  (KLOPROGGE et al., 2004; MAHJOUBI et al., 2015). Porém, vale ressaltar, que as bandas de Raman dependem da natureza e concentração dos materiais analisados (PALMER et al., 2009; ROSENBERG, 2013).

Figura 18 - Espectro de Ramam de ZnAlHDL



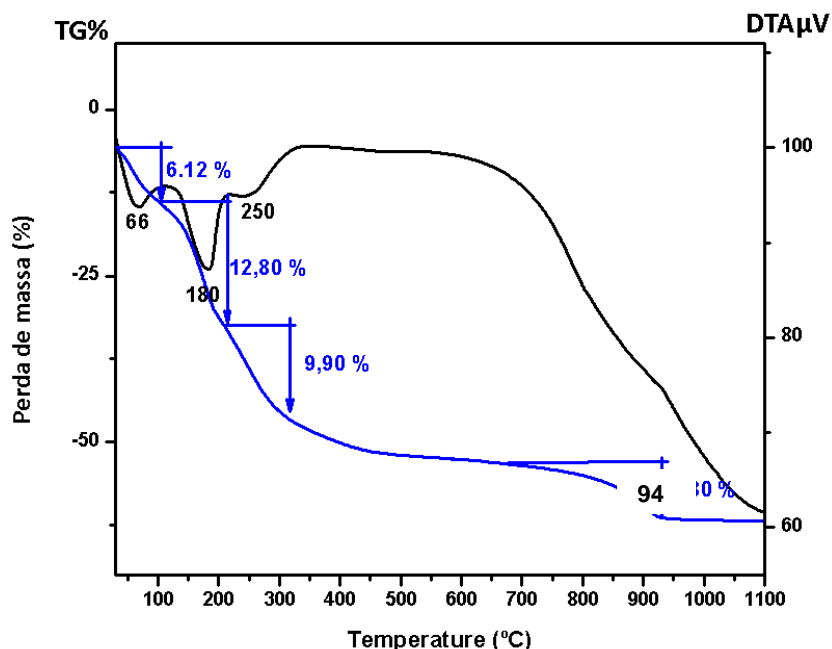
### 5.1.4 Análise térmica

O comportamento térmico da amostra ZnAlHDL é mostrado na Figura 19. Pode-se observar que o HDL sofre decomposição termal em quatro principais eventos. Segundo Malherbe e Besse (2000) durante a decomposição térmica dos HDL acontecem quatro etapas principais: (1) a evaporação da água adsorvida, (2) a eliminação da água estrutural, (3) a desidroxilação das lamelas, e por último (4) a perda do ânion volátil ( $\text{Cl}^-$ ). No entanto, a ocorrência desses quatro eventos bem definidos depende de fatores como a umidade da amostra, estabilidade do ânion intercalado, e a maneira com que as espécies interlamelares interagem com os



grupos hidroxila (PALMER et al., 2009; MALHERBE e BESSE, 1999; PEREJÓN et al., 2011).

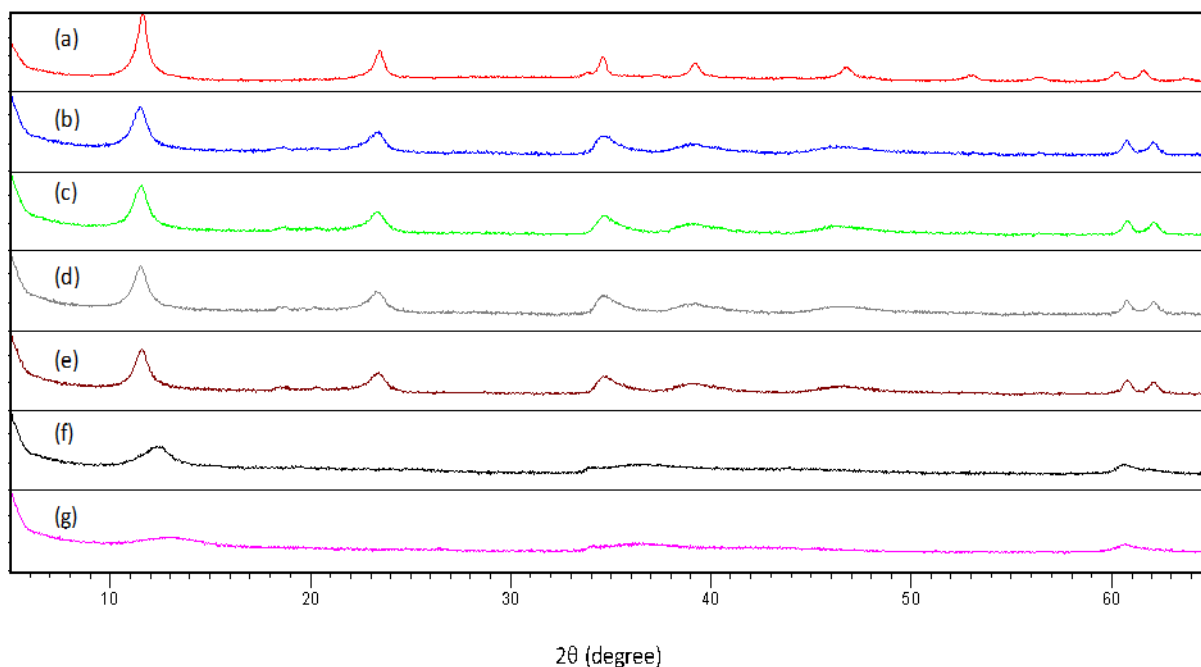
Figura 19 - Curvas TG e DTA de ZnAlHDL.



Na curva termogravimétrica, o primeiro evento de decomposição corresponde à perda de água que se encontra adsorvida na superfície do material. Esse evento ocorre na temperatura de 66°C e corresponde a uma perda de massa de 6,12%. O segundo evento ocorreu a 180°C, com perda de 12,8% de massa, e corresponde a perda de água interlamelar. O terceiro evento se encontra a 250°C e indica a desidroxilação das camadas ZnAlHDL, com perda de 9,9% de massa. E o quarto evento em 940°C demonstra a distribuição dos ânions Cl<sup>-</sup>, com perda de 5,8% de massa.

Foi realizado o estudo do comportamento termal de ZnAlHDL, monitorado por DRX através do aquecimento da amostra em 50, 100, 150, 200, 250 e 300 °C por 1 h (Figura 20). Conforme pode ser observado, o material mantém sua estrutura lamelar até 200 °C através da presença dos planos (003) e (006) próximos a 11,7 e 23,5 ° (2θ). Acima desta temperatura, observa-se um desordenamento das folhas como identificado pela baixa definição dos picos referentes aos planos basais nas amostras aquecidas a 250 e 300 °C.

Figura 20 - Padrões DRX da amostra DZNAL1.8 aquecidas a 50 (a), 75 (b), 100 (c), 150 (d), 200 (e), 250 (f) e 300 °C (g).



A Tabela 10 apresenta os dados dos parâmetros de rede, espaço interlamelar e espessura das folhas de ZnAlHDL nas referentes temperaturas. Os resultados revelaram uma diminuição gradativa do espaço interlamelar de 7,57 até um mínimo de 7,51 Å. De forma similar, a espessura das folhas também foi reduzida de 2,77 até 2,71 Å, revelando que a estrutura possui uma boa estabilidade até 200 °C.

Tabela 10 - Parâmetros da amostra ZnAlHDL, obtidos a partir dos padrões DRX, em diferentes tratamentos térmicos por 1 h.

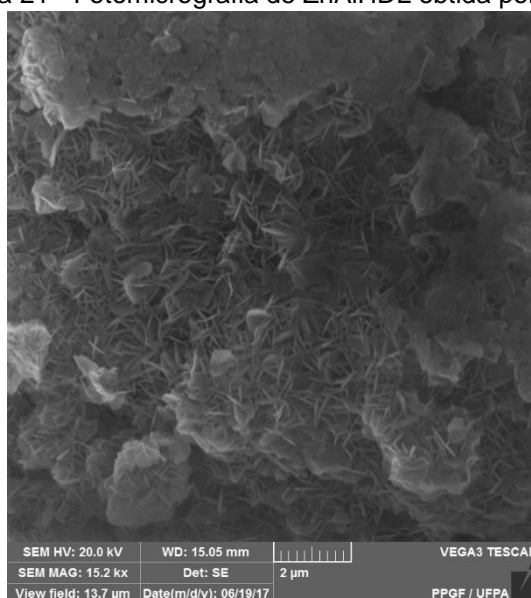
Temperatura	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	<i>d</i> <sub>003</sub> (Å)	E.i (Å)
25°C	3,062	22,624	7,57	2,77
75°C	3,067	22,674	7,56	2,76
100°C	3,064	22,65	7,55	2,75
125°	3,058	22,59	7,53	2,73
150°C	3,053	22,56	7,52	2,72
200°C	3,044	22,54	7,51	2,71

Onde: folha =  $d_{003} - 4,8$  (Å);  $d_{003} = c/3$  (COMPARELLI et al., 2005; RIVES 2002).

### 5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Além das técnicas já apresentadas, também foi usado para análise o MEV, com o objetivo de avaliar as características morfológicas da amostra sintetizada (Figura 21). A imagem mostra a microestrutura e sugere um agregado morfológico como “folha”, o qual é esperado para compostos do tipo hidrotalcita. Pode ser visto que todos os tamanhos de partículas de HDL e as lamínas de HDL são empilhadas como folhas perpendiculares sobre a superfície com tamanho médio em torno de 1  $\mu\text{m}$  (WANG et al., 2010; AMBROGI et al., 2001).

Figura 21 - Fotomicrografia de ZnAlHDL obtida por MEV.



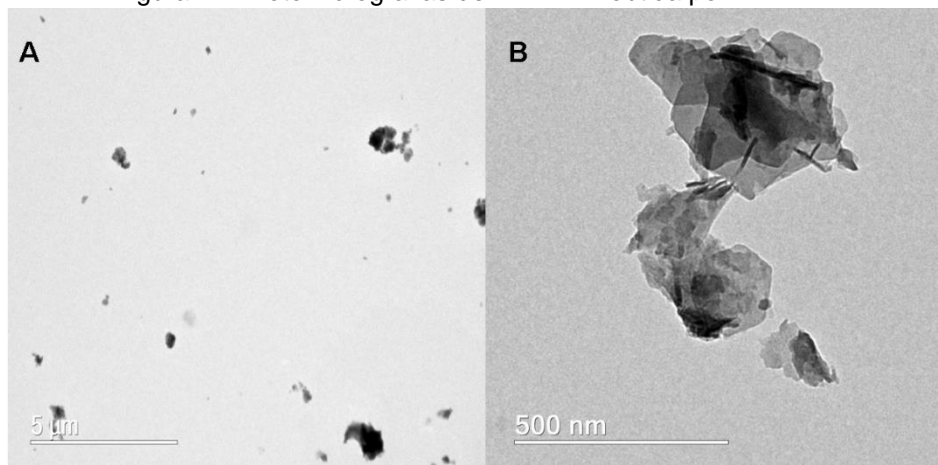
### 5.1.6 Microscopia Eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM)

No HR-TEM é possível observar a morfologia ou estrutura do nanocompósito e como o HDL está disperso através das imagens. Na Figura 22a é possível observar que as lamelas de HDL, pontos escuros na imagem, estão distribuídas aleatoriamente (parte clara da imagem). Não existe um ordenamento das lamelas, estas se apresentam delaminadas.

Na Figura 22b é apresentada uma imagem do HR-TEM em alta resolução. Nesta imagem é possível observar claramente a existência de várias lamelas de HDL. Estas lamelas se encontram dispersas na matriz, não existe evidência destas lamelas

apresentarem alguma estrutura cristalina (empilhamento), algum tipo de ordenação, caracterizando a estrutura de natureza esfoliada deste material (BOTAN et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2000).

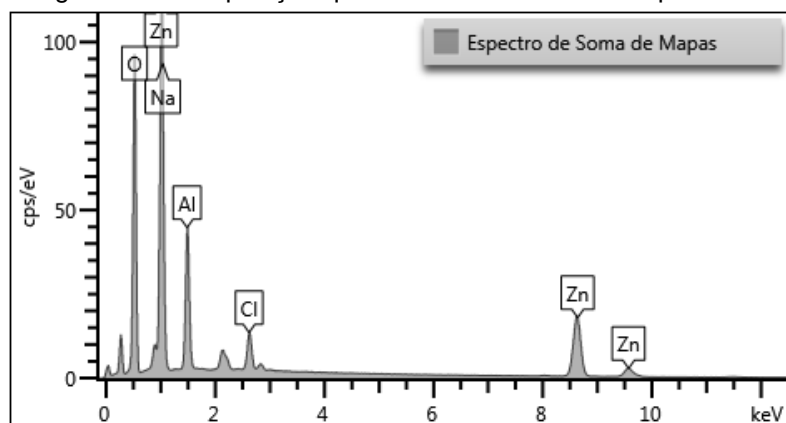
Figura 22 - Fotomicrografias de ZnAlHDL obtida por HR-TEM



### 5.1.7 Composição química

A composição química da amostra ZnAlHDL, Figura 23, foi investigada por microanálise por Espectro de Soma de Mapas (EDS). De acordo com os dados obtidos, ela é formada basicamente por 11,56 % de Al, 36,61 % de Zn e 3 % de cloro. Confirmando assim, que a amostra ZnAlHDL apresenta os elementos essenciais a sua estrutura.

Figura 23 - Composição química de ZnAlHDL obtida por EDS.

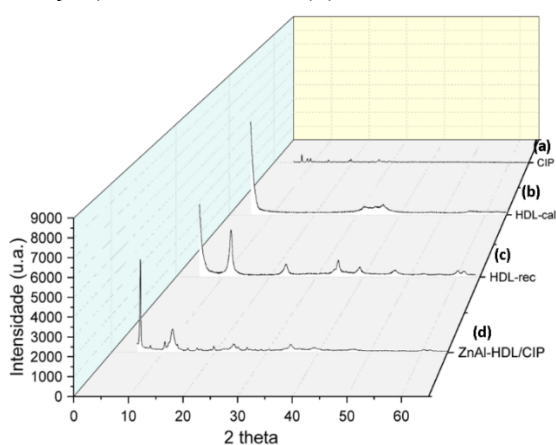


## 5.2 INTERCALAÇÃO DO CIPROFLOXACINO NO ZnAlHDL PELO MÉTODO DE RECONSTRUÇÃO

### 5.2.1 Caracterização do material intercalado por DRX

A Figura 24 mostra os padrões de DRX dos produtos envolvidos durante o estudo de intercalação do HDL com o Ciprofloxacino.

Figura 24 - (a) Padrão DRX do ciprofloxacino; (b) HDL-250 °C; (c) HDL-250°C imerso em solução aquosa (método da reconstrução) sem o fármaco; (d) HDL intercalado com ciprofloxacino.



Conforme ilustrado na Figura 24a, o padrão do fármaco mostrou picos exclusivos de ciprofloxacina o que indica que o material está puro. Observa-se que o fármaco apresenta uma estrutura, com picos de maior intensidade em  $2\theta = 7,1^\circ, 8,5^\circ, 9,3^\circ, 13,9^\circ, 19,6^\circ$  e  $26,8^\circ$ . Em relação ao material aquecido a 250 °C (Figura 24b), o perfil DRX revelou a ausência de picos bem definidos, indicando que o produto está amorfo, conforme reportado na literatura (NALAWADE et al., 2009; ZOELLNER et al., 2015). A figura 24c, demonstra que o HDL calcinado, após ser colocado em solução aquosa, se reconstituiu e volta a demonstrar o seu DRX padrão (003), (006), (009), (101), (015), (018), (110) e (113). Após a reconstrução do HDL na presença do ciprofloxacino (Figura 24d) um padrão cristalino e picos com maior intensidade em  $2\theta = 5,5^\circ$  e  $11,9^\circ$  respectivamente, podem ser observados, correspondentes aos planos (003) e (006). Relatos na literatura podem ser encontrados caracterizando diferenças nas amostras das misturas com os componentes isolados, como surgimento ou o desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades e largura, indicam a formação do complexo híbrido (CUNHA- FILHO e SÁ-BARRETO, 2007; BUGATTI et

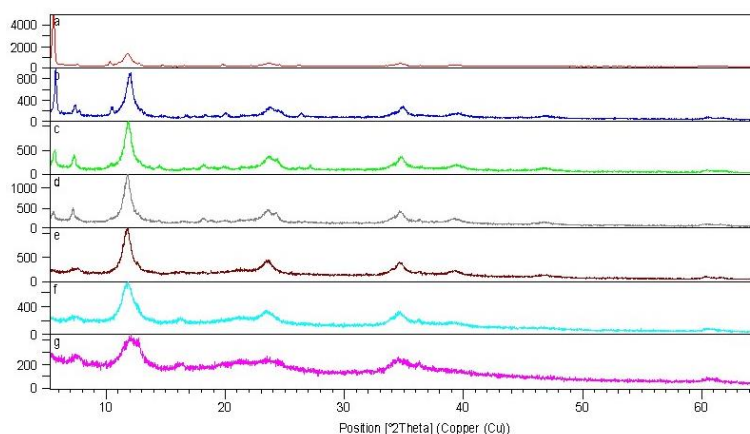
al., 2013). É possível observar que o pico referente ao plano (003) se desloca para ângulos mais baixos ( $2\theta$ ) em comparação ao HDL de partida (antes da calcinação), o que indica que este procedimento dá lugar a intercalação do fármaco entre as lamelas do HDL. Na Tabela 11 é possível observar que o espaçamento basal do produto vai para 15,79 Å, bem acima do espaçamento basal de 7,6 Å observado na matriz lamelar inicial, evidenciando um aumento no espaçamento basal pela presença do ciprofloxacino intercalado. Considerando que a espessura de uma lamina tipo brucita seja de 4,8 Å, se deduz um valor de incremento no espaçamento basal de aproximadamente de 10,99 Å para o híbrido ZnAlHDL/CIP. O plano (003) indica que o material sintetizado apresenta simetria romboédrica ( $3 \times 15,79 \text{ \AA} = 47,37 \text{ \AA}$ ). Além disso, evidenciam-se os planos (110) e (113) na estrutura intercalada, confirmando que o fármaco foi inserido na estrutura lamelar, pois  $d_{110}$  fornece o valor de “a”, sendo  $a = 2d_{110}$ , de acordo com a literatura. Este parâmetro deve se manter o mesmo, independente do ânion de intercalação utilizado, uma vez que está associado à presença da lamela do tipo brucita, confirmando assim a intercalação do antibiótico ciprofloxacino, uma vez que este valor não sofreu alteração ( $a = 3,06$ ) (ALEJANDRE et al., 1999; CAVANI, 1991) (Tabela 10).

Tabela 11 - Parâmetros da amostra ZnAlHDL e ZnAlHDL/CIP

<b>Amostras</b>	<b>a (Å)</b>	<b>c (Å)</b>	<b>d<sub>003</sub> (Å)</b>	<b>E.I (Å)</b>
<b>ZnAlHDL</b>	3,062	22,624	7,57	2,77
<b>ZnAlHDL/CIP</b>	3,062	47,37	15,79	10,99

Foi monitorado o comportamento termal da amostra ZnAlHDL/CIP nas temperaturas 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175°C, para acompanhar a estabilidade do composto (Figura 25). Conforme pode ser observado, o material mantém sua estrutura até 100 °C, podendo ser constatado através da presença dos planos (003) e (006) próximos a 5,5° e 11,9° ( $2\theta$ ). Acima desta temperatura, observa-se o início da decomposição do ciprofloxacino, devido a redução do espaçamento basal, que a princípio possuía 15,79 Å e após ser aquecida a 125°C passou a apresentar 11,57 Å.

Figura 25 - Padrões DRX da amostra ZnAlHDL/CIP aquecidas a 25 (a), 50 (b), 75 (c), 100 (d), 125 (e), 150 (f) e 175 °C (g).



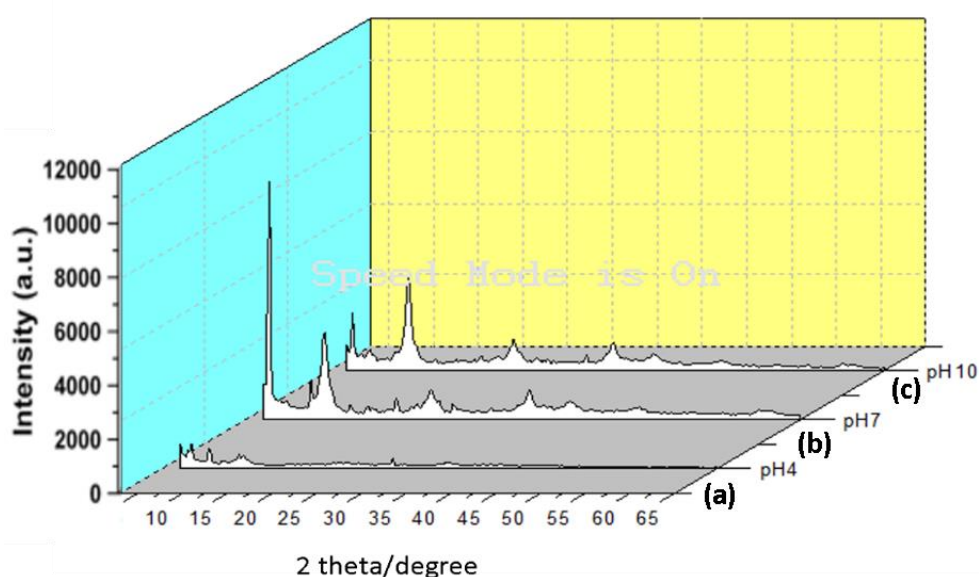
A Tabela 12 apresenta os dados dos parâmetros de rede, espaço interlamelar e espessura das folhas de ZnAlHDL/CIP aquecida nas respectivas temperaturas. Os resultados revelaram uma diminuição do espaço interlamelar de 15,79 (25°C) para 15,21 (50°C). De forma similar, o espaço interlamelar também foi reduzido de 10,99 Å para 10,66 Å, respectivamente. Porém, a estrutura ao continuar a ser aquecida, demonstra aumentar o espaçamento basal novamente, apresentando valores de 15,42 Å (75°C) e 15,81 Å (100°C). Esta redução seguida de um aumento, pode ser explicada devido a oscilação de temperatura que faz com que haja uma diminuição na proporção de partículas pequenas e um aumento na proporção das partículas maiores do fármaco (ALLEN, 2010; FLORENCE e ATTWOOD, 2006). Acima de 100°C é possível observar uma diminuição gradativa do espaçamento basal, configurando assim a degradação progressiva do ciprofloxacino e desconfiguração da estrutura do material intercalado.

Tabela 12 - Parâmetros da amostra ZnAlHDL/CIP, obtidos a partir dos padrões DRX, em diferentes tratamentos térmicos por 1 h.

Temperatura	a (Å)	c (Å)	d <sub>003</sub> (Å)	e.i (Å)
25°C	3,06	47,28	15,79	10,99
50	3,06	45,63	15,21	10,41
75°C	3,06	46,26	15,42	10,62
100°C	3,06	47,43	15,81	11,01
125°	3,06	34,71	11,57	6,77
150°C	3,06	34,68	11,56	6,76
175°C	2,90	34,68	11,56	6,76

Além da temperatura, outro fator analisado foi o pH, pois também é um dos fatores importantes quando se trata da estabilidade do fármaco. Na figura 26 pode-se observar o padrão DRX da amostra ZnAlHDL/CIP em pH ácido (pH 4), neutro (pH 7 – que corresponde ao pH da estrutura) e básico (pH = 10). O padrão DRX da amostra referente ao tratamento em pH 4 não apresenta o plano (110), o que sugere uma desconfiguração da lamela octaédrica, pois em pH ácido ocorre a destruição da estrutura do HDL, liberando os ânions presentes no espaço interlamelar e consumindo ácido. Essa característica resulta na propriedade antiácida dos HDLs, devido a sua basicidade. Quando ocorre a intercalação de medicamentos, a nanopartícula que deve ser protegida do ataque ácido do estômago (pH 1,2), somente a presença das lamelas do HDL não são suficientes para que ocorra a sua proteção (CHOY et al., 1999; AGRAHARI et al., 2017). É possível observar o deslocamento do plano (003), indicando a presença do ciprofloxacino, isso se deve a estabilidade do fármaco em pH3- 4,5. A intercalação após a reconstrução, seguida de agitação (troca iônica) ocorre em pH neutro ou alcalino, logo foi possível observar que apenas a estrutura se manteve em pH10, apresentando diferenças mínimas em relação ao pH 7, demonstrando uma redução do espaço interlamelar para 10,69 Å (AMBROGI et al., 2003).

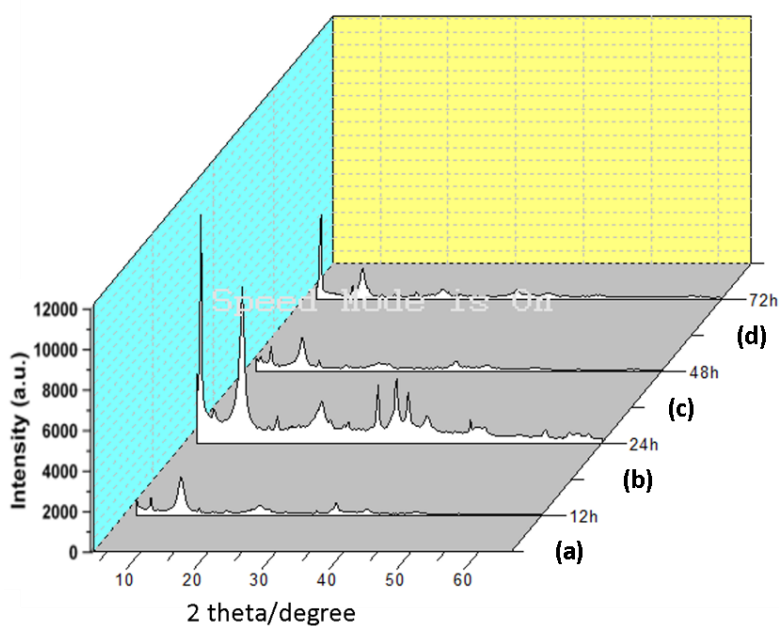
Figura 26 - (a) Padrão DRX ZnAlHDL/CIP – pH4; (b) ZnAlHDL/CIP – pH7; (c) ZnAlHDL/CIP – pH10.





A influência do tempo também foi avaliada, pois de acordo com Del Arco (2009) a cristalinidade da hidrotalcita aumenta com o decorrer do tempo de agitação da solução. Na figura 27 é possível observar a evolução da formação do material intercalado e com relação ao tempo de 24 a 72 horas. Com 12 horas de agitação para intercalação a amostra apresenta baixa cristalinidade e com 72 horas observa-se picos mais intensos. Podendo ser evidenciado através de uma maior intensidade e menor alargamento de meia altura a meia largura referente ao plano (003), que respectivamente vai de 0,26 ( $2\theta$ ) para 0,19 ( $2\theta$ ) (FWHM).

Figura 27 - (a) Padrão DRX ZnAlHDL/CIP – 12h; (b) ZnAlHDL/CIP – 24h; (c) ZnAlHDL/CIP – 48h; (d) ZnAlHDL/CIP – 72h.



Na tabela 13 constam os valores dos parâmetros e do tamanho do cristalito que corroboram com a literatura, com um aumento gradativo do espaçamento basal ( $12,36 \text{ \AA} - 15,79 \text{ \AA}$ ) e do interlamelar ( $7,56 \text{ \AA} - 10,99 \text{ \AA}$ ) (KAUL et al., 2017). Segundo Haraketi et al., (2017), outro fator que confirma a influência do tempo é a diminuição do tamanho do cristalito com maior tempo de agitação, que no caso de ZnAlHDL/CIP foi de  $32,89 \text{ \AA}$  para  $15,08 \text{ \AA}$ .

Tabela 13 - Parâmetros da amostra ZnAIHDL/CIP com variação do tempo de síntese.

Tempo (h)	a (Å)	c (Å)	d <sub>003</sub> (Å)	e.i(Å)	Tamanho de cristalito (nm)
12	3,08	37,08	12,36	7,56	32,89
24	3,05	46,74	15,58	10,78	29,09
48	3,08	47,04	15,68	10,88	17,96
72	3,06	47,28	15,79	10,99	15,08

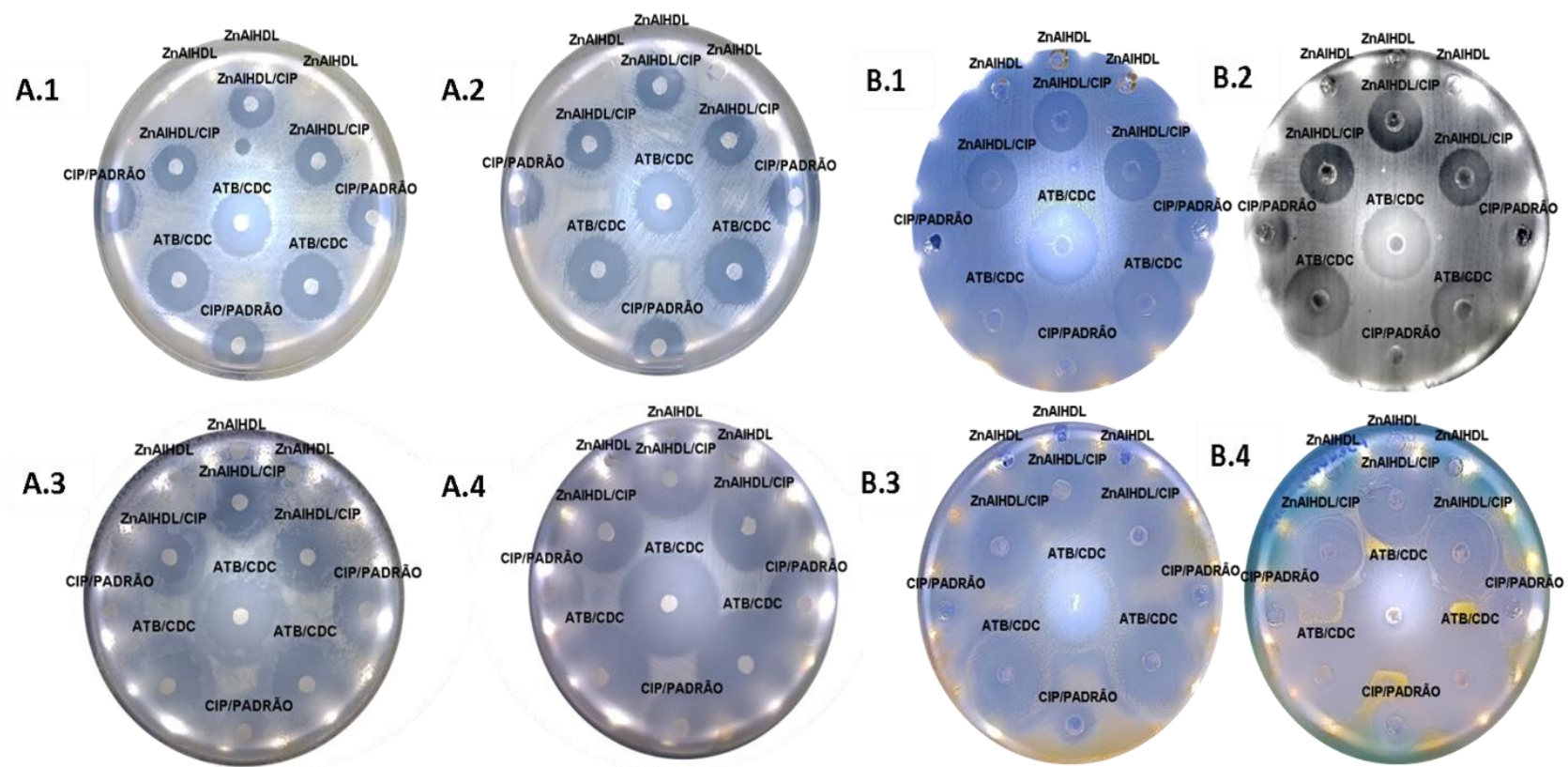
### 5.3 ESTUDO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO ZnAIHDL-CIP

Os estudos de liberação são de fundamental importância para determinação do comportamento do fármaco em relação ao veículo, bem como com o sistema no qual se encontra incorporado, permitindo verificar as possíveis interações entre o ativo e os componentes da formulação. Neste estudo, teve-se como intuito verificar se o fármaco incorporado a sistemas nanoestruturados apresentava comportamento de liberação modificado, com relação ao fármaco livre.

#### 5.3.1 Análise comparativa dos métodos de disco-difusão e difusão em poço

Foram realizados bioensaios pelo método de disco-difusão e difusão em poço, são métodos qualitativos e passíveis de uma análise comparativa em relação a atividade das amostras frente as cepas bacterianas utilizadas no estudo. As duas técnicas apresentaram a formação de halo de inibição ao redor dos discos e dos poços. Verificou-se que, em ambos, não houve a formação de halo no controle negativo ZnAIHDL. As amostras ZnAIHDL/CIP, CIP/PADRÃO e ATB/CDC inibiram o crescimento das bactérias, com formação de halos de inibição ao redor de onde foram depositadas as soluções testes (Figura 28).

Figura 28 – Ensaio TSA Disco-difusão x difusão em poço.



A) A.1 *Staphylococcus aureus*; A.2 *Staphylococcus epidermidis*; A.3 *Escherichia coli*; A.4 *Pseudomonas aeruginosa*; B.1 *Staphylococcus aureus* B.2 *Staphylococcus epidermidis*; B.3 *Escherichia coli*; B.4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Para a técnica de disco-difusão a amostra ZnAIHDL/CIP apresentou halos de inibição com diâmetro médio de 18.7, 19.3, 21.3 e 31.0 mm, inferiores aos halos do ATB/CDC que apresentou diâmetros de 25.0, 24.0, 24.7 e 38.7 mm, para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermids*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Essa diferença de diâmetro, pode ser explicada, devido ZnAIHDL/CIP possuir aproximadamente metade do princípio ativo do ciprofloxacino, o que pode ser confirmado com a determinação da CMI. E apesar do intercalado ter difundido satisfatoriamente no meio de cultura, observou-se uma ação menor que o CIP/PADRÃO frente as bactérias de interesse clínico *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermids* que não ocorreu com a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os tamanhos dos halos de inibição formados permitem classificar o microorganismo para ciprofloxacino 5 µg resistente ≤15mm, intermediário 10-20mm e sensível ≥21mm (CLSI, 2018). As cepas possuem sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino (CIP/PADRÃO), apresentando halos de 20,3±0,6mm. Exceto *Pseudomonas aeruginosa* que se mostrou sensível, com halo 27,7±0,6mm (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação estatística entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas técnicas de disco-difusão e difusão em poço.

Cepas	Disco-difusão			Difusão em poço		
	ZnAIHDL/ CIP	ATB/CDC	CIP/ PADRÃO	ZnAIHDL/ CIP	ATB/CDC	CIP/PADRÃO
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	18,7±0,6 cv=3,09% b	25,0±0,0 cv=3,09% b	20,3±0,6 cv=3,09% b	20,7±0,6 cv=2,79% a	25±1,0 cv=2,79% a	19,3±0,6 cv=2,79% a
<b><i>Staphylococcus epidermids</i></b>	19,3±0,6 cv=2,99% a	24,0±0,0 cv=2,99% a	20,3±0,6 cv=2,99% a	21,0±1,0 cv=4,96% a	26,0±1,0 cv=4,96% a	18±0,0 cv=4,96% a
<b><i>Escherichia coli</i></b>	21,3±1,2 cv=5,41% b	24,7±0,6 cv=5,41% b	20,3±0,6 cv=5,41% b	25,0±0,0 cv=0,00% a	31,3±0,6 cv=0,00% a	22,0±0,0 cv=0,00% a
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	31,0±0,0 cv=0,00% a	38,7±1,2 cv=0,00% a	27,7±0,6 cv=0,00% a	30,7±1,2 cv=3,77% a	39,3±1,2 cv=3,77% a	21,0±0,0 cv=3,77% a

letras distintas indicam diferença significativa entre as técnicas, de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); cv = coeficiente de variação

A técnica de difusão em poço apresentou, para ZnAIHDL/CIP, halos de inibição com diâmetro médio de 20.7, 21.0, 25.0 e 30.7 mm, inferiores aos halos do ATB/CDC que apresentou diâmetros de 25.0, 26.0, 31.3 e 39.3 mm, para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermeids*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente.

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios de disco-difusão e difusão em poço indicam que a solução testada foi capaz de causar a morte das bactérias cultivadas no meio e que quanto maior o tamanho do halo formado, maior a ação do princípio ativo sobre o microrganismo (RADAELLI et al., 2018; SANTOS et al., 2011; SOARES et al., 2008).

Com o objetivo de identificar qual método apresentou melhores resultados, realizaram-se análises estatísticas de variância seguindo o modelo ANOVA, a fim de avaliar se cada método possuía uma precisão adequada, foram calculados os coeficientes de variação de cada amostra e seu respectivo patógeno, a partir das medidas dos halos de inibição (Tabela 13). Para a técnica de difusão em poço, observou-se que em 100% das medidas dos halos de inibição, utilizando os coeficientes de variação, ficaram abaixo de 5%, enquanto que a de difusão em disco apresentou apenas 75%. Isso indica que houve uma precisão significativa da difusão em poço entre as medidas dos halos de inibição (ESMERINO et al., 2004; CHERN et al., 2015). Os resultados da análise estatística seguindo o modelo ANOVA (probabilidade de 95%), não apresentaram diferença dos métodos estatisticamente para *Staphylococcus epidermids* e *Pseudomonas aeruginosa*. E para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* demonstraram diferença com melhor resultado para difusão em poço. Porém, essa diferença pode estar relacionada ao fato de que o teste de difusão em poço tem eficiência para substâncias que são solúveis em água, possibilitando difusão destas através do meio de cultura, não sendo esta diferença, necessariamente, em virtude da substância, mas da metodologia aplicada, pois o resultado inverso acontece com a amostra CIP/PADRÃO, que apresentou diferença estatística com o melhor resultado para disco-difusão, já que o ciprofloxacino puro é pouco solúvel em água (BANDEIRA et al., 1998; VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991).

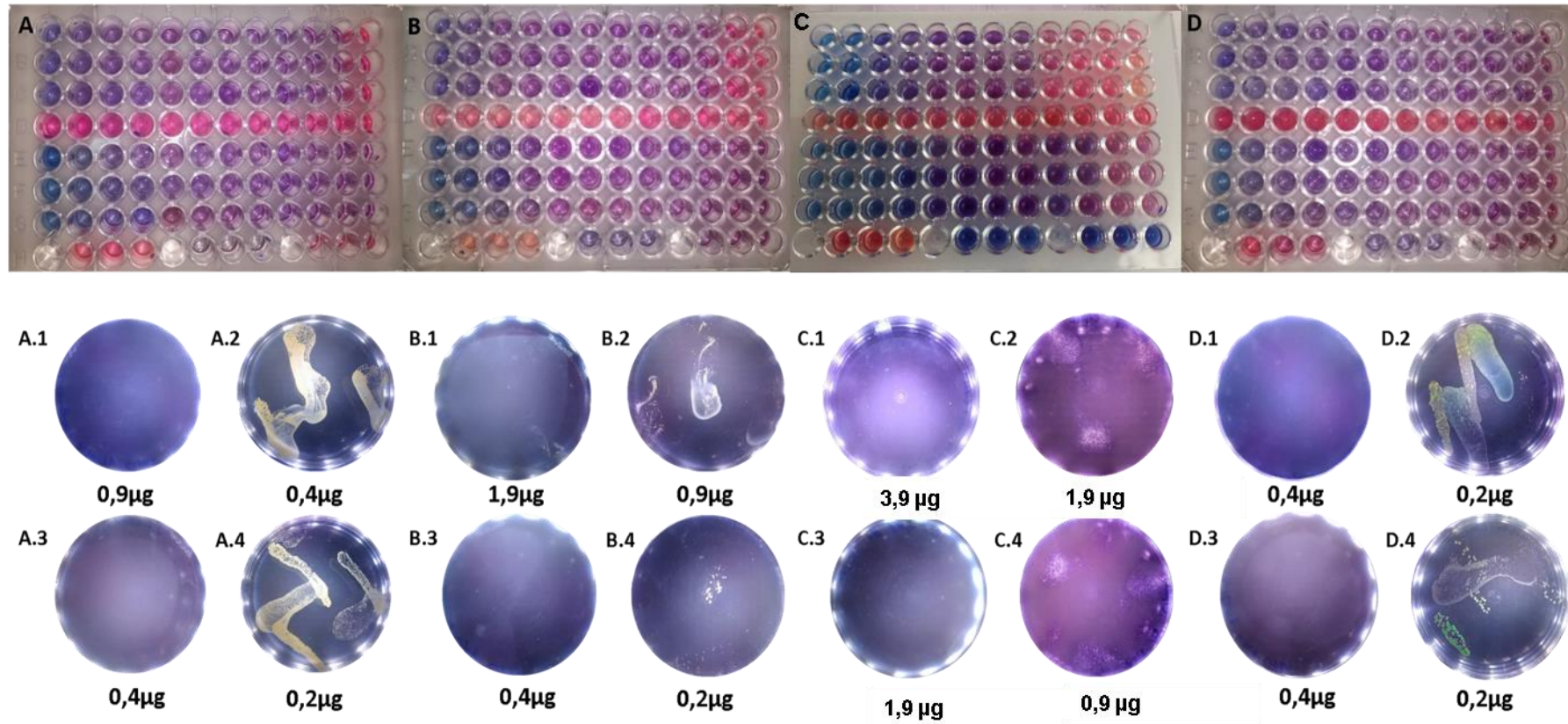
### **5.3.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)**

A CMI foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2018). E as concentrações superiores a CMI demonstram o efeito bactericida, visto que o efeito bacteriostático é determinado pelo crescimento das bactérias após o cultivo dos poços em placas contendo MHA, determinando assim a CMB (POZZATTI et al., 2009; FREIRE et al., 2014) (Figura 29).

A análise dos níveis de CMI fornece informações importantes sobre sensibilidade microbiana às substâncias ativas, principalmente em termos de concentrações que causam mortalidade ou vitalidade das espécies testadas, que é essencial quando se seleciona a antibioticoterapia apropriada. Esse método já está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e fornece bons resultados quantitativos. Além disso, através desse método é possível confirmar se os ensaios realizados, para determinar a eficiência da intercalação, estão coerentes, se após este processo o antibiótico está ou não ativo na nanopartícula e se ocorre sua liberação (BRITO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2012;).



Figura 29 - Microplacas seriada para determinação da CMI.



A) *Staphylococcus aureus*: A.1- CBM – ZnAIHDL/CIP; A.2- CMI – ZnAIHDL/CIP; A.3- CMB – ATB/CDC/CIP; A.4- CMI – ATB/CDC/CIP; B) *Staphylococcus epidermidis*: B.1- CBM – ZnAIHDL/CIP; B.2- CMI – ZnAIHDL/CIP; B.2- CMB – ATB/CDC/CIP; B.4- CMI – ATB/CDC/CIP; C) *Escherichia coli*: C.1- CBM – ZnAIHDL/CIP; C.2- CMI – ZnAIHDL/CIP; C.3- CMB – ATB/CDC/CIP; C.4- CMI – ATB/CDC/CIP; D) *Pseudomonas aeruginosa*: D.1- CBM – ZnAIHDL/CIP; D.2- CMI – ZnAIHDL/CIP; D.3- CMB – ATB/CDC/CIP; D.4- CMI – ATB/CDC/CIP;

Na figura 29A pode-se observar uma significativa atividade inibitória da cepa do *Staphylococcus aureus* da amostra ZnAIHDL/CIP (Linhas – A, B e C) nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,4 µg (Coluna 11), observando que sua CMB é 0,9 µg (Figura 29A.1) e CMI é 0,4 µg (Figura 29A.2). A amostra ZnAIHDL (Linha D – controle negativo) não apresentou nenhuma atividade, como o esperado. A amostra ATB/CDC (Linhas E, F e G) apresentou atividade bactericida nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,2 µg (Coluna 12), sua CMB é 0,4 µg (Figura 29A.3) e CMI 0,2 µg (Figura 29A.4).

Na figura 29B há atividade inibitória da cepa do *Staphylococcus epidermidis* da amostra ZnAIHDL/CIP (Linhas – A, B e C) nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,9 µg (Coluna 10), observando que sua CMB é 1,9 µg (Figura 29B.1) e CMI é 0,9 µg (Figura 29B.2). A amostra ZnAIHDL (Linha D – controle negativo) não apresentou nenhuma atividade, como o esperado. A amostra ATB/CDC (Linhas E, F e G) apresentou atividade bactericida nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,2 µg (Coluna 12), sua CMB é 0,4 µg (Figura 29B.3) e CMI 0,2 µg (Figura 29B.4).

Na figura 29C pode-se constatar atividade inibitória da cepa do *Escherichia coli* da amostra ZnAIHDL/CIP (Linhas – A, B e C) nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 1,9 µg (Coluna 9), observando que sua CMB é 3,9 µg (Figura 29C.1) e CMI é 1,9 µg (Figura 29C.2). A amostra ZnAIHDL (Linha D – controle negativo) não apresentou nenhuma atividade, como o esperado. A amostra ATB/CDC (Linhas E, F e G) apresentou atividade bactericida nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,9 µg (Coluna 10), sua CMB é 1,9 µg (Figura 29C.3) e CMI 0,9 µg (Figura 29C.4).

Na figura 28D pode-se constatar atividade inibitória da cepa do *Pseudomonas aeruginosa* da amostra ZnAIHDL/CIP (Linhas – A, B e C) nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,2 µg (Coluna 12), observando que sua CMB é 0,4 µg (Figura 29D.1) e CMI é 0,2 µg (Figura 29D.2). A amostra ZnAIHDL (Linha D – controle negativo) não apresentou nenhuma atividade, como o esperado. A amostra ATB/CDC (Linhas E, F e G) apresentou atividade bactericida nas concentrações de 500 µg (Coluna 1) a 0,2 µg (Coluna 12), sua CMB é 0,4 µg (Figura 29D.3) e CMI 0,2 µg (Figura 29D.4).

De maneira geral, a linha 8, que foi destinada aos controles, pode-se identificar que a viabilidade do patógeno (Coluna 2, 3 e 4) demonstrou que todas as cepas utilizadas estavam viáveis. A esterilidade do meio (Coluna 6,7 e 8) estava sem contaminação. E o CIP/PADRÃO na concentração de 5 µg (Coluna 10, 11 e 12) inibiu o crescimento dos microrganismos, exceto *Staphylococcus aureus*. Novamente os



resultados do ATB/CDC, demonstraram mais atividade que ZnAIHDL/CIP devido apresentar o dobro do princípio ativo.

Os resultados apresentados neste estudo, são considerados satisfatórios, pois a CMB não excedeu a CMI em mais que o dobro, resultados que corroboram com a literatura. Concluindo que a amostra ZnAIHDL/CIP possui atividade antimicrobiana tanto em bactéria Gram-positiva quanto em Gram-negativa, mostrando que também possui um amplo espectro de ação comparando-se ao ATB/CDC (OLIVEIRA et al., 2012; MARANHO, 2000).

### 5.3.3 Liberação Controlada de ZnAIHDL/CIP pelo método de difusão em poço

Devido a técnica de difusão em poço ter apresentando diferença estatística (ANOVA) em duas cepas bacterianas, foi realizado o acompanhamento do crescimento/redução do halo de inibição, durante 24, 48, 72 e 96h, para verificar se ZnAIHDL/CIP realiza liberação controlada do fármaco (Tabela 14).

Com o intuito de avaliar qual amostra apresentou melhores resultados, realizaram-se análises estatísticas de variância seguindo o teste de Tukey, com probabilidade de 95%, foram calculados os coeficientes de variação de cada amostra e seu respectivo patógeno/tempo, a partir das medidas dos halos de inibição, fazendo uma associação do tamanho do halo com a ação do fármaco (RYU et al., 2010). Observou-se que as medidas do halo de inibição de ZnAIHDL/CIP utilizando o coeficiente de variação, só apresentaram tamanhos acima de 5% para *Staphylococcus epidermids*, em 48, 72 e 96 horas. ATB/CDC apresentou apenas no tempo de 72 horas para *Pseudomonas aeruginosa*. E para CIP/PADRÃO, foram as cepas de *Staphylococcus aureus*, no tempo de 72 e 96 horas e *Escherichia coli* em 48 e 72 horas. Isso indica que houve uma precisão significativa da difusão em poço entre as medidas dos halos de inibição com relação ao tempo (ESMERINO et al., 2004; CHERN et al., 2015).

Dessa forma, foi possível constatar que o comportamento da amostra ZnAIHDL/CIP em relação ao *Staphylococcus aureus* não apresenta diferença estatística, ou seja, os halos de inibição se mantiveram. Para o *Staphylococcus epidermids* houve uma constante em 24, 48 e 72 horas e diferença somente quando se atingiu 96 horas, indicando uma diminuição no halo de inibição e uma possível

redução da ação do fármaco. Na *Escherichia coli* apresenta um “pico de ação” do fármaco entre 24 e 48 horas, após isso demonstra uma diminuição do halo, porém não apresenta diferença estatística em 72 e 96 horas, mantendo a mesma ação em relação a bactéria. E a *Pseudomonas aeruginosa* não apresenta diferença estatística. Diante desses dados é possível classificar que a amostra ZnAlHDL, possui um sistema de liberação de droga sustentada, pois mantém seus halos de inibição ou apenas apresenta uma pequena redução, porém continua a agir de forma constante (BRASIL, 2011; COLLETT e MORETON, 2005; LORD, 2001).

A ação da amostra ATB/CDC para *Staphylococcus aureus* não apresentou nenhuma diferença. Para o *Staphylococcus epidermids* a amostra apresenta melhor resposta entre 24 e 48 horas, após isso demonstra uma diminuição do halo, porém não apresenta diferença estatística em 72 e 96 horas, mantendo os níveis de ação do fármaco. A ação diante da *Escherichia coli* se caracteriza por entrega imediata, pois apresenta diferença estatística decrescente em relação ao tempo (BRASIL, 2011; ANSEL et al., 2007; COLLETT e MORETON, 2005; VEIGA, 1988). E para *Pseudomonas aeruginosa* não apresenta diferença estatística.

O CIP/PADRÃO para o *Staphylococcus aureus* não apresentou nenhuma diferença. Para *Staphylococcus epidermids* e *Escherichia coli* apresenta diferença estatística decrescente em relação ao tempo. E *Pseudomonas aeruginosa* não apresenta diferença estatística.

A diferença entre o tratamento convencional e a utilização de nanoestruturas está basicamente em como o medicamento é conduzido no organismo. Em tese, nada muda em relação ao antibiótico, mas no seu transporte até as células. O antibiótico intercalado em uma nanopartícula menor do que a célula, o que possibilita sua atuação tanto extra como intracelular (CASTRO, 2009; ANSEL, 2007)

Tabela 15 - Comparação estatística entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) x tempo obtidas pelas técnicas de difusão em poço

Microorganismos	<u>ZnAIHDL/CIP</u>				ATB/CDC				CIP/PADRÃO			
	24H	48H	72H	96H	24H	48H	72H	96H	24H	48H	72H	96H
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,67±0,58	20,67±0,59	20,67±0,60	20,67±0,61	20,00±0,57	25,33±0,57	24,67±1,15	24,33±0,57	19,33±0,57	18,33±0,57	16,67±1,52	16,33±01,52
	cv (2,79%)	cv (2,79%)	cv (2,79%)	cv (2,79%)	cv (2,27%)	cv (2,27%)	cv (4,68%)	cv (2,37%)	cv (2,98%)	cv (3,14%)	cv (9,16%)	cv (9,35%)
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21,00±1,00	22,33±1,52	22,67±1,52	22,67±1,52	26,00±1,00	25,00±0,00	24,00±0,00	24,00±0,00	18,00±0,00	15,00±0,00	13,67±0,57	13,67±0,57
	cv (4,76%)	cv (6,83%)	cv (6,73%)	cv (6,73%)	cv (3,85%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (4,22%)	cv (4,22%)
	a	a	a	b	a	ab	b	b	a	b	c	c
<i>Escherichia coli</i>	26,00±1,00	25,00±0,00	24,00±0,00	24,00±0,00	31,33±0,57	30,00±0,00	27,00±0,00	25,00±0,00	21,00±1,73	17,67±2,30	14,67±1,52	13,00±0,00
	cv (3,85%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (1,84%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (8,24%)	cv (13,07%)	cv (10,41%)	cv (0,00%)
	a	ab	b	b	a	a	b	c	a	b	c	d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30,67±1,15	31,00±1,00	31,00±1,00	31,00±1,73	39,33±1,15	39,00±1,00	38,00±2,00	36,67±1,52	21,00±0,00	21,00±0,00	20,33±0,57	19,67±0,57
	cv (3,76%)	cv (3,22%)	cv (3,22%)	cv (5,58%)	cv (2,93%)	cv (2,56%)	cv (5,56%)	cv (4,16%)	cv (0,00%)	cv (0,00%)	cv (2,83%)	cv (2,93%)
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	b

letras distintas indicam diferença significativa entre as técnicas, de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); cv = coeficiente de variação

### 5.3.4 Ensaio *time-kill*

Dentre os métodos descritos para avaliar a sinergia *in vitro* entre o antibiótico e a nanopartícula, o teste de *time-kill* tem sido amplamente utilizado e validado. O *time-kill* avalia a atividade bactericida, a partir dos resultados podem ser obtidos dados de potência em função do tempo de interação da combinação antibacteriana (BONAPACE et al., 2000; SOPIRALA 2010).

A partir da análise comparativa dos testes de disco-difusão e difusão em poço, conclui-se que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentaram melhor resultado para difusão em poço. Dessa forma, para o teste *time-kill* foi utilizado apenas a cepa de *Escherichia coli*, pois é o agente mais freqüente envolvido em infecções urinárias, sendo responsável por 90% ou mais das infecções adquiridas na comunidade. O ciprofloxacino é um dos antibióticos mais prescritos empiricamente nas infecções urinárias, devido ao amplo espectro de ação em gram-negativos e gram-positivos, e também pela comodidade terapêutica que ele apresenta (via injetável e oral) (DINIZ e SANTOS, 2015; HOOTON, 2012).

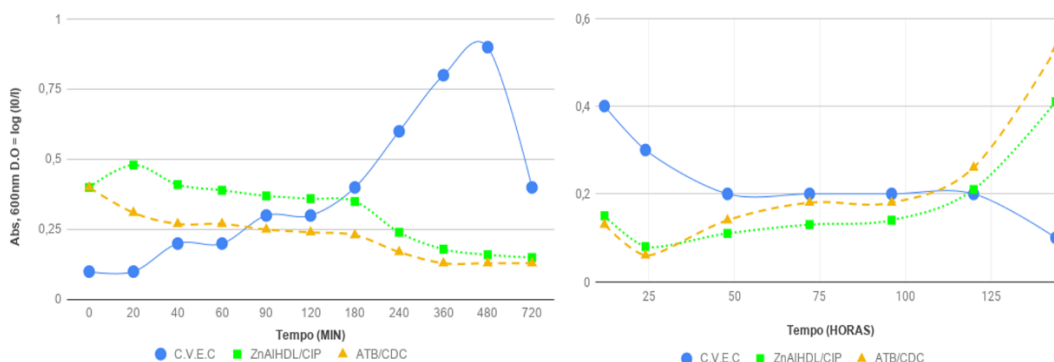
O ensaio *time-Kill* foi realizado com a cepa da *Escherichia coli* para determinar em quanto tempo o ZnAlHDL/CIP em comparação ao ATB/CDC age inibindo o seu crescimento. Estes resultados estão apresentados na Figura 30. Onde há a relação do crescimento bacteriano e a atividade de ciprofloxacino incorporado na nanopartícula e o antibiótico padrão.

Na Figura 30 é possível acompanhar o ciclo de crescimento *Escherichia coli* (C.V. E. C) que apresenta quatro fases principais. A primeira corresponde fase lag onde ocorre intensa atividade metabólica. Contudo, as células não se dividem. Essa fase pode durar alguns minutos, como no caso da *Escherichia coli* que leva em média de 20 a 30 minutos, que corrobora com o resultado apresentado de 40 minutos. A segunda fase é a log (logarítmica) onde a partir de um determinado momento, as células iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento. Durante esse período, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa, e o tempo de geração atinge um valor constante, é o período de maior atividade metabólica da célula que ocorreu a partir de 40 minutos até 8 horas. A terceira fase é a estacionária em que ocorre a depleção de nutrientes ou os produtos tóxicos provocam uma diminuição no crescimento até que o número de células novas produzidas equilibra-se com o número de células que morrem, resultando em um *steady state* (estado de

equilíbrio), que ocorreu de 8 a 10 horas. E a quarta fase é a da morte, caracterizando-se por um declínio no número de células bacterianas viáveis que no caso aconteceu de 12 a 144 horas (WHO, 2

018; VALERO e GINER, 2006).

Figura 30 – Ensaio time-kill



Densidade Óptica (D.O.) da cultura corresponde à Absorvância, que é determinada com base na expressão  $D.O = \log(I_0/I)$ , onde  $I_0$  é a intensidade da luz incidente e  $I$  é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células.

As amostras ZnAIHDL/CIP e ATB/CDC diferem no início de liberação do princípio ativo, demonstrando uma liberação mais lenta do ZnAIHDL e uma liberação imediata de ATB/CDC, no período de 0 a 24 horas, atingindo atividade bactericida máxima em 24 horas e a partir desse intervalo um declínio da atividade antimicrobiana. Porém, comparando a perda gradativa dessa atividade antimicrobiana a partir do período de 48 horas do nanohíbrido e ATB/CDC mostra um tempo de ação prolongada da nanohíbrido em relação a formulação comercial.

Na Tabela 16 o constam os valores do tempo de duplicação e a taxa de crescimento específico é útil para selecionar as condições de cultura ótimas para o microrganismo e estudar o efeito que uma determinada alteração das condições ambientais exerce sobre o seu crescimento. Sendo assim, a Taxa de crescimento exponencial do microrganismo de  $0,257 \text{ h}^{-1}$  e o tempo duplicação celular  $15'42''$ , demonstra que o C.V.E.C estava em excelentes condições de crescimento para a realização do teste de time-kill, apresentando um período de geração inferior a 20' que é o tempo de referência da *Escherichia coli*.

Tabela 16 - Avaliação do crescimento e morte bacteriana.

	C.V.E.C	ZnAIHDL/CIP	ATB/CDC
Taxa de crescimento exponencial do microrganismo	0,257h <sup>-1</sup>	-	-
Coefficiente bactericida	-	-0,159 h <sup>-1</sup>	-0,135 h <sup>-1</sup>
Taxa específica de morte bacteriana	-	0,291 h <sup>-1</sup>	0,364 h <sup>-1</sup>
Tempo duplicação celular	15'42"	-	-
Tempo para uma geração morrer	-	9'54"	8'10"
Tempo de efeito bactericida mínimo eficaz	-	17'46"	22'40"

Os valores do tempo de duplicação e a taxa de crescimento específico também foram utilizados para avaliar o método *time-Kill*, tempo em que a substância-teste leva para matar as células microbianas. Verificou-se que ATB/CDC possui o coeficiente bactericida de -0,135h<sup>-1</sup> e Tempo para uma geração morrer de 8'10", frente a -0,159h<sup>-1</sup> e 9'54" do ZnAIHDL/CIP, possui uma liberação imediata do ciprofloxacino.

Ao ser compar a taxa específica de morte bacteriana 0,364 h<sup>-1</sup> de ATB/CIP e 0,291 h<sup>-1</sup> ZnAIHDL/CIP e tempo de efeito bactericida mínimo eficaz de 22'40" e 17'46", respectivamente, nota-se que a velocidade da perda de ação do fármaco ocorre de forma mais rápida do que a do nanohíbrido, notando-se uma ação mais prolongada em cada tempo que foi analisado, podendo observar que o antibiótico comercial tem o mecanismo de ação mais rápido, reduzindo com maior rapidez suas concentrações na suspensão teste. ZnAIHDL/CIP, apesar de também apresentar uma diminuição gradativa, a velocidade em relação ao tempo é menor, mantendo sua ação por mais tempo na suspensão teste, apresentando uma liberação diária melhor do que o

ATB/CDC, ele fornece a dinâmica da ação da substância-teste e sua interação com o tempo (Tabela 17).

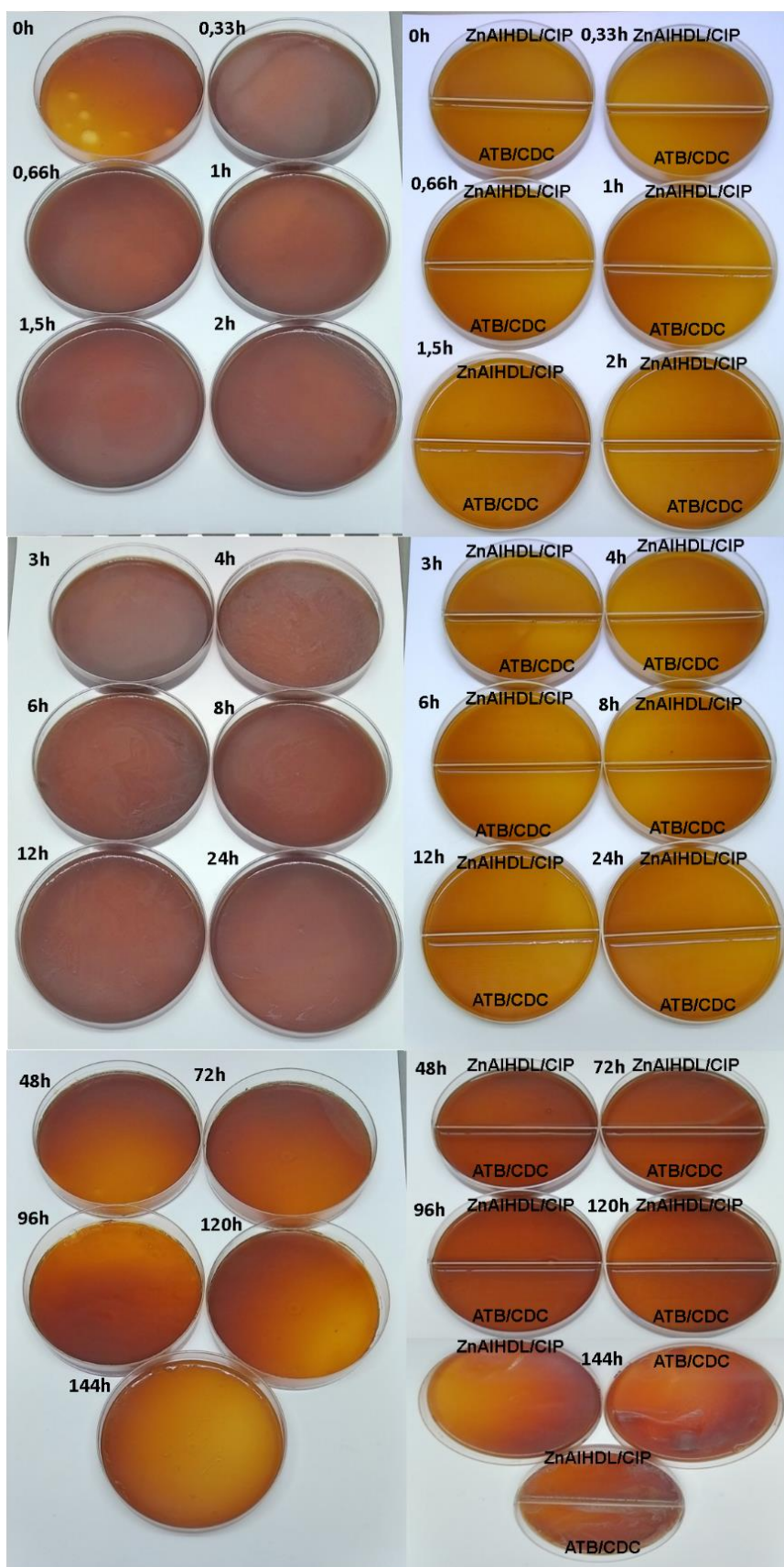
Tabela 17 - Valores absolutos de concentração de células bacterianas de *Escherichia coli*.

Horas	x10 <sup>8</sup> UFC/ml		
Tempo	C.V.E.C	ZnAIHDL/CIP	ATB/CDC
0	1,5	6	6
0,33	1,5	7,2	4,65
0,66	3	6,15	4,05
1	3	5,85	4,05
1,5	4,5	5,55	3,75
2	4,5	5,4	3,6
3	6	5,25	3,45
4	9	3,6	2,55
6	12	2,7	1,95
8	13,5	2,4	1,95
12	6	2,25	1,95
24	4,5	1,2	0,9
48	3	1,65	2,1
72	3	1,95	2,7
96	3	2,1	2,7
120	3	3,15	3,9
144	1,5	6,15	7,95

Time-Kill fornece a dinâmica da ação da substância-teste e sua interação com o tempo

Placas de petri por Pour-plate ou disseminação (método em profundidade) em meio de chromocult coliform agar (Figura 31). O modo usual de realizar uma contagem de células viáveis permitiu determinar o número de células capazes de formar colônias UFC num meio de cultura sólido com composição adequada ao crescimento do microrganismo em causa. Assim foi possível obter os valores absolutos de concentração de células por ml de suspensão. O resultado deste teste validou o acompanhamento da curva de crescimento da *Escherichia coli*. E confirmou que de 0 a 120 horas houve inibição completa do crescimento bacteriano pelas amostras de ZnAIHDL/CIP e ATB/CDC.

Figura 31 - Contagem de células viáveis





## 6 CONCLUSÃO

Por rota mecanoquímica, foi possível realizar a síntese de materiais híbridos em seis variações de razão de  $Zn^{2+}/Al^{3+}$ , para encontrar a razão adequada. Após encontrar o de 1,85, como demonstrou o padrão de DRX, a amostra foi nomeada de ZnAlHDL para que assim fosse realizado IV-FTIR e Ramam que apresentaram resultados confirmando a formação do HDL, com espectros característicos deste material. Com os resultados obtidos através das técnicas de caracterização, é possível concluir que, efetivamente, foi sintetizado o HDL com os ânions interlamelares selecionados e morfologia adequada. Este HDL apresentam uma expansão nos seus espaços interlamelares, possibilitando a síntese para intercalação, possuindo 7, 57 Å de espaçamento basal e 2, 77 Å de espaço interlamelar, que são valores similares encontrados na literatura. Assim, foi possível constatar que a amostra ZnAlHDL apresentou características (estruturais e químicas) que a torna um material potencial para ser utilizada com matriz de armazenado de liberação.

Para o processo de intercalação do antibiótico na nanopartícula, usou-se o método de reconstrução que pode ser confirmado através do padrão DRX, o qual mostrou deslocamento do plano (003), relacionado ao HDL, para ângulos menores de  $2\theta$ , evidenciando que houve uma fase intercalada, com aumento do espaçamento basal para 15,79 Å e espaço interlamelar para 10,99 Å. E o valor de “a” não sofreu alteração, mantendo a identidade do HDL. Para que ocorresse a incorporação completa do antibiótico, foi constatado que são necessárias 72 horas, tempo que apresentou perfil DRX com boa cristalinidade, picos de difração estreitos e bem definidos. O nanohíbrido (ZnAlHDL/CIP) formado apresentou instabilidade em pH ácido, devido a característica de basicidade do HDL, sendo uma limitação comum a utilização da argila aniônica devido esta possuir sensibilidade aos pHs ácidos como o do estômago, entretanto utilizá-la incorporada em matrizes poliméricas ou biohíbridas pode ser uma alternativa eficiente para que protejam o fármaco durante a passagem gástrica.

Durante a realização do TSA, ZnAlHDL demonstrou ser um bom carreador do ciprofloxacino. Com halos de inibição com diâmetro médio de 20.7, 21.0, 25.0 e 30.7 mm. Também apresentou melhor índice terapêutico, comparado ao fármaco comercial, mesmo com concentração inferior, em relação a quantidade do princípio ativo  $\approx 33,3$  (ZnAlHDL/CIP) e 65,3  $\mu g$  (ATB/CDC). Sendo necessário para causar um

efeito terapêutico de CMB 0,9 µg, 1,9 µg, 3,9 µg e 0,4 µg com redução dos efeitos tóxicos resultantes da proporção da dose terapêutica para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermeids*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Que possuem sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino, apresentando halos de 20,3±0,6mm, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* que se mostrou sensível, com halo 27,7±0,6mm. Os testes de liberação do fármaco comprovaram que o sistema de entrega da droga é de liberação sustentada através do híbrido ZnAIHDL/CIP que apresentou atividade permanente na difusão em poço por 96h. Taxa específica de morte bacteriana de 0,364 h<sup>-1</sup> (ATB/CIP) e 0,291 h<sup>-1</sup> (ZnAIHDL/CIP). Tempo de efeito bactericida mínimo eficaz de 22'40" e 17'46" de 24-120h, sendo comprovado pela contagem direta de células viáveis, que de 0 a 120horas houve inibição completa do crescimento bacteriano pelas amostras de ZnAIHDL/CIP e ATB/CDC.

Os resultados obtidos mostraram que a liberação é mais lenta do CIP quando intercalado em HDL. Podendo concluir que o material desenvolvido neste trabalho é grande promissor para carreador de fármacos, pois potencializa sua atividade com novas características aos fármacos convencionais, e em sua maioria, como encontrado na literatura, é capaz de melhorar a eficiência terapêutica. Com a intercalação do antibiótico foi possível observar que seu mecanismo de ação sofreu alteração, através do teste *in vitro*, podendo assim ser uma possível saída para combater a resistência aos antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, NBR 7217 – Agregados determinação da composição granulométrica. ABNT, Rio de Janeiro (1987) 3 p.
- AGRAHARI, V., AGRAHARI, V., MITRA, A.K. **Inner ear targeted drug delivery: what does the future hold?** *Ther. Deliv.* 8, 179–184. 2017.
- AHMED A. A.; TALIB, Z. A.; HUSSEIN, M. Z.; ZAKARIA, A. **Zn–Al layered double hydroxide prepared at different molar ratios**: Preparation, characterization, optical and dielectric properties *Journal of Solid State Chemistry* 191, 2012, p. 271-278.
- AHMET, N. A; BIRGUL, Z. K.; LUIS, M. Z. **A simple mechanochemical route to layered double hydroxides**: synthesis of hydrotalcite-like Mg–Al-NO<sub>3</sub>-LDH by manual grinding in a mortar, *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie* 635, 2009, p. 1470-1475.
- ALCANTARA, A. C. S. et al. Bionanocomposites based on alginate-zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 42, p. 9495-9504, 2010.
- ALEJANDRE, A. et al. Preparation and Study of Cu-Al Mixed Oxides via Hydrotalcite-like Precursors. **Chem. Mater.** v.11, 1999.
- ALIPOUR, M.; OMRI, M.; SUNTRES, Z. E. **Liposome-Entrapped Antibiotics: Recent Progress and Clinical Application. Nanomedical Device and Systems Design.** 2013, 255-490.
- ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Drug delivery system: Entering the mainstream. **Science.** 2004, 303, p. 1818-1822.
- ALMEIDA, A.J.; RIBEIRO, H.M.; SIMÕES, S. Micro e nanoemulsões. In: LOPES, C.M.; SOUTO, E.B. **Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos.** Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, 2011, p. 271-291.
- AMBROGI, V.; FERDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents-i. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. **Inter. J. Pharmaceutics**, 220, 2001, p. 23-32.
- ANDERSSON, M. I; MACGOWAN, A. P. *Development of the quinolones. J Antimicrob Chemother.* 2003 May;51 Suppl 1:1-11.
- ANDRIOLE, V.T. **Quinolones.** In: Mandeli, G.L.; Douglas, R.GJr.; Benneto IE. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3rd. ed., New York. Churchill Livingstone Inc., 1990, pp. 345-349.
- ANIRUDHAN, T.S.; SUCHITHRA, P.S. **Applied Clay Science**, 42, 2008, p. 214-223.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Formas farmacêuticas com velocidade controlada e sistemas de liberação de fármacos. In: \_\_\_\_\_.

**Farmacotécnica:** formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2007. cap. 9, p. 283-300.

ASSIS, L.M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. **Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos.** Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.

AY, A. N.; ZÜMREOGLU-KARAN, B.; TEMEL et al. Bioinorganic magnetic core shell nanocomposites carrying antiarthritic agents: intercalation of ibuprofen and glucuronic acid into Mg-Al-layered double hydroxides supported on magnesium ferrite. **Inorg. Chem.**, 48, 2009, p. 8871-8877.

AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a Liberação controlada de fármacos.** **Monografia.** Disponível em <<http://lqes.iqm.unicamp.br>>. 2002.

BANDEIRA, M.F.C. et al. **Jornal Brasileiro de Clínica Estética e Odontologia**, 3(17): 47, 1998.

BARAHUIE, F.; HUSSEIN, M. Z.; FAKURAZI et al. Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. **Int. J. Mol. Sci.**, 15, 2014, p. 7750-7786.

BARBOSA, R., et al. Efeito de sais quaternários de amônio na organofilização de uma argila entonita nacional (Effect of quaternary ammonium salts on the organophilization of national bentonite clay). **Cerâmica**, v. 52, 2006, p. 264-268. Disponível em: <[scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036669132006000400009](http://scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036669132006000400009)>. Acesso em: 24 maio 2017.

BARNABAS, M.J.; PARAMBADATH, S.; MATHEW, A.; PARK, S. S.; VINU, A.; HA, C.S. J. **Solid State Chem.** 233, 2016, p. 133-142.

BASU, D.; DAS, A.; STÖCKELHUBER, K. W.; WAGENKNECHT, U.; HEINRICH, G. **Prog. Polym. Sci.** 39, 2014, p. 594-626.

BENÍCIO, L. P. F.; SILVA, R. A.; LOPES, J. A.; EULÁLIO, D.; SANTOS, R. M. M. dos; AQUINO, L. A. de; VERGÜTZ, L.; NOVAIS, R. F.; COSTA, L. M. da; PINTO, F. G.; TRONTO, J. Layered double hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture. **Rev. Bras. Cienc. do Solo** 39, 2015, p. 1-13.

BERGAN, T. **Pharmacokinetics of fluorinated quinolones.**In: ANDRIOLE, V.T. The Quinolones, New York, Academic Press, 1988, pp. 119-154.

BEYTH, N; HOURI-HADI, Y; DOMB, A; KHAN, W; HAZAN, R. **Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. (2015) 1–16.

BISH, D. L. **Bulletin de Mineralogie**, 1980, 103, 170.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Med Clin North Am.** 2011 Jul;95(4):793-817, viii.

- BONAPACE, C. R.; WHITE, R. L.; FRIEDRICH, L. V.; BOSSO, J. A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2000 Sep;38(1):43-50
- BORDONAL, A. C. **Materiais Híbridos Baseados em Compostos Lamelares e Moléculas Redox Ativas**. Ribeirão Preto, 2016.
- BOTAN, R. **Síntese e Caracterização de nanocompósitos de poli (estireno) com materiais lamelares – hidróxido duplo lamelar e hidroxissal lamelar – via in situ** – Campinas, SP, 2004.
- BOTAN, R.; NOGUEIRA, T. R.; LONA, L. M. F.; WYPYH, F. – Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno - Hidróxido Duplo Lamelar Via Polimerização *In Situ*, **Polímeros**, 21, 2011, p. 34-38.
- BRASIL. **Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos**, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.
- BU, M., TANG, J., WEI, Y., SUN, Y., WANG, X., WU, L., LIU, H. Enhanced bioavailability of nerve growth factor with phytantriol lipid-based crystalline nanoparticles in cochlea. **Int. J. Nanomedicine** 10, 6879–89. 2015.
- BRITO, A.; BORGES, M.E.; GARIN, M.; HERNANDEZ, A. Biodiesel Production from Waste Oil Using Mg-Al Layered Double Hydroxide Catalysts. **Energy & Fuels**, v. 23, 2009, p. 2952-2958.
- BRITO, M. A. V. P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 5, p. 531–537, 2001.
- BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. **Necessidade de novos antibióticos**. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2012, vol.48, n.4, pp.247-249.
- Brito, M. M.; Cordeiro, B. C. **The need of new antibiotics**. J Bras Patol Med Lab v. 48 n. 4, 247-249, 2012.
- BUGATTI, V.; ESPOSITO, L.; FRANZETTI, L.; TAMMARO, L.; VITTORIA, V. Influence of the powder dimensions on the antimicrobial properties of modified layered double hydroxide. **Appl. Clay Sci**. 2013, p. 75–76, 46–51.
- CARDOSO, P.L.; **Estudo da Aplicação de Hidróxidos Duplos Lamelares na Remoção e Liberação lenta de pesticidas**. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Área de concentração: Química, São Paulo, 2006.
- CARRETERO, M.I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review **Appl. Clay Sci.**, v. 21, 2002, p. 155.
- CARRIAZOA, D.; DEL ARCO, M.; GARCÍA-LÓPEZ, E.; MARCÌ, G.; MARTÍN, C.; PALMISANO, V.; RIVES, V; MOL, J. **Catal. A-Chem**. 2011, p. 342-343, 83-90.

- CASTRO, K. A. D. F. **Imobilização de metaloporfirinas em hidróxidos duplos lamelares esfoliados e funcionalizados**. 2009, 109f. Dissertação (Químico)-UFPR, 2009.
- CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACARRI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catal. Today**, 11(2): 173-301, 1991.
- CHAKRABORTY J.; CHAKRABORTY M.; GHOSHS.; MITRA, M. K. Key Engineering Materials Vol. 571 (2013) pp 133-167© (2013) **Trans Tech Publications**, Switzerland, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.571.133.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, 2007, p. 269-280. <[http:// dx.doi.org/10.1016/j.tifs](http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs)>. 2007.01.007.
- CHEN, Y.; WANG, X.; LUO, S.; BAO, Y. **Rare Earth** 34, 2016, p. 1095-1102.
- CHERN, M. MEI, X. YANG, Q. ZHANG, A. **Stability of non-monotone critical traveling waves for reaction–diffusion equations with time-delay**, J. Dynam. Differential Equations 259 (2015) 1503–1541.
- CHITRAKAR, R.; TEZUKA, S.; SONODA, A.; SAKANE K.; OOI K; and HIROTSU, T. A. Solvent free Synthesis of Zn–Al Layered Double Hydroxides. **Chemistry Letters**. Vol.36, No.3, 2007.
- CHIU, W.; GOODWIN, J.T.; Li F.; Li K. C.; Li Z.; KHANT, H. A., O'Neill B.E., QIN, G., XIN, R. Partially polymerized liposomes: stable agaisnt leakage yet capable of instantaneous release for remote controlled drug delivery. **Nanotechnology**. 2011. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/0957-4484/22/15/155605>> Acesso em 19/3/2013.
- CHOY, J.H., et al., **Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide**. J. Am. Chem. Soc. v. 121, p. 1399, 1999.
- CLSI. **Clinical and laboratory standards institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania 19087 USA, 2018.
- COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas – uma revisão. **Química Nova**. v. 30, n. 5, 2007, p.1282-1294.
- COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. São Paulo: Artmed, 2005. cap. 20, p. 298-313.
- COMPARELLI, R.; FANIZZA, E.; CURRI, M. L.; COZZOLI, P. D.; MASCOLO, G.; AGOSTIANO, A. **Appl. Cat. B: Environ.** 60 (2005) 1.
- CONCEIÇÃO, L.; PERGHER, S. B. C.; MORO, C. C.; OLIVEIRA, L. C. A. Compósitos magnéticos baseados em hidrotalcitas para a remoção de contaminantes aniônicos em água. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 2007, p.1077-1081.

COSTA, A. L. P.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura** v. 7, n. 2, p. 45-57. 2017

COSTANTINO, U.; NOCCHETTI, M.; SISANI et al. Recent progress in the synthesis and application of organically modified hydrotalcites. **Z. Kristallogr**, 224, 2009, p. 273-281.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. – “Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações”, **Química Nova**, 21,1997, p. 300-311.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Layered Double Hydroxides: Structure, Synthesis, Properties and Applications. **Química Nova**, 21, 1998, p. 300–311.

CREPALDI, E.L.; TRONTO, J.; CARDOSO, L.P.; VALIM, J.B. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, 211, 2002, p. 103-114.

CUI, X., DAI, X., KHAN, K.Y., LI, T., YANG, X., HE, Z. Removal of phosphate from aqueous solution using magnesium-alginate/chitosan modified biochar microspheres derived from *Thalia dealbata*. **Bioresour. Technol.** 218, 1123-1132. 2016

CUNHA, V. R. R.; FERREIRA, A. M. C.; COSNTATINO, V. R. L. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**, vol. 33, nº.1, 2010, p. 159-171.

CUNHA-FILHO, M.S.S.1; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.

DE ROY, A.; FORANO, C.; BESSE, J. P. **Anionic Clays - Trends in Pillaring Chemistry**. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1991, 202,127-ETR.

DE, M.; GHOSH, P.S.; ROTELLO, V.M. Applications of nanoparticles in biology. **Adv. Mater.** 2008, 20, p. 4225-4241.

DEL ARCO, M.; CEBADERA, E.; GUTIERREZ, S.; MARTÍN, C.; MONTERO, M. J.; RIVES, V.; ROCHA, J.; SEVILLA, M. A.; J. **Pharm. Sci.** 2004, 93, 1649.

DEL ARCO, M.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, C.; RIVES, V., 2009. Release studies of different encapsulated in Mg,Al,Fe-hydrotalcites. **Applied Clay Science** 42, 538–544.

DIAS, M.; MONTEIRO, M.; MENEZES, M. **Antibiotics and bacterial resistance, old issues, new challenges**. Clínica farmacológica. Lisboa: Hospital Cuf Descobertas, 2010.

DINIZ, M. M.; SANTOS, R. M.C. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in hospitalized patients from a University Hospital in Manaus, 2015. **R Epidemiol Control Infec**, Santa Cruz do Sul, 7(1):20-24, 2017.

DUNCAN, R. Y.; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. **Molecular Pharmaceutics**, (2011) 8(6), 2101-2141.

EDENHARTER, A., BREU, J. Applying the flame retardant LDH as a Trojan horse for molecular flame retardants. **Appl. Clay Sci.** 114, 603–608. 2015

EHRlich, P. **Collected Studies on Immunology.** John Wiley & Sons, Londres, 1906.

ELKHATTABI, E. H.; LAKRAIMI, M.; BADREDDINE et al. Removal of remazol blue from wastewater by zinc–aluminium–chloride-layered double hydroxides. **Appl. Water Sci.**, 2013, 3:431-438.

EL-TONI, A.M.; YIN, S.; SATO, T. Silica coating of Zn<sub>2</sub>Al/4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid nanocomposites via seeded polymerization technique, **Materials Chemistry and Physics** **89**, 2005, p. 154-158.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; Schelesky, M. E.; **Biol. Health Sci.** 2004, 10, 53.

EVANS, D.G.; SLADE, R.C.T. Layered double hydroxides. In: **Structure and Bonding.** Vol. 119. Springer, Berlin, Germany, 2006, p. 1-87.

FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; CLARK, D. S.; Dordick, J. S.; Cabral, J. M. S.; **Trends Biotechnol.** 2009, 27, 342.

FENG, H.A.; AL-MEGREN, Z.; ZHANG, M.C.; AL-KINANY, Z.; YAN, Z.; ZHANG, X. **Softtemplating pathway to create nanostructured Mg–Al spinel as high-temperature absorbent for SO<sub>2</sub>**, *J. Porous Mater.* 21 (6) (2014) 947–956.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* (1929)10, 226–236.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of pharmacy.** English, Book, Illustrated edition. 2006.

FONTES, D. A. F. **Síntese e Aplicação de Hidróxidos Duplos Lamelares: Adjuvantes Funcionais para Incremento de Solubilidade e Sistemas de Liberação de Fármacos** - Recife, 2016.

FORANO, C.; HIBINO, T.; LEROUX, F. Layered double hydroxides. **Handbook of clay Science.** V.1, p. 1021-1095, 2006.

FRANCO, N. A. **Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas, o Estado da Arte.** Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2013.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *hypericum brasiliense choysi*. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 5, 1103-1106, 2009

FREIRE, I.C.M.1; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos



Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.372-377, 2014.

FROST, L.; ERICKSON, K. L. Raman spectroscopic study of the hydrotalcite desautelsite  $Mg_6Mn_2CO_3(OH)_{16} \cdot 4H_2O$ . **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 61(11): 2697-2701, 2005.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GELINSKI, J. M. L. N.; ROSA, J. C. D.; DUQUESNE, E. F. A.; BARATTO, C. M **Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima.** Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 131-144, jul./dez. 2007

GENNARO, A. R.; REMINGTON, J., P. **Remington: a ciência e a prática da farmácia.** 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 1015-1021.

GIBSON, M. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. **CRC Press.** Florida, 2001, p. 335.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Quim. Nova**, Vol. 33, N.3, 667-679, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova** vol.33 no.3 São Paulo. 2010

GUIMARAES, J.L. et al. Covalent grafting of ethylene glycol into the Zn-Al-CO<sub>3</sub> layered double hydroxide. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 227 (2), 2000, p. 445.

GUNAWAN, P.; XU, R. Direct Control of Drug Release Behavior from Layered Double Hydroxides through Particle Interactions. **Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 97, n.10, 2008, p. 4367-78.

GUPTA, A; LANDIS, R. F.; ROTELLO, V. M. **Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical.** Research. (2016) 1–10.

HAJIBEYGI, M.; SHABANIAN, M.; KHONAKDAR, H. A. Zn–AL LDH reinforced nanocomposites based on new polyamide containing imide group: From synthesis to properties. **Applied Clay Science**, 114, 2015, p. 256-264.

HARAKETI, M.; HOSNI, K.; SRASRA, E. **Surface Engineering and Applied Electrochemistry.** Allerton Press, Inc., 2017, Vol. 53, No. 4, pp. 360–370.

HOOTON, T. M. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. **N Engl J Med** 2012;366(11):1028-37.

HOURI, B.; LEGROURI, A.; BARROUG, A.; FORANO, C.; BESSE, J. P. Use of the Ion-Exchange Properties of Layered Double Hydroxides for Water Purification.

**Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique**, 96, 1999, p. 455-463.

HOYO, C.D. **Appl. Clay Sci.** 36, 103-121, 2007.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Send to J Control Release*. 2011 Dec 10;156(2):128-45.

HUSSEIN, M. Z. B.; ZAINAL, Z.; YAHAYA et al. Controlled release of a plant growth regulator,  $\alpha$ -naphthaleneacetate from the lamella of Zn–Al-layered double hydroxide nanocomposite. **J. Controlled Release**, 82, 2002, p. 417-427.

INTISSAN, M. et al., Trivalent Cation Substitution Effect into Layered Double Hydroxides  $\text{Co}_2\text{Fe}_y\text{Al}_{1-y}(\text{OH})_6\text{Cl}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ : Study of the Local Order: Ionic Conductivity and Magnetic Properties; **J. Solid State Chem.**, v. 167, 2002, p. 508.

IWASAKI, T.; SHIMIZU, K.; NAKAMURA, H.; WATANO, S. **MATER. Lett.** 68, 2012, p. 406-408.

JUDEINSTEIN, P.; SANCHEZ, C. Hybrid organic-inorganic materials: A land of multi disciplinary. **Journal of Materials Chemistry**, 1996, 6 (4), p. 511-525.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital . **Rev. Bras. Farm.** 93(2): 128-135, 2012.

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

KAPOOR, M.P.; MATSUMURA, Y. Liquid-phase methanol carbonylation catalyzed over tin promoted nickel–aluminium layered double hydroxide, **Catalysis Today** 93–95 (93), 2004, p. 287-290.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜ, L. M.; ADIGÜZEL, A. **Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus**. *J Ethnopharmacol.* 2003. 85: 231-235.

KAUL, P.K., SAMSON, A.J., SELVAN, G.T., ENOCH, I.V.M.V., SELVAKUMAR, P.M. Synergistic effect of LDH in the presence of organophosphate on thermal and flammable properties of an epoxy nanocomposite. **Appl. Clay Sci.** 135, 234–243. 2017

KEVADIYA, B. D. et al. **Biodegradable gelatin-ciprofloxacin-montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application**. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 122C, p. 175-183, Jun 30 2014.

KHAN, A.I.; O'HARE, D. **Intercalation chemistry of layered double hydroxides: recent developments and applications**. *J. Mater. Chem.* 12, 2002, p. 3191-3198.

KHUSNUTDINOV, V.P.; ISUPOV, V.P. **Mechanochemical synthesis of a hydroxycarbonate form of layered magnesium aluminum hydroxides**. *Inorg. Mater.* 44, 2008, p. 315–319.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3rd Ed. Washington DC, American Pharmaceutical Association, 2000, 665 p.

KIM, H. J.; RYU, K.; KANG, J. H.; et al. Anticancer activity of ferulic acid-inorganic nanohybrids synthesized via two different hybridization routes, reconstruction and exfoliation-reassembly. **The ScientificWorld J.**, 2013, p.1-9.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jun;8(6):423-35

KOST, J.; LANGER, R. **Responsive polymeric delivery systems**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 327-341, 2012. ISSN 0169409X.

KUTHATI, Y.; KANKALA, R.K.; LEE, C.H. Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: current status and recent prospects. **Appl. Clay Sc.** 2015, p.112-113, 100-116.

LAGUNA, H.; LOERA, S.; IBARRA et al. Azoic dyes hosted on hydrotalcite-like compounds: Non-toxic hybrid pigments. **Microporous and Mesoporous Materials**, 98, 2007, p. 234-241.

LEBARON, P. C.; WANG, Z.; PINNAVAIA, T. J. Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview. **Applied Clay Science**, 1999, 15 (1-2), 11-29.

LEE, M. K.; Kanatani, M. S. Quinolones: which generation for which microbe? **West J Med.** 1999;170(6):359-61.

LEI, X.; LU, W.; PENG et al. Activated MgAl-layered double hydroxide as solid base catalysts for the conversion of fatty acid methyl esters to monoethanolamides. **Applied Catalysis A: General**, 2011, 399, 87-92.

LERF, A. Storylines in intercalation chemistry. **Dalton Trans.**, 43, 2014, p. 10276-10291.

LEROUX, F.; BESSE, J.P.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K.G. Layered Double Hydroxide/Polymer Nanocomposites. In: WYPYCH, F. **Clay Surfaces: Fundamentals and Applications**. London: Elsevier, 2004. 553 p.

LI, B.; HE, J.; EVANS et al. Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of fenbufen. **Applied Clay Science**, 27, 2004, p. 199-207.

LI, J.; FRONCZEK, F. R.; FERREIRA, D.; BURANDT-JR, C. L.; SETOLA, V.; ROTH, B. L.; ZJAWIONY, J. K.; *J. NAT. Prod.* 2012, 75, 728.

LIEBERMAN, H. **Pharmaceutical Dosage Forms**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, p. 286.

LIMA, A. E. **Hidróxidos duplos lamelares: uma visão experimental das propriedades químicas e físicas e aplicação industrial**. Niterói: 2017. 100f.

LIN, B.; SUN, P.; ZHOU, Y.; JIANG, S.; GAO, B.; CHEN, Y.; HAZARD, J. **Mater.** 280, 2014, 156-163.

LIU, Z.; MA, R.; OSADA, M.; IYI, N.; EBINA, Y.; TAKADA, K.; SASAKI, T.; Synthesis, Anion Exchange, and Delamination of Co–Al Layered Double Hydroxide: Assembly of the Exfoliated Nanosheet/Polyanion Composite Films and Magneto-Optical Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, 2006, p. 4872-4880.

LOPES, H. Antibiotics, resistance and a new action mechanisms. **Revista Panam Infectol.** 2009; 11(2):67-68

LOPEZ, T.; BOSCH, P.; RAMOS, E.; GOMEZ, R.; NOVARO, O.; ACOSTA, D., FIGUERAS, F. **Langmuir**, v. 12, 1996, p. 189-192.

LORDI, N.G. Formas farmacêuticas de liberação prolongada. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIE, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkia, 2001. v. II, p. 737-781.

LU, X.; MENG, L.; LI et al. Facile fabrication of ibuprofen–LDH nanohybrids via a delamination/reassembling process. **Materials Research, Bulletin**, 48, 2013, p.1512-1517.

LU, Y.; ZHAO, Y. Synthesis of layered cathode materials  $\text{Li}[\text{Co}_x\text{Ni}_y\text{Mn}_{1-x-y}]\text{O}_2$  from layered double hydroxide precursors. **Particuology**, 8, 2010, p. 202–206.

LYON, R.; BINGHAM, D.J.; MILLS, O. **Prog. Org. Coat.** 102A (2017) 2–7.

MA, R.; LIU, Z.; LI et al. Exfoliating layered double hydroxides in formamide: a method to obtain positively charged nanosheets. **J. Mater. Chem.**, 16, 2006, p. 3809-3813.

MACHADO, J. A. C.; OLIVEIRA, A. C.; ANTÔNIO, N. S.; CANESINI, R.; ROCHA, J. R.; NEGRI, D. **Quinolonas: revisão de literatura**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária – issn: 1679-7353. Ano VII Número 12 – janeiro de 2009.

MAHJoubi F. Z.; KHALIDI, A.; ABDENNOURI, M., BARKA, N. Zn–Al layered double hydroxides intercalated with carbonate, nitrate, chloride and sulphate ions: Synthesis, characterisation and dye removal properties. **Journal of Taibah University for Science**, 11, 2017, p. 90-100.

MAI, Y-W, YU, Z-Z. **Polymer Nanocomposites**. 1.ed. New York: CRC press LLC, 2006. 594 p.

MALHERBE, F.; FORANO, C.; BESSE, J. P. **Journal of Materials Science Letters**, 18, 1999, p. 1217-1219.

MAMMERI, F., LE BOURHIS, E., ROZES, L., SNACHEZ, C. **Journal of materials chemistry**, 2005, 15, 37871.

MARANGONI, R. **Imobilização de nanopartículas de ferro em óxidos isolantes e semicondutores**. Dissertação de Mestrado, área de concentração: Química Inorgânica. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Paraná, 2005a.

MARANGONI, R. **Materiais multifuncionais obtidos a partir da intercalação de corantes aniônicos em hidróxidos duplos e hidroxissais lamelares e disperso em polímeros**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009b 193 p., Tese (Doutorado).

MARANHO, D. **Estudo comparativo “in vitro” de formas farmacêuticas sólidas de liberação controlada contendo diclofenaco sódico**. 2000. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MARTIN, K.J.; PINNAVAIA, T.J. Layered double hydroxides as supported anionic reagents. Halide-ion reactivity in zinc chromium hexahydroxide halide hydrates  $[Zn_2Cr(OH)_6X.nH_2O]$  (X=Cl, I). **J. Am. Chem. Soc.**, v.108, 1986, p. 541.

MEYAGUSKU, V. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- Campus Araraquara, 2014

MEYER, O.; ROESSNER, F.; RAKOCZY et al. Impact of organic interlayer anions in hydrotalcite precursor on the catalytic activity of hydrotalcite-derived mixed oxides. **Chem. Cat. Chem.**, 2, 2010, p. 314-321.

MILANEZ, D. H.; CHANCHETTI, L. F.; AMARAL, R. M. **Prospecção tecnológica dos processos de obtenção da nanocelulose a partir de indicadores tecnológicos**. Contribuição técnica ao 69º Congresso Anual da ABM – Internacional e ao 14º ENEMET - Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Metalúrgica, de Materiais e de Minas, 21 a 25 de julho de 2014, São Paulo, SP, Brasil.

MINGOS, D. M. P. Structure and bonding. **Springer**, 1-242, 2006.

MODI, K. et al. Oral Controlled Release Drug Delivery System: An Overview. International **Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 70-76, 2013. ISSN 22308407.

MORAIS, E. A. **Incorporação de Er em SnO<sub>2</sub> obtido via sol-gel: uma análise de xerogéis e filmes finos**. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2002.

MORPURGO, S.; JACONO, M. L.; PORTA, P. – Copper-zinc-cobalt-aluminium chromium hydroxycarbonates and mixed oxides, **Journal of Solid State Chemistry**, 122, 1996, p. 324-332.

MUSUMECI, A. W.; MORTIMER, G. M.; BUTLER et al. Fluorescent layered double hydroxide nanoparticles for biological studies. **Applied Clay Science**, 48, 2010, p. 271–279.

NALAWADE, P. et al. Layered Double Hydroxides: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.68, 2009.

NEU, H.C. **Quinolonas: Uma nova classe de agentes antimicrobianos com ampla utilização potencial**. In Clínicas Médicas da América do Norte. Atualização em Antibioticoterapia 11, Volume 3, Interlivros, Rio de Janeiro, 1988, p.647-661.

NOGUEIRA, T. R., BOTAN, R., WYPYCH, F., LONA, L.M.F. J. Appl. **Polym. Sci.**, v. 124, p. 1764-1770, 2012.

NUNES, P. A. R. **Aplicação dos lipossomas como estratégia para superar a resistência bacteriana aos antibióticos**. Faculdade de Ciências e Tecnologias. 2015

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

O'HARE, D. M.; ASHLEY, A. E. Drug delivery system comprising a drug intercalated between a layered double hydroxide. PCT/GB2001/005484, WO2002047729 A2, 12 dez. 2001, 20 jun. 2002. **Isis Innovation Limited**, 2004.

OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃESA, A. L.; PACHECOB, M.; ARAÚJO, C. S. Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e citotóxica de espécimes de *Leonotis nepetifolia* L. r. (br). **quim. nova**, vol. 39, no. 1, 32-37, 2016

OLIVEIRA, F. B. M. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, Teresina. v.4, n.4, p.72-77, 2011.

OLIVEIRA, J. F. A. **Funcionalização de nanopartículas de prata com antibióticos -lactâmicos: uma alternativa para a resistência bacteriana**. Universidade estadual de campinas instituto de química, 2014

OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1913–1920, 2012.

ORTHMAN, J., ZHU, H. Y., LU, G. Q. **Sep Purif. Technol.** 2003, p. 31-53.

OUTMAN, W.R., NIGHTINGALE, C.H. Metabolism and fluoroquinolones. **Am. J. Med.** 87:37-42, 1989.

PAHALAGEDARA, L.R.; PAHALAGEDARA, C.; KUO, S.; DHARMARATHNA, S.L. **Ordered mesoporous mixed metal oxides: remarkable effect of pore size on catalytic activity**, *Langmuir* 30 (27) (2014) 8228–8237.

PALMER, S.J.; NGUYEN, T.; FROST, R.L. **Coordination Chemistry Reviews**, 253, 2009, p. 250-267.

PARK, D.; YANG, J.; VINU, A.; ELZATAHRY, A.; CHOY, J. **X-ray diffraction and X-ray absorption spectroscopic analyses for intercalative nanohybrids with low crystallinity**. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.

PAVAN, P.C.; CREPALDI, E.L.; GOMES, G.A.; VALIM, J.B. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 154, 1999, p. 399-410.

PELGRIFT, R. Y; FRIEDMAN, A. J. **Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65:13-14 (2013) 1803–1815.

PEREJÓN, A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, P. E., CRIADO, J. M., et al. Kinetic analysis of complex solid-state reactions. A new deconvolution procedure. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, vol. 115, no 8, p. 1780-1791

PERIOLI, L.; NOCCHETTI, M.; GIANNELLI et al. Hydrotalcite composites for an effective fluoride buccal administration: a new technological approach. *Inter. J. Pharmaceutics*, 454, 2013, p. 259-268.

PERIOLI, L.; POSATI, T.; NOCCHETTI et al. Intercalation and release of antiinflammatory drug diclofenac into nanosized ZnAl hydrotalcite-like compound. *Applied Clay Science*, 53, 2011, p. 374-378.

PESSANHA A.F.V.; ROLIM L.A.; PEIXOTO M.S.; SILVA R.M.F.; ROLIM-NETO P.J. Influence of functional excipients on the performance of drugs in dosage forms, *Ver Bras Farm.*, v. 93, n. 2, 2012, p.136-145.

POZZATTI, P.; LORETO, E.S.; LOPES, P.G.M.; ATHAYDE, M.L.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; **Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils**. *Mycoses*. 2009;53(1):12-5

PSHINKO, G. N. Layered Double Hydroxides as Effective Adsorbents for U (VI) and Toxic Heavy Metals Removal from Aqueous Media. *J. Chem.*, v. 2013, p. 1- 9, Article ID 347178, 2013.

PUTTASWAMY, N. S.; VISHNU KAMATH, P. Reversible thermal behaviour of layered double hydroxides: a thermogravimetric study. *Journal of Materials Chemistry*, v. 7, n. 9, p. 1941, 1997. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/DOI=a701911d>>. Acesso em: 30 Jun. 2012.

QU, J.; HE, X.; LEI, Z.; ZHANG, O.; LIU, X. Mechanochemical synthesis of dodecyl sulfate anion (DS<sub>-</sub>) intercalated Cu-Al layered double hydroxide. *Solid State Sciences* 74, 2017, p. 125 e 130.

QU, J.; HE, X.; WANG, B.; ZHONG, L.; WAN, L.; LI, X.; SONG, S.; ZHANG, Q. *Appl. Clay Sci.* 120, 2016, p. 24–27.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L; SLAGADO, R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. *Rev Bras Clin Med.* São Paulo, 2012 mar-abr;10(2):132-8.

RADAELLI, M. et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424–430, 2016.

RADHA, A.V.; KAMATH, P. V.; SUBBANNA, G. N. Disorder in layered hydroxides: synthesis and DIFFaX simulation studies of  $Mg(OH)_2$ . **Materials Research Bulletin**, 38, 2003, p. 731-740.

RAJAMATHI, M. THOMAS, G. S., KAMATH, P. V. **Proc. Indian Acad Sci-Chem Sci.** 2001, 113, 671-80.

RAPHAEL, E. **Estudo de eletrólitos poliméricos a base de ágar para a aplicação em dispositivos eletrônicos**. Tese Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. 147 p.

REESE, R. E.; SENTOCHNICK, D.E.; DOUGLAS, R. G.; BETS, R. F. **Manual de Antibióticos**, Medsi, Rio de Janeiro, 1990, p. 221-233.

REICHEL, C.; BRUGGER, R.; BANG et al. Molecular Cloning and Expression of a 2-Arylpropionyl- Coenzyme A Epimerase: A Key Enzyme in the Inversion Metabolism of Ibuprofen. **Mol. Pharmacol**, 51: 1997, p. 576-582.

REICHLER, W. T. **Synthesis Of Anionic Clay Minerals** (Mixed Metal Hydroxides, Hydrotalcite). *Solid States Ionics* 22, 135-141 North Holland, Amsterdam, 1986.

RIBEIRO, C. **Intercalação de Ânion Enalaprilato em Hidróxido Duplo Lamelar Recoberto com Xiloglucana: Estudos De Liberação *In Vitro***. Curitiba, UFPR, 2008.

RIVES, V. Characterisation of layered double hydroxides and their decomposition products. **Mater. Chem. Phys.** 2002a. 75, 19–25.

RIVES, V. **Layered Double Hydroxide: Present and Future**. New York: Nova Science Publisher, 2001b, 503 p.

RIVES, V.; KANNAN, S. Layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure containing  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Al^{3+}$ . **Journal of Materials Chemistry**, 2000c, 10 (2), p. 489-495.

RODRIGUES, J. C. **Síntese, caracterização e aplicações de argilas aniônicas do tipo hidrotalcita**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

ROJAS-AGUIRRE, Y.; AGUADO-CASTREJÓN, K.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? **Educación Química** (2016) 27, 286-291.

ROMÁN, M. S.; HOLGADO, M. J.; SALINAS, B.; RIVES, V. **Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure** *Applied Clay Science* 55. 2012, p. 158–163.



ROSENBERG, M. ROSE, A. FERNANDES. E. **Organotin compounds in foods, Persistent Org. Pollut. Toxic Met. Foods** 150 (2013) 430.

RYU, A, B.; HYUN JUNG, C.; JAE-MIN, O. D.; JIN-KYU LEE, A.; JIN-HO CHOY, E. N. Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system. **Journal of Physics and Chemistry of Solids** 71 (2010) 685–688

SÁEZ, V.; HERNÁEZ E.; ANGULO, L.S.; KATIME, I. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.4, 2003, p.111-122.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, 2007, p. 20-31. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>>.

SAKR, A.A.-E.; ZAKI, T.; SABER, O.; HASSAN, S.A.; ABOUL-GHEIT, A.K.; FARAMAWY, S. **Taiwan Inst. Chem. E** 44, 2013, p. 957–962.

SALCEDO, S. S.; NIETO, A.; VALLET-REGI. M. Fosfato Hydroxyapatite /  $\beta$ -tricalcío / andaimes agarose macroporosas para engenharia de tecido ósseo. **Chemical Engineering Journal**. v. 137, n. 1, p. 62-71, 2008.

SALMONES, J.; ZEIFERT, B.; GARDUÑO, M.H.; CONTRERAS-LARIOS, J.; ACOSTA, D.R.; SERRANO, A.R.; GARCIA, L.A. **Synthesis and characterization of hydrotalcites by mechanical milling and conventional method**. *Catal. Today*, 2008, p. 133-135, 886–890.

SANCHES, E. A. **Estudo de XRD e SAXS aplicados à polianilina e a poli (Ômetoxianilina)**. Instituto de Física, Química e Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011. 148 p

SANCHEZ, C., JULIAN, B., BELLEVILLE, P., POPPAL, M. **Journal of materials chemistry**. 2005, 15, 3559.

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO C. D.; BARROS, D ; GUIMARÃES, A. G. **Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole**. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564. 2011

SANTOS, P. S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**, São Paulo: Edgard Blucher, 1989.

SANVICENS, N.; MARCO, M. P. **Trends. Biotechnol.** 2008, 26, 425.

SCHAPER, H.; BERG-SLOT, J.J.; STORK, W.H. Stabilized magnesia: a novel catalyst (support) material, **Applied Catalysis** 54. 1989, p. 79-80.

SACHS, I. **Estratégias de transição para o século XXI: desenvolvimento e meio ambiente**. São Paulo: Studio Nobel, 1993.

SEJAS, L. M.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Evaluation of the quality of the antimicrobial agents disks used in disk-diffusion tests commercially available in Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.39 no.1 Rio de Janeiro, 2003.

SHIMANOVICH, U; GEDANKEN, A. Nanotechnology solutions to restore antibiotic activity. **Journal Materials Chemistry B.** (2016) 824–833.

SILVA, L. P. R. **Materiais híbridos de hidróxidos duplos lamelares com ácido cólico: estudo da liberação em meio aquoso.** Ribeirão Preto, 2010.

SIPICZKI M. Functional materials syntheses, characterisation and catalytic applications. 2013. 83f. **PhD Dissertation** (Chemical) – Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Szeged, 2013.

SLAGHEK, T. M.; BATENBURG, L. F.; FISCHER et al. **Preparation for treatment of mineral deficiency.** 7 dez. 2005, 13 jun. 2007.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; DRUMOND, M. R. S.; TRAVASSOS, D. B.; SILVA, C. A.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de tinturas de plantas tropicais sobre microorganismos da cavidade bucal. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 29, n. 1, p. 20-24, 2008.

SOARES, I. C. Sistemas matriciais: otimização de fórmulas de comprimidos do tipo matriz inerte contendo os agentes tuberculostáticos rifampicina e isoniazida. **Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.**

SOARES-SOBRINHO, M. T. B.; LA ROCA, J. A. B., OSNIR, D. E. S.; ROLIM NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2007.

SOPIRALA, M. M.; MANGINO, J. E.; GEBREYES WA, B. B.; BANNERMAN, T. BALADA-LLASAT, J. M.; PANCHOLI, P. **Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii.** **Antimicrob Agents Chemother.** 2010 Nov;54(11):4678-83.

SOUSA, P R M. **Intercalação de ibuprofeno em hidróxidos duplos lamelares: Caracterizações físico-químicas e avaliações biológicas.** Belém-Pará, 2016.

SPRINGFIELD, E. P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. **An assessment of two Carpobrotus species extracts as potential antimicrobial agents.** **Phytomedicine.** 2003.10: 434-439.

STARUKH, G.; ROZOVIK, O.; ORANSKA, O. **Nanoscale Res. Lett.** 11, 2016, 228.

STOCKEL, R. Bisphosphonates inorganic carriers. US11/157,003, **US20060013893A1**, 20 jun. 2005, 19 jan. 2006.

SUAREZ, J. J. B.; MOZO, E. A. P.; OYAMA, S. T. Review of the synthesis of layered double hydroxides: a thermodynamic approach. **Química Nova**, v.27, n.4, p. 601-614, 2004.

- SUN, Y.; ZHOU, Y.; YE, X.; CHEM, J.; WANG, Z. Fabrication and infrared emissivity study of hybrid materials based on immobilization of collagen on to exfoliated LDH. **Mater. Lett.**, v. 62, p. 2943-2946, 2008.
- TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-Guest Interaction swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. 1: Complex formation between a swelling clay mineral and griseofulvin. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular recognition in Chemistry**, v. 10, 1991, p. 283-297.
- TARUTANI, Y.; TOKUDOME, M.; FUKUI, K.; NAKANISHI, M. **Fabrication of hierarchically porous monolithic layered double hydroxide composites with tunable microcages for effective oxyanion adsorption**, RSC Adv. 5 (70) (2015) 57187–57192.
- TENENBAUM, I., CHEFETZ, B., AVISAR, D. Physicochemical behavior of tetracycline and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with wastewater sludge-derived humic substances. **Water Air Soil Pollut.** 225, 1–11. 2014.
- THEISS, F.L.; COUPERTHWAITE, S.J.; AYOKO, G.A.; FROST, R.L. **Colloid Interface Sci.** 417, 2014, p. 356-368.
- TOKIWA, Y.; CALABAIA, B. P.; UGWU, C. U.; AIBA, S. – “Biodegradability of plastics”, **International Journal of Molecular Sciences**, 10, p. 3722-3742 (2009).
- TONGAMP, W.; ZHANG, Q.W.; SAITO, F. **Mater. Sci.** 42. 2007, p. 9210–9215.
- TONGAMP, W.; ZHANG, Q.W.; SAITO, F. **Mechanochemical route for synthesizing nitrate form of layered double hydroxide**. Powder Technol. 185, 2008, p. 43-48
- TRIKERIOTIS, M.; GHANOTAKIS, D. F. **Int. J. Pharm.** 332: 2007, p. 176-184.
- TRONTO, J. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades de hidróxidos duplos lamelares intercalados com polímeros condutores**. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2006a. 207 p.
- TRONTO, J.; BORDONAL, A. C.; NAAL, Z.; VALIM, J. B. Conducting polymers/ layered double hydroxides intercalated nanocomposites. **Mater. Sci. - Adv. Top.** 2013b, p. 3-32.
- USUKI, A.; KOJIMA, Y.; KAWASUMI, M.; OKADA, A.; FUKUSHIMA, Y.; KURAUCHI, T.; KAMIGAITO, O. Synthesis of Nylon 6-Clay Hybrid. **Journal of Materials Research**, 1993, 8 (5), p. 1179-1184.
- VACCARI, A. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. **Catalysis Today**, v. 41, 1998, p. 53-71. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00038-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00038-8)>. Acesso em: 30 Jun. 2016.
- VALERO, M. e GINER, M. J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, 108, p. 1–9. 2006.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clin Microbiol Infect.** 2005 Apr; 11(4):256-80.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J.. **Screening method for antibacterial and antiviral agents from higher plants.** Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London, 1991. p.47.69

VEIGA, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrófilos. **Bol. Fac. Farm. Coimbra**, Coimbra, v. 12, n. 2, p. 17-87, 1988.

VIEIRA, A. C. **Síntese, Caracterização e Aplicação de Hidróxidos Duplos Lamelares.** Ouro Preto, 2009.

VIEIRA, D. C. M.; Takamune, L. F. Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2013;34(4):555-558

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

WANG, C. J. Controlled synthesis and properties of layered double hydroxides. 2012. 228f. **Thesis** (Chemistry-Inorganic) – University of Oxford., USA, 2012.

WANG, J.; ZHOU, J.; LI et al. Magnetic, luminescent Eu-doped Mg-Al layered double hydroxide and its intercalation for ibuprofen. **Chem. Eur. J.**, 16, 2010, p. 14404-14411.

WANG, Y.Z., LUO, S.H., WANG, Z.G., FU, Y. Structural and textural evolution of nanocrystalline Mg–Al layered double hydroxides during mechanical treatment. **Appl. Clay Sci.** 2013, p. 80-81, 334–339.

WEINER, M.L.; KOTKOSKIE, L.S. Excipient Toxicity and Safety. **Series Drug and Pharmaceutical Sciences.** New York: Marcel Dekker Inc., 1999, p. 78.

WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C. **The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro.** Agents Chemother. 28:581-586, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO traditional medicine strategy.** Disponível em:<<http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/index.html>> Acesso em: 01 de novembro, 2018.

WYPYCH, F.; ARIZAGA, G. G. C. Intercalation and functionalization of brucite with carboxylic acids. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, 2005, p. 24-29.

XIONG, W., SUN, Y., ZHANG, T., DING, X., LI, Y., WANG, M., ZENG, Z., 2015. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. **Microb. Ecol.** 70, 425–432.

XU, Z. P.; ZENG, Q. H.; LU et al. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. **Chemical Engineering Science**, 61, 2006, p. 1027-1040.

YANG, J. H.; LEE, S. Y.; HAN, Y. S.; PARK, K. C.; CHOY, J. H. Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid Encapsulated in an Inorganic Nanocapsule. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 24, n. 4, 2003a, p. 499-503.

YANG, Z.; FISCHER, H.; CEREZO et al. Aminobenzoate modified Mg/Al hydrotalcites as a novel smart additive of reinforced concrete for anticorrosion applications. **Construction and Building Materials**, 47, 2013b, p. 1436-1443.

YANGA, Y.; SONGC, W.; LIND, H.; WANGA, W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. **Environment International** (2018)116, 60–73

YIN, H.; CUI, L.; AI et al. Electrochemical determination of bisphenol A at Mg–Al CO<sub>3</sub> layered double hydroxide modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, 55, 2010, p. 603-610.

ZAZO, H; COLINO, C. I; LANA O, J. M. - Current applications of nanoparticles in infectious diseases. **Journal of Controlled Release**. (2016) 86–102.

ZHANG A, G.; XIAOFENG, L.; ZHANG, S.; PAN, B.; LIU, M. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities **European Journal of Medicinal Chemistry** 146 (2018) 599-612.

ZHANG Y.; LI H.; DU N.; SONG S. Hou W\* Betamethasone dipropionate intercalated layered double hydroxide and the composite with liposome for improved water dispersity. **Applied Clay Science**, 143, 2017, p. 336-344.

ZHANG, F.; SONG, Y.; SONG, S.; ZHANG, R.; HOU, W. **ACS Appl. Mater. Interfaces** 7, 2015, p. 7251-7263.

ZHANG, T.; LI, Q.; XIAO et al. Synthesis of li-al layered double hydroxides (ldhs) for efficient fluoride removal. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 51, 2012, p. 11490-11498.

ZHAO, P.; LIU, X.; TIAN, W.; YAN, D.; SUN, X.; LEI, X. Adsorbabilization of 2,4,6 trichlorophenol from aqueous solution by surfactant intercalated ZnAl layered double hydroxides. **Chemical Engineering Journal** 279, 2015, p. 597-604.

ZHONG, L.; HE, X.; QU, J.; LI, X.; LEI, Z.; ZHANG, Q.; LIU, X. **Solid State Chem.** 245, 2017, p. 200-206.

ZOELLNER, M.-I. RICHARD, G.A. CHAHINE, P. ZAUMSEIL, C. REICH, G. CAPELLINI, F. MONTALENTI, A. MARZEGALLI, Y.-H. XIE, T.U. SCHULLI, M. HABERLEN, P. STORCK, T. Imaging structure and composition homogeneity of 300 mm size virtual substrates for advanced cmos applications by scanning X-ray diffraction microscopy, **ACS Appl. Mater. Interf.** 7 (17) (2015) 9031–9037

ZS FERENCZ, M.; SZABADOS, G.; VARGA, Z.; CSENDES, Á.; KUKOVECZ, Z.; KÓNYA, S.; CARLSON, P.; SIPOS, I.; PÁLINKÓ, J. **Solid State Chem.** 233, 2016, p. 236–243.

ZS FERENCZ, M.; SZABADOS, M.; ÁDOK-SIPICZKI, Á.; KUKOVECZ, Z.; KÓNYA, P.; SIPOS, I.; PÁLINKÓ, J. **Mater. Sci.** 49, 2014, p. 8478-8486.